

ANTONI MURKOWSKI

Akademia Rolnicza w Szczecinie

FOTOSYNTETYCZNA LUMINESCENCJA — WSKAŹNIKIEM STANU FIZJOLOGICZNEGO ROŚLINY I JEJ ODPORNOŚCI NA EKSTREMALNE CZYNNIKI ZEWNĘTRZNE

Wstęp

W badaniach biologicznych, a w szczególności w takich młodych specjalnościach jak fotobiologia, bioenergetyka, biologia molekularna i submolekularna, duże powodzenie w ostatnich latach zyskują metody badawcze oparte o detekcję ultrasłabej biochemiluminescencji (UBCL) oraz fotosyntetycznej luminescencji (FSL).

UBCL jest charakterystycznym przejawem procesów życiowych w komórkach zarówno roślinnych jak i zwierzęcych. Posługując się detekcją UBCL badano m. in. bioenergetykę procesów wewnątrzkomórkowych i reakcje komórek na ekstremalne czynniki fizykochemiczne.

FSL związana jest z pierwszymi stadiami fotosyntezy i emitowana przez wszystkie organizmy fotosyntetyzujące. Przy pomocy detekcji FSL bada się pierwotne procesy fotosyntezy, a także i oddziaływanie środowiska na organizmy roślinne.

Mechanizmy, geneza, a także i ewentualne role jakie mogłyby spełniać wymienione luminescencje w procesach życiowych organizmów nie zostały całkowicie wyjaśnione i pozostają wciąż przedmiotem intensywnych badań. Równolegle do badań podstawowych rozwinęły się prace mające na celu wykorzystanie detekcji ultrasłabych świeceń w diagnostyce rolniczej. Aktualny stan osiągnięć w diagnostyce opartej o detekcję UBCL przedstawiono w poprzednim artykule (26). Niemniej obiecujące, a pod pewnymi względami nawet bardziej korzystne wydaje się wykorzystanie detekcji FSL jako wskaźnika stanu fizjologicznego rośliny i jej odporności na ekstremalne czynniki zewnętrzne.

Absorpcja światła przez organizmy fotosyntetyzujące i pierwotne procesy w fotosyntezie

Istotą fotosyntezy jest absorpcja energii świetlnej i jej utrwalenie w postaci potencjalnej energii chemicznej stosunkowo trwałych związków organicznych.

Z widma promieniowania słonecznego na powierzchnię Ziemi docierają fotony o długości fali od 0,3 μm do 3 μm , ponieważ pozostałe zostają w poważnym stopniu zaabsorbowane przez różne warstwy atmosfery. Porcje promieniowania nazwane fotonami posiadają energię określoną wzorem Plancka:

$$E = h \cdot \nu \text{ [J]}$$

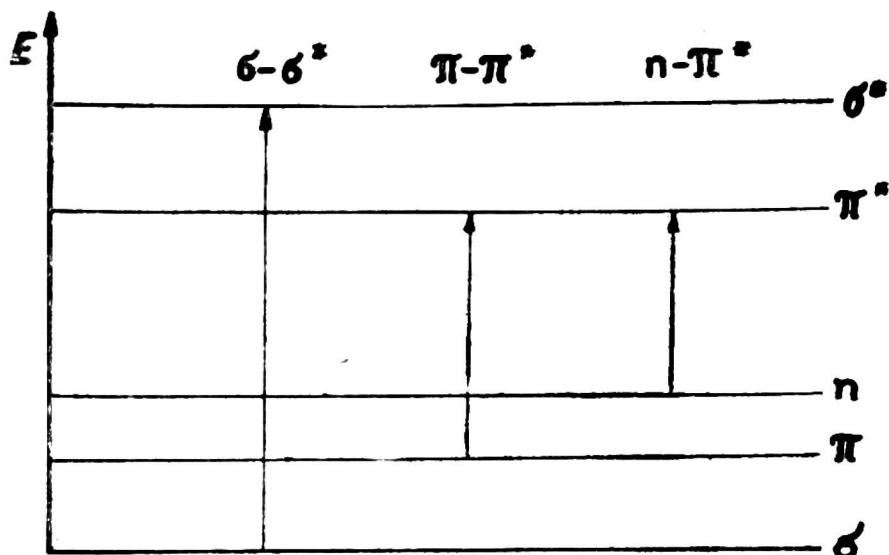
gdzie $h = 6,625 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$ — stała Plancka; ν — częstotliwość promieniowania.

W reakcjach fotochemicznych każda drobina może zostać pobudzona do reakcji przez pochłonięcie jednego kwantu światła. Jedną gramodrobinę — mol ($6,023 \cdot 10^{23}$ drobin) można pobudzić do reakcji przy pomocy $6,023 \cdot 10^{23}$ kwantów o odpowiedniej długości fali czyli o odpowiedniej energii. Całkowita ilość energii jaką zawiera taka liczba kwantów określona jest najczęściej w kcal/mol, czasem nazywana jest einsteinem.

Energia fotonów może być absorbowana przez różne substancje i w wyniku szeregu procesów fotofizycznych i fotochemicznych zamieniona na energię cieplną, elektryczną lub chemiczną (30).

W obecnej fazie rozwoju ewolucyjnego byt prawie wszystkich żywych organizmów, z wyjątkiem autotrofów chemosyntetyzujących, jest uzależniony bezpośrednio lub pośrednio od dopływu energii w postaci promieniowania słonecznego. By energia promieniowania widzialnego mogła ulec zamianie na energię chemiczną niezbędną dla żywych organizmów, względnie stać się czynnikiem informującym i regulującym musi zostać selektywnie zaabsorbowana przez specjalne substancje zwane barwnikami. Wszystkie autotroficzne rośliny, glony, a także bakterie fotosyntetyzujące posiadają we wnętrzu swoich komórek szereg specyficznych barwników, wśród których szczególną rolę odgrywa chlorofil „a” u roślin zielonych i bakteriochlorofil u bakterii. Barwniki posiadają zdolność pochłaniania tych części promieniowania świetlnego, które odpowiadają ich widmu absorpcji. Zdolność pochłaniania energii przez barwniki uzależniona jest od ich budowy chemicznej, a dokładniej od istnienia odpowiedniej ilości podwójnych lub potrójnych wiązań międzyatomowych. W wiązaniach pojedynczych utworzonych przez jedną parę elektronów wzbudzenie któregoś z nich wymaga dużej energii, z reguły ponad 150 kcal/mol. Taką energię może dostarczyć jedynie daleki nadfiolet. W wiązaniach podwójnych pojawiają się, oprócz elektronów wiążących σ , także elektrony słabo zlokalizowane tzw. π . Elektrony π ulegają łatwiej wzbudzeniu co wiąże się z absorpcją promieniowania o fali dłuższej (o mniejszej energii) niż w przypadku elektronów σ . Wydłużone łańcuchy drobin, w których wiązania podwójne występują na przemian z pojedynczymi (wiązania sprzężone) charakteryzują się znacznym obniżeniem energii wzbudzenia elektronów,

uzależnionym od ilości wiązań sprzężonych. Jeszcze większe obniżenie energii wzbudzenia powoduje obecność n-elektronów od wolnych par elektronowych. Występują one w związkach organicznych, w skład których wchodzi tzw. „pierwiastki życia” jak tlen, azot, siarka i fosfor. Wszystkie barwniki posiadają w drobinie mniej lub więcej wiązań sprzężonych. Ich ilość oraz rozmieszczenie wpływa na charakterystyczne zabarwienie danego barwnika (2). Schemat poziomów σ , π i n oraz przejść elektronowych w drobinie przedstawia rysunek 1.



Rys. 1. Schemat poziomów energetycznych dla wzbudzonych elektronów walencyjnych

Istnieje dużo barwników spełniających różnorodne role w procesach wzrostu i wegetacji roślin. Najważniejszymi jednak barwnikami roślinnymi są chlorofile, zlokalizowane wraz z barwnikami pomocniczymi w chloroplastach i mogące przekształcać energię promieniową zakresu widzialnego zarówno w energię wiązań wysokoenergetycznych jak również w energię chemiczną związków organicznych. Proces przemiany labilnej energii promieniowania widzialnego w energię chemiczną nosi nazwę fotosyntezy i jest najważniejszym procesem foto- i biochemicznym na kuli ziemskiej.

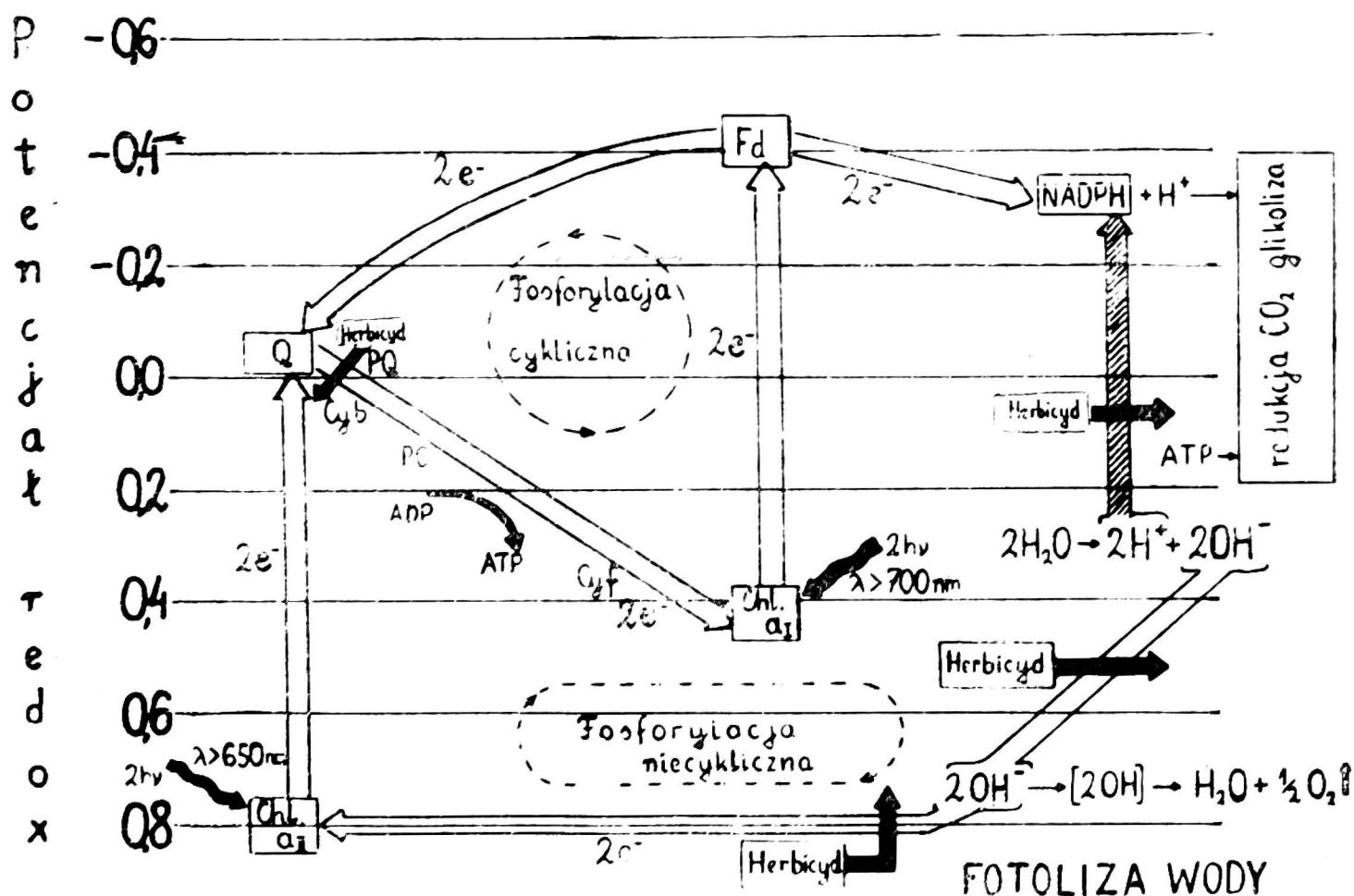
W przebiegu fotosyntezy można wyróżnić trzy stadia: fotofizyczne, fotochemiczne i enzymatyczne (ciemne).

W pierwszym stadium następuje absorpcja energii świetlnej przez zespoły specyficznych barwników roślinnych. Drobiny barwników, w wyniku absorpcji fotonów, ulegają wzbudzeniu, a energia wzbudzenia zostaje przekazana do centrów aktywnych.

W drugim stadium, wzbudzone drobiny barwników w centrach aktywnych pośredniczą w przeniesieniu jonu wodoru z drobin wody (równie dobrze może być to elektron, ponieważ w środowisku wodnym gdzie znajdują się zawsze zdysocjowane H^+ i OH^- efekt jest ten sam) poprzez cały łańcuch cytochromowy i poprzez dwa fotosystemy do ferredoksyny. Zredukowana ferredoksyna może z kolei zredukować koenzym NADP do NADPH. „Po drodze” powstaje w łańcuchu cytochromowym, w wyniku

fosforylacji, ATP. Wymienione, fotochemiczne procesy drugiego stadium są enzymatycznymi. Doprowadzają one do utlenienia H_2O — w wyniku czego powstaje tlen drobinowy — do nagromadzenia zredukowanego fosforanu dwunukleotydu nikotynamido-adeninowego NADPH oraz pewnej ilości ATP.

Drugie stadium można prześledzić na schemacie procesów fotosyntezy na rysunku 2. Na schemat ten naniesiono miejsca oddziaływania herbicydów co będzie omówione w ostatniej części artykułu.



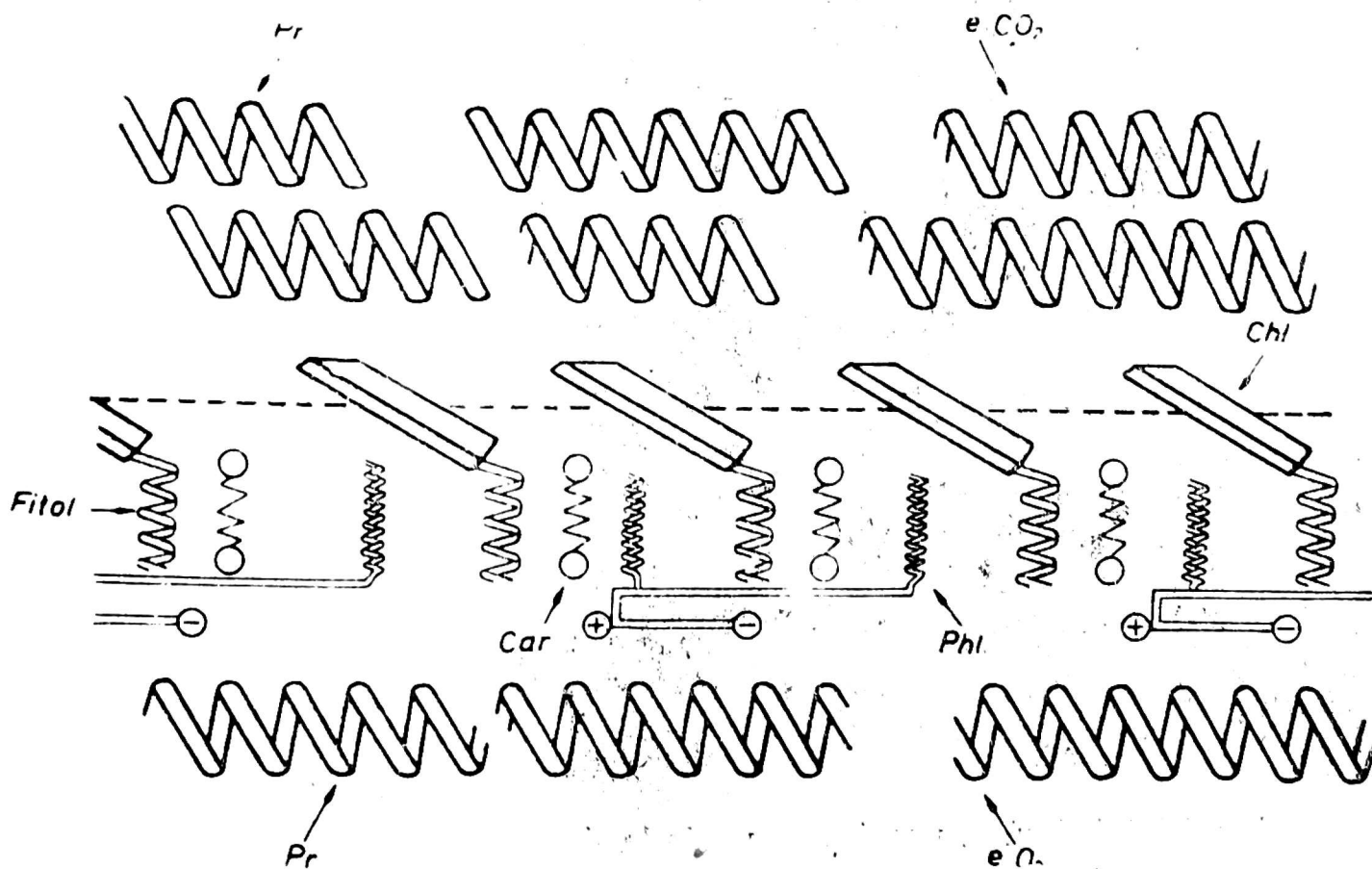
Rys. 2. Schemat procesów fotosyntezy oraz miejsca, w których herbicydy mocznikowe zakłócają prawidłowy transport elektronów

W trzecim stadium następuje asymilacja CO_2 tzn. jego redukcja do cukrów prostych. Proces ten wymaga dopływu energii oraz obecności czynnika redukującego. Energia dostarczana jest w wyniku hydrolizy ATP do ADP, a czynnikiem redukującym jest NADPH. Zarówno ATP jak i NADPH są wytwarzane w procesach fotochemicznych drugiego stadium. W wyniku szeregu procesów enzymatycznych, które mogą przebiegać w ciemności następuje synteza, początkowo cukrów prostych następnie złożonych.

Luminescencja chloroplastów jest związana z dwoma pierwszymi procesami i dlatego wymagają one nieco szerszego omówienia.

Cały proces fotosyntezy u roślin zielonych przebiega w wysoko wyspecjalizowanych organellach — chloroplastach. W komórce roślinnej może ich być od 1 do ok. 100. Co kilka lub kilkanaście godzin rozmnażają się one przez podział. Chloroplasty zawierają własny DNA i RNA zarówno informacyjny jak i transportowy, a także posiadają rybosomy co umożliwia im samodzielną syntezę białek. Ta tak daleko posunięta autonomiczność stała się podstawą wysuniętej niedawno hipotezy, według której zarówno chloroplasty jak i mitochondria mogą pochodzić od wolno żyjących organizmów bezjądrowych, które drogą ścisłej symbiozy zespoliły się z komórkami jądrowymi heterotroficznych pierwotniaków. Przodkami chloroplastów miały być błękitnozielone glony podobne do dzisiejszych sinic, natomiast mitochondria to wyspecjalizowane bakterie tlenowe. Ta, brzemienna dla dalszego rozwoju życia na Ziemi, symbioza miała nastąpić już w okresie bliskiego prekambrium (28).

Chloroplasty zawierają dużą ilość różnych barwników, są to przeważnie chlorofile. Pewna odmiana chlorofilu tzw. chlorofil „a” występuje powszechnie, a jego obecność warunkuje możliwość fotosyntezy u roślin wyższych i glonów. Barwniki w chloroplastach nie są rozmieszczone w całej objętości, ale skupione na powierzchniach charakterystycznych warstwowych tworów nazwanych lamellami. Lamelle przypominają błony



Rys. 3. Struktura lamelli (wg Calvin M.: Rev. mod. Phys., 31, 147, 1959):
 Chl. — porfirynowy pierścień chlorofilu; Pr. — proteiny; Car. — karotenoidy;
 Phl. — fosfolipidy; $e.CO_2$ — enzym redukujący CO_2 ; $e.O_2$ — enzym czynny
 w przemianie O_2

elementarne pozbawione jednej warstwy fosfolipidowej. Utworzone są one z dwóch warstw białka i warstwy lipidowej między nimi. Na granicy fazy lipidowej i białkowej rozmieszczone są drobiny chlorofilu oraz barwników pomocniczych, głównie karotenoidów. Barwniki te tworzą w lamellach monomolekularne warstwy. Za takim modelem lamelli przemawia specyficzna budowa drobin chlorofilu składająca się z hydrofilowej „główki” — pierścienia tetrapiolowego i lipofilowego „ogonka” jaki tworzy fitol. W warstwie lipidowej zanurzone są fitole natomiast hydrofilowe pierścienie położone są między fazą lipidową, a warstwą drobin białka. Taką hipotetyczną strukturę lamelli przedstawiono na rysunku 3.

Struktura lamellarna jest charakterystyczna dla wszystkich chloroplastów. U roślin niższych np. krasnorostów, lamelle są równomiernie zawieszane w białkowej stromie (rys. 4). U roślin wyższych tworzą bardziej złożone struktury tzw. grana będące stosami od 10 do 30 lamell (rys. 5).



Rys. 4. Fotografia fragmentu ultracienkiego skrawka krasnorostu *Porphyridium cruentum*. Fotosyntetyzujące lamelle nie są ułożone w grana (wg Fogg G.E.: Fotosynteza. PWN. 1972)

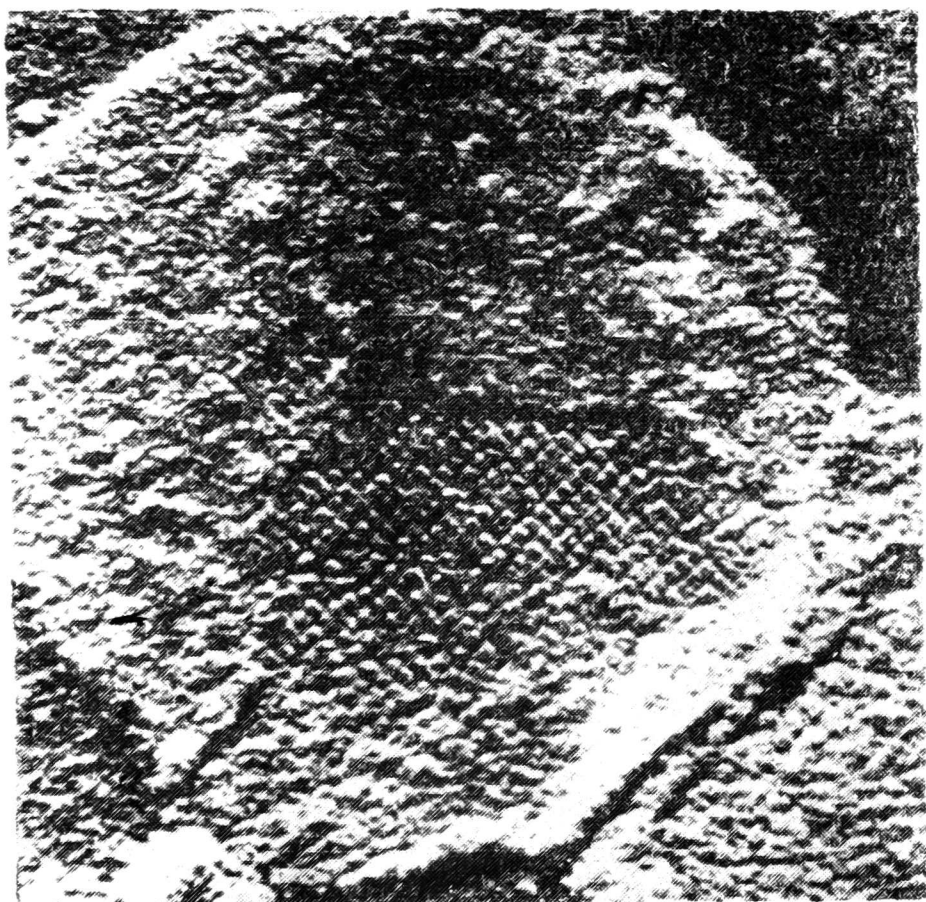
Chlorofil jak każda porfiryna posiada dużo wiązań podwójnych ułożonych na przemian z pojedynczymi. Tworzy to układ sprzężony, który zawiera ruchliwe elektrony π . Elektrony te nie są zlokalizowane na pojedynczych atomach, ale są wspólną własnością układu sprzężonego. Przestrzenne uporządkowanie chlorofilu w lamellach tworzące monomolekularne



Rys. 5. Fotografia fragmentu ultracienkiego skrawka chloroplastu z liścia szpinaku *Spinacia oleracea*. Fotosyntetyzujące lamelle są ułożone w stosy granum (wg Fogg G.E.: Fotosynteza. PWN. 1972)

powierzchni sprzyja powstawaniu jakby quasi kryształów, w których orbitale elektronów walencyjnych częściowo się pokrywają. W ten sposób umożliwia się przemieszczanie się wzbudzonego elektronu, a także i powstałej po nim dodatniej „dziury”, w obrębie całego tego niby kryształu, podobnie jak to ma miejsce w półprzewodnikach.

Przy pomocy mikroskopu elektronowego wykryto, że powierzchnie lamell nie są jednorodne, a na ich powierzchniach występują sferoidalne twory nazwane kwantosomami (10, 11, 35). Po uwzględnieniu wielkości drobin chlorofilu wyliczono, że kwantosomy mogą zawierać ich od 200 do 400. Zdjęcie kwantosomów przedstawiono na rys. 6. Wykrycie kwantosomów ma duże znaczenie w zrozumieniu procesów fotofizycznych ponieważ potwierdzają koncepcję istnienia jednostki fotosyntetycznej lansowaną już od kilkadziesiąt lat. Stwierdzono już dawniej, że rozdrabnianie wyizolowanych chloroplastów na fragmenty zawierające mniej niż 200 drobin chlorofilu prowadzi do zaniku aktywności fotosyntetycznej. Niektóre substancje nieodzowne w transporcie elektronów w I i II fotosystemie jak ferredoksyna, chlorofil P_{700} cytochrom f, występują w stosunku do ilości chlorofilu jak 1 do ok. 400. Te i inne jeszcze badania dowiodły, że chloro-



Rys. 6. Fotografia ultrastruktury lamelli (wg Rabinowitch E.I. Govindjee: Sci. American, 213, 74, 1965)

fil jest przestrzennie i energetycznie zagregowany tworząc jednostki fotosyntetyczne (10, 11).

Każda taka jednostka, której można prawdopodobnie przypisać jeden kwantosom z powierzchni lamelli, zawiera od 200 do 400 drobin chlorofilu wzajemnie ze sobą powiązanych przy pomocy zewnętrznych orbitali. W jednostce fotosyntetycznej znajdują się też drobiny barwników pomocniczych rozszerzające pasmo absorpcji, a także przynajmniej po jednej drobinie ferredoksyny, chlorofilu P_{700} , cytochromów i innych związków pośredniczących w transporcie elektronów w obu fotosystemach. Drobiny chlorofilu i barwników pomocniczych rozłożone na stosunkowo dużej powierzchni kwantosomu pełnią rolę jakby dwuwymiarowej anteny. Kwant światła pochłonięty przez którąkolwiek drobinę chlorofilu powoduje jej wzbudzenie. Wzbudzeniu mogą ulec nawet drobiny chlorofilu, które same nie zaabsorbowały fotonu, ale pobrały energię od wzbudzonych barwników pomocniczych (karotenoidów, fikobilin). Ponieważ energia fotonu może być wykorzystana do fotosyntezy jedynie wtedy, gdy wzbudzeniu ulegnie centrum aktywne, musi więc istnieć mechanizm przenoszenia stanu pobudzenia z jakichkolwiek drobin barwników w danej jednostce fotosyntetycznej do tej jednej uprzywilejowanej drobinie chlorofilu „a” umiejscowionej w centrum jednostki. Noszą one czasem nazwę P_{700} w I i P_{680} w II fotosystemie.

Istnieje kilka hipotez dotyczących sposobu przekazywania energii w obrębie jednostki fotosyntetycznej (rezonansowe, ekscytonowe, półprze-

wodnikowe) najbardziej chyba przekonywujący wydaje się model, w którym wykorzystano półprzewodnikowe własności lamelli. Według hipotezy półprzewodnikowej w wyniku wzbudzenia powstaje wolny elektron w paśmie przewodnictwa i dodatnia dziura w paśmie podstawowym. Zarówno elektron jak i dziura mogą przemieszczać się w obrębie jednostki dosyć swobodnie, jednakże najbardziej prawdopodobny jest ich ruch w kierunku centrum. Spowodowane jest to tym, że najniższe stany wzbudzenia mają wartość najwyższą u drobin chlorofilu znajdującego się na brzegach jednostki fotosyntetycznej, minimum zaś osiągają w centrum aktywnym. Po przekazaniu energii do chlorofilu „a” znajdującego się w centrum następuje jego wzbudzenie oraz uzyskanie zdolności do inicjowania procesów fotochemicznych drugiego stadium (1). Poglądowe przedstawienie jednostki fotosyntetycznej jako zespołu drobin o najniższych stanach wzbudzonych obniżających się od brzegów do centrum aktywnego zamieszczono na rysunku 7.

Rys. 7. Poglądowe przedstawienie jednostki fotosyntetycznej jako dużej jamy potencjału na dnie której znajduje się centrum aktywne

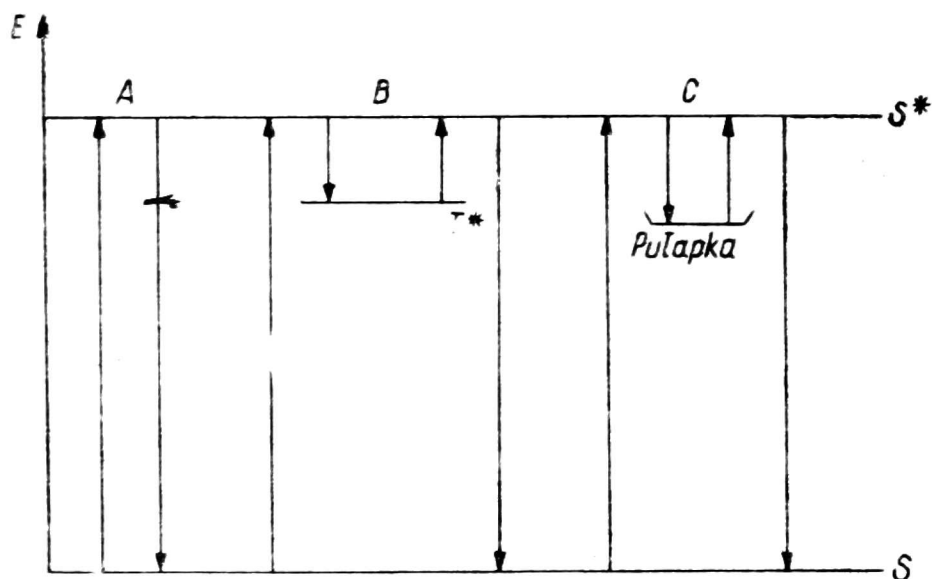


Fotosyntetyczna luminescencja i mechanizmy jej emisji

Nasuwa się pytanie czy cała, zaabsorbowana przez zespół barwników energia świetlna zostaje zużyta do fotosyntezy? Po wzbudzeniu drobin chlorofilu elektron walencyjny zostaje przeniesiony do pierwszego poziomu singletowego, a stamtąd po 10^{-8} s do pierwszego poziomu trypletowego tzw. metatrwałego, na którym może przebywać przez okres do 10^{-2} s. Około 2% elektronów nim osiągnie poziom metatrwały ulegnie rekombinacji z dziurą co powoduje emisję fluorescencji. Po osiągnięciu poziomu trypletowego prawdopodobieństwo straty energii w postaci luminescencji szybko maleje i już tylko nieznaczna część elektronów zostanie przeniesiona z powrotem na poziom S^* skąd mogą zrekombinować emitując przy tym kwant światła. To znacznie słabsze i dłużej trwające świecenie nosi nazwę fluorescencji długożyciowej.

Luminescencja chloroplastów, występująca w czasie późniejszym niż kilka milisekund po zaprzestaniu oświetlenia, nosi nazwę fotosyntetycznej luminescencji. Wszystkie organizmy, mające nieuszkodzony aparat fotosyntetyczny reemitują od 10^{-5} do 10^{-7} całkowitej zaabsorbowanej energii

światłej, w postaci fotosyntetycznej luminescencji — FSL. Uproszczony diagram przejść elektronowych w wzbudzonej drobinie chlorofilu przedstawiono na rysunku 8. Z fizycznego punktu widzenia FSL jest słabym,



Rys. 8. Przejścia elektronowe we wzbudzonej drobinie chlorofilu i możliwe reemisje zaabsorbowanego promieniowania: A — fluorescencja, B — fluorescencja długościowa, C — druga składowa FSL, S — poziom singletowy, S* — poziom singletowy wzbudzony, T* — poziom trypletowy (metatrwały)

czerwonym świeceniem wykrywalnym jedynie przy pomocy fotopowielacza. FSL została wykryta niedawno bo dopiero w roku 1951 przez Strehlera i Arnolda (31). Obserwować ją można po wyłączeniu oświetlenia i oczekaniu pewnego czasu (rzędu ms), w którym wyświecą się fluorescencje, ponieważ te świecenia jako znacznie silniejsze maskują słabą FSL. Zanik FSL następuje w kilku kolejnych etapach charakteryzujących się różnym mechanizmem i różną kinetyką przebiegu. Na tej podstawie można ją ogólnie podzielić na trzy etapy: do 100 ms, od 1 do 60 s oraz świecenie w czasie dłuższym niż 90 s (1).

1. W zakresie od ok. 1 ms do 100 ms emisja FSL związana jest z rekombinacją dziur powstałych w chlorofilu z elektronami przeniesionymi na skutek wzbudzenia do poziomu ferredoksyny. Świecenie to w niewielkim stopniu zależy od temperatury.

2. W zakresie od 1 s do 60 s emisja FSL związana jest z termicznie aktywowanym przenoszeniem elektronów z pułapek na utlenione drobiny chlorofilu. Pułapki powstają w sieci quasi krystalicznej chlorofilu na skutek obecności barwników pomocniczych, warunków brzegowych i innych podobnych nieciągłości. Natężenie tego świecenia wykazuje silną zależność temperaturową w zakresie fizjologicznego obszaru temperatur.

3. W zakresie dłuższym niż 90 s emisja FSL uzależniona jest od obecności tlenu i jest to prawdopodobnie chemiluminescencja związana z fotoredukcją i fotoutlenianiem różnych form chlorofilu.

Zewnętrzne czynniki uszkodzające względnie działające toksycznie na aparat fotosyntetyczny powodują jednocześnie zmiany w natężeniu i charakterze emisji FSL. Detekcja FSL może więc w sposób pośredni dostarczać informacji o stanie fizjologicznym rośliny, jej odporności na ekstremalne czynniki, zewnętrzne, zdolnościach adaptacyjnych itp.

Przykłady zastosowania FSL w celach diagnostyki rolniczej

Prace nad wykorzystaniem FSL w badaniach biologicznych i rolniczych są przeprowadzane w kilku laboratoriach naukowych w Związku Radzieckim, Europie zachodniej i Stanach Zjednoczonych. Badania dotyczące zastosowania FSL w diagnostyce rolniczej są prowadzone prawie wyłącznie przez naukowców radzieckich. Wykonano liczne prace i uzyskano w wielu wypadkach pozytywne wyniki w zastosowaniu detekcji FSL do oceny mrozo- i ciepłoodporności różnych gatunków i odmian roślin uprawnych. Bada się możliwość wykorzystania FSL do oceny odporności roślin uprawnych na suszę, zasolenie, herbicydy, choroby wirusowe i grzybowe (4, 7, 8, 12, 15, 18, 19, 20, 29, 32, 37, 38). Ciekawe są także próby oceny produktywności mieszańców poprzez detekcję FSL ich kielków (5, 39).

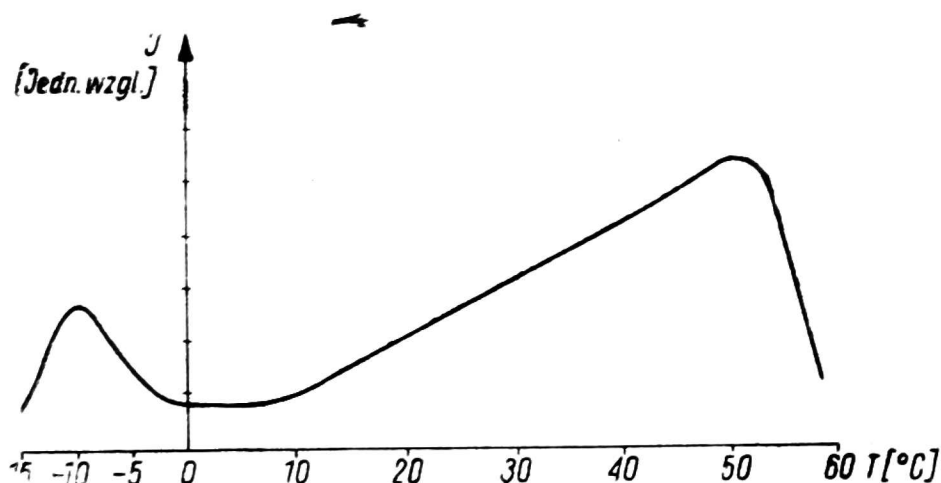
W odpowiedzi na oddziaływanie ekstremalnych temperatur czy też dużych stężeń roztworów solnych występuje charakterystyczna dwufazowa reakcja rośliny. Początkowo obserwuje się wzrost świecenia, a następnie jego zanik. Jest to reakcja podobna do opisanego w poprzednim artykule „krzyku komórki” obserwowanego w postaci nagłego wzrostu natężenia ultrasłabej biochemiluminescencji emitowanej z niezielonych organów roślin także pod wpływem działania czynników stressowych (16, 17, 21, 38, 39).

Badanie mrozo- i ciepłoodporności roślin

Szerzej znana i opisana w paru artykułach jest metoda oceny mrozo- i ciepłoodporności niektórych roślin uprawnych przy pomocy detekcji FSL (8, 18). Zestaw pomiarowy składa się ze światłoszczelnej termokamery, w której można liniowo zmieniać temperaturę od $+60^{\circ}\text{C}$ do -20°C z zaprogramowaną prędkością 0,2—0,5 deg/min. Detektorem FSL jest fotopowielacz, czasem specjalnie ochładzany w celu podwyższenia stabilności i obniżenia prądu ciemnego. Fotopowielacz jest zasilany stabilizowanym wysokim napięciem, a sygnał wzmacniany jest prądowo przy pomocy wzmacniacza prądu stałego. Fotopowielacz może także pracować

w układzie kwantometrycznym, wtedy strumień impulsów elektrycznych, których ilość jest proporcjonalna do strumienia świetlnego, zostaje wzmacniony przez wzmacniacz impulsowy, a następnie scałkowany w integratorze liniowym. W obu wypadkach intensywność emisji FSL jest zapisywana przez rejestrator samopiszący.

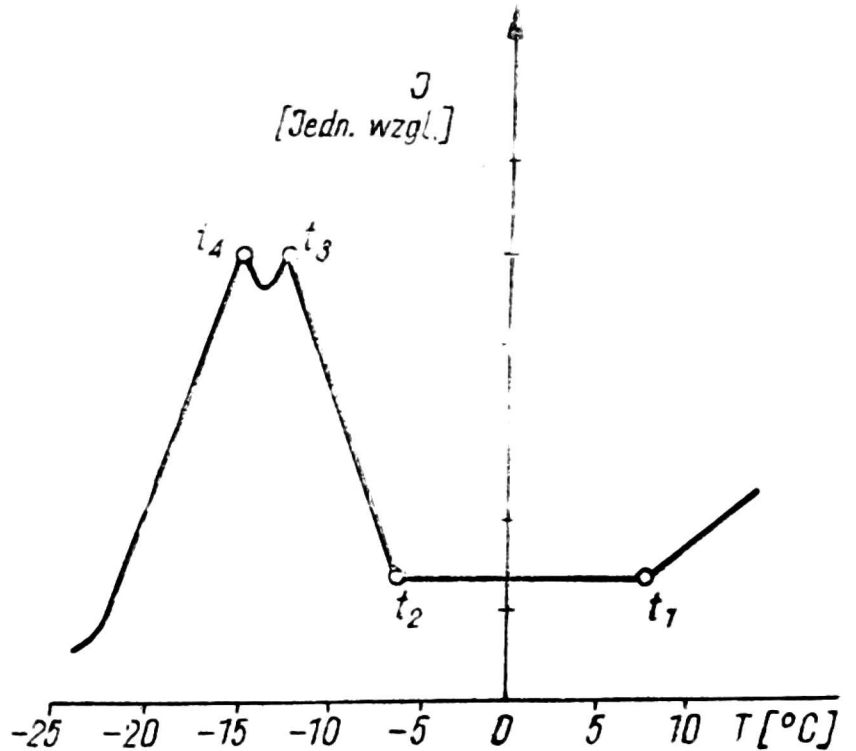
Wzbudzenie FSL w badanych obiektach odbywa się najczęściej przy pomocy fosforoskopu. Pomiar temperatury przeprowadza się przy pomocy termistorów. Jako obiekty badane używano kielki zbóż i roślin motylkowych, a także liście roślin pokojowych, drzew i krzewów. Przykładowy przebieg diagramu ciepło- i mrozoodporności przedstawiono na rysunku 9.



Rys. 9. Przykładowy przebieg zmian natężenia FSL w funkcji zmian temperatury wg (8). Objasnienia w tekście

Przy wzroście temperatury obserwuje się proporcjonalny w dużym zakresie temperatur wzrost natężenia FSL. W okolicach temp. $+50^{\circ}\text{C}$ osiągnięte zostaje maksimum, po którym następuje nieodwracalny spadek intensywności świecenia. Wzrost emisji FSL wraz ze wzrostem temperatury można tłumaczyć zwiększoną prędkością rekombinacji spułapkowanych elektronów z dodatnimi dziurami zlokalizowanymi w chlorofilu. W wypadku, gdy temperatura staje się na tyle wysoka, że następuje denaturacja cytoplazmy i uszkodzenie struktury chlorofilo-lipidowego kompleksu emisja FSL ulega zanikowi (8). Niskotemperaturowe maksimum badano szczególnie uważnie. Niektórzy badacze wyróżniają w nim obecność podwójnego maksimum (18). Przedstawiono to na rys. 10.

W niskotemperaturowej części wykresu zmian intensywności FSL w funkcji temperatury wyróżniono cztery temperatury: t_1 , t_2 , t_3 i t_4 . W temperaturze t_1 następuje prawdopodobnie zahamowanie funkcji życiowych rośliny wskutek czego wchodzi ona w stan tzw. odrętwienia, który trwa aż do obniżenia temperatury do wartości t_2 . Temperatury niższe od t_2 działają szkodliwie, ponieważ zaczyna się prawdopodobnie tworzyć lód w przestrzeniach międzykomórkowych, co staje się przyczyną odwodnienia protoplastu (14). Pierwsze maksimum w temperaturze t_3 sygnalizuje nieodwracalne zakłócenia stacjonarnego przebiegu procesów biochemicz-



Rys. 10. Przykładowy przebieg zmian natężenia FSL w zakresie niskotemperaturowym wg (18). Objaśnienia w tekście

nych. Drugie maksimum w temperaturze t_4 sygnalizuje zmiany destrukcyjne w tkankach spowodowane powstawaniem lodu wewnątrz komórki. Interpretacje zmian intensywności FSL i wartości krytycznych temperatur korelują z danymi osiągniętymi poprzez specjalne doświadczenia wegetatywne (8).

W kilku wypadkach można było porównać dane otrzymane na drodze detekcji FSL oraz detekcji UBCL i w tych wypadkach potwierdziły się uzyskane wyniki. Niskotemperaturowy wzrost intensywności FSL niektórzy badacze tłumaczą uszkodzeniem struktur subkomórkowych w wyniku czego następuje reakcja uprzednio rozdzielonych przestrzennie rodników nadtlenkowych z lipidami. W wyniku utleniania lipidów część powstającej energii wydziela się w postaci promieniowania widzialnego (18).

Przy pomocy detekcji FSL określono szereg ekstremalnych temperatur dla pszenicy, żyta i grochu. W pracy (8) podano następujące skrajne temperatury. Są to kolejno najwyższe dopuszczalne temperatury dla najmniej i najbardziej odpornej z kilku badanych odmian: pszenica — Diamant 40°C , Odesskaja 46°C , żyto — Tetra krótkoźdźbłowa 41°C , Hybryd-naja $42,3^{\circ}\text{C}$, groch — Balwa 42°C , Prewoschodnyj 47°C .

Badano odporność na podwyższone temperatury kielków pszenicy i grochu przy sztucznie zwiększonym zasoleniu. Stosowano roztwory NaCl, CaCl₂ i Na₂SO₄ w stężeniach 0,005, 0,05 i 0,1 M. Ciepłoodporność sprawdzano po upływie od 1 do 3 dób od dnia zasolenia. Hipertoniczne roztwory soli zmniejszały ciepłoodporność. Wysokotemperaturowe maksimum przesuwało się o $4\text{--}5^{\circ}\text{C}$ w kierunku temperatur niższych (8).

Zbadano także ekstremalne temperatury dwóch odmian pszenicy ozimej w listopadzie i w styczniu (8).

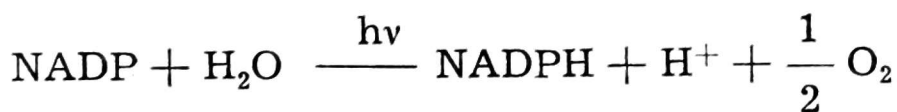
Tabela

Ekstremalne temperatury odmian pszenicy ozimej

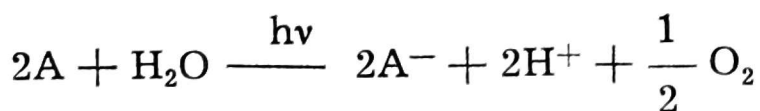
Odmiana	Listopad		Styczeń	
	ciepłoodporność °C	mrozoodporność °C	ciepłoodporność °C	mrozoodporność °C
Uljanowka	41,5	-5,8	38,0	-11,5
PPG-186	41,0	-4,5	37,0	-10,0

Badanie wpływu herbicydów na rośliny uprawne i chwasty

Oprócz czynników fizycznych, jak omawiane uprzednio ekstremalne temperatury, również i czynniki chemiczne mogą nieraz wpływać szkodliwie na rozwój i funkcjonowanie aparatu fotosyntetycznego. Specyficznymi związkami chemicznymi, których zadaniem jest właśnie zakłócanie procesu fotosyntezy są herbicydy grupy triazynowych i mocznikowych. Jak widać ze schematu 2 w procesie fotosyntezy w wyniku szeregu sprzężonych ze sobą reakcji oksydoredukcyjnych następuje redukcja nieorganicznego węgla z CO₂ przez wodór pochodzący z rozkładu wody. Proces rozkładu wody pod wpływem światła nosi nazwę fotolizy wody. Ponieważ pierwszym substratem ulegającym redukcji jest NADP, reakcję fotolizy wody można sumarycznie zapisać:



Reakcja fotolizy należy do pierwszego etapu fosforylacji niecyklicznej noszącej ogólną nazwę reakcji Hilla, którą można zapisać:



Substrat A nazwany czynnikiem Hilla nie musi być związkiem organicznym, może to być np. szczawian żelazawy będący dobrym czynnikiem utleniającym. Doświadczenia tego rodzaju wykonywano w warunkach laboratoryjnych przy użyciu wyizolowanych chloroplastów. W warunkach naturalnych czynnikiem Hilla jest NADP.

W wyniku szeregu badań stwierdzono, że herbicydy będące pochodnymi triazyny jak np. Simazin hamują fotosyntezę w wyniku blokowania reakcji Hilla (9, 22, 24).

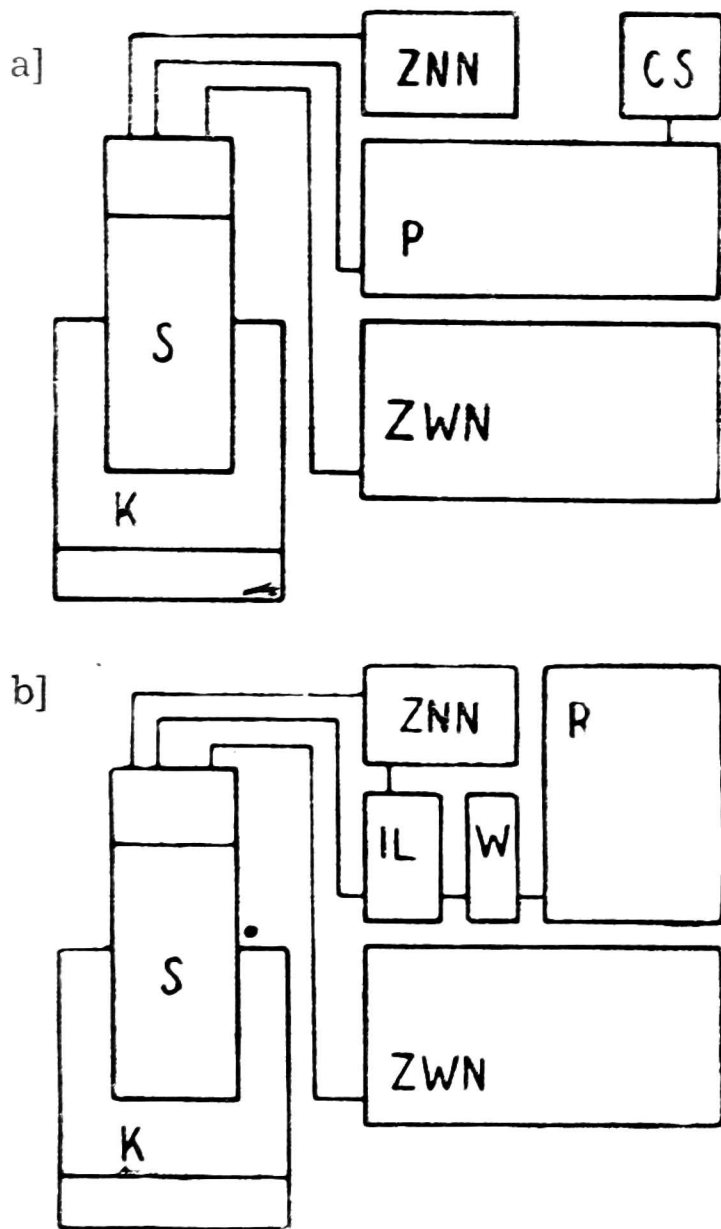
W taki sam sposób działają herbicydy będące pochodnymi mocznika jak np. Afalon, Aresin i in. (13, 25, 36). Niektóre badania dowodzą, że herbicydy mocznikowe inhibują także redukcję cytochromu (6). Miejsce, w którym mogą oddziaływać herbicydy mocznikowe na proces fotosyntezy uwidoczniono na rys. 2.

Ponieważ herbicydy mocznikowe akumulują się w aktywnych miejscach w chloroplastach inhibicja reakcji fotosyntezy następuje już w stężeniach 10^{-7} M (23). Jeden z herbicydów Diuron oznaczany symbolem DCMU jest używany w laboratoryjnych badaniach fotosyntezy jako inhibitor funkcjonowania II fotosystemu. Proces fotosyntezy jest zakłócany także i przez herbicydy typu regulatorów wzrostu jak 2,4-D i MCPA, jednakże przyczyn tego dokładnie jeszcze nie wyjaśniono (23). Specyfika działania nowoczesnych herbicydów systemowych i ich stale wzrastająca rola we współczesnym rolnictwie wymaga dokładnej znajomości sposobu i prędkości ich przemieszczania się, akumulacji, rozkładu, a szczególnie określania optymalnych dawek. Z powyższych względów wydało nam się właściwe wykorzystanie detekcji FSL do badań nad oddziaływaniem wymienionych herbicydów na niektóre rośliny uprawne i chwasty (27a).

Ze względu na niską intensywność FSL pomiary mogły być przeprowadzane jedynie przy pomocy fotopowielaczy i wzmacniająco-rejestrującej aparatury elektronicznej. W omawianej pracy autora użyto fotopowielacza o dużej czułości w czerwonym zakresie widma, typu EMI 9558B oraz wzmacniacza impulsowego (x1000) wraz z układem formująco-dzielącym impulsy wyjściowe. Wymienione elementy stanowią tzw. sondę, która została wbudowana w światłoszczelną kamerę pomiarową. Fotopowielacz był zasilany wysokim napięciem z zasilacza typu ZWN-2,5. Sumę impulsów mierzono przelicznikiem tranzystorowym typu PT-67A. Częstotliwość impulsów mierzono przy pomocy miliwoltomierza V-616 wysterowanego przez integrator liniowy. Wskazania miliwoltomierza były rejestrowane przez rejestrator samopiszący. Schematy blokowe zestawów pomiarowych umieszczono na rysunku 11. Użyto dwie kwantometryczne metody pomiarowe.

1. Zliczano impulsy w przedziale od 5 s do 10 s oraz w przedziale od 20 s do 25 s po odcięciu dopływu światła. W pierwszym zakresie świecenie było oczywiście silniejsze, ale szybko zanikało, w drugim zakresie zanik był wolniejszy przy ogólnie niższej intensywności świecenia. Nazwano je dalej umownie składową szybką i wolną.

2. Wyznaczano i rejestrowano zmiany częstotliwości impulsów w ciągu kilkudziesięciu sekund po odcięciu dopływu światła. Do badań użyto kilku gatunków roślin: fasolę zieloną „Saxa”, żyto Smolickie, pszenicę Ostka Popularna oraz kąkol polny *Agrostemma githago*. Działano dwoma



Rys. 11. Schematy blokowe kwantometrycznych stanowisk pomiarowych:

a) zestaw do pomiarów sumy impulsów

b) zestaw do pomiarów częstotliwości impulsów

K — światłoszczelna kamera, S — sonda, PE — przelicznik elektronowy, R — rejestrator, IL — integrator liniowy, W — wskaźnik, ZNN — zasilacz niskiego napięcia, ZWN — zasilacz wysokiego napięcia

herbicydami, z grupy mocznikowych — aresinem i z grupy triazynowych — simazinem. Rośliny rosły na wodzie wodociągowej, przy oświetleniu światłem fluorescencyjnym — białym, 3500 lx. Wykonano kilka serii pomiarów, w wyniku których stwierdzono bezsprzecznie oddziaływanie herbicydów na intensywność i kinetykę zaniku FSL badanych roślin jedno- i dwuliściennych.

Badano oddziaływanie dokorzeniowe herbicydów na rośliny rosnące w kulturach wodnych. Zauważono wyraźny wpływ koncentracji herbicydu na szybkość jego oddziaływania, przy czym działanie aresinu było silniejsze niż simazinu. Z wykresów wynikało, że identyczne koncentracje obu herbicydów działają silniej na kąkol niż na fasolę.

Zbadano również oddziaływanie herbicydów dolistnie na trzytygodniową fasolę. Można było zauważyć znacznie szybsze działanie zarówno aresinu jak i simazinu. I w tym przypadku aresin działa szybciej niż simazyn tłumiąc FSL w ciągu 40 minut prawie o 80%. Obliczono także w tym doświadczeniu zmiany stosunku składowych, szybciej (pomiar od 5 s do

10 s) do wolnej (pomiar od 20 do 25 s po oświetleniu). Stosunek ten oznaczono literą „m”.

Zrobiono też badania nad długotrwałym, dokorzeniowym działaniem herbicydów na fasolę. W tym celu 10-dniowe rośliny przeniesiono do pożywki Knoppa, do której dodano aresin w różnych koncentracjach. Po ośmiu dniach zbadano kinetykę zaniku FSL przy pomocy rejestratora oraz jednocześnie zmierzono wartość szybkiej i wolnej składowej w celu obliczenia „m”. Stwierdzono wyraźne różnice w wartościach „m” i pewną ich proporcjonalność do stężenia herbicydu. Obszerniejsze omówienie powyższych badań zostało już opublikowane (27b).

Z powyższych badań wynika niejednakowe oddziaływanie herbicydów na różne składowe FSL. Trudno to zjawisko na obecnym etapie badań wnikliwie zinterpretować, jednakże można wykorzystać je do pomiaru pewnych wartości względnych (jak np. współczynnik „m”) mogących dostarczyć informacji o działaniu herbicydowym na rośliny. Tego rodzaju pomiary są wygodne bo uniezależniają wynik detekcji od wielkości począstkowych (np. powierzchnia liścia, stan pigmentacji itp.), a mogłyby służyć do określania koncentracji niektórych herbicydów w środowisku korzeniowym czy nawet w zielonej masie roślin. To ostatnie byłoby możliwe po skorelowaniu wyników otrzymanych przy pomocy standardowych metod pomiarowych z wynikami otrzymanymi na drodze detekcji FSL.

Na podanych przykładach starałem się wykazać zakres możliwości jakie w diagnostyce rolniczej mogłyby spełniać metody oparte o detekcję FSL. W poprzednim artykule (26) podałem również szereg przykładów, które wskazują na możliwości wykorzystania UBCL w podobnych lub nawet tych samych analizach i diagnozach rolniczych. Jak dotychczas w niewielkim stopniu są wykorzystywane zarówno UBCL jak i FSL, mimo że stan badań przeprowadzanych w kilku ośrodkach radzieckich wskazuje na szeroki wachlarz zastosowań, wysoką czułość i dużą prędkość uzyskiwania danych. Omawiane metody pomiarowe wymagają zastosowania wyspecjalizowanej aparatury elektronicznej, jednakże proste zestawy detekcyjne można uzyskać poprzez zaadaptowanie standardowej aparatury radiometrycznej. Badanie ultrasłabych świeceń biologicznych przyczyniło się do wyjaśnienia niektórych zjawisk, a w przyszłości na pewno wiele więcej zagadek dotyczących żywej materii zostanie na tej drodze rozwiązanych. Widać też wyraźnie, że po okresie intensywnych badań podstawowych w dziedzinie ultrasłabych świeceń biologicznych dzisiaj już można mówić o narodzeniu się nowej dyscypliny biofizycznej, której zadaniem jest wykorzystanie uzyskanej wiedzy w biologii stosowanej, medycynie i rolnictwie.

LITERATURA

1. Arnold W., Azzi I.: *Photochem. Photobiol.*, vol. 14, 233—240, 1971.
2. Blaim K.: *Barwniki roślinne*. PWRiL, 1967.
3. Czuchajowska Z., Wojtaszek T.: *Post. Nauk Roln.*, nr 6, s. 38—70, 1971.
4. Doskocz J.E., Zamotajew A.J., Płatonowa O.W., Tarusow B.N.: IV Wsesojuznyj Simpozium 1—4.VI.1971, *Izd. Mosk. U-ta, Tezisy*, s. 42—43, 1971.
5. Doskocz J.E., Jakowlewa A.P., Tarusow B.N.: IV Wsesojuznyj Simpozjum 1—4.VI.1971, *Izd. Mosk. U-ta, Tezisy*, s. 43—44, 1971.
6. Duysens L., Amez J., Kamp B.M.: *Nature (Lond.)*, vol. 190, s. 510, 1961.
7. Dżanumow D. A., Wiesiełowski W.A., Tarusow B.N., Klimow S.W.: IV Wsesojuznyj Simpozium 1—4.VI.1971, *Izd. Mosk. U-ta, Tezisy*, s. 42, 1971.
8. Dżanumow D.A., Szczerbakow A.A.: *Naucz. dokł. wyższej szkoły. Biologicz. nauki*, nr 10, 1971.
9. Exer B.: *Experientia*, vol. 14, s. 135, 1958.
10. Fogg G.E.: *Fotosynteza*. PWN, 1972.
11. Frąckowiak D.: *Postępy Fizyki*, t. 17, z. 4, s. 383—402, 1966.
12. Gaziew M.M., Tarusow B.N., Kitłajew B.N.: IV Wsesojuznyj Simpozium, 1—4.VI.1971, *Izd. Mosk. U-ta, Tezisy*, s. 39, 1971.
13. Gingras G., Lemasson C., Fork D.C.: *Biochem. et biophys. acta*, vol. 69, nr 2, s. 438—440, 1963.
14. Kacperska-Palacz A.: *Postępy Nauk Rol.*, nr 1/2, s. 107—120, 1970.
15. Kitłajew B.N., Własienko J.W.: IV Wsesojuznyj Simpozjum 1—4.VI.1971, *Izd. Mosk. U-ta, Tezisy*, s. 47, 1971.
16. Kitłajew B.N., Kuragin W.I.: IV Wsesojuznyj Simpozium 1—4.VI.1971, *Tezisy*, s. 48, 1971.
17. Kitłajew B.N., Goponienko W.I.: *Inter. Biophysics Congress. Moscow 7—14.VIII.1972*, EXXIII a 1/3, t. 4, s. 342—343, 1972.
18. Kitłajew B.N., Tarusow B.N.: *DAN SSSR*, t. 195, nr 3, s. 725—727, 1970.
19. Magomiedow Z.G., Doskocz J.E., Tarusow B.N.: IV Wsesojuznyj Simpozium, *Izd. Mosk. U-ta, Tezisy* s. 50—51, 1971.
20. Magomiedow Z.G., Rybakowa M.I., Tarusow B.N., Doskocz J.E.: IV Wsesojuznyj Simpozium 1—4.VI.1971, *Izd. Mosk. U-ta, Tezisy*, s. 51, 1971.
21. Marenkow W.S.: *Inter. Biophysics Congress. Moscow 7—14.VIII.1972* EXXII, a 3/7, t. 4, s. 369, 1972.
22. Masztakow S.M., Wołyniec A.P.: *DAN SSSR*, t. 150, nr 1, s. 191—194, 1963.
23. Masztakow S., Diejewa W., Wołyniec A.: *Działanie herbicydów na rośliny uprawne*. PWRiL. Warszawa 1971.
24. Moreland D.E., Hill K.L.: *J. Agr. Food Chem.*, vol. 7, s. 832—837, 1959.
25. Moreland D.E., Hill K.L.: *Weeds*, vol. 11, nr 4, s. 284—297, 1963.
26. Murkowski A.: *Postępy Nauk Rol.*, nr 4, s. 3—16, 1973.
- 27a. Murkowski A.: Use of standard radiometric systems in the study of herbicides action on the photosynthetic luminescence of cultivable plants and the weeds. — Discussion: Use of Nuclear techniques in the study of Accumulations and Translocation of Nutrients and Regulators in Plant Organisms. Warszawa—Jabłonna may 14th—18th, 1973.
- 27b. Murkowski A.: *Prace IS, Skierniewice, S.E*, nr 3, s. 595—606, 1973.

28. Raven P.H.: *Science*, vol. 169, nr 3946, s. 641—646, 1970.
29. Sokołow M.S. et al: IV Wsesojuznyj Simpozium 1—4.VI.1971, Idz. Mosk. U-ta, Tezisy, s. 59—60, 1971.
30. Strebeyko P.: *Fotobiologia*. PWN. 1971.
31. Strehler B., Arnold W.: *J. Gen. Physiol.*, vol. 34, s. 809, 1951.
32. Striekozow B.P., Agarkow W.D.: IV Wsesojuznyj Simpozium 1—4.VI. 1971, Idz. Mosk. U-ta, Tezisy, s. 60, 1971.
33. Tarusow B.N., Doskocz J.E.: IV Wsesojuznyj Simpozium 1—4.VI.1971, Idz. Mosk. U-ta, s. 61, 1971.
34. Tarusow B.N., Iwanow I.I., Pietruszewicz J.M.: *Swierchslabyje swieczienia w biologiczeskich sistiemach.* — Moskwa, Idz. Mosk. Gosud. U-ta. 1967.
35. Villed C.A.: *Biologia*. PWRiL. 1972.
36. Wessels J.S.C., van der Veen R.: *Biochem. et biophys. acta*, vol. 19, s. 548, 1956.
37. Wiesielowa T.W., Wiesielowski W.A.: IV Wsesojuznyj Simpozium 1—4.VI.1971. Idz. Mosk. U-ta, s. 37, 1971.
38. Wiesielowski W.A., Dżanumow D.A.: IV Wsesojuznyj Simpozium, 1—4. VI.1971, Idz. Mosk. U-ta, Tezisy, s. 38, 1971.
39. Wiesielowski W.A. et al: *Inter. Biophysics Congress. Moscow 7—14.VIII. 1972*, EXXIII a 1/3, t. 4, s. 342—343, 1972.
40. Władimirow J.A.: *Swierchslabyje swieczienia pri biochemiczeskich reakcjach.* Moskwa. 1966.