

O ciałach redukujących w hemolimfie gąsienic i poczwerek *Celerio euphorbiae* L. (Lepid.)

Reducing substances in the blood of *Celerio euphorbiae* - (Lepid).

napisali

W. ŚWIECHOWSKA¹ i T. WYRWALSKI.

Zagadnienie i metodyka.

Bishop (1) i jego współpracownicy wykazali w r. 1923 obecność cukru w hemolimfie larw i poczwerek pszczoły. W r. 1924 ogłosił Hemmingsen (2) wyniki badań nad zawartością cukru w hemolimfie różnych gąsienic i poczwerek motyli. Równocześnie jednak wykazał przy pomocy fermentacji, że na cukier wypada w krwi owadów tylko drobna część całkowitej redukcji. Redukcję w krwi gąsienic badali następnie Heller i Mokłowska (3), którzy pierwsi zwrócili uwagę na zmiany, zachodzące w zależności od stadium rozwoju. Glikemię u jedwabnika oznaczali Demjanowski i Prokofjewa (4), polemizując z poglądem Hellera i Mokłowskiej, jakoby glikemia w fazie gąsienicy była wyższa, niż u poczwarki. W monografii poświęconej składowi krwi owadów omawia Florkin (5) całe piśmiennictwo przedmiotu, wykazuje rozbieżności i odnosi je do różnic: 1. w sposobie odbiańczania i 2. w metodach, stosowanych do samego oznaczania. Florkin oznaczał cukier w krwi jedwabnika i kałużnicy. Celem pracy niniejszej jest prześledzenie zarówno całej zawartości ciał redukujących jak i prawdziwej glikemii w zależności od stadium rozwojowego wilczomlecza. Stosowaliśmy metodę Hagedorna-Jensena (6), podobnie jak większość dotychczasowych badaczy. Ponieważ jednak odbiańczanie wodorotlenkiem cynku usuwa, jak wiadomo, szereg ciał redukujących, zastosowaliśmy w późniejszych badaniach strącanie kwasem wolframowym (Folin-7), wedle przepisu Hellera i Świechowskiej (8).

Do oznaczania „cukru prawdziwego“ obok niecukrowych ciał redukujących, zastosowaliśmy odczynnik Hagedorna-Jensena w 37^o, jak to do oznaczania dwuoksy-fenilalaniny

¹ P. Z. H. w Krakowie.

opracowali Heller i Świechowska. Różnica między redukcją w 100° a redukcją w 37° odpowiada zawartości cukru. Dla porównania przeprowadziliśmy w szeregu krwi oznaczenie kontrolne przy pomocy fermentacji drożdżowej: 0,2 g świeżych drożdży piekarskich przemycano 5ml wody destylowanej, stosując ten zabieg 4-krotnie. Po ostatnim przemyciu, odwirowaniu i zdekantowaniu zawieszono drożdże w 5 ml destylowanej wody. Do próby braliśmy 0,1 ml krwi, 0,5 ml wody i 0,2 ml opisanej zawiesiny drożdżowej. Po 30 min. w 37° próbkę odbiałczano wedle Folina i bezpośrednio oznaczano redukcję wedle Hagedorna-Jensena w 100°. W równoległych 2 próbkach kontrolnych wykonywano wszystkie te zabiegi, jedynie opuszczając dodatek krwi. Wynik redukcji po fermentacji daje zawartość ciał redukujących niecukrowych. Odejmując ten wynik od wyniku otrzymanego bezpośrednio z krwią niesfermentowaną, otrzymujemy prawdziwą zawartość cukru w krwi.

Wyniki.

I. Redukcja całkowita. Podajemy najpierw nieogłoszone dotąd wyniki, otrzymane przy pomocy metody Folina-Wu przez Hellera i Mokłowską. Wyniki te, znacznie liczniejsze niż ogłoszone w cytowanej (3) pracy tych autorów, potwierdzają pierwotny ich wniosek: Przy zastosowaniu metody

Tab. 1.

Nieogłoszone dane Hellera i Mokłowskiej
Redukcja całkowita metodą Folina—Wu w mg % na 100 ml.

A. Gąsienica	B. Poczwarka
1 65,4	1 57,0
2 93,0	2 58,5
3 119,0	3 60,5
4 120,0	4 62,0
5 132,0	5 64,5
6 136,0	6 66,0
7 136,4	7 70,0
8 137,8	8 74,0
	9 87,0
	10 93,0
	11 95,5
	12 97,5
Śred. 116,2 mg %	śred. 73,8 mg %

Folina - Wu otrzymujemy wyższe wartości dla gąsienicy niż dla poczwarki.

Z kolei podajemy wyniki własne, otrzymane dla redukcji całkowitej, przy zastosowaniu oryginalnej metody Hagedorna - Jense na, a więc przy odbiałczaniu wodorotlenkiem cynku. Otrzymane wartości przeliczyliśmy częściowo wedle zasad rachunku błędu, by móc ocenić, o ile różnice występujące między przeciętnymi wartościami są realne. Poszczególne wartości w obrębie grup różnią się bowiem tak znacznie, że różnica między przeciętnymi może wynikać z przypadkowego doboru badanych osobników. Ten rozrzut naturalny spotykamy w materiale wszystkich cytowanych autorów, stąd przy małej ilości badań, odnoszących się do jednego i tego samego okresu rozwojowego, wnioski ich nie są statystycznie dość uzasadnione. Dla naszych szeregów obliczyliśmy: a. średnie M , b. dyspersję σ , oraz c. dyspersję średniej wartości: m . Jak wiadomo różnica między dwoma przeciętnymi wartościami jest wtedy „statystycznie znacząca“, czyli wystarczająco udowodniona, jeśli przewyższa conajmniej trzykrotnie wartość $\sqrt{m_1^2 + m_2^2}$, tj. pierwiastek z sumy kwadratów dyspersji obu rozpatrywanych wartości średnich. W Tab. 2 zestawiliśmy wartości dla gąsienic żrących (17 doświadczeń), dla „biegających“, tj. rozpoczynających zapoczwarczenie (6 doświadczeń) i dla „wrzecion“, tj. kończących zapoczwarczenie (6 doświadczeń, z tych jedno o wyniku odbiegającym od innych opuszczono przy przeliczeniach).

Zestawiliśmy też wyniki badań nad krwią gąsienic, pozbawionych pokarmu przez kilka do kilkunastu godzin. Średnia wartość dla żrących wynosi $129 \pm 4,4$ mg%, dla poszczących zaś $104,4 \pm 9,6$ mg%. Pozornie jest to różnica wystarczająco duża, jednak wartość ilorazu $\frac{129 - 104,4}{\sqrt{4,4^2 - 9,6^2}}$ wynosi 2,4, nie dochodzi zatem do wymaganej statystycznie wartości 3,0. Przeliczone przez nas wyniki Hemmingsena dają ten sam wynik: 2,4. Zatem nasze i jego doświadczenia mają równą wartość dowodowa. Hemmingsen głodził swoje gąsienice dłużej, przeciętnie 2 dni, bezwzględny spadek wartości jest też u niego większy: wynosi 34,6%, gdy w naszych doświadczeniach tylko 18,8%.

Różnica między średnią dla gąsienic żrących a biegających leży w granicach błędu. Natomiast przyrost u „wrzecion“ jest zupełnie realny nawet przy tak dużej dyspersji. Różnica $190 - 129 = 61$ przewyższa $\sqrt{4,4^2 + 13,9^2} = 14,1$ więcej niż 3-krotnie (4,3 razy).

Tab. 2.

Redukcja całkowita w krwi metodą Hagedorna-Jensena
w mg % na 100 ml.

Gąsienica.

I. żrąca	II. głodzona	III. „biegająca“	IV. „wrzeciono“
1 97	1 82	1 92	1 135
2 101	2 83	2 130	2 174
3 103	3 103	3 131	3 195
4 117	4 117	4 140	4 219
5 119	5 137	5 140	5 227
6 122	śred. 104,4	6 162	6 (378)
7 124		śred. 132	śred. 190
8 130			
9 131			
10 134			
11 135			
12 137			
13 140			
14 140			
15 146			
16 154			
17 167			
<hr/>			
śred. 129			

W następnej tabeli, Tabl. 4, podajemy wartości dla krwi poczwarek. Poczwarka „świeża“, tj. w ciągu pierwszych 3 dni po zapoczwarczeniu, wykazuje jeszcze taki sam wysoki poziom ciał redukujących, jak gąsienica „wrzecionowa“ tuż przed zapoczwarczeniem. Jeszcze wyżej wznosi się ten poziom na krótko przed wylęciem. Wartości nasze odnoszą się do ostatniego tygodnia przed wylęciem motyla, kiedy już na skrzydłach poczwarki zaznacza się rysunek imaginalny. Natomiast w ciągu okresu latencji, podczas długich miesięcy zimowania, zawartość ciał redukujących leży w granicach błędu na tym samym poziomie, co u żrącej gąsienicy.

Tab. 3.

Całkowita redukcja metodą Hagedorna-Jensena.

Poczwarka.		
I. Świeża	II. Zimująca	III. Przed wykluciem
1 133 ♂	1 77 ♂	1 257 ♀
2 180 ♀	2 86 ♀	2 278 ♀
3 191 ♀ i ♂	3 107 ♀	3 280 ♂
4 226 ♀	4 109 ♀	4 344
5 237 ♂	5 126 ♂	
<hr/>	6 127 ♂	<hr/>
śred. 193	7 133 ♂	śred. 292
	8 135 ♂	
	9 138 ♀	
	10 142 ♂	
	11 149 ♂	
	12 155 ♂	
	13 155 ♀	
	14 156 ♂	
	15 156 ♀	
	16 180 ♂	
	<hr/>	
	śred. 133	

Twierdzenie innych autorów, którzy znajdowali u poczwarki wartości wyższe niż u gąsienicy, opiera się prawdopodobnie na wciągnięciu do obliczeń także poczwarek młodych i poczwarek, zbliżających się do końca rozwoju.

Przegląd średnich wartości w zależności od wieku daje tabela 4-ta.

II. Redukcja całkowita przy odbiałczaniu kwasem wolframowym. W tabeli 5-tej zestawiliśmy wyniki oznaczeń całkowitej redukcji w krwi 14-stu gąsienic, 8-miu poczwarek krótko po zapoczwarczeniu, 6-ciu poczwarek w okresie diapauzy zimowej oraz 8-miu poczwarek w okresie wiosennego rozwoju.

Średnie wartości zestawiliśmy w 6-tej tabeli z odpowiednimi wynikami, uzyskanymi przy zastosowaniu do odbiałczania wodorotlenkiem cynku wedle oryginalnej metody Hagedorna. Widzimy, że cynk strąca ciała redukujące w ilości odpowiadającej 35 do 66 mg glukozy. Różnica 35 mg dla poczwarek w rozwoju jest z pewnością za niska, bo w tabeli 3-ciej

Tab. 4.

Redukcja metodą Hagedorna-Jensena w mg %
„glukozy“ na 100 ml krwi.

I Stadium	II Ilość doświadczeń	III Średnia	IV Dyspersja	V Dyspersja wartości średniej
1 Gąsienica żerująca	17	129	± 18	± 4,4
2 Gąsienica głodzona	5	104,4	± 21,7	± 9,6
3 Gąsienica „biegająca“	6	132	± 20,8	± 8,5
4 Gąsienica „wrzeczono“	6	190	± 31	± 13,9
5 Poczwarka świeża	5	193	± 33	± 14,3
6 Poczwarka zimująca	16	133	± 18,2	± 4,6
7 Poczwarka przed wylęciem	4	292	± 34	± 17

Tab. 5.

Redukcja całkowita przy odbiłczeniu wedle Folina:

I. Gąsienica	II. Poczwarka	III. Poczwarka	IV. Poczwarka
1 150	świeża	zimująca	w rozwoju
2 156	1 234 ♀	1 164 ♂	1 293 ♀
3 161	2 241 ♀	2 166 ♂	2 301 ♀
4 163	3 255 ♀	3 189 ♂	3 311 ♂
5 163	4 256 ♂	4 189 ♀	4 333 ♂
6 169	4 256 ♂	5 228 ♂	5 333 ♀
7 174	6 263 ♂	6 237 ♀	6 337 ♂
8 174	7 276 ♀	śred. 195 $\sigma = \pm 27,5$ $m = \pm 11,1$	7 346 ♀
9 175	8 289 ♂		8 361 ♂
10 178	śred. 259	śred. 327 $\sigma = \pm 21$ $m = \pm 7,5$	
11 180	$\sigma = \pm 16,6$		
12 180	$m = \pm 6,1$		
13 187			
14 204			
śred. 172			
$\sigma = \pm 12,6$			
$m = \pm 3,4$			

zebrano dane dla poczwerek w ostatnich dniach przed wylęgiem, zaś w tab. 5-tej poczwarki były znacznie mniej posunięte w rozwoju, a wartości redukcyjne wzrastają niewątpliwie w miarę dojrzewania motyla.

Tab. 6.

Odbiałczanie	Gąsienica	Poczwarka świeża	zimująca	w rozwoju
Folin	172	259	195	327
Hagedorn	129	193	133	292
Różnica	43	66	62	35

III. Redukcja niecukrowa. Nasuwa się z kolei pytanie, czy strącają się równoległe redukujące składniki cukrowe i niecukrowe, czy też przeważnie jedna frakcja. Dane tabeli 7-mej zawierającej wyniki redukcji na zimno w krwi gąsienic przy obu sposobach odbiałczania wykazują jasno, że cały ubytek przy strącaniu cynkiem dotyczy wyłącznie frakcji niecukrowej. Wynik ten pokrywa się z danymi piśmiennictwa: różni autorzy zalecali odbiałczanie wodorotlenkiem cynku z różnymi dodatkami (np. Somogyi) właśnie w celu usunięcia ciał redukujących niecukrowych. Zmniejszenie siły redukcyjnej w naszych badaniach jest mniej więcej tego samego rzędu, co strącanie dwuoksyfenilalaniny w badaniach Hellera i Świechowskie j.

IV. Glikemia prawdziwa. Wyniki redukcji na zimno, odjęte od całkowitej redukcji na gorąco, powinny dać wedle metody Hellera i Świechowskiej zawartość „prawdziwego“ cukru. Obliczenie dla krwi gąsienicy daje nam wartość 69 mg% glukozy. Dla sprawdzenia wartości metody wykonaliśmy u 12 gąsienic równoległe badania metodą fermentacyjną, oznaczając redukcję na gorąco przed i po fermentacji. Średnia wartość redukcyjna po fermentacji wynosi (tab. 8) 106,5 mg%, zatem różnica od wartości dla redukcji na zimno bez fermentacji wynosi tylko 3,5 mg% i leży całkowicie w granicach dyspersji. Niemniej różnica ta może być realna w razie obecności nie fermentujących cukrowców, redukujących na gorąco, a nie na zimno. Należy tu myśleć przede wszystkim

o glukozaminie, z której wytwarza się chityna skorupki poczwaraki.

Tab. 7.

Redukcja metodą Hagedorna na zimno w krwi żerujących gąsienic.

I. Odbiałczenie Zn/OH ₂	II. Odbiałczanie w. Folina
1 39	1 69
2 63	2 73
3 65	3 87
4 65	4 92
5 66	5 96
<hr/>	
śred. 59,6	6 96
$\sigma = \pm 10,2$	7 96
$m = \pm 4,6$	8 103
	9 110
	10 110
	11 111
	12 111
	13 111
	14 117
	15 118
	16 146
	<hr/>
	śred. 103
	$\sigma = \pm 18$
	$m = \pm 4,5$

Tab. 8.

Redukcja po fermentacji w krwi gąsienicy i zawartość glukozy, obliczona z ubytku redukcji przez fermentację — mg w 100 ml.

Odbiałczanie wedle Folina.

I. Redukcja niecukrowa	II. Glukoza
1 89	1 57
2 90	2 58
3 90	3 59
4 98	4 59
5 101	5 61
6 104	6 67
7 110	7 75
8 112	8 76
9 116	9 77
10 119	10 77
11 121	11 84
12 129	12 88
<hr/>	
śred. 106,5	śred. 69,8
$\sigma = \pm 13,0$	$\sigma = \pm 8,8$
$m = \pm 3,8$	$m = \pm 2,55$

U żrącej gąsienicy zawartość cukrów niefermentujących nie może stanowić uchwytnych ilości. Przeciętna bowiem z 12 indywidualnych oznaczeń glukozy metodą fermentacyjną wynosi u naszych gąsienic 69,8 mg% \pm 2,55, a więc praktycznie tyleż, co metodą Hellera-Świechowskiej. W tabeli 9-tej ze-

Tab. 9.

Zawartość glukozy w krwi gąsienicy obliczona :

1. jako różnica między redukcją na gorąco a redukcją na zimno — mg na 100 ml krwi.

	Strącanie :	
	A. kw. wolframowym	B. Zn/OH ₂
Na gorąco	172 \pm 3,4	129 \pm 4,2
Na zimno	103 \pm 4,5	59,6 \pm 4,6
Glukoza	69,0	69,4

2. jako różnica między redukcją na gorąco przed fermentacją i po fermentacji :

Przed	172	3. Bezpośrednio
Po	106,5	z tabeli 8 :
Glukoza	65,5	69,8

stawiliśmy wartości dla glukozy w krwi gąsienic wyliczone 4 sposobami: 1. metodą Hellera-Świechowskiej przy odbiałczaniu wedle Folina, 2. to samo przy odbiałczaniu w/g Hagedorna, 3. fermentacją z różnicy wartości średnich, 4. fermentacją jako średnią z 12 indywidualnych oznaczeń.

Wykazawszy w ten sposób równą przydatność obu metod do oznaczania „prawdziwego“ cukru (przy czym metoda Hellera-Świechowskiej góruje łatwością wykonania), podamy wyniki oznaczeń dla gąsienic głodzonych, dla okresu zapoczwarczenia i dla poczwarek.

Gąsienice głodzone wykazują znacznie niższy poziom cukru we krwi, niż żerujące. Różnica wynosi 32 mg, cała zatem obniżka ogólnej redukcji tłumaczy się zmniejszeniem zawartości cukru w krwi. W tym wypadku stosunek różnicy do sumy kwadratów dyspersji wynosi 5, różnica jest więc statystycznie zupełnie pewna. Poczwarka zimująca zawiera we krwi około 60 mg% cukru, a więc nieco mniej, niż żerująca gąsienica. U świeżej poczwarki znajdujemy redukcją zawartość cukru dwukrotnie większą, 130 mg%. Średnia zawartość cukru oznaczona fermentacją, wynosi 108,5 mg. Wprawdzie różnica 21,5 mg

Tab. 10.

Zawartość glukozy w krwi w mg %.

I. Gąsienica głodzona	II. Poczwarka zimująca	III. Świeża poczwarka (metodą Hellera-Swiechowskiej)	IV. Świeża poczwarka metodą fermentacyjną	V. Poczwarka w rozwoju Glukoza met. Hellera-Swiechowskiej
1 23	1 36 ♂		1 66	
2 27	2 41 ♂	1 85	2 94	1 129 ♀
3 33	3 47 ♂	2 86	3 106	2 132 ♀
4 44	4 52 ♂	3 97	4 109	3 162 ♂
5 59	5 57 ♂	4 112	5 114	4 166 ♂
<hr/>	6 62 ♂	5 115	6 123	5 171 ♂
śred. 37,2	7 65 ♂	6 116	7 127	6 176 ♀
$\sigma = \pm 13$	8 66 ♂	7 142	8 127	7 181 ♀
$m = \pm 5,8$	9 68 ♂	8 150	<hr/>	8 184 ♂
	10 73 ♀	9 160	śred. 108,5	9 196 ♂
	11 73 ♂	10 162	$\sigma = \pm 19,2$	<hr/>
	12 83 ♀	11 163	$m = \pm 6,9$	śred. 166,3
	<hr/>	12 174		$\sigma = \pm 18,5$
	śred. 59,7	<hr/>		$m = \pm 6,2$
	$\sigma = \pm 13,4$	śred. 130		
	$m = \pm 3,9$	$\sigma = \pm 36,5$		
		$m = \pm 10,4$		

$$\frac{130 - 108,5}{21,5} \sqrt{\frac{21,5}{10,4^2 + 6,9^2}} = \frac{21,5}{12,5} = 1,7$$

przy dużym rozrzucie nie jest statystycznie pewna, ale uważamy ją mimo to za realną. Świadczy ona o zawartości cukrów nie fermentujących. W tym wypadku myślimy o glukozaminie, w związku z wytwarzaniem chityny przy zapoczwarczeniu.

Dyskusja wyników.

Wyniki dotychczasowych badań nad ciałami redukcyjnymi w krwi owadów doprowadziły do stwierdzenia, że ciała te występują w krwi owadów w ilości podobnej, jak w krwi kręgowców, że jednak główną ich frakcją stanowią ciała niecukrowe. Badania te jednak nie dały pewnych podstaw do ilościowego oznaczenia cukru oraz redukcji niecukrowej, z powodu dużych rozbieżności w wynikach różnych autorów, a bardzo dużej dyspersji w wynikach poszczególnych autorów. Naogół bowiem badano krew różnych gatunków w różnych momentach rozwoju, co daje oczywiście wyniki nie nadające się do jednolitego opracowania. W przeciwieństwie do tego nasza praca ograniczyła się do jednego gatunku, posługując się jedną metodą w dwu różnych modyfikacjach, których wyniki mają nieco odmienne znaczenie. Ogółem wykonaliśmy 174 oznaczeń, prawie wyłącznie na krwi niezmięszanej, pobieranej od jednego osobnika. Nasze wilczomlecзки pochodziły z hodowli i były przed użyciem do doświadczenia przez szereg dni obserwowane, tak że wiek i stadium rozwojowe były dokładnie znane. W tych warunkach zebranie tak dużego materiału doświadczalnego rozciągnęło się na lata. Doświadczenia były robione w latach 1937—1939 w Krakowie oraz w latach 1948—49 we Wrocławiu. Otrzymaliśmy jednak dzięki temu materiał, który dał się opracować statystycznie, pozwalając się zorientować w wartości dowodowej poszczególnych przeciętnych wyników.

Metoda Hagedorna-Jensena w modyfikacji Hellera i Świechowskiej pozwala przy zastosowaniu fermentacji oznaczyć osobno cukry fermentujące, osobno zaś sumę ciał niefermentujących, tak cukrów jak i ciał niecukrowych. Ta sama metoda z zastosowaniem redukcji na zimno rozdziela całość ciał redukujących na cukry — tak fermentujące jak i niefermentujące oraz na ciała redukujące niecukrowe. Metoda ta mogłaby prowadzić do błędnych wyników, gdyby występowały

w krwi ciała fermentujące, mające zdolność redukowania na zimno. Ciał takich jednak dotąd nie poznano.

Na zakończenie przytoczymy z nieogłoszonej pracy H e l l e r a próbę zidentyfikowania poszczególnych ciał redukujących, występujących w hemolimfie owadów.

1. Ciała fermentujące, redukujące na gorąco, nie redukujące na zimno: Wchodzi tu w rachubę: glukoza, jako najczęstszy cukier zwierzęcy, fruktoza oraz galaktoza. Próby jakościowe na fruktozę wypadły ujemnie. Badań w kierunku galaktozy dotąd nie przeprowadzono, ale obecność jej jest raczej wątpliwa. Możemy więc przyjąć zgodnie z wszystkimi dotychczasowymi autorami, że cukrem hemolimfy jest g l u k o z a.

2. Ciała redukujące na gorąco, lecz nie na zimno, niefermentujące: laktoza, pentozy, kwasy glukuronowe i aminocukry. Doświadczeń i w tym kierunku nie wykonano, ze względów teoretycznych należy myśleć przede wszystkim o g l u k o z a m i n i e. Zamierzamy badania nad glukozaminą rozpocząć w bieżącym roku.

3. Ciała niecukrowe, redukujące na zimno: Z ciał tej grupy stwierdzono występowanie w świecie zwierzęcym glutationu, cysteiny, tioneiny, kwasu moczowego, kreatyniny, witaminy C, dwuoksyfenilalaniny i fenoli o typie krezolu. Trzy pierwsze, wedle badań H e l l e r a, nie występują w hemolimfie w uchwytnej ilości. Świadczy o tym ujemny wynik charakterystycznych odczynów barwnych tych ciał i brak hamowania redukcji na zimno pod wpływem formaldehydu. Kwas moczowy jest stałym składnikiem hemolimfy w ilości od 10 do 20 mg%, co odpowiada redukcji 5—10 mg% glukozy. Ilościowo zatem redukcja od kwasu moczowego stanowi drobną część całej oznaczanej redukcji na zimno. Kreatyna u bezkręgowców nie występuje. Witamina C może tu wchodzić w rachubę, odnośne badania są w projekcie.

4. Ciała nie redukujące, a fermentujące, jak sacharoza i ester Corich musiały by być brane pod uwagę tylko wtedy, gdyby cukry oznaczano metodą fermentacyjną bezpośrednio, np. manometrycznie na podstawie wywiązywanego CO₂.

W naszym wypadku zatem jako składniki redukujące wcho-

dzą pod uwagę przede wszystkim glukoza jako składnik fermentujący i dwuoksyfenilalanina (dofa) z chinonami i fenolami. Na obecność i ewentualną rolę dofy zwrócili uwagę Heller i Świechowska. W 5 oznaczeniach Hellera w krwi poczwariki zawartość dofy (metodą Arnowa⁹) wynosiła 23, 40, 36, 26 i 20 mg%, średnio 29 ± 4 mg%, co odpowiada redukcji 58 mg% glukozy. Reakcję tę dają jednak również fenole, których obecność u owadów wykazały ostatnio badania Hackmana i współprac (10).

Jako najbliższe zadanie stawiamy sobie badanie hemolimfy na witaminę C, glukozaminę i dokładniejsze oznaczenie frakcji fenolowej w różnych okresach rozwojowych wilczomlecza.

Prof. Hellerowi dziękujemy za pozwolenie wykorzystania jego nieogłoszonych materiałów, za pomocną krytykę i rady.

Institut Zoologiczny Uniwersytetu we Wrocławiu,
Zakład Fizjologii Zwierząt, Kierownik: Prof. Dr Józef Heller.

L i t e r a t u r a

1. G. H. Bishop, A. P. Briggs i S. Ronzoni. J. B. Chem. 1925. 66. 77.
2. A. M. Hemmingsen. Scand. Arch. f. Phys. 1924. 45. 205.
3. J. Heller i A. Mokłowska. Bioch. Z. 1930. 219. 473.
4. S. Demjanowski i Prokoffjewa: Bioch. Z. 1935. 275. 455.
5. M. Florkin: Bruksela 1937, str. 1—69.
6. H. C. Hagedorn i B. N. Jensen. Bioch. Z. 1923. 135. 47.
7. Folin
8. J. Heller i W. Świechowska. Acta. Biol. Exper. 1939. 13. 24.
9. R. H. Hackman, M. G. M. Pryor i A. R. Todd. Bioch. J. 1948. 43. 474.

Summary.

Reducing substances were estimated in the blood of the caterpillar and pupa of the hawk-moth using the method of Hagedorn and Jensen after deproteination with tungstic acid.

Non-sugar reducing substances were estimated after yeast-fermentation or applying the reduction in 37°C after Heller and Świechowska. The results of both methods are identical, except for fresh pupa, where the apparent glucose after fermentation is higher, probably owing to glucosamine-content of the blood.

Explanation of tables :

All values in the tables mean the reduction in 100 ml haemolymph, expressed as mg of glucose.

Table 1. Reduction after Folin - Wu A: caterpillars B: pupae.

Table 2. Total reduction after Hagedorn - Jensen in caterpillar: I feeding, II starved, III at the begin of pupation, IV „spinderform“.

Table 3. Total reduction after Hagedorn - Jensen. I Just pupated, II overwintering pupa, III Near to emerge.

Table 4. Averages values from tables 2 and 3. I Stage, II Number of experiments, III Mean, IV standart deviation, V st. dev. of the Mean.

Table 5. Total reduction after deproteinisation with tungstic acid. I Caterpillar, II Just pupated, III Diapausing pupa, IV Pupa during development.

Table 6. Losses in reducing substances when deproteinating after Hagedorn and Jensen.

Table 7. Reduction in cold in the blood of feeding larva. Deproteination I: with $Zn/OH/2$, II: with tungstic acid.

Table 8. I. Non-sugar reduction in the blood of the caterpillar after fermentation. II. True sugar. calculated from I. and total reduction.

Table 9. Glucose in the blood of feeding larva: 1) calculated as difference between the reduction in $100^{\circ}C$ and in the cold. Deproteinized: A: with tungstic acid, B: with $Zn/OH/2$. 2) calculated as difference between total reduction and reduction after fermentation.

Table 10. Glucose in the blood: I. Starving larva, II. Pupa (in diapausis), III. Just pupated-cold-reduction method, IV. The same fermentation method. V. Developing pupa, cold-reduction method.