

ALEKSANDER BRZÓSTOWICZ, EDWARD GRABIKOWSKI, ANTONI
MURKOWSKI

Akademia Rolnicza w Szczecinie

LUMINESCENCYJNE METODY OCENY MROZODPORNOŚCI ZBÓŻ OZIMYCH

Zboża ozime są uprawiane na ok. 80% areалу trzech podstawowych zbóż. Ważnym czynnikiem decydującym o wierności plonowania zbóż ozimych jest ich zimotrwałość, a szczególnie mrozoodporność. Zimotrwałość roślin uzależniona jest od wielu czynników i oprócz odporności na niskie temperatury zależy od ich odporności na szereg innych niesprzyjających czynników klimatycznych, edaficznych i biotycznych. Wymienione czynniki mogą występować z różnym natężeniem i w różnych kombinacjach podczas pierwszych miesięcy wegetacji powodując straty spowodowane wyprzieniem, wymakaniem, wysmaleniem, a także rozerwaniem mechanicznym. Poziom mrozoodporności roślin jest uwarunkowany czynnikami genetycznymi i zewnętrznymi. Zależy on też w dużym stopniu od etapu wzrostu i rozwoju rośliny. Według ocen niektórych hodowców, u pszenicy ozimej istnieje większe zróżnicowanie odmianowe niż u jęczmienia, a cechy genetyczne przeważają nad wpływem pozostałych czynników [7].

Uzyskiwanie przez roślinę odporności na mróz czyli hartowanie jest procesem dwufazowym. Hipotezy dotyczące mechanizmów zjawisk występujących podczas całego procesu hartowania są zróżnicowane [17, 19]. Pełniejszy pogląd na mrozoodporność i hartowanie uzyska się z pewnością wówczas, gdy oprócz aspektów fizjologicznych i biologicznych uwzględni się również i biofizyczne.

Zarówno gospodarcza jak i poznawcza ważność problemu wymaga opracowania prostych w stosowaniu, tanich i szybkich metod oceny mrozoodporności. Metody takie są szczególnie oczekiwane przez hodowców nowych odmian roślin uprawnych.

Metody oceny zimotrwałości i mrozoodporności

Najbardziej wiarygodną, ale niestety i czasochłonną metodą badania zimotrwałości, jest ocena roślin w polu. Posługując się tą metodą w warunkach ostrej zimy można ocenić odporność roślin na wpływy całego

zespołu niekorzystnych warunków okresu zimowania. Ponieważ mroźne zimy w krajach Europy Środkowej bywają przeciętnie raz na 10—12 lat, w celu selekcji odmian stosuje się metody prowokacyjne [15]. Metody te polegają na wzmocnieniu działania mrozu poprzez sztuczne usuwanie pokrywy śnieżnej z poletek lub polewanie wodą w celu wytworzenia sztucznej pokrywy lodowej.

Podobnym celem służy także wysiew roślin w skrzynkach wypełnionych ziemią i ustawionych na stołach ok. 1 m nad powierzchnią gruntu. Dodatkowe zabezpieczenie skrzyń przed opadem śniegu powoduje, że warunki zimowania roślin są szczególnie trudne.

Badanie i ocena mrozoodporności jak również i hartowania roślin w różnych fazach rozwojowych w ciągu całego roku umożliwiają urządzenia techniczne takie jak szafy i komory chłodnicze, chłodzone szklarnie i hale wegetacyjne. Przydatność wymienionych urządzeń jest sprawdzona i doceniana przez hodowców, jednakże z powodu ich ceny oraz kosztów instalacji nie są one rozpowszechnione w naszym kraju [6].

Z powyższych względów duże powodzenie zyskują pośrednie metody oceny mrozoodporności, które można sklasyfikować w trzech grupach: plazmolityczne, konduktometryczne i oparte na przyżyciowym barwieniu komórek [15, 18]. Przy użyciu wymienionych metod można bezpośrednio określać uszkodzenia mrozowe, a z nich pośrednio wnioskować o mrozoodporności roślin.

Metody plazmolityczne zostały opracowane pod koniec lat trzydziestych i są często stosowane do oceny stopnia uszkodzenia komórek przez mróz. Podstawą tej metody są obserwacje plazmolizy lub deplazmolizy zachodzącej w przemrożonych komórkach roślinnych. Metody plazmolityczne są pracochłonne i nie nadają się do szybkich seryjnych oznaczeń.

Metody oparte na pomiarach przewodności należą również do częściej stosowanych i opracowano kilka ich modyfikacji. Najczęściej polegają one na pomiarze przewodności elektrycznej wody, w której umieszczono badaną tkankę roślinną. Przewodnictwo elektryczne (konduktancja) wzrasta proporcjonalnie do ilości elektrolitów wydostających się z komórek roślinnych uszkodzonych wskutek zaniku półprzepuszczalnych właściwości błon cytoplazmatycznych. Pomiar konduktometryczny można również przeprowadzić bezpośrednio w tkance roślinnej posługując się elektrodami igłowymi lub płytkowymi. Metody konduktometryczne należą do szybkich i nowoczesnych, jednakże nadają się raczej do oceny lokalnych uszkodzeń tkanki. Przy ich użyciu można określić zmiany przepuszczalności błon cytoplazmatycznych pod wpływem hartowania oraz na skutek działania bodźców świetlnych [18].

Metody oparte na przyżyciowym barwieniu cytoplazmy polegają na ocenie aktywności życiowej komórek, które będąc żywe, dzięki własno-

ciom błon mają zdolność akumulowania niektórych barwników (np.: rodamina, erytrozyna i in.), bądź też za pomocą układów enzymatycznych utleniają niektóre związki chemiczne zmieniając ich własności optyczne (np.: błękit metylowy lub TTC). Ten ostatni związek, chlorek 2,3,5trójfenylo-tetrazoliowy (krót TTC) został wykorzystany po raz pierwszy w połowie lat pięćdziesiątych. TTC łatwo rozpuszcza się w wodzie i jest bezbarwny, natomiast dehydrogenazy żywej komórki redukują go do czerwono zabarwionego formazanu, który po wyekstrahowaniu etanolem w podwyższonej temperaturze oznaczany jest spektrofotometrycznie. W omawianej metodzie wymagana jest inkubacja badanej tkanki w roztworze buforowym o określonym stężeniu TTC i zawierającym środek zwilżający. Inkubacja odbywa się w ściśle określonej temperaturze w ciemności i trwa kilkadziesiąt godzin. Obecność bakterii lub innej mikroflory na badanych próbkach może niekiedy spowodować duży błąd w ocenie stopnia uszkodzenia tkanki. Powyższa metoda mimo swoich zalet jest dość czasochłonna bowiem wymaga 20—30 godzin inkubacji [18]. Wśród metod pośrednich szczególnie atrakcyjne są metody umożliwiające wykorzystanie badanych roślin do dalszej hodowli. Do metod tych należą bezpośrednie pomiary konduktometryczne oraz metody luminescencyjne [7, 18]. Wśród metod luminescencyjnych mogących w przyszłości służyć do diagnostyki odporności roślin na szkodliwe czynniki środowiska szczególną rolę spełniają: ultrasłaba biochemiluminescencja, elektrochemiluminescencja oraz opóźniona luminescencja aparatu fotosyntetycznego. Detekcja wymienionych luminescencji może służyć do oceny mrozoodporności roślin i w tym celu zestawia się różnego typu stanowiska oraz opracowuje się specjalne metody pomiarów.

Zastosowanie detekcji ultrasłabej biochemiluminescencji do oceny mrozoodporności roślin

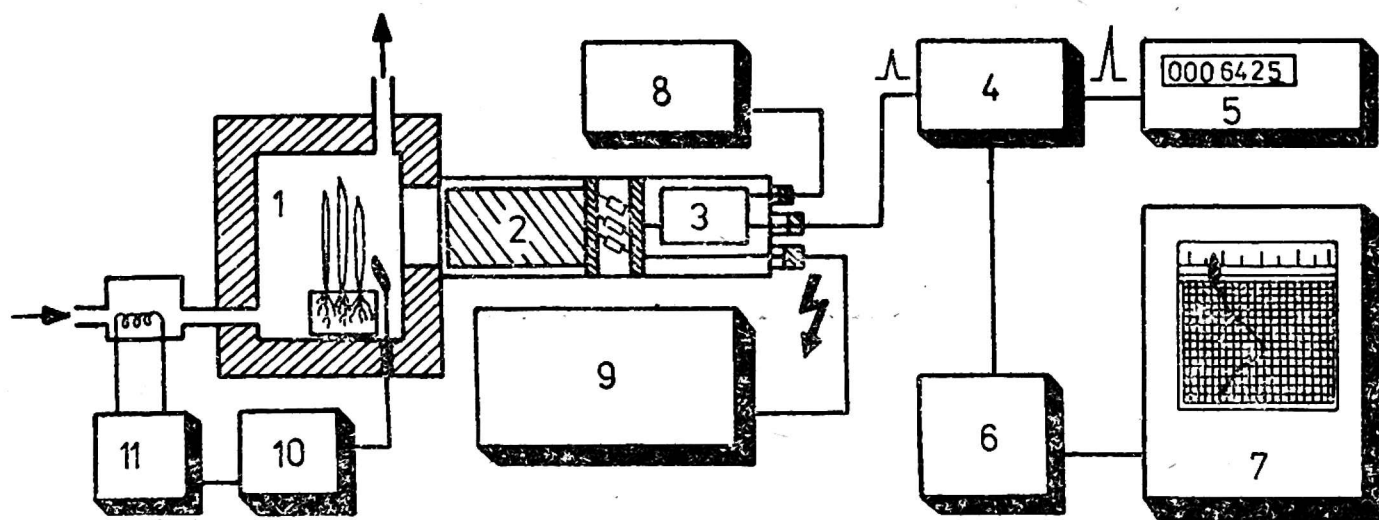
Ultrasłaba biochemiluminescencja (UBCL), wykryta w roku 1954, jest emitowana przez prawie wszystkie żywe komórki zarówno roślinne jak i zwierzęce [4, 35]. Główną przyczyną emisji tego światła jest złożony proces chemiluminescencyjny zapoczątkowany utlenieniem lipidów w mitochondriach oraz błonach cytoplazmatycznych [25, 26, 32, 40].

Wpływ czynników zewnętrznych naruszających lipidowo-białkowe kompleksy błon komórkowych lub zakłócających transport endogennych antyutleniaczy do lipidów strukturalnych powodują narastanie reakcji łańcuchowej utleniania i związanej z tym emisji UBCL.

Natomiast niski i stabilny poziom spontanicznej UBCL tkanek roślinnych świadczy o właściwym stężeniu swobodnych rodników, dostatecznej

ilości endogennych antyutleniaczy doprowadzonych do błon komórkowych, sprawnym ich transporcie na poziomie subkomórkowym oraz ogólnie stacjonarnym i regulowanym przebiegu metabolizmu [1, 8, 10, 20]. Zagadnienie wpływu ekstremalnie niskich i wysokich temperatur na emisję UBCL jest tematem licznych prac uczonych radzieckich (Tarusowa, Wiesiołowski, Doskocza, Gasanowa, Agawierdiejewa i in.) prowadzonych od połowy lat sześćdziesiątych [1, 8, 10, 33, 34, 35, 36].

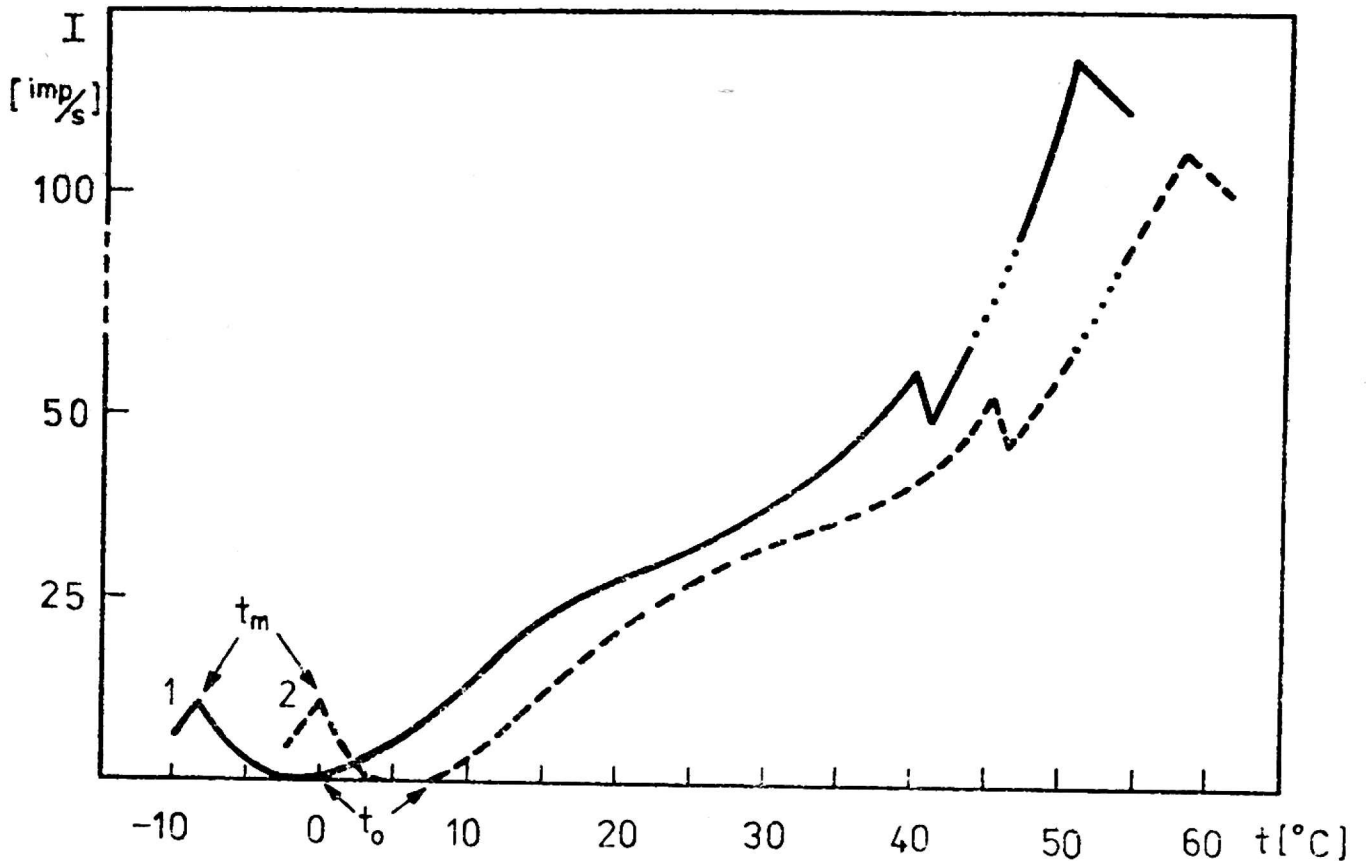
Stwierdzono, że niska temperatura dodatnia powoduje początkowo obniżenie emisji UBCL aż do poziomu tła. Początek niskotemperaturowego przedziału wyznacza temp. t_0 (rys. 2). Obniżenie temperatury do wartości ujemnych powoduje szybkie narastanie natężenia świecenia nazwanego degradacyjnym, ponieważ jego przyczyną jest uszkodzenie struktury i zakłócenie funkcji komórek. Przystają sprawnie działalność autoregulacyjne mechanizmy subkomórkowe, a w szczególności systemy endogennych antyutleniaczy, które regulują i hamują reakcje utleniania w komórce roślinnej. Przy dalszym obniżaniu temperatury następuje wzrost emisji UBCL aż do osiągnięcia maksimum w temp. t_m , a następnie nieodwracalny spadek do poziomu tła (rys. 2). Niskotemperaturowy wzrost UBCL można tłumaczyć uaktywnieniem np. degradacyjnych procesów autoutleniania rodnikowego składników lipidowych przy ograniczonym dopływie endogennych antyutleniaczy. Do oceny mrozoodporności używa się zwykle kilkadziesiąt sztuk etiolowanych kiełków, które rosły 4—5 dni w temperaturze pokojowej.



Rys. 1. Schemat blokowy stanowiska pomiarowego do oceny mrozoodporności roślin poprzez detekcję ultrasłabej biochemiluminescencji. Objasnienia w tekście.

Do detekcji UBCL używa się najlepszych, wyselekcjonowanych fotopowielaczy o bardzo małym poziomie szumów, pracujących w układzie zliczania impulsów jednoelektronowych [8, 9, 26, 29, 35].

Schemat blokowy typowego zestawu, używanego do oceny mrozood-



Rys. 2. Przebieg termogramów ultrasłabej biochemiluminescencji roślin pszenicy należących do odmiany mrozoodpornej — 1 (Moskiewska 2453) i mało odpornej na mróz — 2 (Apulikum 77/2) (wg 9).
Objaśnienia w tekście.

porności poprzez detekcje UBCL przedstawiono na rys. 1. Badany obiekt (np. etiolowane kiełki) umieszcza się w światłoszczelnej komorze pomiarowej (1), przez którą przepuszcza się strumień oziębionego i osuszonego powietrza. Temperaturę w kamerze reguluje się poprzez ogrzewanie oziębionego powietrza grzałką, której moc jest regulowana przez zasilacz (11). Zasilacz ten jest z kolei sterowany przez mostkowy układ pomiaru temperatury (10), którego jedno ramię stanowi termistor umieszczony w kamerze. Część kwantów światła emitowanych przez badany obiekt przechodzi przez okienko kamery i pada na fotokatodę fotopowielacza (2), na wyjściu którego pojawiają się impulsy napięciowe. Impulsy te po przejściu przez wtórnik katodowy (3) zostają podane na wzmacniacz impulsowy (4), skąd następnie przekazywane są na przelicznik elektronowy (5) oraz integrator liniowy (6). Integrator całkuje impulsy w zadanych odstępach czasu, a uśrednioną wartość, będącą miarą szybkości zliczania impulsów wskazuje i zapisuje rejestrator kompensacyjny (7). Wtórnik katodowy jest zasilany przez stabilizowany zasilacz (8), a fotopowielacz jest zasilany przez wysokonapięciowy zasilacz stabilizowany (9).

Dla różnych roślin dobierano różną szybkość obniżania temperatury. Przy badaniu mrozoodporności różnych odmian pszenicy przyjęto $0,4^{\circ}\text{C}$ w ciągu 1 minuty [9]. Termogramy UBCL dwóch odmian pszenicy, które

kontrastowo różnią się mrozoodpornością przedstawiono na rys. 2. Linia ciągłą zaznaczono termogram odmiany mrozoodpornej, a linią przerywaną przedstawiono przebieg luminescencji odmiany wrażliwej. U odmiany mrozoodpornej — Moskiewska 2453 można zauważyć wyraźne przesunięcie zarówno punktu t_0 (początku niskotemperaturowego przedziału) jak i t_m (niskotemperaturowego pik) w stronę temperatur niskich porównując z analogicznymi punktami na termogramie odmiany mało odpornej — Apulikum 77/2. Na tym samym rysunku można zauważyć podobne „piki” w zakresie temperatur dodatnich, które według autorów (Doskocz, Tarusowa i Agawierdiejewa) świadczą o odporności roślin na podwyższone temperatury. Poza zakresem pierwszego „piku” zaczyna się obszar niekontrolowanych i nieodwracalnych procesów prowadzących do śmierci rośliny („pik” drugi). Obszar pomiędzy dwoma dodatnimi „pikami” nazwano zakresem temperatur letalnych.

Tabela 1

Temperaturowe wskaźniki mrozoodporności niektórych odmian pszenicy uprawianych w różnych strefach klimatycznych [wg 9].

Odmiana	t_m [°C]	t_n [°C]	Rejon uprawy
Saratowska 29	—7	0	Okręg omski
Moskiewska 2453	—7	0	Okręg moskiewski
Dalekowschodnia	—7	1	Okręg amurski
Ulianawka	—6	2	Powolże
Lgowska 873	—4	3	Okręg kurski
Mironowska 808	—3	3	Ukraina
Białocerkiewska 198	—3	4	Ukraina
Bezostna 1	—3	5	Ukraina
PPG 186	—2	5	Okręg briański
Cluj 722	—2	5	Rumunia
Casau	—1	6	Węgry
Nord desprez	—1	7	Francja
Apulikum 77/2	—1	7	Azerbejdżan
Ponchean	0	7	Francja
Safedaki	0	7	Tadżykistan
Nadmerbebener	0	7	NRD

W tabeli 1 umieszczono temperaturowe wskaźniki mrozoodporności kilkunastu odmian pszenicy uzyskane z termogramów podobnych do poprzednio omawianych [wg 9].

Metoda oceny mrozoodporności roślin poprzez detekcję UBCL nie znalazła szerszego zastosowania bowiem stawia bardzo wysokie wymagania techniczne układowi fotometrycznemu, a konieczność użycia roślin etiolowanych przekreśliła możliwość ich hartowania przy udziale świa-

tła. U roślin niehartowanych różnice odmianowe nie są duże, a uzyskane wyniki nieraz trudne do interpretacji.

Elektroluminescencyjna metoda pomiaru mrozoodporności roślin

Szereg faktów doświadczalnych wskazuje na udział endogennych antyutleniaczy w ochronie lipidowego składnika błon komórkowych przed destrukcją spowodowaną niską temperaturą, a tym samym na istotną rolę antyutleniającej aktywności (AOA) w kompleksowo rozumianym zjawisku mrozoodporności. Niektórzy badacze wiążą zwiększoną mrozoodporność roślin nie tylko z ilością antyutleniaczy w tkankach roślinnych, ale także z zachowaniem ich dużej aktywności w niskich temperaturach co prawdopodobnie jest uwarunkowane ochronną rolą fosforu organicznego nagromadzonego we frakcji fosfolipidowej [36].

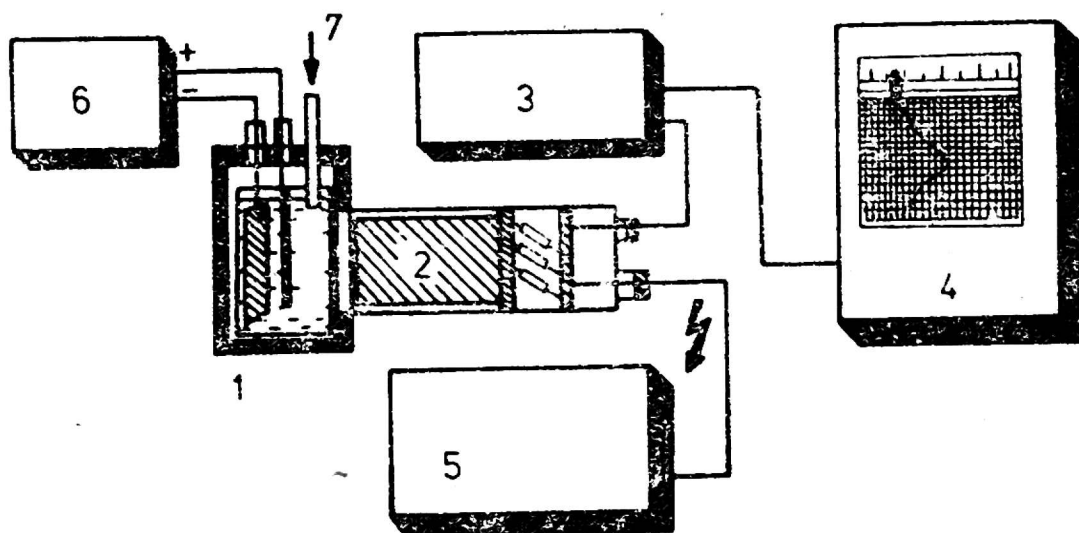
Równolegle opracowano metody oceny mrozoodporności poprzez bezpośredni pomiar AOA sumarycznej frakcji lipidów i fosfolipidów z tkanek roślinnych lub pomiar AOA związków rozpuszczalnych w wodzie.

Według Agawierdiejewa bardziej przydatna w praktyce okazała się elektroluminescencyjna metoda pomiaru AOA we frakcji lipidowej [2, 9]. Zasadą tej metody jest pomiar wpływu odmierzonej ilości lipidowego ekstraktu na zmianę elektroluminescencji (ECL), powstającej podczas elektrochemicznego utleniania modelowych układów. Jako układ modelowy emitujący światło podczas elektrolizy wybrano nasycony roztwór cytrynianu sodu w metanolu. Badano mrozoodporność nasion i etiolowanych kiełków, które poddano 10-minutowej ekspozycji w zadanej temperaturze, a następnie zamrażano w ciekłym azocie i szybko homogenizowano.

Frakcję lipidową uzyskiwano poprzez ekstrakcję homogenatu eterem naftowym lub mieszaniną chloroformu z metanolem, a lipidy i fosfolipidy wytrącono lub wydzielano chromatograficznie na żelu krzemionkowym. Uzyskane z tkanek roślinnych sumaryczne frakcje lipidów i fosfolipidów posiadają zróżnicowaną zdolność do gaszenia stacjonarnego poziomu indukowanej ECL w zależności od stanu fizjologicznego roślin oraz stopnia ich uszkodzenia temperaturowego. Jako standardu dla określenia względnej AOA wybrano α — tokoferol, znany endogenny antyutleniacz w organizmach roślinnych i zwierzęcych. Jako względną jednostkę hamującego efektu AOA przyjęto zmianę natężenia emisji ECL wywołaną przez wprowadzenie α — tokoferolu w stężeniu $1,25 \cdot 10^{-4}$ mol/l.

Według autorów metody była to najmniejsza ilość α -tokoferolu, która w sposób zauważalny i powtarzalny tłumiała stacjonarną emisję ECL [9].

Schemat układu pomiarowego do oceny AOA metodą rejestracji indukowanej ECL przedstawia rys. 3.



Rys. 3. Schemat blokowy stanowiska pomiarowego do rejestracji indukowanej elektrochemiluminescencji. Objasnienia w tekście.

W światłoszczelnej kamerze pomiarowej (1) znajduje się elektrolityczna komórka wypełniona standardowym roztworem cytrynianu sodu w alkoholu metylowym. Anodą jest platynowa igła ϕ 0,5 mm znajdująca się w ognisku parabolicznie wygiętej katody. Przez roztwór przepuszcza się stabilizowany prąd o natężeniu kilku miliamperów (np. 3 mA), który doprowadzony jest z elektrycznego stabilizatora prądu (6). Do komórki elektronicznej można wprowadzić odmierzoną ilość (1 ml) ekstraktu lipidowego przez specjalną rurkę (7). Detektorem ECL jest fotopowielacz (2) pracujący w układzie prądowym i zasilany przez wysokonapięciowy zasilacz stabilizowany (5).

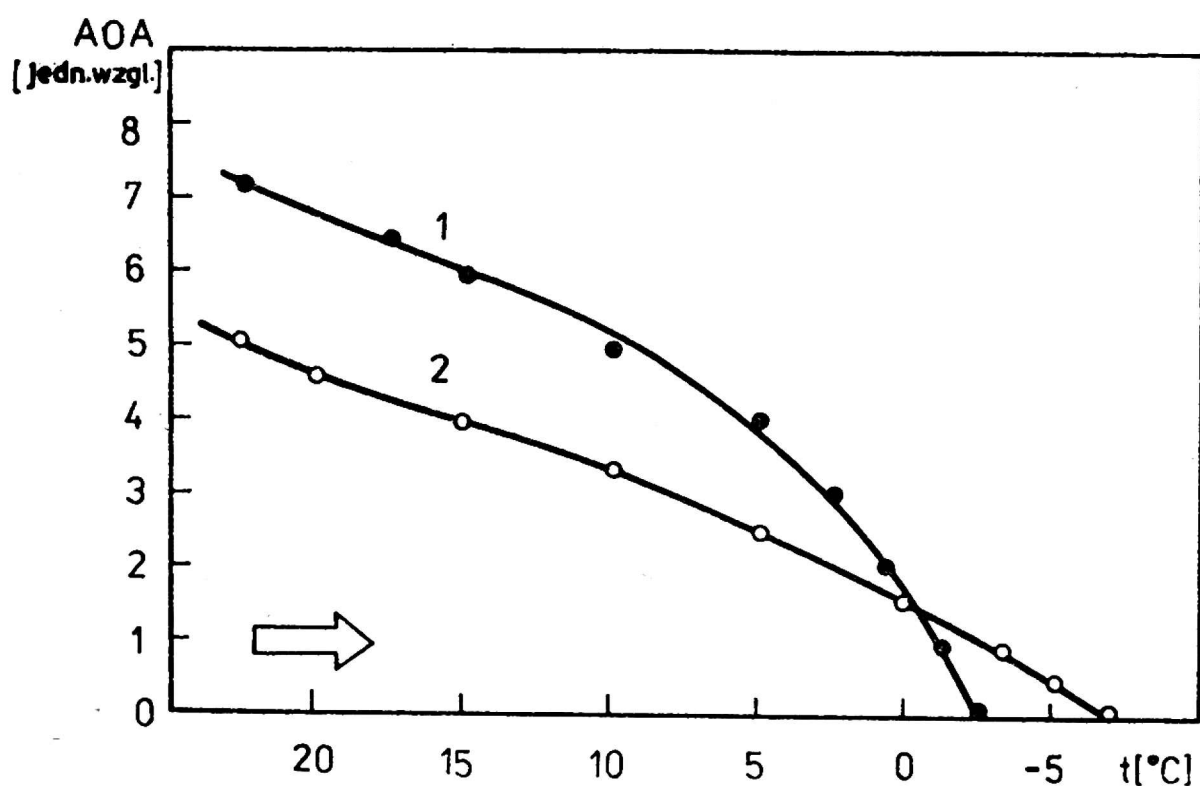
Sygnal z fotopowielacza zostaje wzmocniony przez wzmacniacz prądu stałego (3) i przekazany na rejestrator kompensacyjny (4).

Na rys. 4 przedstawiono przebieg zmian AOA frakcji lipidowej etiolowanych kielków dwóch odmian pszenicy różniących się kontrastowo poziomem mrozoodporności. Strzałka wskazuje na kierunek zmiany temperatury

AOA obu odmian osiąga wartość 0 w temperaturach zbliżonych do ich t_m (niskotemperaturowych „pików”) uzyskanych poprzez detekcję UBCL (rys. 2).

Potwierdzałoby to przytoczoną uprzednio hipotezę iż przyczyną UBCL jest reakcja utleniania lipidowego składnika błon biologicznych oraz wskazywałoby na istotną rolę antyutleniaczy w utrzymaniu emisji ultrasłabej luminescencji na niskim, stacjonarnym poziomie.

Wskaźniki AOA lipidowych frakcji nasion i kielków odmian pszenicy mrozoodpornych i mało odpornych na mróz przedstawiono w tabeli 2. Odmiany bardziej mrozoodporne (Moskiewska, Saratowska) mają niższy



Rys. 4. Wpływ niskich temperatur na aktywność antyutleniającą frakcji lipidowej z kiełków pszenicy odmiany mrozoodpornej — 2 (Moskiewska 2453) i odmiany mało odpornej na mróz — 1 (Apulikum 77/2) (wg 9). Objaśnienia w tekście.

Tabela 2

AOA ekstraktu lipidowego nasion i kiełków czterech odmian pszenicy wyznaczona w temperaturze 23°C [wg 9]

Odmiana	AOA jednostki względne	
	nasiona	kiełki
Moskiewska 2453	5,61 ± 0,32	5,11 ± 0,45
Saratowska 29	5,45 ± 0,47	4,94 ± 0,31
Apulikum 77/2	7,40 ± 0,20	7,22 ± 0,25
Safedaki	7,23 ± 0,83	7,16 ± 0,48

poziom AOA zarówno w nasionach jak i w kiełkach. W odróżnieniu od nich odmiany wrażliwe (Apulikum, Safedaki) mają w tej temperaturze wyraźnie wyższą AOA co pozwala im na wegetację i sprawny metabolizm w podwyższonych temperaturach, które dla odmian mrozoodpornych są zabójcze.

Badano także AOA kilku odmian pszenicy zahartowanych w sposób naturalny w polu, a następnie poddawanych działaniu niskich tempera-

tur (+5, 0°, -7, -17°, -27°C). Stwierdzono, że w niskich temperaturach AOA frakcji lipidowej, uzyskanej z liści pszenic ozimych, może być wskaźnikiem ich mrozoodporności. U roślin bardziej odpornych lub zahartowanych poziom AOA spada wraz z obniżeniem temperatury wolniej niż u roślin wrażliwych. W badanych, niskich temperaturach nastąpiło odwrócenie zależności przedstawionych w tabeli 2 i AOA pozostała najwyższa u roślin mrozoodpornych [22].

Otrzymane wyniki świadczą, że strukturalna przebudowa komórek roślin w procesie hartowania jest ściśle powiązana ze zmianami w organizacji struktury błon lipoproteidowych. Hartujący wpływ niskiej temperatury na rośliny związany jest z mobilizacją wszelkich mechanizmów obronnych a zwłaszcza AOA błon komórkowych i cytoplazmy.

Przy użyciu opisanej metody nie można ocenić wpływu wzajemnego oddziaływania oraz lokalizacji poszczególnych komponentów błon lipoproteidowych na całkowitą ich aktywność antyutleniającą *in vivo*. Mimo tych ograniczeń elektroluminescencyjna metoda pomiaru AOA może być przydatna do oceny odporności organizmów roślinnych na różne niesprzyjające czynniki środowiska, a tym samym i na niskie temperatury [14, 16, 35].

Wykorzystanie detekcji opóźnionej luminescencji aparatu fotosyntetycznego do oceny mrozoodporności roślin

Opóźniona luminescencja (OL) została wykryta w roku 1951 i określona jako słabe, czerwone promieniowanie emitowane z funkcjonującego aparatu fotosyntetycznego po wygaszeniu fluorescencji [30]. Przy użyciu dostatecznie czułych detektorów światła można OL rejestrować przez kilkanaście minut od chwili wyłączenia światła wzbudzającego. Zjawisko OL, ściśle związane z przebiegiem procesu fotosyntezy jest od wielu lat wykorzystane w badaniach zarówno samego procesu jak i zjawisk ściśle z fotosyntezą związanych. OL związana jest z istnieniem w centrach reakcji mechanizmów stabilizujących energię fotowzbudzenia, w celu jej wykorzystania do „napędu” transportu elektronicznego w procesach fotofosforylacji. Natężenie emisji OL jest także bardzo czułym wskaźnikiem przebiegu reakcji fotolizy wody [3, 13, 24, 27, 28, 31].

Zarówno struktura jak i funkcjonowanie aparatu fotosyntetycznego są ściśle powiązane z właściwym uformowaniem i funkcjonowaniem błon tworzących lamelle. Wszystkie czynniki uszkodzające błony komórkowe, będące najwrażliwszym składnikiem żywej komórki, uszkodzają równocześnie strukturę jednostek fotosyntetycznych zlokalizowanych w lamellach chloroplastów. Uszkodzenia takie zakłócają proces fotosyntezy,

a szczególnie przebieg reakcji pierwotnych, co znajduje też natychmiast odzwierciedlenie w przebiegu emisji fotoindukowanej OL.

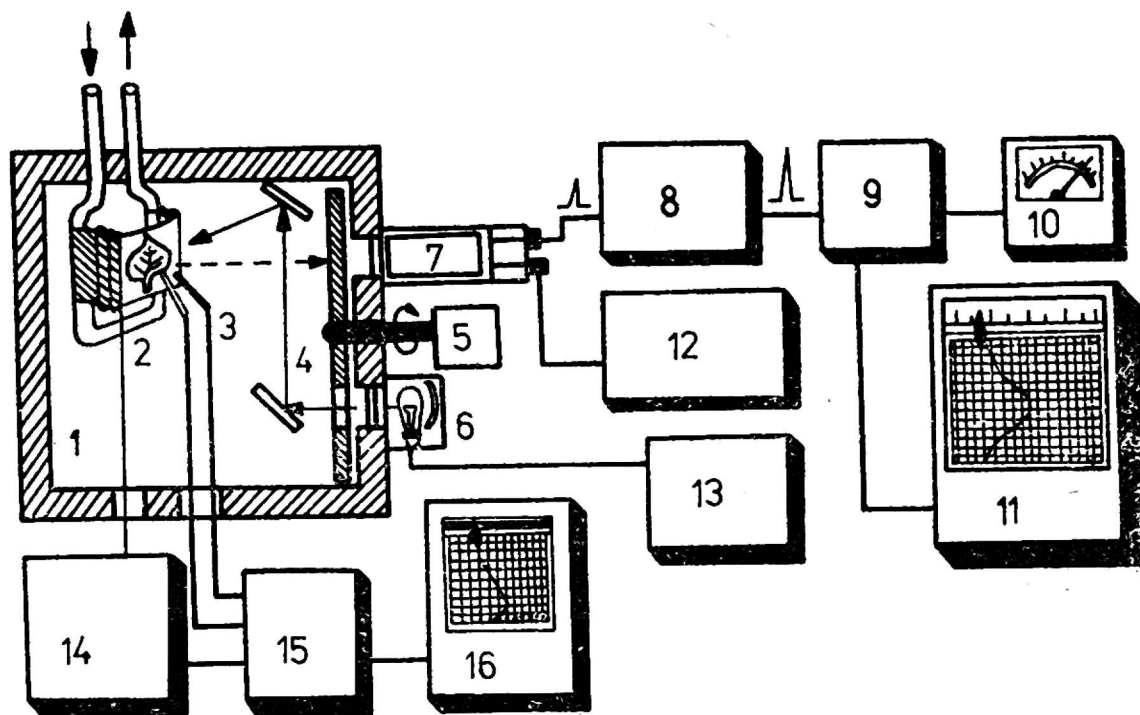
Detekcja OL dostarcza więc informacji zarówno o mechanizmach stabilizacji labilnej energii fotowzbudzenia w celu jej zużytkowania w procesach fotofosforylacji i fotolizy wody, jak i o czynnikach zakłócających transport elektronów w obu fotosystemach, a także pośrednio o funkcjonowaniu błon lipoprotoidowych. Pomiar OL zastosowane do oceny mrozoodporności dają wyniki, które są niejednokrotnie podobne lub całkowicie zbieżne z wynikami uzyskanymi poprzez detekcję UBCL. Potwierdza to związek OL z systemem mechanizmów obronnych i adaptacyjnych w komórkach roślinnych [37].

W odróżnieniu od UBCL emitowanej z tkanek młodych roślin etiolowanych detekcja OL pozwala na uzyskanie informacji o stanie fizjologicznym roślin w pełni sformowanych i dojrzałych, co znacznie rozszerza mrozoodporności roślin [11, 12, 20, 21, 34].

Detekcja OL została z powodzeniem zastosowana w metodach oceny mrozoodporności roślin [11, 12, 20, 21, 34].

Pomiary OL przeprowadza się zwykle przy użyciu światłoszczelnych termokamer, w których temperaturę można zmieniać w szerokich granicach (np. od $+70^{\circ}\text{C}$ do -30°C). Detektorem opóźnionej luminescencji jest fotopowielacz czuły w zakresie dalekiej czerwieni. Do wzbudzania OL służy silne źródło światła białego (projekcyjna lampa żarowa lub ksenonowa przesłonięta filtrem cieplnym), które pozwala na uzyskanie natężenia oświetlenia powyżej 10^4lx [35]. Na rys. 5 przedstawiono schemat typowego zestawu pomiarowego używanego przez Tarusowa i współpracowników do oceny mrozoodporności roślin poprzez detekcję składowej milisekundowej OL (22, 34).

Badany obiekt: liść, łodygę, całą roślinę umieszcza się w światłoszczelnej kamerze (1) na stoliku (2), do którego przymocowana jest metalowa rurka z przepływającym czynnikiem chłodzącym oziębianym w typowej zamrażalce. Żądaną temperaturę uzyskuje się ogrzewając stół grzałką zasilaną przez regulator (14) sterowany układem elektrycznym (15) z czujnikami termistorowymi (3). Naprzeciw badanego obiektu umieszczona jest wirująca tarcza (4) napędzana silnikiem elektrycznym (5). W tarczy znajduje się otwór, który odsłania kolejno: źródło światła wzbudzającego (6) oraz fotopowielacz (7). Źródło światła jest zasilane napięciem ze stabilizowanego zasilacza (13). Strumień światła wpada do kamery poprzez otwór w wirującej tarczy i zostaje skierowany za pomocą luster na obiekt powodując jego fotowzbudzenie. Czas trwania tego etapu uzależniony jest wielkością otworu oraz szybkością obrotu tarczy (najczęściej 10—20 obr/s). Po krótkiej pauzie następuje etap drugi, gdy otwór w tarczy znajdzie się na przeciw fotopowielacza. Następuje



Rys. 5. Schemat blokowy stanowiska do pomiaru mrozoodporności roślin poprzez detekcję opóźnionej luminescencji. Objasnienia w tekście.

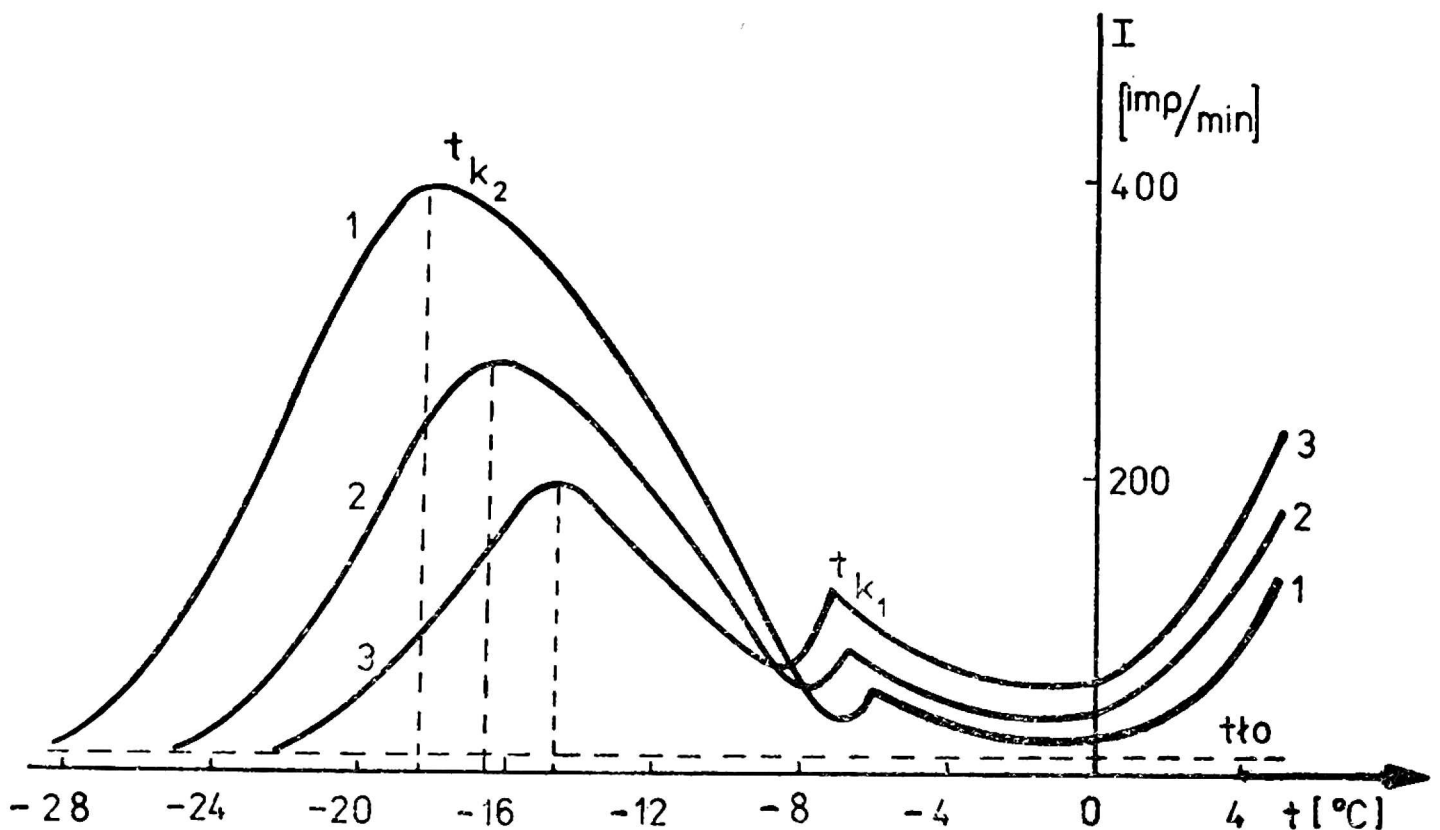
wówczas detekcja opóźnionej luminescencji emitowanej po kilku milisekundach od zakończenia etapu wzbudzenia. Składowa ta nosi także nazwę fluorescencji opóźnionej.

Ilość impulsów napięciowych pojawiających się na wyjściu fotopowielacza (7) jest proporcjonalna do ilości kwantów promieniowania padających na fotokatodę. Impulsy po wzmacnieniu przez wzmacniacz impulsowy (8) doprowadzane są do integratora (9), gdzie następuje ich całkowanie w zadanym odstępie czasu. Na wyjściu integratora przyłączony jest miernik wychyłowy (10) oraz rejestrator (11). Ich wskazania są proporcjonalne do częstotliwości rejestrowanych impulsów, a tym samym do średniej ilości kwantów emitowanych przez badany obiekt w wyniku fotowzbudzenia. Fotopowielacz jest zasilany stałym napięciem uzyskiwanym z wysokonapięciowego zasilacza stabilizowanego (12).

Do badań pobierano młode rośliny zbóż ozimych, od których oddzielano liście i umieszczono je na chłodzonym stoliku w termokamerze. Po uruchomieniu silnika i ustaleniu się stacjonarnej OL, następowało schładzanie tkanki roślinnej z szybkością $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

W miarę obniżania temperatury zmniejszało się natężenie emisji OL. Na rys. 6 przedstawiono przebieg termogramów liści z młodych zahartowanych roślin należących do trzech odmian pszenicy, różniących się w wyraźny sposób mrozoodpornością.

Stwierdzono prawidłowość polegającą na tym, że rośliny mało odporne na mróz należące do wysokoprodukcyjnych odmian posiadają w temperaturach dodatnich większą emisję OL. Natężenie OL odmian mrozoodpornych szybko ulega obniżeniu i utrzymuje się na niskim poziomie. Za-



Rys. 6. Termogramy OL zahartowanych roślin pszenicy ozimej, należących do trzech odmian (wg 22).

1 — Odeska 16; 2 — Bezostna 1; 3 — Skorospielka 35.

Objaśnienia w tekście.

kres ten utrzymuje się aż do pojawienia się pierwszego piku (temp. t_{k1}) odpowiadającego temperaturze, w której zatrzymany zostaje wzrost rośliny i następuje jej przejście w stan spoczynku zimowego.

Pierwsze niskotemperaturowe maksimum (t_{k1}) pojawia się u zahartowanych roślin zbożowych w zakresie temperatur pomiędzy -6° i -8°C .

Zjawisko to jest spowodowane tworzeniem się lodu w przestrzeniach międzykomórkowych i towarzyszy temu wzrost temperatury tkanek rośliny. Opisany skok temperaturowy (na rys. 6 oznaczony t_{k1}) nosi też nazwę punktu krioskopowego.

Mrozoodporne odmiany pszenicy (np. Odeska 16) po zahartowaniu mają niższy poziom emisji OL oraz słabo zaznaczony pik t_{k1} w temperaturze ok. -6°C .

Nieodporne na mróz, wysokoproduktywne odmiany (np. Skorospielka 35), mają po zahartowaniu dosyć wysoki poziom emisji w niskich temperaturach dodatnich oraz wyraźnie występujący niskotemperaturowy pik w temperaturze ok. $-7,5^{\circ}\text{C}$. Wielkość piku t_{k1} jest prawdopodobnie uzależniona od stopnia uwodnienia tkanek, a to z kolei jest m.in. wskaźnikiem zahartowania rośliny. W miarę dalszego obniżania temperatury można zaobserwować kolejny spadek natężenia emisji OL, a następnie szybki jej wzrost, aż do osiągnięcia maksimum w temperaturze t_{k2} , cha-

rakteryzującej stopień uszkodzenia rośliny w niskich letalnych temperaturach. Stwierdzono, że rośliny o wysokiej mrozoodporności po niewielkim obniżeniu emisji poniżej punktu krioskopowego wykazują silny wzrost natężenia OL, aż do osiągnięcia maksimum w temperaturze t_{k2} (10° — 12° C) niższej od temperatury t_{k1} . Ten drugi niskotemperaturowy pik nosi nazwę „błysku” opóźnionej luminescencji i sygnalizuje zniszczenie struktury aparatu fotosyntetycznego i rozprzężenie funkcji metabolicznych komórki. U roślin małoodpornych na mróz ten powtórny przyrost emisji OL jest mniejszy, a maksimum (punkt t_{k2}) następuje w temperaturze wyższej w porównaniu z roślinami mrozoodpornymi.

U roślin niezahartowanych nie obserwuje się zwykle piku t_{k1} , a „roz-błyki” OL w temp. t_{k2} roślin o różnej mrozoodporności pokrywają się. Po przejściu punktu t_{k2} „rozbłyki” OL ulega gaszeniu, aż do osiągnięcia poziomu tła. Luminescencja roślin mrozoodpornych „gaśnie” w temperaturach niższych niż roślin odmian wrażliwych na mróz [21]. Można się tutaj dopatrzeć analogii z przebiegiem krzywych przedstawiających zmianę AOA frakcji lipidowej tkanek roślinnych (rys. 4).

Uzyskiwane na drodze detekcji OL termogramy pozwalają określić stopień mrozoodporności roślin, a także informują o przebiegu pierwotnych procesów fotosyntezy w roślinach poddanych stresowi temperaturowemu [20, 21, 34, 35, 38].

Opisana metoda oceny mrozoodporności roślin zbożowych na drodze detekcji OL została w ostatnich latach zmodyfikowana i opatentowana przez Dżanumowa i wsp. [11, 12].

Autorzy nowej wersji wyszli z założenia, że biofizyczne metody oceny odporności i adaptacji są z natury swojej na tyle subtelne, że mogą dostarczać informacji o funkcjonowaniu regulujących mechanizmów na poziomie komórki i jej organelli. Mechanizmy utrzymujące homeostazę żywej komórki mają naturę elementarnych procesów biofizycznych. Naruszenie stanu fizjologicznego organizmu roślinnego przez czynniki stresowe powoduje natychmiastową reakcję obronną mającą charakter niespecyficznego wzrostu ich odporności [11, 38].

Odpowiednio subtelna biofizyczna metoda pomiarowa powinna dostarczać wiadomości o zmianach w lokalizacji i wzajemnym oddziaływaniu biomakromolekuł oraz o ich zdolnościach do zmian konformacyjnych. W ten sposób możnaby uzyskać informacje o różnicach w reakcjach różnych odmian zbóż ozimych różniących się mrozoodpornością na ten sam czynnik stresowy (np. niską temperaturę) działający przez krótki okres czasu.

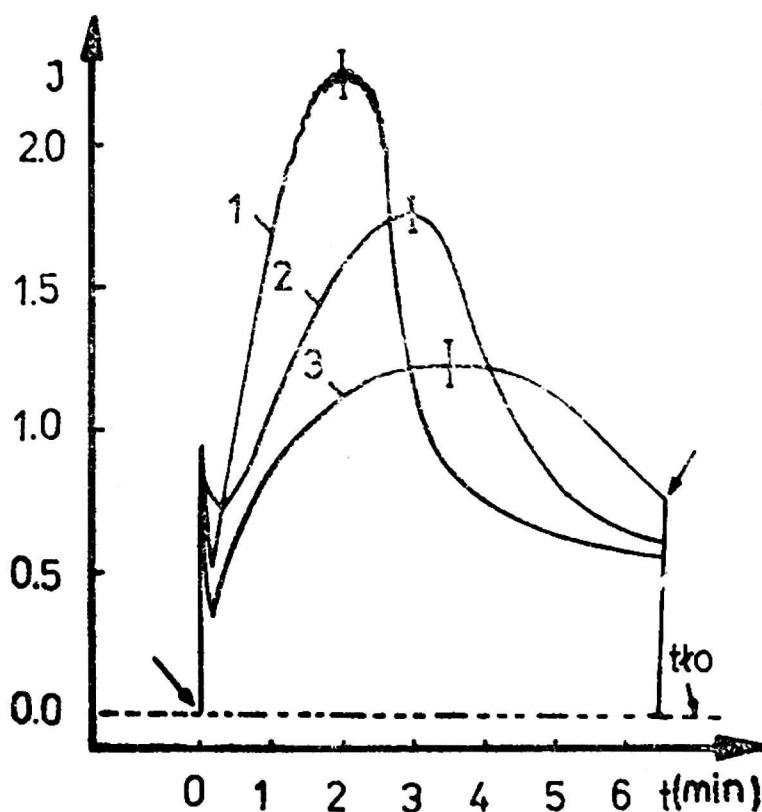
Według Dżanumowa i współpracowników pozwoliłoby to w konsekwencji na zrezygnowanie z czasochłonnego i kłopotliwego procesu hartowania materiału roślinnego przeznaczonego do oceny mrozoodporności.

Autorzy ci uznali, że najwrażliwszym procesem fizjologicznym w komórkach fotoautotroficznych jest fotosynteza, a jej przebieg dobrze odzwierciedla charakter indukcji OL.

Do detekcji OL wykorzystali oni kwantometryczne stanowisko pomiarowe przedstawione na rys. 5.

Obiektem pomiarów były 7—8-dobowe rośliny zbóż ozimych, które kiełkowały i rosły w ściśle określonych, kontrolowanych warunkach klimatycznych [11, 12]. Przed pomiarem całe rośliny były adaptowane w ciemności przez okres 2 godzin i temperaturze 18°C. Następnie liść przytwierdzano do chłodzonego stolika a korzenie pozostawały w roztworze Knopa o temp. pokojowej. Jako optymalną temperaturę stolika wybrano -4°C i czas chłodzenia 1,5 minuty.

Po upływie tego czasu włączano fosforoskop i rejestrowano krzywe indukcji OL. Czas pojedynczego pomiaru trwał od 4 do 6 minut i przez cały ten okres była utrzymana stała temperatura -4°C . Przykładowe przebiegi indukcji OL trzech odmian pszenicy ozimej przedstawia rys. 7.



Rys. 7. Przebiegi indukcji składowej milisekundowej OL trzech odmian pszenicy ozimej o różnej mrozoodporności (wg 11):

- 1 — Uljanowka (odmiana mrozoodporna),
- 2 — Mironowska 808 (odmiana średnioodporna),
- 3 — Kaukaz (odmiana nieodporna).

Autorzy opracowanej metody nie próbują wyjaśnić mechanizmów, które wpływają na kinetykę OL i ich korelacji z mrozoodpornością.

Przy użyciu opisanej metody można testować nie tylko szybko, ale i dokładnie, bowiem jak podają autorzy, podczas testu sprawdzającego ze 169 zaszyfrowanych próbek do prawidłowych grup zaszeregowano 166 roślin [11]. Jako miarę mrozoodporności przyjęto trzy najbardziej charakterystyczne parametry geometryczne krzywej indukcji OL.

Nie są nam znane prace, których celem byłaby weryfikacja przedstawionej metody lub jej adaptacja do oceny mrozoodporności innych zbóż. Prace nad sprawdzeniem opisanej metody i jej przydatności w praktyce rolniczej, a także opracowaniem nowych metod luminescencyjnych, przydatnych do oceny mrozoodporności różnych roślin zbożowych, są od dwóch lat prowadzone przez autorów w Akademii Rolniczej w Szczecinie. Zestawy pomiarowe, metodyki i wyniki badań postaramy się przedstawić w najbliższym czasie.

LITERATURA

1. Agawierdiejew A.S., Doskocz J.E., Tarusow B.M.: *Biofizyka*, V. 10, N. 5, 832—836, 1965.
2. Agawierdiejew A.S., Rukawisznikowa Ł.W.: *Swierchslab. swiecz. w bioł.*, Moskwa, Izdat. Nauka, 139—140, 1972.
3. Arnold W.A., Azzi J.R., *Photochem. and Photobiol.*, V. 14, 233—240, 1971.
4. Colli L., Facchini U.: *Nuovo Cimento*, V. 12, N. 1, 150—154, 1954.
5. Dałłakjan i in.: *Bioantiokisliteli*, Moskwa, Izdat. Nauka, 230—234, 1975.
6. Dolnicki A.: *Biuletyn IHAR*, N. 1—2, 141—144, 1975.
7. Dolnicki A.: *Biuletyn IHAR*, N. 1—2, 145—149, 1975.
8. Doskocz J.E.: *Awtorif. kand. diss.*, Moskwa, 1968.
9. Doskocz J.E., Tarusow B.N., Agawierdijew A.S., *Miet. ocenki ustojcz. rast. k nieblig. usłowijam sriedy*, Leningrad, Izd. Kolos, 205—221, 1976.
10. Dżanumow D.A. i in.: *Fizjoł. rast.*, V. 18, N. 3, 588, 1971.
11. Dżanumow D.A., Boczarow E.A., Klimow S.W.: *Sielskochoz. bioł.*, V. 13, N. 2, 302—306, 1978.
12. Dżanumow D.A. i in.: *Biul. Otkrytija i izobryet., promysl. obrazcy, towar znaki*, 3, 4, 1976.
13. Esser A.: *Lumineszenz von Grünalgen — Dissertation*, Uniw., Frankfurt/Main, 1969.
14. Gorłanow N.A.: *Bioantiokisliteli*, Moskwa, Izdat. Nauka, 187—188, 1975.
15. Hoffman W., Mudra A., Plarre W.: *Ogólna hodowla roślin*, PWRiL Warszawa, 1975.
16. Iwanow I.I.: *Bioantiokisliteli*, Moskwa, Izdat. Nauka, 241—246, 1975.
17. Kacperska-Palacz A.: *Post. Nauk Roln.*, N. 1—2., 107—120, 1970.
18. Kacperska-Palacz A., Długolecka E.: *Wiad. Bot.*, V. 15, N. 1, 79—90, 1971.
19. Kacperska-Palacz A. i in.: *Biol. Plant.*, V. 19, 18—26, 1977.
20. Kitłajew B.N., Tarusow B.N.: *DAN SSSR*, V. 195, N. 3, 725—727, 1970.
21. Kitłajew B.N.: *Dlitielnoje posleswieczenije i termoustojcziwost rastienij. Awtoreferatiwna kand. dissertacija*, Moskwa, 1969.
22. Kitłajew B.N., Gazijew M.M., Gaponienko W.I.: *Swierch. swiecz. w mied. i sielsk. chozjajst.*, Moskwa, Izdat. MGU, 143—145, 1974.
23. Koczur N.A., Morenkow W.S.: *Swierch. swiecz. w biologii* Moskwa, Izdat. Nauka, 228—230, 1972.
24. Lavorel J.: *Progress in Photosynth. Research*, Tubingen, V. 2, 883—898, 1969.

25. Mamiedow T.G., Popow G.A., Koniew W.W.: Swierch. swiecz, w mied. i sielsk. chozjajst., Moskwa, Izdat. MGU, 106—111, 1971.
26. Murkowski A.: Post. Nauk Roln., N. 4, 3—16, 1973.
27. Murkowski A.: Post. Nauk Roln., N. 2, 3—21, 1974.
28. Murkowski A.: Luminescencyjne metody badania wpływu herbicydów na organizmy fotosyntetyzujące — Praca doktorska, AR Szczecin, 1975.
29. Sławiński J., Grabikowski E., Murkowski A.: Zesz. Nauk WSR Szczecin, N. 37, 301—317, 1971.
30. Strehler B.L., Arnold W.A.: J. Gen. Physiol. V. 34, 809—820, 1951.
31. Szuwałow W.A., Litwin F.F.: Mol. biol., N. 3, N. 1 59—73, 1969.
32. Tarusow B.N. i in.: Biofizyka, V. 6, N. 4, 490—494, 1961.
33. Tarusow B.N.: Swierch. swiecz. w biologii, Moskwa, Izdat. Nauka 9—17, 1972.
34. Tarusow B.N., Kitłajew B.N., Doskocz J.E.: Miet. ocenki ustojcz. ustojcz. rast. k niebłag. usłowijam sriedy, Leningrad, Izdat. Kołos, 191—204, 1976.
35. Tarusow B.N., Wiesiołowski W.A.: Swierch swiecz. rast. i ich priklad. znac. Moskwa, Izdat. MGU, 1978.
36. Tumanow I.I.: Fizjologija rast., V. 14, N. 3, 521—536.
37. Wiesiołowa T.W., Wiesiołowski W.A.: Swierch. swiecz. w mied. i sielsk. chozjajstwie, Moskwa, Izdat. MGU, 127—132, 1974.
38. Wiesiołowski W.A., Dżanumow D.A.: Swierch. swiecz. w mied. i sielsk. chozjajstwie, Moskwa, Izdat. MGU, 89—98, 1974.
39. Władymirow J.A.: Swierch, świecz. pri biochim, rjeakcjach, Moskwa, Izdat. Nauka, 1966.
40. Żurawlew A.I.: Świerch. świecz. w biologii, Moskwa, Izdat. Nauka, 17—32, 1972.

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO ROLNICZE I LEŚNE
POLECA KSIĄŻKĘ

DR JÓZEF ROSTKOWSKI

GOSPODARKA ZIEMIĄ
PODSTAWY PRAWNE

WARSZAWA 1981, S. 212, NAKŁ. 3 000 EGZ. ZŁ 50,—

Książka stanowi przewodnik po obowiązujących przepisach prawnych dotyczących gospodarki ziemią. Zawiera interpretację przepisów prawnych stosowanych przez resort rolnictwa. Zamierzeniami Autora jest dostarczenie wyjaśnień dotyczących poszczególnych kwestii praktycznych, co stanowi zaletę książki.

Zmiany przepisów prawnych (wynika to z doskonalenia form i metod gospodarki ziemią), które mogą wejść w życie dopiero w 1982 r. Autor omówi w drugim wydaniu książki. W omawianym wydaniu uwzględniono stan prawny w dniu 30 czerwca 1981 r.

W książce znajdują się cenne materiały dotyczące gospodarki ziemią, zwłaszcza dla czytelników, którzy nie mają wykształcenia prawniczego.

Książka podzielona jest na osiem rozdziałów. W pierwszym Autor podaje zagadnienia ogólne, a więc pojęcia administracji i prawa, organa administracji, uregulowanie własności gospodarstw rolnych.

Następnie rozdziały dotyczą obrotu nieruchomościami rolnymi i dziedziczenie gospodarstw, rejestrów oraz rozgraniczania nieruchomości, dysponowania gruntami Państwowego Funduszu Ziemi, form prawnych zapobiegania ekstensywnemu użytkowaniu gruntów rolnych, przekazywania gospodarstw rolnych za rentę lub emeryturę, ochrony gruntów rolnych oraz gospodarki terenami budowlanymi, jak również postępowania w sprawie scalania i wymiany gruntów.

Na końcu poszczególnych rozdziałów jest umieszczony wykaz ważniejszych aktów prawnych i literatura, co stanowi uzupełnienie informacji opracowanych przez Autora.

Książka przeznaczona jest dla pracowników organów administracji państwowej stopnia podstawowego i wojewódzkiego oraz banków spółdzielczych, jak też dla działaczy społecznych. Mogą też z niej korzystać uczestnicy kursów dokształcających wszystkich stopni oraz uczniowie szkół rolniczych, w których są prowadzone zajęcia z zakresu podstaw prawnych gospodarki ziemią.