
Z Katedry Chemii Ogólnej Wydz. Rolnego W.S.R. w Lublinie
Kierownik: prof. dr Zenon Wierzchowski

Zenon WIERZCHOWSKI, Andrzej LEONOWICZ,
Kazimierz SAPIECHA i Anna SYKUT

**Studia nad występowaniem alfa i beta-karotenu
w świecie roślinnym. Cz. I. Drzewa**

**Исследования над выступанием альфа и бета каротинов
в растениях. Часть I. Деревья**

**Studies on the Occurrence of Alfa and Beta-Carotenes in Plants.
Part I. Trees**

Od dawna wiadomo, że wszystkie zielone części roślin zawierają karotenoidy, polyenowe barwniki stale towarzyszące chlorofilowi. Są to głównie karoten i ksantofil. Pierwszy z nich odkryty w r. 1831 (Wackenroder) w korzeniu marchwi był uważany przez sto lat za jednolitą substancję. Dopiero dzięki zastosowaniu nowoczesnych metod chromatograficznych można było stwierdzić jego złożoną naturę oraz to, że jest mieszaniną kilku izomerów. Uczynili to R. Kuhn i E. Lederer (10) oraz P. Karrer i współprac. (7), wykrywając w r. 1931 w preparatach z marchwi α karoten obok β formy. Stwierdzili oni, że α izomer często towarzyszy β karotenowi w świecie roślinnym.

β karoten jest w naturze bardzo szeroko rozpowszechniony. Rozliczne prace badawcze poświęcone temu zagadnieniu wykazały to bezspornie, zarówno dla materiału roślinnego, jak i zwierzęcego. Opracowano metody jego wyosobnienia w stanie czystym oraz ilościowego oznaczania. Bardzo wiele prac poświęcono również ogólnie karotenowi jako sumie obu form izomerycznych. Natomiast występowanie drugiego α izomeru jest stosunkowo znacznie mniej zbadane, zwłaszcza pod względem ilościowym i w stosunku do β formy.

W ciągu ćwierćwiecza, jakie minęło od czasu odkrycia α karotenu, ustalili się poglądy, oparte o wyniki nielicznych badań, że jest on dość rozpow-

szechniony w świetle roślinnym. W zielonych liściach zwykle towarzyszy β karotenowi, ale przeważnie w małych ilościach, natomiast w owocach jego koncentracja, zarówno bezwzględna, jak i w stosunku do β formy, jest zwykle większa.

Drzewa

Z prac G. Mackinney'a (12) i H. Strain'a (14) wynika, że z 83 zbadanych gatunków roślin, liście 49 gatunków (ca 60%) zawierały α izomer przeważnie w bardzo małych ilościach. Tylko w 14 przypadkach (35%) zawartość jego wynosiła $7 \div 35\%$ całkowitej frakcji karotenowej, przy czym największy procentowy udział znaleziono tylko u 3 drzew; u cedru balsamicznego (*Libocedrus decurrens*) — 35%, u kasztanowca (*Aesculus hippocastanum*) — 25% i u magnolii (*Magnolia grandiflora*) — 20%. Wykryte różnice w stosunkach α do β izomeru starano się wytłumaczyć fizjologicznie przypuszczając, że obecność lub brak α karotenu jest cechą danego gatunku związaną z jego wymaganiami fizjologicznymi. Tymczasem stwierdzono, że liście kalii, eukaliptusa, mniszka, mięty i katalpy, roślin o bardzo różnym zapotrzebowaniu światła i wody, nie zawierają wcale α karotenu, wobec tego nie można w sposób prosty fizjologicznie wyjaśnić sporadycznego występowania tego izomeru. Natomiast zwraca uwagę fakt, że z 17 gatunków traw, badanych przez Millera (13), Mackinney'a i Straina, tylko jeden zawierał α karoten. Odnośnie wyników tych badań trzeba jednak zaznaczyć, że ci badacze posługiwali się niedokładnymi metodami ilościowego oznaczania karotenów, opartymi bądź na otrzymywaniu krystalicznych preparatów, bądź na ocenie intensywności zabarwień pasm chromatograficznych. Mackinney wyraźnie też zaznacza: „Przy bardziej wysubtelnionej metodzie będzie można prawdopodobnie znaleźć małe ilości karotenu i w liściach, które badane według dotychczasowych metod nie zawierały α karotenu”. Przypuszczenie to zostało już wkrótce potwierdzone pracą dwóch japońskich badaczy z r. 1941; A. Fujita i M. Ajisaka (4), posługując się własną znacznie doskonalszą metodą, opartą o pomiary ekstynkcji rozтворów karotenów, rozdzielonych na kolumnie Ca(OH)_2 , znaleźli w liściach wszystkich zbadanych 21 gatunków jarzyn α karoten w ilościach $1 \div 15\%$ ogólnej zawartości karotenów. Natomiast w owocach zbadanych 38 gatunków procentowy udział α izomeru był przeważnie znacznie większy: $10 \div 65\%$.

W ostatnich latach V. H. Booth (2), stosując najnowsze dokładne metody, znalazł w liściach marchwi pastewnej koncentrację α karotenu

1 ÷ 35 p. p. m., które średnio stanowiły 13% całkowitej zawartości karotenów, natomiast stwierdził zupełny jego brak we wszystkich typach marchwi tak uprawnej, jak i dzikiej o białych korzeniach.

W ciągu naszych badań nad karotenami roślin pastewnych wyłoniło się zagadnienie wzbogacania sian naturalnych w karoteny, ważne dla żywienia zwierząt prowitaminy. Wobec tego poszukując nowych źródeł tych składników postanowiliśmy przebadać liście i igły naszych drzew na ogólną zawartość karotenów. Wyniki tych badań będą ogłoszone później. Spośród nich na szczególną uwagę zasługują dane o zachowaniu się karotenów w stadium jesiennym nekrobiozy. Na ten temat istniały w nauce do ostatnich lat różne poglądy, oparte o sprzeczne nieraz wyniki doświadczalne. Nasze pomiary potwierdziły, na znacznie bogatszym materiale doświadczalnym, wyniki prac P. K a r r e r a i współpr. Nekrobiozę liści u większości drzew cechuje szybki i zupełny zanik karotenów, u kilku jednak gatunków drzew proces ten jest powolniejszy i nie dobiega do końca. Liście całkowicie żółte, a nawet schnące, robinii akacjowej, buku i dębu, zachowują jeszcze znaczne ilości karotenów. Koncentracja ich odpowiada mniej więcej takiej, jaka powinna cechować dobre siana, bogate w te prowitaminowe substancje. W związku z tym postanowiliśmy dokładniej poznać zachowanie się karotenów u tych drzew i przeprowadziliśmy systematyczne badania przebiegu zmian ilościowych obu karotenów w liściach tych drzew podczas całego okresu wegetacji. Ponadto dodatkowo przebadaliśmy sporadycznie, głównie w stadium wegetacji jesiennej, następujące drzewa: brzozę brodawkowatą (*Betula verrucosa*), cis pospolity (*Taxus baccata*), choinę kanadyjską (*Tsuga canadensis*), dagleżję (*Pseudotsuga glauca*), dagleżję zieloną (*Pseudotsuga taxifolia*), grab zwyczajny (*Carpinus betulus*), jałowiec pospolity (*Juniperus communis*), jałowiec wirginiański (*J. virginiana*), jemiolę pospolitą (*Viscum album*), jesion wyniosły (*Fraxinus excelsior*), jodłę pospolitą (*Abies alba*), kasztanowiec zwyczajny (*Aesculus hippocastanum*), kasztanowiec żółty (*Aesculus octandra*), klon zwyczajny (*Acer platanoides*), kosodrzewinę (*Pinus mughus*), leszczynę (*Corylus avellana*), limbę (*Pinus cembra*), lipę drobnolistną (*Tilia cordata*), młorząb (*Ginkgo biloba*), modrzew europejski (*Larix decidua*), sosnę zwyczajną (*Pinus silvestris*), sosnę czarną (*Pinus nigra*), sosnę wejtmutkę (*Pinus strobus*), sosnę Banka (*P. Banksiana*), świerk pospolity (*Picea excelsa*), świerk kłujący (*P. pungens*), świerk srebrny (*P. pungens v. argentea*), topole berlińską (*Populus berolinensis*), wiąz górski (*Ulmus scabra*), wierzbę płaczącą (*Salix elegantissima*).

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Materiały

Wybrano drzewa starsze, okazałe w stanowiskach parkowych. Wiek ich oceniono na podstawie wymiarów piersnicy i wysokości, dla buku 100, dębu 200 i robinii 50 lat. Próbkę liści pobierano rano, zawsze o tej samej porze i z jednej strony drzewa południowo-wschodniej. Z odciętych gałązek, przeniesionych niezwłocznie w stanie świeżym do pracowni, wybierano 100 (50) typowych, przeciętnej wielkości, liści, które służyły jako materiał do analizy. Pomiary wykonywano natychmiast, tylko wyjątkowo przechowywano odważone próbki zalane eterem naftowym w chłodni w temp. -5°C . Przy badaniach sporadycznych postępowano podobnie biorąc bądź próbkę stu liści, bądź kilkudziesięciogramową masę liści przeciętnych. Zwykle przerabiano liście całe wraz z ogonkami, tylko w przypadkach liści złożonych, jak u kasztanowca i robinii, odrzucano osłówną.

Pomiary

Cykl pomiarów dla robinii trwał od 10 maja do 55 listopada 1957 r. dla buku od 30 kwietnia do 27 października 1957 r., a dla dębu od 30 kwietnia do 22 października 1957. Pomiary obejmowały oznaczenia świeżej masy stu liści, % suchej masy, ogólnej zawartości sumy karotenów oraz oddzielnie α i β karotenu. Wykonywano je z początku co 4 ÷ 5 dni, w okresie stabilizacji rozwoju liści co 10 ÷ 15 dni, a w czasie nekrobiozy znów co 2 ÷ 5 dni.

Metody

Sumę karotenów wyrażaną jako β karoten oznaczano metodą przyjętą przez Brytyjskie Stow. Analityków publ. (Society of Public Analysts Method — Carotene panel, 1950, 1952) (1).

Do oznaczania poszczególnych izomerów zastosowano metodę rozdzielania ich na kolumnie chromatograficznej z $\text{Ca}(\text{OH})_2$ według prac P. Karrera i O. Walkera (8). Do analizy brano próbki 0,5—1—2 gramowe w zależności od koncentracji karotenów. Wykonywano zawsze co najmniej po 2 analizy.

Opracowano własny sposób otrzymywania dobrego adsorbenta z technicznego wapna palonego; również na podstawie własnych doświadczeń opracowano szczegółowy tok postępowania chromatograficznego, dostosowany do naszych celów i warunków pracy. Ekstrahowano karoteny w ten sposób, jak w metodzie S.P.A.M., tj. roztworem 50% acetonu w eterze

naftowym, wymywając następnie aceton wodą w aparacie syfonowym. Używano kolumny o wymiarach 10 cm/1 cm. Roztwór karotenów zagęszczano w eksikatorze próżniowym w temp. pokojowej do 1 ml. Rozwijano chromatogram eterem naftowym, stosując ssanie i ciśnienie z góry. Osiągano rozsuniecie pasków barwnych obu karotenów wynoszące 5 ÷ 40 mm. Eluowano tym samym rozpuszczalnikiem. Objętość frakcji α karotenu wynosiła, w zależności od szerokości pasma, 5 ÷ 8 ml. Rozcieńczano ją zwykle do 25 ml. Objętość frakcji α karotenowej wahała się w granicach 15 ÷ 20 ml, — rozcieńczano ją do 25 ÷ 50 ml.

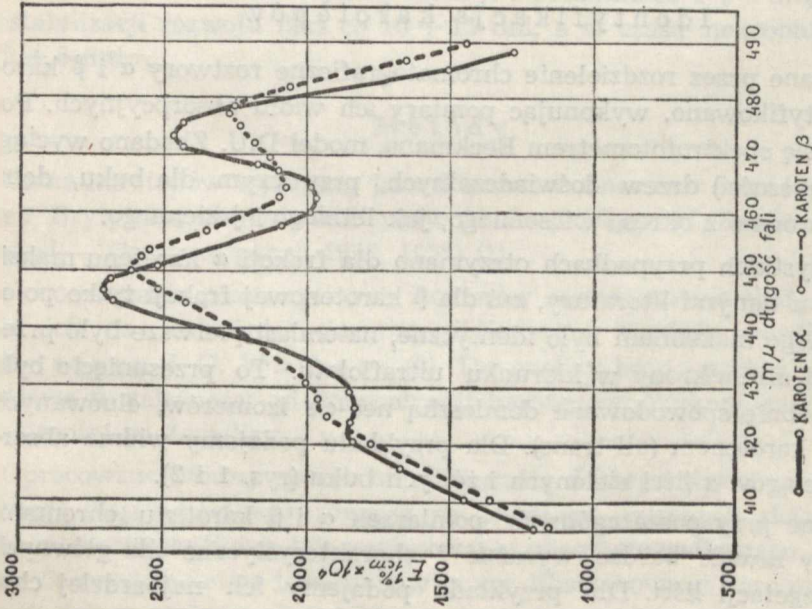
Koncentrację karotenów w otrzymanych eluatach oznaczano przez pomiar ich ekstynkcji na fotometrze wizualnym (Zeiss-Pulfrich) stosując filtr S47. Do obliczeń używano współczynnika opartego na $E 1\% / 1 \text{ cm} = 2340$. Wielkość tę znaleziono doświadczalnie dla danego aparatu przy użyciu roztworów czystego preparatu β karotenu (E. Merck). Był on prawie identyczny ze współczynnikiem, jaki wyznaczyli doświadczalnie A. Fujita, T. Narita i M. Ajisaka (5) w swojej metodzie, posługując się, takimi samymi jak nasze, aparatem i filtrem. Tego samego współczynnika używaliśmy przy obliczaniach zarówno sumy karotenów, jak i poszczególnych izomerów. Zawartość karotenów wyrażaliśmy jako część na milion (p.p.m.) lub w mg⁰/. Obliczano ją zarówno w stosunku do świeżej, jak i suchej masy oraz na 100 liści.

Identyfikacja karotenów

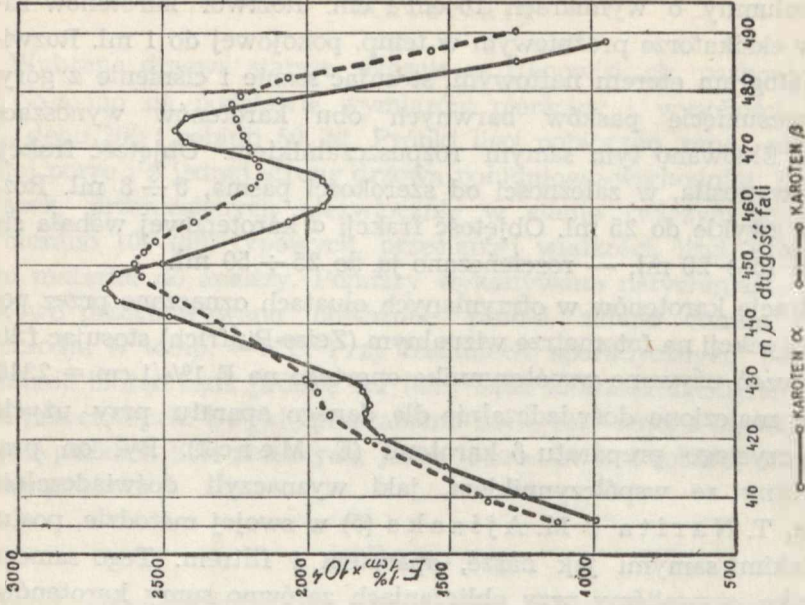
Otrzymane przez rozdzielenie chromatograficzne roztwory α i β karotenu zidentyfikowano, wykonując pomiary ich widm absorpcyjnych. Posługiwano się spektrofotometrem Beckmana, model D.U. Zbadano wyciągi z liści (większości) drzew doświadczalnych, przy czym dla buku, dębu i robinii zarówno z okresu wiosennego, jak letniego i jesiennego.

We wszystkich przypadkach otrzymano dla frakcji α karotenu maksimum zgodne z danymi literatury, zaś dla β karotenowej frakcji tylko położenie drugiego maksimum było identyczne, natomiast pierwsze było przesunięte o 3 milimikrony w kierunku ultrafioletu. To przesunięcie było prawdopodobnie spowodowane domieszką neo-cis izomerów, eluowanych razem z β karotenem (all-trans). Dla przykładu podajemy widma absorpcyjne wyciągów z liści zielonych i żółtych buku (rys. 1 i 2).

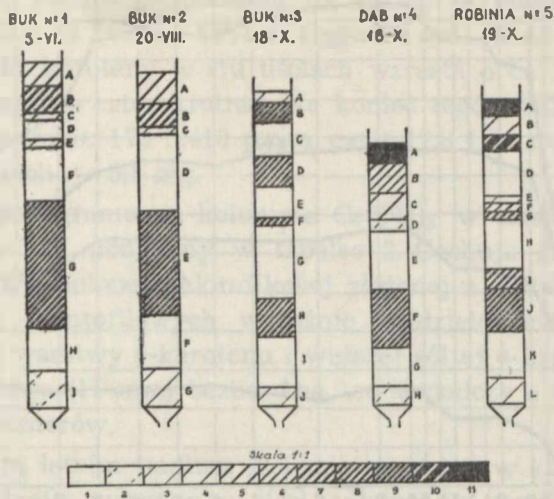
Uzyskane przy poszczególnych pomiarach α i β karotenu chromatogramy były zawsze bardzo wyraźne i charakterystyczne dla głównych stadiów wegetacji liści. Dla przykładu podajemy ich najbardziej charakterystyczne obrazy (rys. 3).



Rys. 1. Widmo absorpcyjne w eterze naftowym. Buk — liście zielone.
The absorption spectrum in light petroleum. Beech — green leaves.



Rys. 2. Widmo absorpcyjne w eterze naftowym. Buk — liście żółte.
The absorption spectrum in light petroleum. Beech — yellow leaves.



Rys. 3. Chromatogramy ekstraktów z liści buku, dębu i robinii. Zabarwienie warstw: 1 — bezbarwne, 2 — jasnożółte, 3 — żółte, 4 — żółtozielone, 5 — jasnozielone, 6 — zielone, 7 — ciemnozielone, 8 — żółtopomarańczowe, 9 — pomarańczowe, 10 — żółtobrunatne, 11 — brunatne.

Adsorbent — $\text{Ca}(\text{OH})_2$; rozwinięcie eterem naftowym.

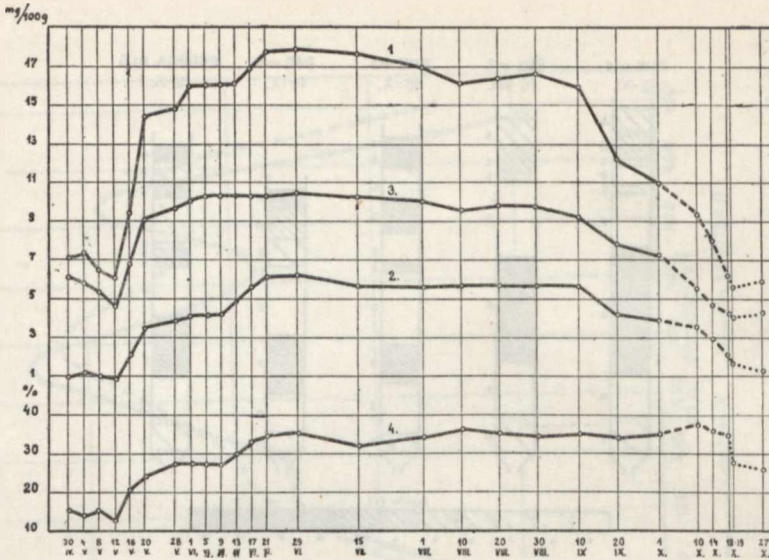
The Chromatograms of the beech, oak, false acacia leaves extracts. Adsorbent — $\text{Ca}(\text{OH})_2$; development with light petroleum. The colour of the zones: 1 — colourless, 2 — pale yellow, 3 — yellow, 4 — yellow-green, 5 — pale green, 6 — green, 7 — dark green, 8 — yellow-orange, 9 — orange, 10 — yellow-brown, 11 — brown.

Wyniki

B u k (*Fagus silvatica*). Wyniki systematycznych pomiarów, prowadzonych od 30 kwietnia do 27 października, zebrano w tabeli 1 i przedstawiono na wykresach (rys. 4 i 5).

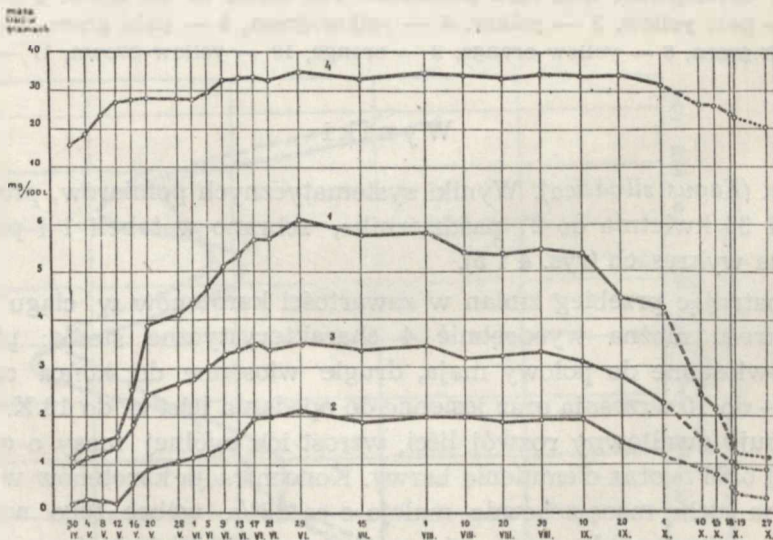
Rozpatrując przebieg zmian w zawartości karotenów w ciągu całego tego okresu można wyodrębnić 4 charakterystyczne stadia: pierwsze wczesnowiosenne do połowy maja, drugie wiosenne do końca czerwca, letnie — do 10 września oraz jesienne do opadania liści tj. do 18.X. Pierwsze cechuje gwałtowny rozwój liści, wzrost ich ogólnej masy o ca 72%, a suchej o 60% oraz ciemnienie barwy. Koncentracja karotenów w przeliczeniu na suchą masę znacznie maleje o ca 28%, wobec tego notujemy tylko stosunkowo wolny przyrost karotenów w 100 liściach, tempo rozwoju liścia jest znacznie szybsze od przyrostu ogólnej zawartości karotenów.

W drugim stadium, kiedy ogólna i sucha masa liści powiększa się już znacznie wolniej (przybytki za 1,5 miesiąca wynoszą tylko ca 27 i 18%), stwierdzamy szybki wzrost koncentracji karotenów zarówno



Rys. 4. Zmiany koncentracji karotenów w liściach buku podczas okresu wegetacji. 1 — koncentracja ogólna karotenów w świeżej masie; 2 — koncentracja α -karotenu w świeżej masie; 3 — koncentracja β -karotenu w świeżej masie; 4 — procent α -karotenu w ogólnej sumie; - - - - żółknięcie liści; opadanie liści.

The variation in the carotenes concentration of beech leaves during the vegetation period. 1 — the total carotenes concentration (wet wt); 2 — the α -carotene concentration (wet wt); 3 — the β -carotene concentration (wet wt); 4 — the carotene content in relation to total pigment; - - - - yellowing of leaves; fall of leaves.



Rys. 5. Zmiany zawartości karotenów w 100 liściach buku podczas okresu wegetacji: 1 — ogólna ilość karotenów; 2 — ilość α -karotenu; 3 — ilość β -karotenu; 4 — masa 100 świeżych liści; - - - - żółknięcie liści; opadanie liści.

The variation in the carotenes content of 100 beech leaves during the vegetation period. 1 — the total carotenes content; 2 — the α -carotene content; 3 — the β -carotene content; 4 — wet weight of 100 leaves; - - - - yellowing of leaves; fall of leaves.

w świeżej masie, jak i w przeliczeniu na suchą; w pierwszej jego części przyrosty są duże: ca 160% i 68% w ciągu 15 dni. Wobec tego i biometryczna wielkość: karoteny w stu liściach wzrasta o ca 170%, a ogólnie powiększa się prawie czterokrotnie. Na koniec tego stadium przypadają maksima koncentracji: 178 i 410 p.p.m. czyli 17,8 i 41 mg⁰/o oraz zawartości w 100 liściach — 6,1 mg.

Obraz chromatogramu na kolumnie Ca(OH)₂ w dokładnych wymiarach np. z dnia 5.VI. podajemy w tabelce 2. Cechuje go występowanie szerokiej warstwy zielonej chlorofilowej złożonej z dwóch części, dwóch warstw żółtych ksantofilowych wyraźnie rozdzielonych oraz szerokiej pomarańczowej warstwy β -karotenu i węższej żółtej α -karotenu. Oddziela je szeroka warstwa (11 mm) bezbarwna, co świadczy o dokładności rozdzielenia obu izomerów.

W następnym letnim stadium (2,5 miesięcznym), w którym występuje stabilizacja ogólnej i suchej masy liści, odbywa się powolny ubytek koncentracji karotenów, a co za tym idzie i wielkości biometrycznej. Ubytki wynosiły tylko 10—9 i 11%.

Obraz chromatogramu ulega pewnej zmianie: zanika całkowicie druga warstwa ksantofilowa.

W ostatnim jesiennym stadium proces żółknięcia liści był poprzedzony gwałtownym spadkiem koncentracji karotenów. W ciągu 20 dni ubyło ich 30%. Samo żółknięcie liści, trwające 18 dni, było połączone z ubytkiem ogólnej ich masy przy zachowaniu prawie tego samego procentu suchej masy oraz z dalszym zanikiem karotenów aż do poziomu 60 p.p.m. (6 mg⁰/o) masy świeżej tj. 14,0 mg⁰/o suchej masy. 100 liści całkowicie żółtych przed opadnięciem zawierało jeszcze 2,4 mg karotenów, a więc prawie tyle samo, co liście zielone w połowie maja. Liście schnące zarówno pozostałe na drzewie, jak i opadłe zachowują prawie niezmienną koncentrację karotenów, wynoszącą 58 p.p.m. (5,8 mg⁰/o) w świeżej masie, a w suchej — 107 p.p.m. (10,7 mg⁰/o).

Obraz chromatogramu ulega charakterystycznej rozbudowie w części górnej (tab. 3), zanika całkowicie warstwa zielona, obok żółtej pojawiają się trzy wyraźnie rozdzielone warstwy pomarańczowe, prawdopodobnie zawierające tak zwane ksantofile jesiennie, które powstają podczas nekrobiozy na koszt karotenoidów liści zielonych (P. K a r r e r 10).

Odnośnie koncentracji każdego izomeru oddzielnie i ich procentowego udziału w ogólnej ilości w liściach buka, należy przede wszystkim podkreślić wysoką procentową zawartość α -karotenu. Stanowiła ona na przełomie wiosny i lata 1/3 część całkowitej ilości karotenów, ustabilizowaną na długi przeciąg wegetacji. Charakterystyczną cechą przebiegu zmian w jego zawartości jest początkowy stały wzrost procentowego

Tab. 1. Buk. Zawartość karotenów w okresie wegetacji.
Beech. Carotenes content during vegetation period.

Data Date	Świeże liście Fresh leaves		Karoteny Carotenes						Uwagi Remarks				
	masa 100 weight g	s. m. dry weight %	mg % w świeżej masie wet weight		mg % w suchej masie dry weight		% α						
			α	β	suma total	α	β	suma total					
30. IV	15,7	23,1	1,1	6,1	7,0	4,8	26,4	30,3	15,7	0,2	1,0	1,1	Wzrost Growth
16. V	27,2	36,6	2,0	6,8	9,4	5,5	18,6	25,7	21,2	0,5	1,9	2,5	
9. VI	32,3	42,2	4,3	10,3	10,1	10,0	24,3	38,1	26,7	1,4	3,3	5,2	
15. VII	32,8	43,8	5,7	10,2	17,6	12,9	23,3	40,2	32,4	1,9	3,4	5,8	Stabilizacja Stabilization
20.VIII	33,0	43,6	5,7	9,8	16,2	13,1	22,5	37,2	35,2	1,9	3,2	5,4	
20. IX	34,0	42,8	4,1	7,8	12,2	9,6	18,2	28,5	33,6	1,5	2,8	4,4	
1. X	31,3	42,6	3,8	7,2	10,9	8,9	16,9	25,6	34,8	1,2	2,2	3,3	Żółknięcie Yellowing
10. X	26,0	42,0	3,4	5,7	9,3	8,1	13,3	22,2	36,6	0,9	1,5	2,4	
14. X	26,0	40,8	2,9	4,7	8,0	7,1	11,5	19,6	36,3	0,8	1,3	2,1	
18. X	23,5	43,2	2,1	4,2	5,9	4,9	9,7	14,0	35,6	0,5	1,0	1,4	
19. X	22,7	49,4	1,6	4,0	5,5	3,2	8,2	11,1	29,0	0,4	0,9	1,2	
27. X	20,0	53,6	1,2	4,2	5,8	2,3	7,8	10,8	20,7	0,2	0,9	1,2	

Tab. 2. Chromatogram liści buka. Naważka 1 g. Rozwinięcie eterem naftowym.
Chromatogram of beech leaves. Developed with light petroleum.

5. VI. 57 r.

Warstwa Zone	Szerokość Depth (mm)	Opis Description	Widmo absorpcyjne. Maxima w eterze naftowym. m μ Absorption spectrum. Maxima in light petroleum. m μ
A	7	Jasno zielona Pale-green	
B	7	Ciemno-zielona Dark-green	
C	2	Żółta Yellow	
D	5	Bezbarwna Colourless	
E	2	Żółta Yellow	
F	14	Bezbarwna Colourless	
G	33	Pomarańczowa Orange	425, 450, 478 β -karoten
H	11	Bezbarwna Colourless	
I	10	Żółta Yellow	423, 446, 473 α -karoten

udziału. W ciągu dwóch pierwszych stadiów rozwojowych liści udział ten wzrasta z 15 do 35% i pozostaje na tym poziomie z małymi wahaniami przez lato i jesień, aż do opadnięcia liści. Dopiero w liściach schnących zanika on szybciej od swego izomeru.

Dąb (*Quercus robur*). Wyniki systematycznych pomiarów, prowadzonych od 30 kwietnia do 22 października, zebrano w tabeli 4 i przedstawiono na wykresach (rys. 6 i 7).

W przebiegu zmian zawartości karotenów w ciągu całego okresu doświadczalnego dadzą się wyodrębnić 3 stadia: pierwsze wiosenne do początku czerwca, drugie letnie do połowy września i jesienne do końca października. W pierwszym odbywa się gwałtowny rozwój liści — ich ogólna masa powiększa się w ciągu miesiąca dwudziestokrotnie, natomiast procent suchej masy na początku zwolna maleje, ubytek mniej

Tab. 3. Chromatogram liści buka. Nawazka 1 g. Rozwinięcie eterem naftowym.
Chromatogram of beech leaves. Developed with light petroleum.

18. X. 57 r.

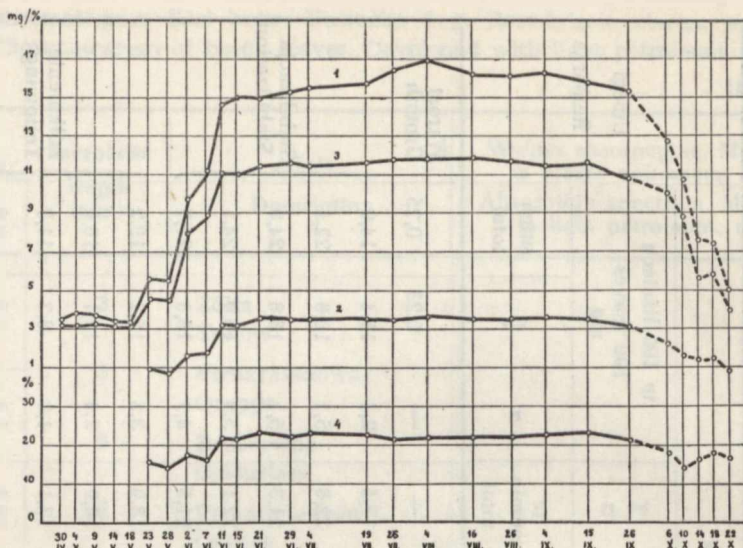
Warstwa Zone	Szerokość Depth (mm)	Opis Description	Widmo absorpcyjne. Maxima w eterze naftowym. m μ Absorption spectrum. Maxima in light petroleum. m μ
A	3	Zółta Yellow	
B	5	Pomarańczowa Orange	
C	9	Bezbarwna Colourless	
D	8	Pomarańczowa Orange	
E	8	Bezbarwna Colourless	
F	2	Pomarańczowa Orange	
G	19	Bezbarwna Colourless	
H	10	Pomarańczowa Orange	425, 451, 478 β -karoten
I	13	Bezbarwna Colourless	
J	5	Zółta Yellow	423, 446, 473 α -karoten

więcej do połowy miesiąca wyniósł ca 34%. W drugiej połowie znów następuje wzrost procentowy suchej masy o ca 60%. Koncentracja karotenów w świeżej masie liści w pierwszej połowie maja utrzymuje się na mniej więcej tym samym poziomie, wobec tego w masie suchej procent karotenów wzrasta dość powoli; dopiero w drugiej połowie maja notujemy nagły skok w górę w przebiegu zmian obu koncentracji. Pierwsza wzrasta potrójnie, a druga prawie podwójnie. Wobec tego i zawartość karotenów w 100 liściach rośnie bardzo szybko, w pierwszej połowie miesiąca powiększa się dziesięciokrotnie, a następnie pięciokrotnie.

Obraz chromatogramu charakterystyczny dla wiosennego stadium np. z dn. 7.VI. (tabela 5), jest zasadniczo podobny do analogicznego dla buka,

Tab. 4. Dąb. Zawartość karotenów w okresie wegetacji.
Oak. Carotenes content during vegetation period.

Data Date	Liście świeże Fresh leaves		Karoteny Carotenes								Uwagi Remarks	
	masa 100 weight g	s. m. dry weight %	mg % w świeżej masie wet weight			mg % w suchej masie dry weight			w 100 liściach 100 leaves mg			
			α	β	suma total	α	β	suma total	α	β		suma total
30. IV	7,3	33,3	—	3,2	3,5	—	9,5	10,5	—	0,23	0,25	Wzrost Growth
2. VI	144	35,0	1,7	7,9	9,7	4,9	22,6	27,7	17,5	11,4	14,0	Stabilizacja Stabilization
4. VII	145	39,4	3,5	11,4	15,5	8,8	28,9	39,3	22,6	16,6	22,5	
4. VIII	142	39,4	3,6	11,8	16,9	9,1	30,0	42,9	21,3	16,8	24,0	Żółknięcie Yellowing
4. IX	148	39,8	3,6	11,4	16,3	8,9	28,6	41,0	22,1	16,9	24,1	
26. IX	151	38,9	3,1	10,8	14,4	8,0	27,8	37,0	21,5	16,3	21,7	Żółknięcie Yellowing
6. X	150	42,6	2,3	10,1	12,8	5,3	23,7	30,0	18,0	15,2	19,2	
10. X	150	42,6	1,6	8,8	10,7	3,8	20,7	25,1	14,9	13,1	16,0	Żółknięcie Yellowing
14. X	149	43,6	1,3	5,6	7,6	2,9	12,8	17,4	17,1	8,3	11,3	
18. X	130	40,0	1,3	5,9	7,4	3,1	14,8	18,5	17,6	1,7	9,6	Żółknięcie Yellowing
22. X	100	56,6	0,8	3,9	4,9	1,4	6,9	8,7	16,3	0,8	4,9	



Rys. 6. Zmiany koncentracji karotenów w liściach dębu podczas okresu wegetacji. 1 — ogólna koncentracja karotenów w świeżej masie; 2 koncentracja α -karotenu w świeżej masie; 3 — koncentracja β -karotenu w świeżej masie; 4 — procent α -karotenu w ogólnej sumie; - - - - żółknienie liści.

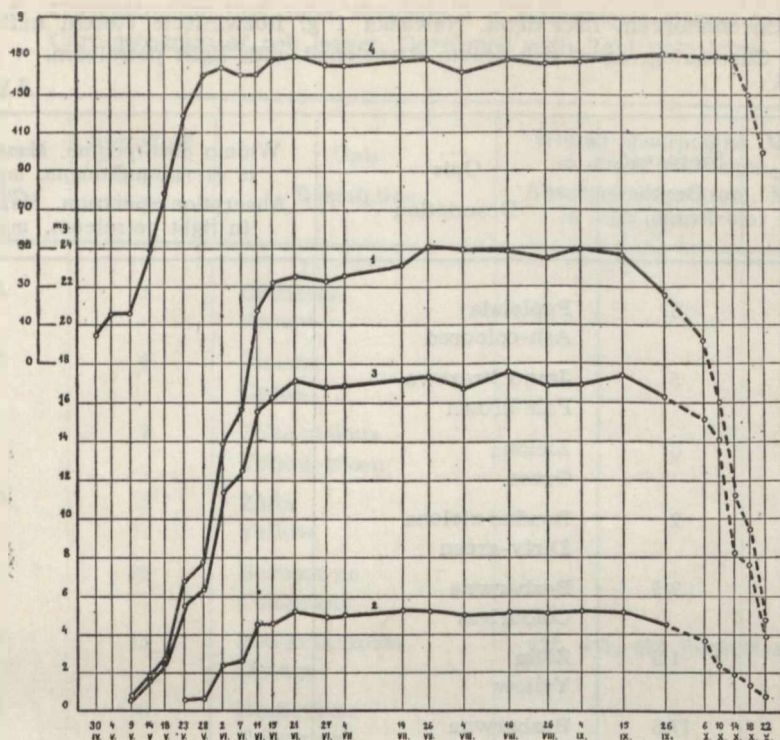
The variation in the carotenes concentration of oak leaves during the vegetation period. 1 — the total carotenes concentration (wet wt); 2 — the α -carotene concentration (wet wt); 3 — the β -carotene concentration (wet wt); 4 — the α -carotene content in relation to total pigment; - - - - yellowing of leaves.

różni się tylko wystąpieniem na czelu kolumny warstwy popielato-brązowej i jednej tylko warstwy ksantofilowej.

W drugim stadium, w którym zarówno masa liści, jak i ich zawartość wody są ustabilizowane, również koncentracje karotenów i ich bezwzględne ilości dość szybko w ciągu czerwca wyrównują swoje poziomy, by w końcu znowa osiągnąć maksymalne wartości na początku sierpnia. Oto one: koncentracja w świeżej masie — 169 p.p.m. (16,9 mg⁰/o), koncentracja w suchej masie 429 p.p.m. (42,9 mg⁰/o) i 24 mg w 100 liściach. Te maksymalne zawartości utrzymują się prawie do końca stadium letniego.

Charakterystyczny dla tego letniego stadium chromatogram np. z dn. 26.VIII. różni się od wiosennego obrazu tylko zmianą barwy warstwy czołowej na brunatną.

Stadium jesienne od razu rozpoczyna się powolnym żółknieniem liści i co za tym idzie, spadkiem koncentracji karotenów. W ciągu miesiąca strata wynosiła ca 53%, a w przeliczeniu na suchą masę niespełna 60%. Mimo to, tak w liściach całkowicie żółtych, jak i brązowych, zbieranych



Rys. 7. Zmiany zawartości karotenów w 100 liściach dębu podczas okresu wegetacji. 1 — ogólna ilość karotenów; 2 — ilość α -karotenu; 3 — ilość β -karotenu; 4 — masa 100 świeżych liści. - - - - żółknięcie liści, opadanie liści.

The variation in the carotenes content of 100 oak leaves during the vegetation period. 1 — the total carotenes content, 2 — the α -carotene content; 3 — the β -carotene content; 4 — wet weight of 100 leaves. - - - - yellowing of leaves, fall of leaves.

z drzewa 18 i 22 października znaleziono jeszcze wcale wysoką koncentrację karotenów wynoszącą 74 i 49 p.p.m. (7,4 i 4,9 mg⁰/o), a w przeliczeniu na suchą masę 185 i 87 p.p.m. (18,5 i 8,7 mg⁰/o). Sto liści żółtych zawierało jeszcze ca 10 mg karotenów, a więc tyle, co sto liści zielonych w końcu maja. W chromatogramie jesiennym, nawet z końca października (tab. 6), występują warstwy brunatne i zielone jak w poprzednich. natomiast warstwy ksantofilowe rozszerzają się, łącząc się z resztkami chlorofilu. Brak pomarańczowych warstw ksantofili jesiennych.

Zmiany procentowego udziału α -karotenu w ogólnej ilości karotenów u dębu przebiegały podobnie jak u buka. Udział ten ustalony z końcem wiosny na poziomie 22 ÷ 23% utrzymywał się z małymi wahaniami aż

Tab. 5. Chromatogram liści dębu. Naważka 1 g. Rozwinięcie eterem naftowym.
Chromatogram of oak leaves. Developed with light petroleum.

7.VI.57 r.

Warstwa Zone	Szerokość Depth (mm)	Opis Description	Widmo absorpcyjne. Maxima w eterze naftowym. m μ Absorption spectrum. Maxima in light petroleum. m μ
A	3	Popielata Ash-coloured	
B	5	Jasno brązowa Pale-brown	
C	6	Zielona Green	
D	2	Brudno-zielona Dirty-green	
E	2,5	Bezbarwna Colourless	
F	1,5	Żółta Yellow	
G	17,5	Bezbarwna Colourless	
H	12	Pomarańczowa Orange	422, 451, 476 β -karoten
I	7	Bezbarwna Colourless	
J	5,5	Żółta Yellow	423, 446, 473 α -karoten

do początku nekrobiozy, tj. do 6-go października. Dopiero następnie wystąpiło pewne obniżenie do 16%. Różnice zaznaczyły się w pierwszym stadium wiosennym. W ciągu 20 dni maja można było wykazać tylko ślady α -karotenu w badanych próbkach liści, jako nikły pasek bladżółty w dole kolumny chromatograficznej. Dopiero w liściach już prawie całkowicie wyrosniętych znaleziono większe, dające się oznaczyć, ilości α -karotenu. Stanowiły one ca 15% sumy karotenów. W ciągu następnych 20 dni koncentracja α -karotenu wzrastała szybciej niż β -formy tak, że 11 czerwca stanowiła ona ca 22% ogólnej zawartości.

Robinia akacyjowa (*Robinia pseudacacia*). Systematyczne pomiary prowadzono od 10 maja, kiedy jeszcze liście były w pąkach, do

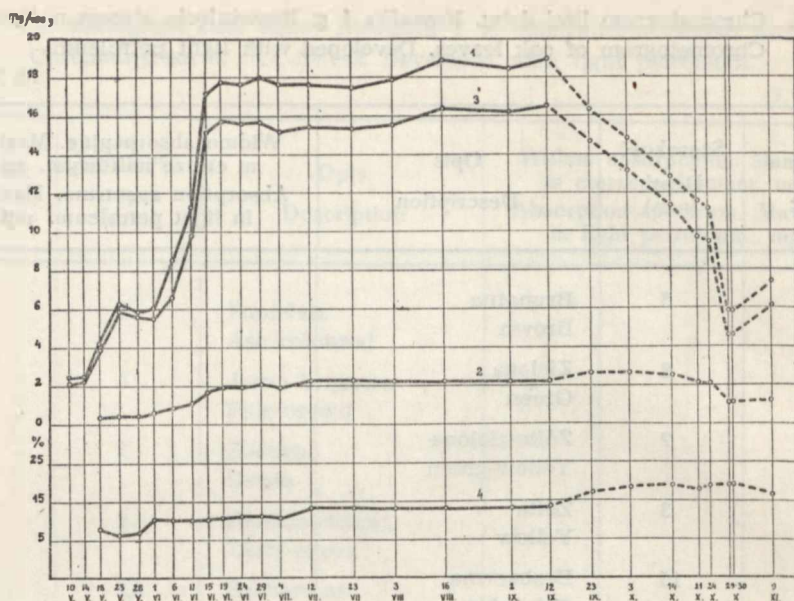
Tab. 6. Chromatogram liści dębu. Naważka 1 g. Rozwinięcie eterem naftowym.
Chromatogram of oak leaves. Developed with light petroleum

18. X. 57 r.

Warstwa Zone	Szerokość Depth (mm)	Opis Description	Widmo absorpcyjne. Maxima w eterze naftowym. m μ Absorption spectrum. Maxima in light petroleum. m μ
A	5	Brunatna Brown	
B	8	Zielona Green	
C	7	Żółto-zielona Yellow-green	
D	3	Żółta Yellow	
E	15	Bezbarwna Colourless	
F	15	Pomarańczowa Orange	422, 451, 476 β -karoten
G	10	Bezbarwna Colourless	
H	5	Żółta (blada) Pale-Yellow	423, 446, 473 α -karoten

30 października, tj. do chwili ich masowego opadania. Zbadano także liście opadłe. Wyniki podane w tabeli 7 ujęto i graficznie w odnośne krzywe (rys. 8 i 9).

W ciągu trzech zasadniczych stadiów wegetacyjnych liści robinii obraz zmian zawartości karotenów bardzo się różnił od obrazów u drzew poprzednich. W pierwszym stadium wiosennym, trwającym do 19 czerwca, odbył się bardzo szybki rozwój i wzrost liści. Ich masa powiększyła się szesnastokrotnie, lecz koncentracja wody zmniejszyła się nieznacznie (78,3%—73,2%). Towarzyszył temu również bardzo szybki wzrost koncentracji karotenów. Powiększenie było prawie 7,5-krotne (na suchą masę ca 6,5-krotne). W stu liściach zawartość ogólna skoczyła z 0,1 mg na 12,8 mg, tj. wzrost był prawie 130-krotny. Pod koniec 11 czerwca robinia zakwitła. W stadium letnim do 12 września notujemy ciągły wzrost masy liści z 77,8 g do 116 g, tj. o 49%. Towarzyszył temu również znaczny wzrost koncentracji suchej masy o 37%. Ale koncentracja karo-

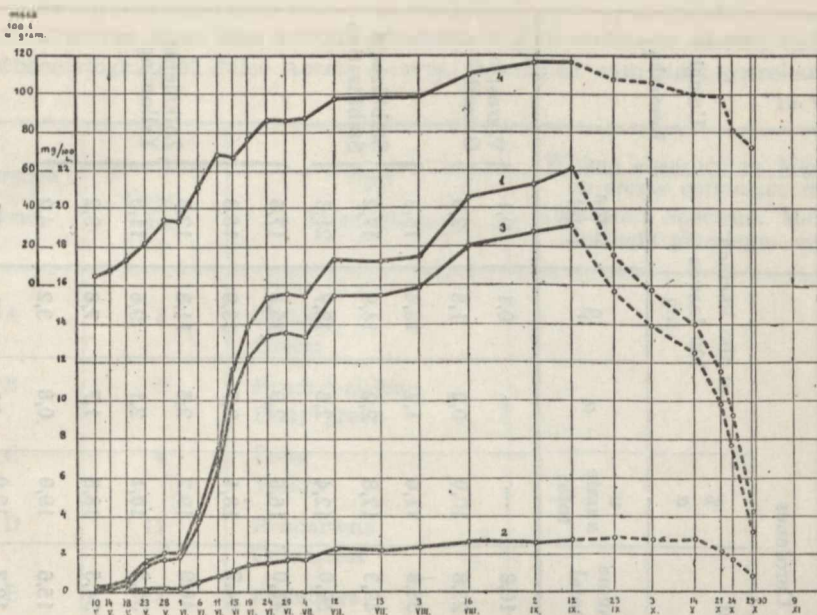


Rys. 8. Zmiany koncentracji karotenów w liściach robinii akacjowej podczas okresu wegetacji. 1 — ogólna koncentracja karotenów w świeżej masie; 2 — koncentracja α -karotenu w świeżej masie; 3 — koncentracja β -karotenu w świeżej masie; 4 — procent α -karotenu w ogólnej sumie; - - - - żółknięcie liści.

The variation in the carotenes concentration of false acacia leaves during the vegetation period. 1 — the total carotenes concentration (wet wt); 2 — the α -carotene concentration (wet wt); 3 — the β -carotene concentration (wet wt); 4 — the α -carotene content in relation to total pigment; - - - - yellowing of leaves.

tenów w liściach była przez 2/3 okresu ustabilizowana na poziomie ca 180 p.p.m. Wobec tego notujemy znaczny spadek o 22% ich koncentracji w przeliczeniu na suchą masę. Na koniec tego stadium przypadły więc maksima masy liścia (sto liści — 116 g), ich zawartości karotenów 22,1 mg oraz ich koncentracji 189 p.p.m. (18,9 mg%).

W stadium jesiennym, trwającym 1,5 miesiąca, odbywał się stały zanik masy liści, połączony z jaśnieniem ich barwy i żółknięciem oraz wzrostem koncentracji wody. Ubytek wyniósł ca 38%. Koncentracja karotenów szybko zmniejszała się, aż do poziomu 58 p.p.m. Strata wyniosła 69%. W stu liściach żółtych pozostało jednak jeszcze 4,2 mg karotenów, a więc tyle, ile zawierały liście wiosenne w początkach czerwca. W liściach opadłych i zebranych z ziemi, koloru żółtego i brązowego, już schnących (% suchej masy 73,9), stwierdzono jeszcze stosunkowo dużą koncentrację karotenów, bo wynoszącą ca 100 p.p.m. w suchej masie, podczas gdy liście zebrane z drzewa 29 października zawierały 156 p.p.m.



Rys. 9. Zmiany zawartości karotenów w 100 liściach robinii akacjowej podczas okresu wegetacji. 1 — ogólna ilość karotenów; 2 — ilość α -karotenu; 3 — ilość β -karotenu; 4 — masa 100 świeżych liści; ---- żółknięcie liści.

The variation in the carotenes content of 100 false acacia leaves during the vegetation period. 1 — the total carotenes content; 2 — the α -carotene content; 3 — the β -carotene content; 4 — wet weight of 100 leaves; ---- yellowing of leaves.

Z chromatogramów, odpowiadających poszczególnym pomiarom, wybrano trzy charakterystyczne dla 3 stadiów wegetacji — dają one obraz bardziej urozmaicony w porównaniu z poprzednio omówionymi. W pierwszych dwóch, z dn. 15 czerwca i 3 sierpnia (tabele 8 i 9), występują warstwy fioletowe, wyraźnie oddzielone od warstw żółtych ksantofili i od pomarańczowej β -karotenowej. W stadium letnim wydzieli się jeszcze poniżej fioletu pasmo pomarańczowe. W stadium nekrobiozy, np. w dn. 14.X., warstwy zielone zanikają, natomiast występują nowe warstwy żółte, żółto-brązowe i pomarańczowo-żółte. Warstwy karotenowe pozostają bez zmiany (tabela 10).

Udział α -karotenu w ogólnym bilansie karotenowym u robinii był najniższy z trzech badanych drzew, bo wynosił w lecie przeciętnie 12%. W stadium wiosennym pierwsze dwa pomiary nie dały wyników ilościowych, wykazały tylko jego obecność w postaci nikłego paska o lekko żółtawym zabarwieniu. Dopiero trzeci pomiar wykazał 3,5 p.p.m. w świeżej masie liści. Z początku koncentracja α -karotenu wzrasta wolno, od początku czerwca szybciej, osiągając 10% udział w sumie karotenów.

Tab. 7. Robinia akacyjowa. Zawartość karotenów w okresie wegetacji.
False Acacia. Carotenes content during vegetation period.

Data Date	Liście świeże Fresh leaves		Karoteny — Carotenes								Uwagi Remarks			
	masa 100 weight g	s. m. dry weight %	mg % w świeżej masie wet weight				mg % w suchej masie dry weight					w 100 liściach 100 leaves mg		
			α	β	suma total	α	β	suma total	% α	α		β	suma total	
10. V	4,8	21,7	—	2,1	2,4	9,5	10,8	—	—	0,1	0,1	0,1	Wzrost Growth	
1. VI	33,4	25,2	0,6	5,4	6,0	21,3	23,8	10,0	0,2	1,8	2,0	2,0	Stabilizacja Stabilization	
24. VI	86,4	30,1	1,95	15,5	17,7	51,5	58,8	11,0	1,7	13,4	15,3	15,3	Stabilizacja Stabilization	
23. VII	99,0	35,0	2,2	15,3	17,3	43,7	49,3	12,8	2,2	14,9	17,2	17,2	Stabilizacja Stabilization	
2. IX	116	36,8	2,3	16,2	18,4	43,9	50,0	12,4	2,6	18,7	21,3	21,3	Stabilizacja Stabilization	
23. IX	108	34,0	2,7	14,7	16,3	43,2	48,0	16,6	2,9	15,8	17,6	17,6	Stabilizacja Stabilization	
3. X	106	33,0	2,7	13,1	14,9	39,3	44,7	18,1	2,7	13,9	15,8	15,8	Stabilizacja Stabilization	
14. X	100	31,2	2,5	11,3	12,7	36,3	40,9	19,2	2,5	11,3	12,8	12,8	Zółknienie Yellowing	
21. X	99,0	32,5	2,1	9,7	11,6	29,8	35,5	18,1	2,1	9,6	11,5	11,5	Zółknienie Yellowing	
24. X	82,0	32,5	2,1	9,5	11,2	28,9	34,5	18,8	1,7	7,8	9,2	9,2	Zółknienie Yellowing	
29. X	72,0	37,3	1,1	4,6	5,8	11,8	15,6	19,0	0,8	3,2	4,2	4,2	Zółknienie Yellowing	
30. X	—	55,6	1,1	4,6	5,8	8,3	10,7	19,0	—	—	—	—	Zółknienie Yellowing	
5. XI	—	73,9	1,2	6,1	7,3	8,3	9,9	16,5	—	—	—	—	Zółknienie Yellowing	

Tab. 8. Chromatogram liści robinii. Naważka 1 g. Rozwinięcie eterem naftowym.
Chromatogram of False Acacia Leaves. Developed with light petroleum.

15. VI. 57 r.

Warstwa Zone	Szerokość Depth (mm)	Opis Description	Widmo absorpcyjne. Maxima w eterze naftowym. m μ Absorption Spectrum. Maxima in light petroleum. m μ
A	8	Zielona Green	
B	5	Brudno-zielona Dirty-green	
C	4	Żółta Yellow	
D	11	Bezbarwna Colourless	
E	2	Fioletowa Violet	
F	20	Bezbarwna Colourless	
G	18	Pomarańczowa Orange	425, 451, 478 β -karoten
H	21	Bezbarwna Colourless	
J	6	Żółta Yellow	423, 446, 473 α -karoten

W następnym stadium przy ogólnej stabilizacji zawartości karotenów, udział α -izomeru ustala się na poziomie ca 12%. W stadium nekrobiozy α -karoten zanikał powolniej niż β -izomer, wskutek czego jego procentowy udział wzrósł do 18 ÷ 19%. A więc i pod tym względem obraz zmian karotenowych u robinii był inny niż u buka i dębu.

Drzewa badane sporadycznie. Z 31 przebadanych gatunków drzew parkowych i leśnych, 17 było iglastych, reszta (14) — liściaste. Te ostatnie oraz modrzew badano przeważnie w okresie jesiennym, biorąc próbki liści zielonych, żółkniejących i żółtych. Wyniki pomiarów zestawiono w tabeli 11. Przy ich rozpatrywaniu, przede wszystkim, zwraca uwagę niespodziewanie bogate występowanie α -karotenu. Koncentracja jego w świeżej masie liści zielonych u większości badanych drzew była zawarta w granicach: 2 ÷ 9,1 mg⁰%, a procentowy udział w sumie

Tab. 9. Chromatogram liści robinii. Naważka 1 g. Rozwinięcie eterem naftowym.
 Chromatogram of False Acacia Leaves. Developed with light petroleum.

3. VIII. 57 r.

Warstwa Zone	Szerokość Depth (mm)	Opis Description	Widmo absorpcyjne. Maxima w eterze naftowym. m μ . Absorption spectrum. Maxima in light petroleum. m μ
A	8	Zielona Green	
B	3	Brudno-zielona Dirty-green	
C	5	Zółta Yellow	
D	12	Bezbarwna Colourless	
E	2	Fioletowa Violet	
F	4	Bezbarwna Colourless	
G	2	Pomarańczowa Orange	
H	23	Bezbarwna Colourless	
I	4	Zółto-pomarańczowa Yellow-orange	
J	12	Pomarańczowa Orange	425, 453, 478 β -karoten
K	14	Bezbarwna Colourless	
L	6	Zółta Yellow	423, 446, 473 α -karoten

karotenów był stosunkowo bardzo wysoki, bo przeważnie wynosił $20 \div 52\%$. Tylko u 7 gatunków znaleziono drobne ilości $4 \div 17\%$ w stosunku do β -karotenu. Szczególnie bogatym źródłem α -karotenu okazały się liście kasztanowca, klonu, miłorzębu i igły modrzewia, sosny i świerku. Znalezione w nich ilości tego izomeru stanowiły prawie połowę ogólnej zawartości karotenów ($41 \div 52,4\%$). A więc wyżej wymienione drzewa są bogatsze w ten barwik od czerwonego oleju palmowego, który

Tab. 10. Chromatogram liści robinii. Naważka 1 g. Rozwinięcie eterem naftowym.
Chromatogram of False Acacia Leaves. Developed with light petroleum.

14. X. 57 r.

Warstwa Zone	Szerokość Depth (mm)	Opis Description	Widmo absorpcyjne. Maxima w eterze naftowym. m μ Absorption spectrum. Maxima in light petroleum. m μ
A	4	Brązowa Brown	
B	5	Żółto-zielona Yellow-green	
C	4	Żółto-brązowa Yellow-brown	
D	12	Bezbarwna Colourless	
E	2	Żółta Yellow	
F	2	Zielona Green	
G	2	Żółto-pomarańczowa Yellow-orange	
H	18	Bezbarwna Colourless	
I	5	Żółto-pomarańczowa Yellow-orange	
J	12	Pomarańczowa Orange	425, 453, 477 β -karoten
K	14	Bezbarwna Colourless	
L	6	Żółta Yellow	423, 446, 473 α -karoten

dotychczas jest uważany za najbogatsze jego źródło (ca 40% sumy karotenów). Tabl. 11 — str. 179, 180, 181, 182.

W okresie nekrobiozy u wszystkich badanych drzew stwierdzono szybki zanik karotenów w porównaniu z bukiem, dębem i robinią — w ich liściach żółtych znaleziono tylko ułamki mg⁰% karotenów, a w schnących — tylko ślady niedające się oznaczyć ilościowo, podczas gdy u trzech drzew wspomnianych koncentracja karotenów w liściach żółtych i schnących pozostawała na poziomie 5 ÷ 11 mg⁰%. α -karoten przeważnie zanikał

Tab. 12. Chromatogram zielonych (a) i żółkniejących (b) liści wierzby.

Naważka 1 i 5 g. Rozwinięcie eterem naftowym.

Chromatogram of green (a) and yellowing (b) willow leaves.

Developed with light petroleum.

10. X. 57 r.

Warstwa Zone		Szerokość Depth (mm)		Opis Description		Widmo absorpcyjne Maxima w eterze naftowym. Absorption spectrum. Maxima in light pe- troleum. m μ
a	b	a	b	a	b	
A	A	6	3	Zielona Green	Zielona Green	
B	B	4	5	Brazowa Brown	Brazowa Brown	
C	C	4	3	Żółta Yellow	Żółta Yellow	
D	D	12	4	Bezbarwna Colourless	Czerwona Red	
E	E	2	16	Czerwono-fiolet. Red-violet	Bezbarwna Colourless	
F	F	25	2	Bezbarwna Colourless	Buraczkowa Beet-red	
G	G	15	5	Pomarańczowa Orange	Bezbarwna Colourless	(a) 425, 451, 478 β -ka- roten
H	H	16	2	Bezbarwna Colourless	Fioletowa Violet	
I	I	5	15	Żółta Yellow	Bezbarwna Colourless	(a) 423, 446, 473 α -ka- roten
—	J	—	10		Pomarańczowa Orange	(b) 425, 451, 478 β -ka- roten
—	K	—	16		Bezbarwna Colourless	
—	L	—	5		Żółta Yellow	(b) 423, 446, 473 α -ka- roten

szybciej od swego izomeru, bo tylko u morwy, grabu i miłorzębu jego procentowy udział pozostawał do końca prawie niezmienny w porównaniu ze stadium stabilizacji letniej.

Obrazy rozwiniętych chromatogramów dla liści zielonych i żółtych są porównawczo bardzo charakterystyczne — zestawiamy kilka z nich poniżej przykładowo w tabelach 12, 13, 14. W liściach zielonych wierzby i lipy w stadium nekrobiozy jesiennej, kiedy na drzewie występują także

Tab. 13. Chromatogram zielonych (a) i żółtych (b) liści lipy. Naważka 1 i 4 g.
Rozwinięcie eterem naftowym.
Chromatogram of green (a) and yellow (b) lime-tree leaves.
Developed with light petroleum

17. IX. 57 r.

Warstwa Zone		Szerokość Depth (mm)		Opis Description		Widmo absorpcyjne Maxima w eterze naftowym. Absorption spectrum. Maxima in light pe- troleum. $m\mu$
a	b	a	b	a	b	
A	A	5	3	Zielona Green	Zielona Green	
B	B	3	4	Brazowa Brown	Brazowa Brown	
C	C	3	4	Żółto-zielona Yellow-green	Żółta Yellow	
D	D	15	14	Bezbarwna Colourless	Bezbarwna Colourless	
E	E	2	2	Czerwono-poma- rańczowa Red-orange	Czerwona Red	
F	F	7	2	Bezbarwna Colourless	Żółta Yellow	
G	G	2	2	Żółta Yellow	Buraczkowa Beet-red	
H	H	20	10	Bezbarwna Colourless	Bezbarwna Colourless	
I	I	18	2	Pomarańczowa Orange	Fioletowa Violet	(a) 425, 451, 478 β -ka- roten
J	J	25	12	Bezbarwna Colourless	Żółta Yellow	
K	K	5	10	Żółta Yellow	Bezbarwna Colourless	(a) 423, 446, 473 α -ka- roten
—	L	—	10		Pomarańczowa Orange	(b) 425, 451, 478 β -ka- roten
—	M	—	20		Bezbarwna Colourless	
—	N	—	5		Żółta Yellow	(b) 423, 446, 473 α -ka- roten

liście żółknijące, pojawiają się już ksantofile jesienne w wyniku rozkładu karotenoidów normalnych liści letnich. Na chromatogramie wierzby z dnia 10.X. widzimy nowe pasmo czerwono-fioletowe obok normalnego

Tab. 14. Chromatogram zielonych (a) i żółtych (b) liści młórząbu.
 Naważka 1 i 4 g. Rozwinięcie eterem naftowym.
 Chromatogram of green (a) and yellow (b) maidenhair-tree leaves.
 Developed with light petroleum.

15. X. 57 r.

Warstwa Zone		Szerokość Depth (mm)		Opis Description		Widmo absorpcyjne Maxima w eterze naftowym. Absorption spectrum. Maxima in light pe- troleum. m μ
a	b	a	b	a	b	
A	A	2	3	Brazowa Brown	Brazowa Brown	
B	B	2	3	Zielona Green	Żółto-brazowa Yellow-brown	
C	C	6	2	Żółta Yellow	Żółta Yellow	
D	D	20	20	Bezbarwna Colourless	Bezbarwna Colourless	
E	E	1	2	Pomarańczowa Orange	Pomarańczowa Orange	
F	F	5	2	Żółto-zielona Yellow-green	Buraczkowa Beet-red	
G	G	25	5	Bezbarwna Colourless	Bezbarwna Colourless	
H	H	18	2	Pomarańczowa Orange	Buraczkowa Beet-red	(a) 425, 451, 478 β -ka- roten
I	I	22	2	Bezbarwna Colourless	Fioletowa Violet	
J	J	6	2	Żółta Yellow	Żółta Yellow	(a) 423, 446, 473 α -ka- roten
—	K	—	20		Bezbarwna Colourless	
—	L	—	8		Pomarańczowa Orange	(b) 423, 451, 478 β -ka- roten
—	M	—	15		Bezbarwna Colourless	
—	N	—	5		Blado-żółta Pale-yellow	(b) 423, 446, 473 α -ka- roten

żółtego w górnej jego połowie. W liściach zaś żółkniejących z tego samego dnia pojawiają się dalsze produkty rozkładu, na chromatogramie występują nowe warstwy czerwone i buraczkowe. Podobnie wyglądają chromatogramy lipy — na pierwszym odpowiadającym liściom zielonym z dn. 17.IX już występuje pasmo czerwopomarańczowe, a na drugim

otrzymanym z liści pożółkłych, widzimy szereg nowych warstw zabarwionych buraczkowo, fioletowo i żółto.

U miłorzębu na chromatogramie z liści całkiem żółtych występuje jeszcze więcej pasm barwnych (5) w porównaniu z chromatogramem liści zielonych.

DYSKUSJA I WNIOSKI

Ogólny obraz zmian zawartości karotenów podczas całego okresu wegetacyjnego badanych drzew odpowiada w zasadzie przebiegom tych zmian, ustalonym przez wielu badaczy dla roślin jedno- i dwuletnich, rosnących w różnych warunkach klimatycznych (T. W. Goodwin — 6). Na okres rozwoju i wzrostu przypada szybkie gromadzenie się karotenów, okres zaś dojrzałości jest połączony z ich ubytkiem większym lub mniejszym, szybszym lub powolniejszym, zależnie od gatunku roślin i ich warunków uprawowych i klimatycznych. W szczególności występują różnice, zwłaszcza w stadium letniej stabilizacji, co jest zrozumiałe z uwagi na całkiem odmienny charakter wegetacji drzew. Tylko u buka występował w okresie dojrzałości liści stały, choć powolny ubytek karotenów, u dębu i robinii notujemy w tym okresie utrzymywanie się koncentracji karotenów na tym samym poziomie, z tym, że u robinii zawartość w 100 liściach wciąż rośnie, aż do jesieni.

Systematyczne badania ilościowych zmian zawartości chlorofilu, karotenu i ksantofilu w liściach przeprowadzili na 2 gatunkach drzew (wierzba — *Salix fragilis* i białodrzew — *Populus alba*) N. T. Deleano i J. Dick (3) podczas całego okresu wegetacji. Ich sposób pobierania próbek i obliczeń był bardzo podobny do naszej metodyki. Natomiast posługiwali się oni własną metodą oznaczania karotenu, która w świetle dzisiejszego stanu badań w tej dziedzinie okazuje się bardzo niedokładną. Wyosobniano i oczyszczano karoten tylko na drodze rozdziału fazowego, a samo oznaczenie polegało na utlenianiu dwuchromianem bocznego łańcucha i jodometrycznym oznaczaniu ilości zużytego utleniacza. Niedokładne rozdzielanie barwników liści musiało się odbić na rzetelności otrzymanych wyników, zwłaszcza w stadium nekrobiozy. Przebieg ilościowych zmian trzech barwników liści, według ich pomiarów, przedstawiał się następująco: w okresie 40 względnie 70 dni rozwoju i wzrostu liści odbywało się gromadzenie barwników w regularnych przyrostach. W następnym okresie letnio-jesiennym zawartości karotenu i ksantofilu pozostają niezmienione, aż do końca nekrobiozy, podczas której tylko chlorofil szybko zanika. Autorzy na podstawie tych wyników doszli do przekonania, że wyjaśnili ostatecznie zagadnienie zachowania się karotenów w nekrobiotycznym okresie wobec sprzecznych wyników poprzednich

badaczy. Tymczasem już w świetle badań P. K a r r e r a i jego współpracowników (9) wyniki powyższe okazują się mylne. Źródło błędów tkwi w niedokładności rozdzielania fazowego barwników żółkniejących liści, jeśli chodzi o ilościowe oznaczenie karotenu czy ksantofilu. Na podstawie przebadania preparatywnego dużych kilogramowych próbek liści zielonych, żółkniejących i żółtych, znajdujących się jednocześnie na drzewach kasztanowca, klonu i wiązu, przy czym do rozdzielania i oczyszczania barwników używano metody chromatografii kolumnowej, szwajcarscy badacze stwierdzili, że w postępującym obumieraniu liści, karoteny i ksantofile zanikają — pierwsze wyraźnie szybciej — natomiast na ich koszt powstają jesienne ksantofile jako produkty utlenienia i rozkładu. Cechuje je anormalne zachowanie się przy rozdziale fazowym. Wobec tego D e l e a n o i D i c k oznaczali jako karoteny te powstające z nich produkty utlenienia.

Nasze pomiary ilościowe oparte były na chromatografii kolumnowej, przy użyciu tak silnych adsorbentów, jak aktywny tlenek glinu i wodorotlenek wapnia. Wobec tego oddzielenie karotenów od obu rodzajów ksantofilów przebiegało u nas dokładnie i dało się śledzić. Wyniki naszych badań nekrobiozy u większości drzew są więc zgodne z wynikami szkoły P. K a r r e r a i dadzą się dobrze porównać, gdyż odnoszą się do tych gatunków drzew, które były objęte i naszymi badaniami. I tak np. badacze szwajcarscy wyosobnili z ca 18 kg liści zielonych kasztanowca, zerwanych już w stadium nekrobiozy 19.X., około 100 mg krystalicznego β -karotenu, a my znaleźliśmy w tym czasie w 1 kg liści zielonych ca 180 mg karotenów; natomiast w liściach żółtych, zerwanych 1.XI., w 10 kg stwierdzono tylko spektroskopowo ślady karotenów, a my znaleźliśmy w 1 kg tylko 4 mg.

Tylko u trzech gatunków zbadanych drzew (buk, dąb i robinia) obraz nekrobiozy był odmienny. Zanik karotenów zatrzymywał się na pewnym stosunkowo dość wysokim poziomie. W 1 kg masy świeżych liści, całkiem pożółkłych, stwierdzone ilości sumy karotenów były zawarte w granicach — $50 \div 110$ mg. Bliższe zbadanie przyczyn tego zjawiska mogło by może wyjaśnić mechanizm trwałości tych labilnych związków nienasyconych w chloroplastach liści.

Występowanie ilościowe α -karotenu i przebieg jego zmian, jak to wynika z naszych badań, jest bardzo charakterystyczną cechą drzew. Buk, jesion, kasztanowiec, klon, miłorząb i modrzew miały najwyższą koncentrację α -karotenu w suchej masie, zawartą w granicach — $12 \div 24$ mg⁰/. Średnia koncentracja $4 \div 10$ mg⁰/o cechowała: dąb, cis, grab, jodłę, lipę, robinie, sosnę, świerk i wiąz. Reszta drzew wykazywała niską koncentrację poniżej 4 mg⁰/. Stosunek koncentracji α -formy do β po okresie roz-

woju liści ustala się na właściwym dla danego gatunku poziomie, podobnie jak to się ma ze stosunkiem sumy karotenów do ksantofilów. Dla buka wynosił on $1/2$, dla dębu $1/3,4$, a dla robinii $1/7$. U drzew badanych sporadycznie stwierdzono, że przeważnie te stosunki są wysokie od $ca\ 1/2$ do $1/1$, tylko 20% zbadanych gatunków wykazywało niskie wartości: $1/25 \div 1/5$. Jeśli można już na podstawie powyższego, dość szczupłego materiału doświadczonego wyciągać ogólniejsze wnioski, to wartość tego stosunku zdaje się być charakterystyczną cechą rodzajów botanicznych.

Na znaczenie udziału α -karotenu w ogólnej sumie karotenów u roślin zwrócili uwagę już pierwsi jego odkrywcy R. K u h n i E. L e d e r e r (12). Badali oni ilościowo stosunek obu form, posługując się jeszcze niedokładnymi metodami rozdzielania izomerów. Zbadano liście bluszczu, kasztanowca, pokrzywy, sosny, szpinaku i traw, i stwierdzono, że stosunek ten waha się w szerokich granicach, przy czym w pokrzywie, szpinaku i trawach znaleziono tylko β -karoten. Autorzy wyrażają w końcu pogląd, że dalsze badania licznych roślin, przy uwzględnieniu różnych wegetacyjnych warunków, pozwoli lepiej poznać te wahania i wyjaśnić fizjologiczne znaczenie tych stosunków.

Pomiary koncentracji ogółu karotenów wykonywane najdokładniejszą metodą z dotychczas znanych, przebiegały szybko i sprawnie, więc ich wyniki są najpewniejsze, dlatego obliczenia procentowego udziału α -karotenu w ogólnej koncentracji odnoszono do tych wielkości.

Oznaczenia oddzielne obu izomerów były oparte na ich rozdzielaniu chromatograficznym przy użyciu $Ca(OH)_2$. Metoda ta jest dokładna i czuła, o ile używa się odpowiednio aktywnego adsorbenta. Dowodzą tego prace wielu badaczy, np. P. K a r r e r i W. S c h l i e n t z (8) wykryli przy jej pomocy α -karoten w liściach pokrzywy, szpinaku i traw oraz zidentyfikowali go pomiarem widma absorbcyjnego, chociaż R. K u h n i E. L e d e r e r (12) nie znaleźli go w tych roślinach, gdyż używali mniej dokładnych metod.

Oznaczanie α -karotenu było obarczone błędem metodycznym, a mianowicie przy obliczaniu koncentracji na podstawie zmierzonej ekstynkcji posługiwano się tym samym współczynnikiem, co przy obliczeniach β -karotenu. Błąd ten jest jednak niewielki i wynosił $ca\ 3,4\%$, jak to wynika z porównania współczynników znalezionych przez japońskich badaczy (5), przy użyciu fotometru Pulfricha (0,89 dla α -karotenu, a dla β 0,86). Największym stosunkowo błędem były obarczone oznaczenia izomeru β . Po rozwinięciu chromatogramu i eluowaniu α -formy następowała elucja drugiego paska, co trwało zawsze co najmniej godzinę. W następstwie tego występowały na kolumnie straty przez izomeryzację i utlenianie. Błąd ten można ocenić, porównując wyniki oznaczeń ogólnej

koncentracji karotenów z sumowaniem wyników oznaczeń oddzielnych każdego izomeru. Np. dla buka przy koncentracjach karotenów poniżej 10 mg⁰%, w świeżej masie nie przekraczał on — 6,4⁰%; przy koncentracjach wyższych na skutek dłużej trwającej elucji był większy, zawarty w granicach: —5 ÷ 12⁰%. Podobnie wypadają obliczenia dla dębu. Dla robinii błąd oznaczeń w okresie wiosenno-letnim był nawet znacznie mniejszy, nie przekraczał — 5⁰%. Natomiast w okresie nekrobiotycznym wystąpił błąd odwrotny, suma obu karotenów oznaczonych oddzielnie była wyższa od ogólnej koncentracji. Błąd wynosił: +3,6 ÷ 7⁰%. Źródła jego należy szukać prawdopodobnie bądź w zanieczyszczeniu warstwy β-karotenu na kolumnie z Ca(OH)₂ produktami nekrobiotycznego rozkładu karotenoidów (ksantofile jesienne), bądź w niedokładności pobrania jednolitych średnich próbek z powodu niejednorodnego żółknięcia poszczególnych liści i ich opadania przy dotknięciu. W okresie jesiennym występował na chromatogramie z Ca(OH)₂ podział paska β karotenowego na 3 warstwy o różnych odcieniach barwy. Przy wymywaniu przerwy między nimi wynosiły zaledwie 0,1—0,2 mm, więc rozdzielenie było niemożliwe.

* * *

Pomiary widm absorbcyjnych ekstraktów α i β-karotenów były wykonywane w zakładzie Prof. A. Szczygła, P.Z.H. w Warszawie, gdzie korzystaliśmy z Jego życzliwej gościnności. Wykonywała je Mgr B. Dietl, asystent zakładu, za co Jej serdecznie dziękujemy.

PISMIENICTWO

1. Analytical Methods Committee: Analyst 75, 568, 1950; Analyst 77, 171, 1952. Paech K. Tracey M. V.: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse III, Springer Verlag, Berlin 1955.
2. Booth V. H.: Alpha-Carotene in Leaves of the Carrot Plant. J. Sci. Food Agric., 7, 386, 1956.
3. Deleano N., T. Dick J.: Beiträge zur Kenntnis des quantitativen Carotinwechsels der Laubblätter während der Gesamtvegetation. Biochem. Z., 290, 360, 1937.
4. Fujita A., Ajisaka M.: Über die Verteilung des Provitamins A. I. Mitteilung: Verteilung des Carotins in Pflanzen. Biochem. Z., 308, 430, 1941.
5. Fujita A., Narita T., Ajisaka M.: Über die Bestimmung des Provitamins A. I. Mitteilung: Bestimmung des Carotins. Biochem. Z., 308, 420, 1941.
6. Goodwin T. W.: The comparative Biochemistry of the Carotenoids. Chapman & Hall LTD. London 1952.
7. Karrer P. und Mitarbeiter: Pflanzen Farbstoffe. XXXVIII Helv. chim. Acta, 14, 614, 1931.
8. Karrer P., Schlienz W.: Über das Vorkommen des alfa-u. beta-Carotins in verschiedenen Naturprodukten. Helv. chim. Acta, 17, 7, 1934.
9. Karrer P., Walker O.: Pflanzenfarbstoffe LI. Reines alfa-Carotin. Helv. chim. Acta, 16, 642, 1933.

10. Karrer P., Walker O.: Pflanzenfarbstoffe LVI. Untersuchungen über die herbstlichen Färbungen der Blätter. *Helv. chim. Acta.*, 17, 43, 1934.
11. Kuhn R., Lederer E.: *Ber.* 64, 1349, 1931. *Naturw.* 19, 306, 1931.
12. Kuhn R., Lederer E.: Über alfa- u. beta-Carotin. *Z. physiol. Chem.*, 200, 246, 1931.
13. Mackinney G.: Leaf Carotenes. *J. biol. Chem.* 111, 75, 1935
14. Miller E. S.: *J. Am. Chem. Soc.*, 57, 347, 1935.
15. Strain H. H.: Carotene IX. Carotenes from Different Sources and some Properties of alfa- and beta-carotene. *J. biol. Chem.*, 111, 85, 1935.

Р Е З Ю М Е

Авторами велись систематические исследования над ходом изменений количества альфа—и бета — каротинов в листьях бука, дуба и белой акации во время всего вегетационного периода. Кроме того авторы занялись определением количества обоих изомеров в зеленых и желтых листьях у 17 видов хвойных и 14 видов лиственных деревьев (Табл. 13).

Пробы листьев с деревьев брались всегда в одно и то же время утром. Для исследований срывалось с каждого дерева сто типичных листьев, затем определялись их свежая и сухая масса, общее количество каротинов, а также отдельно количество альфа и бета — каротина. Обозначения делались сначала каждые 4 — 5 дней, в летний период — каждые 10 — 15 дней, в период же некробиоза — каждые 2 — 5 дней. Общее количество каротинов, обозначенное как бета — изомер, определялось по методу разработанному Британским обществом общественных аналитиков (Soc. of Public Analysts Method — Carotene Panel — 1950, 1952), а для определения отдельных изомеров был использован метод разделения их на хроматографической колонке с $\text{Ca}(\text{OH})_2$. При вымывании пользовались нефтяным эфиром. Концентрация каротинов в полученных экстрактах определялась путем измерения экстинкции на фотометре Цейс-Пульфрих, фильтр S 47. Количество каротинов обозначалось как часть на миллион (p. p. m.) или в мг%. Вычисления производились как по отношению к свежей, так и к сухой массе, а также к ста листьям. Полученные путем хроматографического разделения растворы альфа—и бета каротина идентифицировались с помощью измерений их спектра поглощения на спектрофотометре Бекмана, Модель Д. У. Во всех случаях полученные для фракции альфа максимумы оказались согласными с данными литературы, тоже и для фракции бета — каротина положение второго максимума было идентично с данными других авторов, первый же максимум был несколько передвинут (рис. 1, 2).

Полученные для отдельных определений альфа — и бета каротина хроматограммы характеризовались всегда значительной отчетливостью и были характерны для главных стадий развития листьев (рис. 3). Результаты систематических определений для бука, дуба и белой акации, а также спорадических для разных деревьев сопоставлены в таблицах 1, 5, 9 и 13 и иллюстрированы на чертежах (рис. 4, 5, 6, 7, 8 и 9).

Рассматривая ход изменений количества каротинов в листьях бука, видим, что в весенней стадии, длившейся до конца июня, когда происходит быстрое развитие листьев — их масса в течение 15 дней увеличивается на 72% — быстро возрастает и концентрация каротинов, а также их количество в сотни листьев, причем наблюдаются значительные приросты, напр. в течение 15 дней доходят до около 160%. В конце этой стадии выступают также максимумы концентрации: 178 (свежая масса) и 410 (сухая масса) частей на миллион. В этот же срок наблюдается также и максимум содержания каротинов в листьях: 6,1 мг. Описание хроматограммы представлено в табл. 2. Во время летней стадии длившейся два с половиной месяца и характеризующейся более стабилизированной массой листьев, имел место медленный но постоянный убыток концентрации каротинов, а также уменьшение биометрической величины. Убытки доходили до ок. 10%. Картина хроматограммы отчетливо изменяется (Табл. 3). Во время осенней стадии процесс желтения листьев сопровождался быстрым убытком концентрации каротинов. Сам процесс желтения листьев был связан с убытком их общей массы с одновременным сохранением того же процента воды, а также с дальнейшим уменьшением количества каротинов вплоть до уровня 60 частей на миллион свежей массы т. е. 14,0 сухой массы. 10 листьев совсем желтых, но еще не падающих с деревьев, содержало 2,4 г каротинов, следовательно почти столько же, сколько их содержат зеленые листья в половине мая. Сохнувшие листья сохраняют почти постоянную концентрацию каротинов в размере 58 частей на миллион в свежей массе и 107 частей в сухой. Картина хроматограммы подвергается весьма характерному разворачиванию (Табл. 4).

Что касается концентрации альфа—каротина и его процентного количества в общей сумме каротинов, то следует подчеркнуть значительное его количество составляющее: 50,9 частей на миллион (свежая масса) и 117 частей (сухая масса), что составляет 35% от общего количества каротинов.

В листьях дуба во время весенней стадии, длившейся по 2 июля, быстрое увеличение массы листьев (в течение месяца увеличивается 20 раз) сопровождается со второй половины мая внезапным

возрастанием концентрации каротинов (тремякратное). Их количество в ста листьях увеличивается в первые 15 дней десятикратно, а затем пятикратно, во время летней стадии, длившейся по 15 сентября, когда масса листьев является стабилизированной, стабилизируется также и концентрация каротинов, достигая своего максимума в начале августа: 169 частей на миллион в свежей массе и 429 частей в сухой массе. В ста листьях количество каротинов доходит до 24 мг. Эти максимальные количества удерживаются почти до конца лета. Осенняя стадия сразу начинается медленным желтением листьев и, в связи с этим, снижением концентрации каротинов. В течение месяца убыток доходит до 53%. Несмотря на это как в желтых листьях, так и в коричневых, сорванных с дерева 18 и 22 октября обнаружено еще сравнительно значительную концентрацию каротинов: 74 и 79 частей на миллион т. е. в сухой массе — 185 и 87 частей. В ста желтых листьях содержалось еще около 10 мг каротинов, стало быть, столько же сколько в 100 зеленых листьях в конце мая.

Процент альфа — каротина от общего количества каротинов у дуба был ниже, чем у бука и составлял после стабилизации в конце весны 22% — 23%. Это количество удерживалось на этом уровне до начала некробиоза.

Характер изменений содержания каротинов во время вегетационного периода у белой акации, сильно отличается от выше описанных. Это вызвано тем, что листья этого дерева растут также и в течение летней стадии т. е. до 15 сентября. Масса листьев за все это время возросла с 77,8 г до 116 г т. е. на 49%. Максимумы концентрации и количества каротинов выступают лишь в конце лета: 189 частей на миллион (свежая масса) и 22,0 мг. Возрастание концентрации здесь продолжалось значительно короче, чем у выше описанных деревьев т. е. у бука и дуба и было значительно больше, ибо семикратное. Во время осенней стадии, длившейся полтора месяца имело место постоянное уменьшение массы листьев, связанное с явлением их цвета и желтением, а также повышением концентрации воды. Убыток массы листьев равнялся около 38%. Концентрация каротинов быстро снижалась, достигая уровня 58 частей на миллион. Убыток равнялся 69%. В ста желтых листьях однако осталось еще 4,2 мг каротинов, следовательно столько, сколько их содержалось в весенних листьях в начале июня. В опавших листьях и сохнувших обнаружено еще сравнительно большую концентрацию каротинов около 100 частей на миллион в сухой массе, в то время как у листьев сорванных 29 октября их содержалось 156 частей на миллион.

Количество альфа — каротина в общей сумме каротинов у белой акации было самое низкое среди трех рассматриваемых деревьев,

так как летом оно стабилизировалось на уровне в среднем 12%. Во время некробиоза альфа — каротин исчезал гораздо медленнее, чем бета — изомер.

Рассматривая результаты исследований, сопоставленные в таблице 13 для разных деревьев, следует прежде всего обратить внимание на неожиданно обильное выступание альфа — каротина. Концентрация его в свежей массе зеленых листьев у большинства исследуемых деревьев колебалась в границах от 2 мг % до 9,1 мг %, а процентное его количество в общей сумме каротинов было сравнительно очень значительное: от 20% до 52%. У семи лишь видов обнаружено небольшое количество альфа — каротина: от 4% до 17%. Особенно богатым источником альфа — каротина оказались листья каштана, клёна, гинкго а также лиственницы, сосны и ели.

Обнаруженное в них количество этого изомера составляло почти половину общего содержания каротинов (35% — 52%). В период некробиоза у всех исследуемых деревьев наступало быстрое исчезание каротинов, так что в их желтых листьях обнаружено лишь количества каротинов, выражающиеся в дробях мг %, а в сохнувших листьях едва их след, в то время как в желтых и сохнувших листьях бука, дуба и белой акации концентрация каротинов оставалась на уровне от 5 до 11 мг %. Альфа каротин по большей части исчезал гораздо быстрее, чем его изомер, и только у тутового дерева, граба и гинкго (*Ginkgo biloba*) его процентное количество почти не изменялось до самого конца в сравнении со стадией летней стабилизации.

На основании изложенных выше результатов произведенных исследований, можно сделать следующие общие заключения:

1) В период развития и роста листьев у исследуемых деревьев наступает быстрое накапливание каротинов, а в период зрелости выступает либо их концентрация (дуб, белая акация), либо постепенное медленное их снижение.

2) Во время стадии осеннего некробиоза у 31 вида деревьев из 34 исследованных — установлено полное исчезновение каротинов. Лишь только у трех видов (бук, дуб и белая акация) картина некробиоза представлялась иначе, исчезание каротинов не было полным и они удерживались на сравнительно высоком уровне. В одном килограмме свежей массы листьев совершенно пожелтевших обнаружено еще 50—110 мг каротинов.

3) Степень концентрации альфа — каротина и её отношение к концентрации бета — изомера, быть может, является характерным видовым и родовым признаком деревьев.

SUMMARY

Systematic investigations were carried out on quantitative changes of α - and β -carotenes in the leaves of the beech, oak and false acacia trees during the whole period of vegetation. Besides, the green and yellow leaves of 17 species of coniferous trees and of 14 species of deciduous trees were examined to determine the content of their both isomers (Table 11).

Samples of leaves were harvested always at the same time in the morning. A hundred of normal leaves were taken for measurements to determine their wet and dry weight, total carotene and their α - and β -carotenes separately. The measurements were taken at first every 4—5 days and in summertime every 10—15 days. During necrobiosis the measurements were taken every 2—5 days. Total carotene expressed as β -isomer value was determined by the Society of Public Analysts' Method-Carotene, while for determination of individual isomers a method of separating them on chromatographic column on $\text{Ca}(\text{OH})_2$ was used. The concentration of carotenes in the obtained extracts was determined by extinction measurements in Zeiss-Pulfrich photometer, using filter S47. The amount of carotenes was expressed as part per million or in mg^0/o . The concentration of carotenes was calculated both for wet and dry weight of a hundred leaves. The solutions of α - and β -carotenes obtained by chromatographic separation were identified by measuring their absorption spectra in Beckman spectrophotometer, Model D.U. In all the cases the maxima obtained for α -fraction were in accordance with the data recorded in the literature. The situation of the second maximum for β -carotene fraction was identical, while the first maximum was slightly shifted. (Fig. 1, 2). The chromatograms obtained by individual measurements of α - and β -carotenes were always distinct and characteristic of the chief stages of the vegetation of leaves (Fig. 3). The results of systematic measurements for the beech, oak and false acacia trees and those of occasional measurements for other trees were summarised in Tables 1, 4, 7, 11 and presented in diagrams (Fig. 4, 5, 6, 7, 8, 9).

Taking into consideration the variation in carotene content in the leaves of the beech, one may observe that — at the spring stage, lasting till the end of June, when leaves rapidly develop — their weight increases by 72 per cent during 15 days. The concentration of carotenes and their amount in one hundred of leaves is also considerable. The increases amount to about 160 per cent during 15 days. At the end of this stage the maxima of concentrations are 178 p.p.m. of wet weight and 410 p.p.m. of dry weight, while the carotene amount calculated for a hundred of leaves is 6,1 mg.

The description of the chromatogram is given in Table 2. At the summer stage lasting two and a half month and having the established leaf amount, a slow but steady decrease in the concentration of carotenes and their biometric magnitude took place. The decreases amounted to about 10 per cent. The picture of the chromatogram was distinctly changed. At the autumn stage the process of leaf yellowing was preceded by a rapid decrease in the concentration of carotenes. The yellowing of leaves lasting 18 days was accompanied by a general decrease of the leaf weight and their further diminishing of carotenes content, the water percentage maintaining on the same level. The carotene value decreased to 60 p.p.m. of wet weight i.e. 14,0 mg⁰/₀ of dry weight. A hundred of leaves, thoroughly yellow and being on the point of falling down, contained yet 2,4 mg of carotene, that is equivalent to the amount found in the green leaves, in the middle of May. The drying leaves maintain almost unchangeable concentration of carotenes amounting to 58 p.p.m. of wet weight and 107 p.p.m. of dry weight. The picture of the chromatogram undergoes characteristic changes (Table 3).

As far as the concentration of α -carotene and its share in the total amount, calculated in percentage, are concerned, attention must be drawn to their high values amounting at the maximum to 50,9 p.p.m. (wet wt.) and 107 p.p.m. (dry wt.) that makes 35 per cent of the total value.

In regard to the oak leaves observed at the spring stage, lasting till June 2, the rapid growth of their weight (twentyfold increase during one month) is accompanied, since the second half of May, by a sudden increase of the carotene concentration (threefold). The value calculated for one hundred of leaves increases in the first 15 days 10 times and next 5 times. At the summer stage, lasting till September 15, when the weight of leaves is established, the concentrations of carotenes are undergoing a stabilization too, reaching their maxima at the beginning of August: 169 p.p.m. (wet wt.) and 429 p.p.m. (dry wt.) and 24 mg per one hundred of leaves. These maxima maintain till the end of summer. The autumn stage begins with the yellowing of leaves and a concurrent decrease in the concentrations of carotenes. The month decrease is about 53 per cent. In spite of that, both the yellow and brown leaves, harvested on 22 and 24 of October, contained still fairly high concentration of carotenes estimated as 74 and 49 p.p.m. i.e. 185 and 87 p.p.m. of dry weight. A hundred of yellow leaves contained yet about 10 mg of carotenes. This value is equivalent to the amount of carotenes calculated for one hundred of green leaves towards the end of May.

The percentage distribution of α -carotene was lower in the oak than in the beech and after the stabilization at the end of spring it amounted to 22—23 per cent. It maintained on this level till the beginning of necrobiosis.

The changes in the carotene content, during the vegetation period, were in the false acacia different than those discussed previously. It must be put to the constant growth of leaves at the summer stage till September 12. At this time the weight of leaves increased from 77,8 g to 116 g i.e. by 49 per cent. The maxima of concentrations and the maximum values calculated for a hundred of leaves occur not earlier than at the end of summer. They are: 189 p.p.m. (wet wt.) and 22,0 mg. The spring increase of concentration was considerably shorter and more marked (sevenfold) than in the previous trees. At the autumn stage, lasting one and a half month, there was observed a constant decrease in leaf weight accompanied by getting the leaves light in colour and yellow. The increase of water concentration was observed too. The decrease in weight was about 38 per cent. The concentration of carotenes rapidly diminished till 58 p.p.m. i.e. by 69 per cent. In a hundred of leaves there remained yet 4,2 mg of carotenes. This is equivalent to the amount of carotenes observed in the leaves in spring, at the beginning of June. The drying and fallen leaves were found to contain yet a relatively high concentration of carotenes: about 100 p.p.m. of dry weight, while the amount of carotenes calculated for the leaves harvested on October 29 was 156 p.p.m.

The share of α -carotene, in the general carotene balance, was the lowest for the false acacia tree out of the three examined trees. Its average amount in summer was 12 per cent. During necrobiosis α -carotene decreased more slowly than β -isomer.

Considering the results of measurements for various trees, presented in Table 11, one may observe a surprisingly abundant occurrence of α -carotene. Its concentration in the wet weight of green leaves, harvested from the majority of the examined trees, ranged from 2 to 9,1 mg⁰/. Its percentage share in total carotene was relatively high and ranged from 20 to 52 per cent. Only in 7 species of trees the amounts were low i.e. 4—17 per cent. The leaves of the chestnut, acer and maidenhair trees as well as the needles of the larch, pine and fir trees abounded especially in α -carotene. The amounts of this isomer found in them consisted nearly a half of the total amount of carotenes (35—52 per cent). During necrobiosis all the examined trees showed a rapid decrease of carotenes, so that in their yellow leaves there were found only fractions of mg⁰/. of carotenes and in drying ones only traces. Yet in the yellowing and drying leaves of the beech, oak and false acacia trees the concentrations of caro-

tenes ranged from 5 to 11 mg⁰/. In general α -carotene disappeared more rapidly than its isomer. Only in horn-beam tree, mulberry tree and maidenhair tree its percentage share remained hardly changed till the end of the vegetation period, in comparison with the stabilization period in summer.

On the basis of the data calculated in percentage the following conclusions may be drawn.

1. The growth of the leaves in the examined trees is accompanied by the rapid concentration of carotenes. In their adult period there may be observed either a stabilization of their concentration (the oak and false acacia tree) or a slow decrease in concentration (the beech).

2. Total disappearance of carotenes was observed to take place during the necrobiosis in autumn. It was observed in 31 species of trees out of the 34 trees examined. Only in three species, including the beech, oak and false acacia trees, the picture of necrobiosis was different. The disappearance of carotenes was checked on a fairly high level. In 1 kilogramme of fresh leaves, thoroughly yellow, there were found yet 50 to 110 mg of total carotene.

3. The height of α -carotene concentration and its relation to its β -isomer concentration seems to be characteristic of genera and species of trees.

Tab. 11. Różne drzewa. Zawartość karotenów.
Various trees. Carotenes content.

Nazwa Name	Data Date	Sucha masa Dry wt %	Karoteny Carotenes						Barwa liści Colour of leaves	
			w świeżej masie mg % fresh wt			w suchej masie mg % dry wt				α % w sumie of total pigment
			α	β	suma total	α	β	suma total		
										α
<i>Abies alba</i>	12.XII	45,0	3,0	5,3	8,8	6,7	11,8	19,6	34,1	zielone — green
<i>Acer platanoides</i>	24.VIII	41,0	9,1	9,9	19,1	22,2	24,1	46,7	47,6	"
"	3.X	35,0	6,2	8,0	15,2	17,7	22,8	43,4	40,8	"
"	"	36,6	0,4	1,5	2,2	1,1	4,2	6,0	18,2	żółkniejąca — yellowing
"	"	41,4	0,05	0,2	0,3	0,12	0,5	0,7	16,7	żółte — yellow
<i>Aesculus hippocastanum</i>	2.X	38,2	9,3	8,2	17,8	24,3	21,5	46,6	52,2	zielone — green
"	8.X	37,2	0,4	1,1	1,5	1,1	3,0	4,1	26,7	żółkniejąca — yellowing
"	13.X	40,0	—	—	0,4	—	—	1,0	—	żółte — yellow
<i>Aesculus octandra</i>	26.IX	34,0	1,7	3,8	6,0	5,0	11,2	17,7	28,3	zielone — green
"	12.IX	35,6	1,5	2,6	4,9	4,2	7,4	13,8	30,6	żółkniejąca — yellowing
"	26.IX	32,0	0,2	1,3	1,6	0,6	4,1	—	12,5	"
"	5.X	31,2	—	—	ślady	—	—	ślady	—	żółte — yellow
<i>Betula verrucosa</i>	18.IX	42,3	1,8	10,3	13,9	4,3	24,3	32,9	24,3	zielone — green
"	28.IX	35,1	—	—	2,6	—	—	7,4	—	żółkniejąca — yellowing
"	7.IX	34,1	—	—	1,2	—	—	3,5	—	żółte — yellow

Tab. 11. (ciąg dalszy)

Nazwa Name	Data Date	Sucha masa Dry wt %	Karoteny Carotenes						Barwa liści Colour of leaves	
			w świeżej masie mg % fresh wt			w suchej masie mg % dry wt				α % w sumie of total pigment
			α	β	suma total	α	β	suma total		
			α	β	suma total	α	β	suma total		
<i>Carpinus betulus</i>	26.VIII	38,8	6,1	8,7	14,0	15,7	22,4	36,2	43,6	zielone — green
"	6.X	40,6	3,2	8,4	11,6	7,9	20,7	28,5	28,6	"
"	"	39,8	1,2	2,8	4,4	3,4	7,6	11,1	27,1	żółknięjące — yellowing
"	20.X	43,8	0,2	0,7	0,9	0,5	1,7	2,0	26,7	żółte — yellow
<i>Corylus avellana</i>	4.X	36,4	1,7	3,7	6,0	4,6	10,1	16,5	31,5	bladzielone — pale-green
"	5.X	39,6	—	—	0,3	—	—	—	0,8	żółte — yellow
<i>Fraxinus excelsior</i>	29.IX	23,5	3,5	6,8	11,0	15,0	29,1	46,8	33,8	zielone — green
"	6.X	43,2	—	—	1,1	—	—	2,5	—	żółte — yellow
<i>Ginkgo biloba</i>	15.VI	22,4	3,7	4,1	7,2	16,5	18,3	32,2	51,6	zielone-green
"	15.X	26,3	3,3	3,5	7,4	12,6	13,2	28,3	48,8	zielone — green
"	17.X	24,5	1,1	1,2	2,8	4,6	4,8	11,4	49,0	żółto-zielone—yellow-green
"	"	22,6	0,5	0,5	0,95	2,0	2,1	4,2	48,9	żółte — yellow
<i>Juniperus communis</i>	2.XII	53,8	0,3	7,0	7,5	0,6	12,0	12,9	4,4	"
<i>Juniperus virginiana</i>	12.V	43,4	0,6	6,3	6,9	1,3	14,6	15,9	8,1	"
<i>Larix decidua</i>	12.IX	40,2	4,8	8,4	12,5	12,3	20,8	31,1	40,6	zielone — green
"	4.XI	39,8	0,2	0,7	0,84	0,5	1,7	2,1	23,9	żółte — yellow

Tab. 11. (ciąg dalszy)

Nazwa Name	Data Date	Sucha masa Dry wt %	Karoteny Carotenes						Barwa liści Colour of leaves	
			w świeżej masie mg % fresh wt			w suchej masie mg % dry wt				α % of total pigment
			α	β	suma total	α	β	suma total		
<i>Morus alba</i>	4.XI	30,0	1,0	4,6	6,4	3,3	15,3	21,3	15,6	zielone — green
"	10.XI	25,1	0,3	1,6	2,0	1,2	6,4	7,9	15,0	żółte — yellow
<i>Picea excelsa</i>	8.IV	40,0	1,8	2,7	4,4	4,5	6,7	11,0	40,0	
"	21.IV	41,9	2,2	3,3	5,6	5,2	7,9	13,2	29,3	
"	5.VII	42,8	2,1	2,3	4,0	4,9	5,4	9,4	52,4	
" <i>pungens</i>	11.IV	49,5	1,2	2,8	4,0	2,4	5,6	8,0	30,0	
" " <i>var. argentea</i>	11.IV	45,3	1,1	3,5	4,7	2,4	7,8	10,3	23,6	
<i>Pinus Banksiana</i>	23.IV	45,0	1,5	5,0	6,5	3,2	11,0	14,5	23,0	
<i>Pinus cembra</i>	25.IV	44,6	1,6	5,5	7,4	3,5	12,3	16,6	21,6	
" <i>mughus</i>	28.IV	43,2	1,2	4,2	5,7	2,8	9,8	13,1	21,5	
" <i>nigra</i>	14.XII	42,0	1,7	4,5	6,8	4,0	10,6	16,2	25,0	
" <i>strobus</i>	21.IV	44,8	1,4	5,0	6,6	3,1	11,1	14,7	21,1	
" <i>silvestris</i>	2.XII	39,4	1,8	3,1	4,8	4,6	7,9	12,2	37,5	
"	3.V	44,0	2,2	4,3	6,8	5,0	9,7	15,5	32,0	
"	"	43,8	2,2	4,3	6,6	5,0	9,7	15,0	33,4	
<i>Populus berolinensis</i>	22.VIII	28,0	1,2	11,4	12,2	4,3	40,7	43,6	9,8	zielone — green

Tab. 11. (ciąg dalszy)

Nazwa Name	Data Date	Sucha masa Dry wt %	Karoteny Carotenes						Barwa liści Colour of leaves	
			w świeżej masie mg % fresh wt			w suchej masie mg % dry wt				α % w sumie of total pigment
			α	β	suma total	α	β	suma total		
<i>Populus berolinensis</i>	7.X	35,8	0,8	7,4	9,2	2,2	20,7	25,7	8,7	zielone — green
"	"	37,8	śląd	3,1	3,3	—	8,2	8,6	—	żółkniejące — yellowing
"	15.XI	45,2	—	—	—	—	—	—	—	żółte — yellow
<i>Pseudotsuga glauca</i>	11.IV	43,9	1,4	3,9	5,5	3,1	8,9	12,6	25,4	
" <i>taxifolia</i>	12.V	45,0	1,6	4,3	6,0	3,5	9,5	13,3	26,6	
<i>Salix elegantissima</i>	10.X	38,8	1,2	12,0	13,8	3,1	30,9	35,6	8,7	zielone — green
"	"	33,1	0,3	2,0	2,7	0,9	6,1	8,3	10,7	żółto-zielone — yellow-green
"	20.X	32,6	—	—	0,6	—	—	1,8	—	żółte — yellow
<i>Taxus baccata</i>	18.XII	36,5	1,7	7,7	9,8	4,8	21,0	26,8	17,4	
<i>Tilia cordata</i>	17.IX	35,0	2,7	10,6	13,4	7,6	30,4	38,4	20,2	zielone — green
"	22.IX	31,2	0,6	2,1	2,7	1,8	6,9	8,7	20,9	żółto-zielone — yellow-green
"	"	28,9	—	—	0,4	—	—	1,4	—	żółte — yellow
<i>Tsuga canadensis</i>	3.V	45,3	2,2	3,9	6,4	4,8	8,9	14,2	33,9	
<i>Ulmus scabra</i>	7.X	38,0	3,2	6,0	9,2	8,3	15,7	24,3	34,7	zielone — green
"	8.X	33,0	—	—	0,8	—	—	2,5	—	żółte — yellow
<i>Viscum album</i>	1.III	36,2	0,6	4,1	5,0	1,6	11,2	13,8	12,0	