

ANDRZEJ A. TESKE

MECHANIZM RUCHU KOMÓREK SZPARKOWYCH — NOWE DANE DOŚWIADCZALNE I PUNKT WYJŚCIA NOWEJ TEORII

„Słaba przepuszczalność kutikuli dla gazów utrudniałaby znacznie wnikanie do wnętrza liścia dwutlenku węgla i tlenu niezbędnych dla fotosyntezy i oddychania, gdyby nie obecność w skórce licznych i specjalnych szczelin (szparek), przez które mogą wnikać do mezofilu wymienione gazy. Jednak te szparki umożliwiają również uchodzenie pary wodnej z przestworów międzykomórkowych do atmosfery...” (F. Górski: *Fizjologia roślin*, PWN 1962, t. 1, str. 172).

Szparki i regulacja ich apertury poprzez ruchy komórek szparkowych mają więc bardzo duże znaczenie dla życia rośliny przez wpływ na natężenie fotosyntezy i na ilość wody traconej w procesie transpiracji. Mechanizmowi ruchu komórek szparkowych poświęcano wiele uwagi od przeszło stu lat, ale jeszcze do niedawna ilość faktów, a zwłaszcza twierdzeń, które mogłyby być uznane za niewątpliwe, była bardzo skromna. Czytelnik „Wiadomości Botanicznych” miał okazję zapoznać się w 1970 r. z ówczesnym stanem wiedzy o ruchach szparek z artykułu D. Zielińskiej. Autorka omawiała wówczas kilka teorii mechanizmu ruchu komórek szparkowych — widać już choćby z tego, jak chwiejny był stan badań. Nie byłoby sensu nakłaniać czytelnika po krótkim odstępnie czasu do powtórnego rozważania zagadnienia gdyby nie okoliczność, że od 1967 r. pojawiło się wiele prac, które przyniosły istotne, nowe fakty doświadczalne. W oparciu o uzyskane dane sformułowano nową teorię ruchu komórek szparkowych (a raczej dopiero jej podstawy), odsuwającą, jak się wydaje w sposób trwały, dawniejsze hipotezy na drugi plan.

Autor artykułu nie pretenduje do wyczerpującego przedstawienia literatury zagadnienia; chciałby jedynie dać punkt wyjścia do zapoznania się z nowymi faktami doświadczalnymi i nową teorią.

Na wstępie przypomnijmy pewniki znane poprzednio. Od pracy von Mohla, tzn. od 1856 r. ruchy komórek szparkowych wiążemy ze zmianami turgoru. Schwendener (1881, 1889) analizując budowę ścian komórek szparkowych wyjaśnił, jak zmiana turgoru prowadzi do zmiany apertury szparki. Ustalono dalej, że głównymi

czynnikami, które sterują ruchami komórek szparkowych są: stan uwodnienia tkanek liścia, światło i stężenie dwutlenku węgla. W zasadzie światło prowadzi do otwarcia szparki, natomiast deficyt wody lub obecność dwutlenku węgla do jej zamknięcia (u *Crassulaceae* jednak największe rozwarście szparek ma miejsce w ciemności). Prawie zawsze w komórkach szparkowych znajdują się chloroplasty — wyjątkiem jest cebula (*Allium cepa* L.), gdzie dopiero w mikroskopie fluorescencyjnym można stwierdzić obecność drobnych ziarnistości zawierających chlorofil (Mansfield, Willmer 1969). Są to właściwie wszystkie fakty powszechnie uważane za niewątpliwe. Pozostaje obfitość faktów mniej ogólnych lub mniej niewątpliwych, na których próbowano oprzeć różne teorie ruchów komórek szparkowych, z których żadna nie została powszechnie zaakceptowana, bo żadna nie była wolna od poważnych zarzutów. Aby lepiej ocenić nową teorię przypomnijmy pokrótce poprzednie — szersze ich omówienie można znaleźć w artykułach Levitta (1967), Kettellappera (1963), Pallasa (1966), Zelitcha (1969) i Zielińskiej (1970).

Za Kettellapperem (1963) rozważmy najogólniejsze możliwości:

I. Mechanizm, w którym czynne byłyby same ściany komórkowe (wydaje się nieprawdopodobny).

II. Aktywny (nieosmotyczny) transport wody (nie ma jednoznacznych danych doświadczalnych przemawiających za istnieniem pompy transportującej wodę w komórkach szparkowych ani w innych komórkach roślinnych).

III. Osmotyczny transport wody.

Hipoteza wymieniona w punkcie III jest najbardziej przekonująca, jak jednak dochodzi do wytworzenia siły ssącej? Są dwie możliwości:

III. 1. Substancje, które podwyższają siłę ssącą są wytwarzane w obrębie samej komórki szparkowej.

III. 2. Substancje podwyższające siłę ssącą są transportowane do komórki szparkowej z otoczenia.

Do niedawna wysiłki badaczy koncentrowały się głównie na tezie III. 1. Sformułowano tu kilka hipotez, które tłumaczyły pojawianie się substancji osmotycznie czynnych w komórce (lub obniżenie potencjału wody) przez:

III. 1. a. Gromadzenie asymilatów z procesu fotosyntezy, które bezpośrednio miały zwiększać siłę ssącą (von Mohl 1856). Zarzuty przeciw tej teorii są następujące: brak wykształconych chloroplastów w komórkach szparkowych pewnych roślin; wydajność fotosyntezy w komórkach szparkowych jest około 50 razy za mała; szparki w nieobecności CO_2 otwierają się i na świetle i w ciemności; widmo czynnościowe światła podtrzymującego otwarcie szparek nie zgadza się z widmem czynnościowym fotosyntezy.

III. 1. b. Hydrolizę nieczynnej osmotycznie skrobi do cukrów (Kohl 1895); rozwinął tę teorię Sayre (1923, fotosynteza poprzez obniżenie stężenia CO_2 daje wzrost pH sprzyjający hydrolizie skrobi), zmodyfikował ją Scarth (1932, później Levitt 1967 — CO_2 zmienia pH nie bezpośrednio, lecz przez zmiany stężenia kwasów organicznych) — zarzuty: czasami obserwuje się korelację między zawartością skrobi i aperturą szparek, czasami takiej korelacji nie ma; komórki szparkowe cebuli nie zawierają skrobi (niewykluczone, że zawierają inne polisacharydy); spotykane

zmiany stężenia CO_2 są zbyt małe dla uzyskania potrzebnych zmian pH; w buforze o pH optymalnym dla syntezy skrobi szparki otwierają się; pobieranie wody przez komórki szparkowe nie ustaje nawet po (sztucznie wywołanym) całkowitym zniknięciu skrobi.

III. 1. c. Zmiany przepuszczalności komórek szparkowych dla pewnych substancji (np. elektrolitów), które wnikając do tych komórek wpływają na szybkość reakcji enzymatycznych (Linsbauer 1916) — zarzuty: dotyczy to właściwie tylko szybkości procesu a nie jego kierunku, czyli tłumaczy albo tylko otwieranie, albo tylko zamykanie (zdaniem Kettellappera stwarza więcej problemów niż rozwiązuje).

III. 1. d. Zmiany w uwodnieniu koloidów protoplazmy (Scarth 1929); zarzuty: nie stwierdzono korelacji między otwieraniem się szparek a pęcznieniem koloidów w komórkach szparkowych.

Wymieniliśmy tylko główne hipotezy nie rozpatrując bardzo pomysłowych niekiedy wariantów w obrębie każdej z nich ani innych interesujących pomysłów (np. Siegenthaler i Packer 1965 — cyt. za Levittem 1967 — próbowali oprzeć mechanizm ruchu komórek szparkowych na zmianach objętości chloroplastów zachodzących pod wpływem światła). Wspomnijmy jeszcze o próbie połączenia przedstawionych wyżej hipotez w jedną, według której ruchy komórek szparkowych miały zachodzić w wyniku współdziałania wielu procesów przedstawionych wyżej jak: fotosynteza, zmiany pH, zmiany w strukturze koloidów i aktywności enzymów. Podejście takie wymienia i krytykuje Pallas (1966) zarzucając mu zbyt duże skomplikowanie i trudności przy próbie weryfikacji. Dla piszącego te słowa podejście takie, jeśli nie zawiera szczegółowego uzasadnienia, jest krokiem prawie rozpaczliwym: równa się stwierdzeniu, że w komórce zachodzą dziesiątki różnych procesów i na pewno któryś z nich, w zależności od konkretnej sytuacji, można uczynić odpowiedzialnym za ruch komórek szparkowych. Okoliczność, że żadna z wymienionych teorii nie uzyskała powszechnej aprobaty, może nasuwać podejrzenie, że może żadna nie jest prawdziwa. Skierowało to uwagę badaczy na możliwość II — aktywnego transportu wody, ale i tu nie posunięto się naprzód. W przeszło sto lat od rozpoczęcia badań mechanizm otwierania się szparek „...nie został ...wyjaśniony. Przeciwnie, można raczej zaryzykować tezę, że wyniki licznych prac zaciemniły dawniejszy przejrzysty obraz i doprowadziły do rozbieżnych a nawet sprzecznych wyników.” (F. Górski *op. cit.*, str. 174).

Pora wyjawic założenia nowej teorii. Można je ująć następująco: otwieranie się szparek zachodzi w wyniku podwyższenia turgoru na skutek wzrostu siły ssącej komórek szparkowych w następstwie pobierania przez te komórki dużych ilości jonów potasu z otoczenia; zamykanie się szparek jest wynikiem wydalania jonów potasu. Jony potasu nie spełniają tu funkcji regulacyjnych (jak to sugerował dawniej Imamura 1943 lub Levitt 1967) — wzrost siły ssącej jest bezpośrednim wynikiem wzrostu stężenia potasu w komórce szparkowej do około 0,3 M lub więcej, co w połączeniu z ewentualnym udziałem jakiegoś anionu, który równoważyłby elektryczny ładunek niesiony przez jony potasu, w zupełności wystarcza do wyjaśnienia obserwowanego wzrostu turgoru w komórkach szparkowych. W naszej pobieżnej klasyfikacji jest to hipoteza objęta w zasadzie punktem III. 2. — w zasa-

dzie, bowiem równoważące aniony mogą być „pierwszą przyczyną” i mogą być wytwarzane w obrębie komórki szparkowej. Hipoteza jest prosta, możliwa do sprawdzenia i w chwili obecnej sprawdzona w szerokim zakresie.

Od roku 1967 opublikowano kilkadziesiąt prac wskazujących na zasadniczą rolę przemieszczania się potasu dla ruchów komórek szparkowych. Czy były jednak prace wcześniejsze, w których sugerowano znaczenie jednowartościowych jonów, zwłaszcza potasu, dla tych ruchów? Na uwagę zasługuje praca Macalluma z 1905 r., który metodą histochemiczną zaobserwował nagromadzenie się potasu w komórkach szparkowych. Metoda przez niego zastosowana jest z powodzeniem używana i dziś. Wpływ jednowartościowych jonów badali potem m. in. Iljin (1922) i Imamura (1943) — nie badali jednak wpływu tych jonów w powiązaniu z działaniem światła i nie uchwycili wysokiej specyficzności jonów potasu. Imamura, w odróżnieniu od Iljina, trafnie oceniał większą skuteczność potasu w otwieraniu szparek w porównaniu z innymi jonami i wskazywał na gromadzenie się tego pierwiastka w komórkach szparkowych, przypisywał mu jednak rolę regulacyjną. Na znaczenie jonów potasu wskazywały również prace Yamashita (1952) i Fujino (1959).

Dłaczego do 1967 r. nie udało się stwierdzić głębszego powiązania między pobieraniem jonów potasu a ruchem komórek szparkowych, które dzisiaj wydaje się już oczywiste i aż trudne do przeoczenia? Wydaje się, że główną przyczyną były niepowodzenia w próbach uzyskania poprawnych reakcji szparek w skrawkach skórki zdejmowanych z liścia i przetrzymywanych w roztworach doświadczalnych na czynniki zewnętrzne jak światło i CO₂. Skrawki takie byłyby (i dziś są) doskonałym obiektem doświadczalnym — cóż, kiedy dawały reakcje nietypowe lub nie dawały żadnych reakcji. Dopiero Fujino (1967) na skrawkach skórki liści *Commelina communis* L. i Fischer (1968) na *Vicia faba* L. otrzymali poprawne reakcje szparek na światło w powietrzu pozbawionym CO₂: światło otwierało szparki, ciemność powodowała zamykanie się szparek, reakcje były odwracalne i powtarzalne. Okazało się, że warunkiem wystąpienia poprawnych reakcji na światło było umieszczenie skrawków skórki na powierzchni roztworu zawierającego sole potasu. Znalazienie tego warunku dało bardzo dogodny obiekt doświadczalny a zarazem podstawę do sformułowania hipotezy, że potas jest czynnikiem zasadniczym dla mechanizmu ruchu.

Metoda pracy na skrawkach skórki liści spotkała się z zastrzeżeniami (Willmer i Mansfield 1969 b), została jednak następnie niejednokrotnie sprawdzona przez porównanie z doświadczeniami na odciętych liściach lub całych roślinach, dając zgodne wyniki. Obecnie jest stosowana nawet przez uprzednich przeciwników. Oczywiście nie należy zapominać, że ma się wtedy sytuację mogącą się różnić od sytuacji komórek szparkowych w nietkniętym liście. Ostatnio Allaway i Hsiao (1973) podali ulepszenie metody pracy na skrawkach *Vicia faba* przez opracowanie sposobu pozwalającego zachować przy życiu i w dobrym stanie wyłącznie komórki szparkowe. Osiąga się to przez przetaczanie po skrawku lekkiego walca ze szkła organicznego połączone z wywieraniem pewnego nacisku. Zwykle komórki skórki nie przeżywają takiego zabiegu w przeciwieństwie do komórek szparkowych i w rezultacie skrawek stanowi „zespół izolowanych komórek szparkowych”. Unikamy

wtedy wpływu zwykłych komórek skórki, który może zniekształcać wynik eksperymentu na komórkach szparkowych. Oczywiście nie znaczy to, że chcemy ten wpływ w ogóle zignorować; chcemy go tylko uniknąć w danej sytuacji doświadczalnej.

Następnym czynnikiem, który umożliwił szybki postęp badań było zastosowanie następujących metod wykazywania gromadzenia potasu przez komórki szparkowe:

1) izotopy promieniotwórcze potasu i rubidu (którego izotop jest wygodniejszy w użyciu, a przez roślinę nie jest odróżniany od potasu — por. np. Rains i Epstein 1967); badano promieniotwórczość całego skrawka lub roztworu na którym skrawek się unosił;

2) metody histochemiczne polegające na traktowaniu skrawka azotynokobaltanem sodu, który w komórce przechodzi w azotynokobaltan potasu i jest następnie utrwalany siarczkiem amonu; stopień zaczernienia obserwowany pod mikroskopem świadczy o ilości nagromadzonego potasu;

3) oznaczanie stężenia potasu w pojedynczych komórkach, lub nawet w częściach komórki przy zastosowaniu rentgenowskiej mikrosondy elektronowej („*electron microprobe*”): w metodzie tej kieruje się na obiekt, np. pojedynczą komórkę szparkową, wiązkę rozprószonych elektronów mającą średnicę paru μm ; elektrony wnikając w badany materiał (na niezbyt dużą głębokość rzędu paru μm) wybijają elektrony z powłok *K* atomów preparatu — przy zapełnianiu zwolnionej orbitali zachodzi emisja promieniowania rentgenowskiego, którego długość fali jest charakterystyczna dla danego pierwiastka, a natężenie emitowanej linii pozwala określić ilość tego pierwiastka. Jest to dość kosztowna aparatura stosowana od niedawna, ale z powodzeniem i coraz częściej także i w fizjologii roślin. Oczywiście można przy jej pomocy mierzyć nie tylko stężenia potasu, lecz i innych pierwiastków;

4) oznaczanie potasu wyekstrahowanego chemicznie ze skrawków na fotometrze płomieniowym; wymagana jest modyfikacja przyrządu a i tak pracuje się na granicy czułości. Metoda ta ma mniejsze znaczenie, jest jednak interesujące, że daje wyniki zgodne z innymi metodami.

Ostatnim wreszcie czynnikiem, który odegrał istotną rolę w ugruntowaniu poglądu na znaczenie jonów potasu dla ruchów szparek, było odkrycie substancji, przy pomocy których można tymi ruchami sterować. Okazało się, że kwas abscy-synowy (ABA), znany hormon roślinny regulujący m. in. odcinanie liści, starzenie się, kwitnienie i spoczynek (por. artykuł przeglądowy Addicotta i Lyona 1969), w stężeniu 10^{-7}M bardzo wyraźnie zmniejsza transpirację poprzez zamykanie szparek: Little i Eidt (1968), Mittelhauser i Steveninck (1969, 1971), Jones i Mansfield (1970, 1971), Tucker i Mansfield (1971), Cummins *et al.* (1971), Loveys *et al.* (1973). Działanie jego, w przeciwieństwie do innego czynnika anty-transpiracyjnego jakim jest octan fenylortęciowy (PMA), nie zakłóca bezpośrednio procesu fotosyntezy, zmniejsza ją jedynie pośrednio przez ograniczenie dopływu CO_2 w wyniku zamknięcia szparek. Wydaje się, że ABA spełnia rolę czynnika regulującego transpirację w roślinie: stwierdzono, że w liściach roślin poddanych suszy następuje zwiększenie syntezy ABA (Wright i Hiron 1969, Mizrahi *et al.* 1970, Most 1971).

Odkryto także inny czynnik powodujący tym razem otwieranie się szparek. Jest to toksyna należąca do substancji typu marasmin, wytwarzana przez *Fusicoccum amygdali* Del., grzyb patogenny dla migdału (*Prunus amygdali* St.) i brzoskwini (*Prunus persica* L., St.), który oprócz powodowania zmian w miejscach zakażenia powoduje także wędnięcie i usychanie liści (Turner i Graniti 1969, Turner 1972). Toksyna ta, to glikozyd cyklopropanoterpenu („*glicoside of tricarboyclic terpene*”) o masie cząsteczkowej 680 — otwiera szparki (nie tylko u migdału czy brzoskwini, ale i u innych roślin) w stężeniu 10^{-5} M. Turner myśli o wykorzystaniu fusikoksyny do celów praktycznych: przyspieszania wysychania siana (cyt. za Lange 1972) — czy będzie ona nieszkodliwa dla organizmów stykających się potem z sianem?

Spróbujmy teraz przedstawić dowody uzyskane od 1967 roku na istotną rolę potasu dla ruchów szparek i dowody przemawiające za teorią ruchu opartą na roli potasu jako czynnika osmotycznie czynnego.

W następujących pracach stwierdzono, że do otwarcia szparek pod wpływem światła w izolowanych skrawkach skórki unoszących się na powierzchni roztworu potrzebna jest obecność potasu w roztworze:

Fujino 1967 — na *Commelina communis* i *Allium cepa*; wpływ jonów potasu wiązał ze zwiększoną aktywnością ATP-azy, której to aktywności nie udało się potwierdzić późniejszym badaczom.

Fischer 1968a, 1968b — na *Vicia faba*.

Fischer i Hsiao 1968 — na *Vicia faba*.

Willmer i Mansfield 1969a, 1969b — na *Commelina communis* i *Vicia faba* stwierdzają że w skrawkach izolowanych ruchy są związane z obecnością i akumulacją jonów, ale nie uważają tym samym za udowodnione, że odpowiada to dokładnie sytuacji w nietkniętym liściu; dla *Commelina* znaleźli, że sód wywiera jakoby silniejsze działanie niż potas — zarzucano im, że stosowali zbyt wysokie stężenia kationów w pożywce, a mianowicie od 0,1 do 1,0 M; Fischer np. stosował stężenia KCl rzędu 10 mM i stwierdził, że 100 mM wpływa już ujemnie; prócz tego pożywka ich nie zawierała wapnia, w którego nieobecności pobieranie jonów jest zakłócone; zarzucano im także, że w częściowo izolowanych skrawkach skórki (w pewnych partiach nieoddzielonych od liścia) przyczyną odmiennych reakcji może być wpływ pozostałych przy życiu komórek skórki zakłócających sytuację doświadczalną.

Humble i Hsiao 1969 — na *Vicia faba* — podają, że do ruchu komórek szparkowych jest jednak specyficznym wymagany potas i że poziom specyficzności znacznie przekracza i tak przecież wysoką specyficzność dla różnych jonów obserwowaną na innych komórkach roślinnych. Piszą, że jest to pierwszy przykład w fizjologii roślin, gdzie konkretny proces jest specyficznym związany z rolą potasu.

Pallaghy 1970 — *Vicia faba* wykazał pozytywny wpływ jonów potasu, choć także i sodu; wskazywał na pewną rolę wapnia.

Thomas 1970a, 1970b, 1971, 1972 — na *Nicotiana tabacum* wskazywał na istotny wpływ potasu, a także w pewnych warunkach i sodu; sugerował, że u sukulentów odmienne reakcje szparek na światło mogą być wynikiem działania mechanizmu opartego na ruchach sodu; badał wpływ ouabainy, CO_2 i, podobnie jak Fujino, ATP.

Pallaghy 1971 — na *Zea mays* wykazał, że nie trzeba dodawać do pożywki potasu, bo tego typu aparat szparkowy stanowi samowystarczającą całość — komórki szparkowe i pomocnicze wymieniają potas między sobą.

Przedstawimy teraz prace, w których stwierdzono, że w procesie otwierania się szparek potas gromadzi się w komórkach szparkowych, a w procesie zamykania jest z nich wydalany:

Fujino 1967 — na *Commelina communis* i *Allium cepa* wykazał metodą histochemiczną gromadzenie się potasu przy otwieraniu; sugerował że potas przechodzi do komórek szparkowych z mezofilu.

Fischer 1968b — na *Vicia faba* przy pomocy izotopów niezależnie od Fujino potwierdził jego obserwacje; szacuje wzrost stężenia potasu w komórce szparkowej podczas otwierania na około 0,3 M.

Fischer i Hsiao 1968 — na *Vicia faba* przy pomocy izotopów określają wzrost stężenia potasu podczas otwierania na około 0,3 M.

Sawhney i Zelitch 1969 — na *Nicotiana tabacum* przy pomocy mikros sondy elektronowej stwierdzili, że zachodzi liniowy związek między aperturą szparki a stężeniem potasu w komórce szparkowej, związek ten jest identyczny zarówno przy otwieraniu jak i przy zamykaniu się szparki; przy otwieraniu do pełnej apertury następuje wzrost stężenia od 0,2 do 0,5 M; sugerują przenoszenie potasu do komórek szparkowych z komórek skórki.

Humble i Hsiao 1970 — na *Vicia faba* stwierdzili metodą histochemiczną i izotopową gromadzenie się potasu w komórkach szparkowych; badali udział fosforylacji oksydacyjnej i fotofosforylacji na ruch szperek i akumulację potasu.

Willmer i Mansfield 1970a — na *Commelina communis* wykazują histochemicznie gromadzenie się potasu w komórkach szparkowych pod wpływem światła; przy pomocy izotopów stwierdzają pobieranie potasu (także i sodu) przez skrawki skórki; uważają, że potas przemieszcza się tylko w obrębie skórki (nie przechodzi z mezofilu), że reakcje szperek w skrawkach są reprezentatywne dla przebiegu reakcji szperek na nietkniętych roślinach (ponieważ szparki w skrawkach reagują nie tylko na światło ale także i na zmiany stężenia CO₂); sądzą że akumulacja kationów jest częścią mechanizmu ruchów szperek odpowiedzialną za wpływ światła i że może jest jeszcze jakiś inny mechanizm regulowany stężeniem CO₂; obserwowali zanik skrobi podczas otwierania się szperek i zastanawiają się nad możliwością powiązań hydrolyzy skrobi z akumulacją potasu.

Humble i Raschke 1971 — na *Vicia faba* badali mikros sondą elektronową stężenie K, Na, Cl, P, S, Mg, Ca: przy otwieraniu się szperek nieznacznie wzrastała ilość Cl w komórkach szparkowych, bardzo wyraźnie rosła ilość potasu (stężenie K wyliczone dla otwartej szparki sięga wg nich do 0,9 M) natomiast stężenia pozostałych pierwiastków nie wykazywały zmian; sugerują, że ładunek elektryczny jonów potasu jest równoważony przez jony organiczne powstające w komórkach szparkowych (może jako skutek dopływu potasu, może jako efekt pierwotny pociągający za sobą akumulację potasu).

Pallaghy 1971 — na *Zea mays* wykazał metodą histochemiczną przemieszczanie się potasu z komórek pomocniczych do komórek szparkowych podczas otwierania się szparki pod wpływem światła lub w ciemności przy pozbawieniu CO₂.

Raschke i Fellows 1971 — na *Zea mays* metodą mikros sondy elektronowej i metodą histochemiczną stwierdzili nagromadzenie się potasu w komórkach szparkowych podczas otwierania i jednoczesny ubytek potasu z komórek pomocniczych; ruchom potasu towarzyszył ruch jonów chloru w natężeniu około połowę mniejszym; gromadzenie się jonów było zauważalne już po 1—2 minutach od momentu podania światła; proces zachodzi z ogromną szybkością przekraczającą o rząd wielkości najszybsze obserwowane tempo pobierania potasu przez korzenie roślin; metoda sondy elektronowej była tak dostosowana do badań mikroobektów, że mogli z powodzeniem badać lokalizację potasu w obrębie komórki.

Mansfield i Jones 1971 — na *Commelina communis* potwierdzili metodą histochemiczną gromadzenie się potasu w komórkach szparkowych.

Fischer 1972 — na *Vicia faba* histochemicznie i izotopami wykazał ilościowy związek między wzrostem stężenia potasu w komórkach szparkowych a aperturą szparki: wzrost stężenia o 40 mM daje wzrost apertury o jeden μm . Ciśnienie osmotyczne wynikające ze wzrostu stężenia potasu wynosi 1,5 bara/ μm stanowiąc główną część wzrostu ciśnienia osmotycznego obserwowanego w komórce szparkowej — 2,0 bara/ μm .

Hsiao *et al.* 1973 — na *Vicia faba* przy pomocy izotopów stwierdzają identyczność widm czynnościowych pobierania rubidu (zastępującego w doświadczeniu potas) i otwierania się szperek pod wpływem światła. Sądzą, że proces pobierania potasu i otwierania szperek dla małych intensywności światła nie jest związany z fotosyntezą, dla dużych intensywności światła może natomiast być związany z fotosyntezą.

Allaway i Hsiao 1973 — na *Vicia faba* metodą histochemiczną i fotometrem płomieniowym wykazują nagromadzenie się potasu w komórkach szparkowych przy otwieraniu; wzrost stężenia wyliczają na 0,5 M.

Willmer i Pallas 1973 — na około 30 gatunkach roślin poczynając od paprotników, przez nago-

załążkowe i jedno- i dwuliścienne okrytozałążkowe wykazują, że zawsze zachodzi związek między nagromadzeniem potasu a otwarciem szparki dla szparek liści a także liścieni, działek i płatków kwiatu oraz ości kłosa. W sporadycznych tylko wypadkach związek ten nie jest bardzo wyraźny. W przypadku szparek zamkniętych często obserwuje się duże ilości potasu w skórce lub w komórkach pomocniczych. Także na sukulentach obserwowali akumulację potasu, wbrew sugestiom Thomasa, który dla tych roślin sugerował mechanizm oparty na ruchach sodu.

Omówmy jeszcze prace, w których badano związek między akumulacją potasu a ruchami szparek wywoływanymi nie zmianami natężenia światła lub dwutlenku węgla, lecz kwasem abscysynowym lub fusikoksyną:

Mansfield i Jones 1972 — na *Commelina communis* wykazali metodami histochemicznymi na izolowanych skrawkach skórki i na całych liściach, że kwas abscysynowy w stężeniu 0,1 mM powoduje zamknięcie szparek i brak nagromadzenia potasu w komórkach szparkowych, komórki te zawierają jednocześnie dużo skrobi.

Horton i Moran 1972 — na *Vicia faba* wykazali metodą histochemiczną, że komórki szparkowe traktowane kwasem abscysynowym w stężeniu 5 mg/l zamykają się i nie gromadzi się w nich potas.

Turner 1972 — na *Phaseolus vulgaris* metodą histochemiczną stwierdził, że szparki traktowane fusikoksyną w stężeniu 10^{-5} M otwierają się zarówno na świetle jak i w ciemności, i że komórki szparkowe akumulują wtedy potas.

Squire i Mansfield 1972 — na *Commelina communis* wykazali metodą histochemiczną, że kwas abscysynowy zamyka szparki i komórki szparkowe zawierają wtedy mało potasu, natomiast fusikoksyna, nawet w obecności kwasu abscysynowego, otwiera szparki i komórki szparkowe zawierają wtedy dużo potasu. Podanie fusikoksyny powoduje także wzrost przepuszczalności komórek szparkowych dla mannitolu.

Autor niniejszego przeglądu nie znalazł prac, w których udało się podważyć wymowę przedstawionych wyżej doświadczeń. Wydaje się, że decydująca rola akumulacji jednowartościowych kationów, przede wszystkim potasu, dla ruchu komórek szparkowych nie ulega wątpliwości. Wszystkie czynniki prowadzące do otwarcia szparki (światło, usunięcie CO_2 , fusikoksyna) prowadzą jednocześnie do znacznego nagromadzenia potasu w komórkach szparkowych wielu różnych gatunków roślin; wszystkie czynniki prowadzące do zamknięcia szparek (ciemność, CO_2 , kwas abscysynowy) prowadzą jednocześnie do obniżenia zawartości potasu w komórkach szparkowych. Przy otwieraniu się szparki potas jest pobierany przez komórki szparkowe ze zwykłych komórek skórki lub komórek pomocniczych, przy zamykaniu jest do nich wydalany z komórek szparkowych. Wykazano, że zachodzi liniowy związek między ilością potasu w komórkach szparkowych a aperturą szparki, ustalono zgodność widm czynnościowych dla pobierania potasu i otwierania szparek, oraz dokonano oceny wzrostu stężenia potasu (od 0,3 do 0,9 M w zależności od obiektu i autora) i wynikającego stąd wzrostu ciśnienia osmotycznego, który jest niewiele tylko mniejszy od obserwowanego wzrostu ciśnienia osmotycznego w komórkach szparkowych przy otwieraniu.

Nie znaczy to jednak, że choćby tylko podstawy nowej teorii są już w pełni wyjaśnione. Nie wiadomo np. czy sód może pełnić jakąś istotniejszą rolę. Nie wiadomo, jak jest równoważony dopływ ładunku elektrycznego przy przepływie jonów potasu: czy równoważy go czasem jon chloru czy też przede wszystkim aniony kwasów organicznych wytwarzane w komórkach szparkowych, i jakie są to kwasy — czy glicerolowy, malonowy, cytrynowy jak podają Pallas i Wright (1973)? Czy wy-

tworzenie jonów organicznych pociąga za sobą transport jonów potasu, czy też dopływ potasu inicjuje syntezę kwasów? Czy hydroliza skrobi, czynnik tak często podkreślany, ma jednak jakiś udział w mechanizmie otwierania szparek i jaki: przez dostarczanie energii z wzmoczonej fosforylacji oksydatywnej czy przez rozpad do kwasów organicznych? Jaki jest mechanizm działania kwasu absycynowego i fusikoksyny? I jak czynniki takie jak światło, dwutlenek węgla i pewne substancje chemiczne mogą oddziaływać na wciąż ten sam proces akumulacji potasu?

Za wcześnie byłoby zatem powiedzieć, że mechanizm ruchu komórek szparkowych został nareszcie wyjaśniony. Wydaje się, że jest to dopiero punkt wyjścia do opracowania pełnej teorii, chociaż punkt wyjścia bardzo szczęśliwy i obiecujący. Mechanizm ten sprowadza się bowiem do znacznie ogólniejszego zagadnienia, które jest intensywnie rozpracowywane, zwłaszcza w ciągu ostatniego ćwierćwiecza i mimo to nadal nie jest wyjaśnione, mianowicie do mechanizmu pobierania i akumulacji jonów przez komórki roślinne. Postęp w tej dziedzinie będzie odtąd oznaczał także postęp w poznawaniu mechanizmu ruchu szparek a może i nie tylko szparek, ponieważ już są doniesienia wiążące inne ruchy turgorowe roślin z przemieszczaniem się potasu (Satter *et al.* 1973, Galston *et al.* 1973). Wydaje się także, że aparat szparkowy, interesujący sam przez się, może też stanowić interesujący obiekt do badania mechanizmu pobierania jonów w ogóle, bowiem akumulacja potasu przez komórki szparkowe zachodzi z niespotykaną gdzie indziej szybkością oraz natężeniem i łatwo daje się sterować. Być może pewną rolę w procesie szybkiej akumulacji odgrywają plazmodesmy, na których obecność między komórkami szparkowymi a komórkami otaczającymi znów ostatnio wskazywano (Singh i Srivastava 1973) wbrew dawniejszym poglądom (Kettelapper 1963).

Interesujący jest zwłaszcza fakt przemieszczania się potasu w aparacie szparkowym jako skutek działania światła, jako że w ciągu ostatnich kilku lat zwrócono szczególną uwagę na powiązania między działaniem światła na komórki glonów a także roślin wyższych i strumieniami jonów potasu, sodu, chloru i wodoru oraz zmianami potencjału elektrycznego (literatura u MacRobbie 1970). Wypracowano już szereg koncepcji wiążących aktywny ruch jonów przez membrany komórek bądź z fosforylacją oksydatywną bądź z fotofosforylacją cykliczną czy też niecykliczną bądź nawet bezpośrednio z fotosyntetycznym przepływem elektronów. Ponieważ przemieszczanie się potasu w aparacie szparkowym zachodzi m. in. pod działaniem światła, nasuwa się koncepcja powiązania transportu potasu z fotofosforylacją. Fujino (1967) próbował wiązać przepływ jonów potasu z udziałem ATP. Także Thomas (1971) sugerował udział ATP — z fosforylacji oksydatywnej. Po części zgadzał się z nim Turner (1972) dołączając jednak udział fotofosforylacji niecyklicznej i cyklicznej. Humble i Hsiao (1970) oraz Willmer i Mansfield (1970b) wskazują natomiast na powiązanie ruchów szparek z pierwszym fotosystemem i to nie poprzez ATP lecz przez bezpośrednie sprzężenie z transportem elektronów. Badania w tym kierunku na komórkach szparkowych dopiero się zaczynają.

Dla piszącego te słowa szczególnie interesujące jest pytanie, czy przepływowi jonów potasu do komórek szparkowych towarzyszą zmiany potencjału elektrycznego. Dotychczas jedynie Pallaghy (1968) badał potencjał elektryczny komórek

szparkowych liści (na *Nicotiana tabacum*) uzyskując średnią wartość potencjału około -70 mV (w 10 mM KCl), który nie wykazywał wrażliwości na światło. Ostatnio jednak coraz częstsze są doniesienia (por. np. Spanswick 1972), że komórki roślin wyższych mogą mieć potencjały znacznie bardziej ujemne i że wartości rzędu kilkudziesięciu miliwoltów mogą stanowić potencjał odpowiadający zakłóconej sytuacji w komórce. Autor artykułu w nieopublikowanych badaniach również otrzymywał potencjał komórek szparkowych (na *Vicia faba*) rzędu $-70 \div -100$ mV niewrażliwy na światło. Uzyskał natomiast zmiany potencjału pod wpływem światła w zwykłych komórkach skórki, jeśli dawały one odpowiednio wysoką ujemną wartość potencjału po wprowadzeniu mikroelektrody. Nie udało się dotąd stwierdzić, czy w reakcji potencjału komórek skórki na światło pośredniczą komórki szparkowe, czy też same komórki skórki są wrażliwe na światło.

Podsumowując przedstawione badania można stwierdzić, że wśród badaczy zajmujących się ruchami szparek przyjął się pogląd, że nowa teoria ruchu komórek szparkowych oparta na przepływie jonów potasu stanowi najlepszy klucz do wszystkich faktów doświadczalnych i że w każdym razie jakakolwiek przyszła teoria będzie musiała brać pod uwagę fakt i znaczenie przemieszczania się potasu.

Zakład Fizjologii Roślin UMCS w Lublinie

LITERATURA

- Addicott F. T., Lyon J. L., 1969. *Physiology of abscisic acid and related substances*. Ann. Rev. Plant Physiol., 20, 139—164.
- Allaway W. G., Hsiao T. C., 1973. *Preparation of rolled epidermis of Vicia faba. L. so that stomata are the only viable cells: analysis of guard cell potassium by flame photometry*. Aust. J. biol. Sci., 26, 309—318.
- Cummins W. R., Kende H., Raschke K., 1971. *Specificity and reversibility of the rapid stomatal response to abscisic acid*. Planta, 99, 347—351.
- Fischer R. A., 1968a. *Stomatal opening: role of potassium uptake by guard cells*. Science, 160, 784—785.
- Fischer R. A., 1968b. *Stomatal opening in isolated epidermal strips of Vicia faba. I. Response to light and to CO₂-free air*. Plant Physiol., 43, 1947—1952.
- Fischer R. A., 1972. *Aspects of potassium accumulation by stomata of Vicia faba*. Aust. J. biol. Sci., 25, 1107—1123.
- Fischer R. A., Hsiao T. C., 1968. *Stomatal opening in isolated epidermal strips of Vicia faba. II. Response to KCl concentration and the role of potassium absorption*. Plant Physiol., 43, 1953—1958.
- Fujino M., 1959. *Stomatal movement and active migration of potassium* (w języku japońskim). Kagaku, 29, 660—661.
- Fujino M., 1967. *Role of adenosine triphosphate and adenosinetriphosphatase in stomatal movement*. Sci. Bull. Fac. Educ. Nagasaki Univ., 18, 1—47.
- Galston A. W., Satter R. L., Keinrs. J. J., Freeman J., Bitensky M. W., Applewhite P. B., Bau Y. S., 1973. *Physiology of pinna movement in Samanea saman*. Plant Physiol., 51 supplement, 17.
- Horton R. F., Moran L., 1972. *Abscisic acid inhibition of potassium influx into stomatal guard cells*. Z. Pflanzenphysiol., 66, 193—196.
- Hsiao T. C., Allaway W. G., Evans L. T., 1973. *Action spectra for guard cell Rb⁺ uptake and stomatal opening in Vicia faba*. Plant Physiol. 51, 82—88.
- Humble G. D., Hsiao T. C., 1969. *Specific requirement of potassium for light activated opening of stomata in isolated strips*. Plant Physiol., 44, 230—234.

- Humble G. D., Hsiao T. C., 1970. *Light dependent influx and efflux of potassium of guard cells during stomatal opening and closing*. Plant Physiol., 46, 483—487.
- Humble G. D., Raschke K., 1971. *Stomatal opening quantitatively related to potassium transport. Evidence from electron probe analysis*. Plant Physiol. 48, 447—453.
- Iljin W. S., 1922. *Physiologischer Pflanzenschutz gegen schädliche Wirkung von Salzen*. Biochem. Z., 132, 526—542.
- Imamura S., 1943. *Untersuchungen über den Mechanismus der Turgorschwankung der Spaltöffnungsschließzellen*. Japan. J. Bot., 12, 251—347.
- Jones R. J., Mansfield T. A., 1970. *Suppression of stomatal opening in leaves treated with abscisic acid*. J. exp. Bot., 21, 714—719.
- Jones R. J., Mansfield T. A., 1971. *Antitranspirant activity of the methyl and phenyl esters of abscisic acid*. Nature, 231, 331—332.
- Kettlapper H. J., 1963. *Stomatal physiology*. Ann. Rev. Plant Physiol. 14, 249—270.
- Kohl F. G., 1895. *Zur Mechanik der Spaltöffnungsbewegung*. Botanisches Beiblatt zur Leopoldina, 31, 1—4.
- Lange O. L., 1972. *Wasserumsatz und Stoffbewegungen*. Fortschr. Botan., 34, 91—112.
- Levitt J., 1967. *The mechanism of stomatal action*. Planta, 74, 101—118.
- Linsbauer K., 1916. *Beiträge zur Kenntnis der Spaltöffnungsbewegungen*. Flora, N. F., 9, 100—143.
- Little C. H. A., Eidt D. C., 1968. *Effect of abscisic acid on budbreak and transpiration in woody species*. Nature, 220, 498—499.
- Loveys B. R., Kriedemann P. E., Törökfalvy E., 1973. *Is abscisic acid involved in stomatal response to carbon dioxide?* Plant Sci. Let., 1, 335—338.
- Macallum A. B., 1905. *On the distribution of potassium in animal and vegetable cells*. J. Physiol., 32, 95—128.
- MacRobbie E. A. C., 1970. *The active transport of ions in plant cells*. Quart. Rev. Biophys., 3, 251—294.
- Mansfield T. A., Jones R. J., 1971. *Effects of abscisic acid on potassium uptake and starch content of stomatal guard cells*. Planta, 101, 147—158.
- Mansfield T. A., Willmer C. M., 1969. *Stomatal responses to light and carbon dioxide in the hart's-tongue fern, Phyllitis scolopendrium Newm.* New Phytol., 68, 63—66.
- Mittelheuser C. J., Steveninck R. F. M., 1969. *Stomatal closure and inhibition of transpiration induced by (RS)-abscisic acid*. Nature, 221, 281—282.
- Mittelheuser C. J., Steveninck R. F. M., 1971. *Rapid action of abscisic acid on photosynthesis and stomatal resistance*. Planta, 97, 83—86.
- Mizrahi Y., Blumenfeld A., Richmond A. E., 1970. *Abscisic acid and transpiration in leaves in relation to osmotic root stress*. Plant Physiol., 46, 169—171.
- Mohl von H., 1856. *Welche Ursachen bewirken die Erweiterung und Verengung der Spaltöffnungen*. Bot. Ztg. 14, 697—704; 713—720.
- Most B. H., 1971. *Abscisic acid in immature apical tissue of sugar cane and in leaves of plants subjected to drought*. Planta, 101, 67—75.
- Pallaghy C. K., 1968. *Electrophysiological studies in guard cells of tobacco*. Planta, 80, 147—153.
- Pallaghy C. K., 1970. *The effect of Ca⁺⁺ on the ion specificity of stomatal opening in epidermal strips of Vicia faba*. Z. Pflanzenphysiol., 62, 58—62.
- Pallaghy C. K., 1971. *Stomatal movement and potassium transport in epidermal strips of Zea mays: the effect of CO₂*. Planta, 101, 287—295.
- Pallas J. E. jr., 1966. *Mechanisms of guard cell action*. Quart. Rev. Biol., 41, 365—383.
- Pallas J. E. jr., Wright B. G., 1973. *Organic acid changes in the epidermis of Vicia faba and their implication in stomatal movement*. Plant Physiol., 51, 588—590.
- Rains D. W., Epstein E., 1967. *Preferential absorption of potassium by leaf tissue of the mongrove Avicennia marina: an aspect of halophytic competence in coping with salt*. Aust. J. Biol. Sci., 20, 847—857.
- Raschke K., Fellows M. P., 1971. *Stomatal movement in Zea mays: shuttle of potassium and chloride between guard cells and subsidiary cells*. Planta, 101, 296—316.
- Satter R. L., Galston A. W., Applewhite P. B., 1973. *Characterization of two distinct phases of rhythmic leaflet movement in Albizzia julibrissin*. Plant Physiol., 51 supplement, 16.

- Sawhney B. L., Zelitch I., 1969. *Direct determination of potassium ion accumulation in guard cells in relation to stomatal opening in light*. *Plant Physiol.*, 44, 1350—1354.
- Sayre J. D., 1923. *Physiology of stomata of Rumex patientia*. *Science* 57, 205—206.
- Scarth G. W., 1929. *The influence of H ion concentration on the turgor and movement of plant cells with special reference to stomatal behaviour*. *Internat. Cong. Pl. Sci. Ithaca Proc.*, 1151—1162.
- Scarth G. W., 1932. *Mechanism of the action of light and other factors on stomatal movement*. *Plant. Physiol.*, 7, 481—504.
- Schwendener S., 1881. *Über Bau und Mechanik der Spaltöffnungen*. *Mber. preuss. Akad. Wiss.*, 46, 833—867.
- Schwendener S., 1889. *Die Spaltöffnungen der Gramineen und Cyperaceen*. *Sitzgsber. preuss. Akad. Wiss.* 39, 65—79.
- Siegenthaler P. A., Packer L., 1965. *Light-dependent volume changes and reactions in chloroplasts. I. Action of alkenylsuccinic acids and phenylmercuric acetate and possible relation to mechanisms of stomatal control*. *Plant Physiol.*, 40, 785—791.
- Singh A. P., Srivastava L. M., 1973. *The fine structure of pea stomata*. *Protoplasma*, 76, 61—82.
- Spanswick R. M., 1972. *Electrical coupling between cells of higher plants: a direct demonstration of intracellular communication*. *Planta*, 102, 215—227.
- Squire G. R., Mansfield T. A., 1972. *Studies of the mechanism of action of fusicoccin, the fungal toxin that induces wilting, and its interaction with abscisic acid*. *Planta*, 105, 71—78.
- Thomas D. A., 1970a. *The regulation of stomatal aperture in tobacco leaf epidermal strips. I. The effect of ions*. *Aust. J. biol. Sci.*, 23, 961—979.
- Thomas D. A., 1970b. *The regulation of stomatal aperture in tobacco leaf epidermal strips. II. The effect of ouabain*. *Aust. J. biol. Sci.*, 23, 981—989.
- Thomas D. A., 1971. *The regulation of stomatal aperture in tobacco leaf epidermal strips. III. The effect of ATP*. *Aust. J. biol. Sci.*, 24, 689—707.
- Thomas D. A., 1972. *The regulation of stomatal aperture in tobacco leaf epidermal strips. IV The effect of bicarbonate/ carbon dioxide*. *Aust. J. biol. Sci.*, 25, 877—884.
- Tucker D. J., Mansfield T. A., 1971. *A simple bioassay for detecting „antitranspirant” activity of naturally occurring compounds such as abscisic acid*. *Planta*, 98, 157—163.
- Turner N. C., 1972. *K⁺ uptake of guard cells stimulated by fusicoccin*. *Nature*, 235, 341—342.
- Turner N. C., Graniti A., 1969. *Fusicoccin: a fungal toxin that opens stomata*. *Nature*, 223, 1070—1071.
- Willmer C. M., Mansfield T. A., 1969a. *Active cation transport and stomatal opening: a possible physiological role of sodium ions*. *Z. Pflanzenphysiol.*, 61, 398—400.
- Willmer C. M., Mansfield T. A., 1969b. *A critical examination of the use of detached epidermis in studies of stomatal physiology*. *New. Phytol.*, 68, 363—375.
- Willmer C. M., Mansfield T. A., 1970a. *Further observations of cation-stimulated stomatal opening in isolated epidermis*. *New Phytol.*, 69, 639—645.
- Willmer C. M., Mansfield T. A., 1970b. *Effects of some metabolic inhibitors and temperature on ion-stimulated stomatal opening in detached epidermis*. *New Phytol.*, 69, 983—992.
- Willmer C. M., Pallas J. E., 1973. *A survey of stomatal movements and associated potassium fluxes in plant kingdom*. *Can. J. Bot.*, 51, 37—42.
- Wright S. T. C., Hiron R. W. P., 1969.(+) — *Abscisic acid, the growth inhibitor induced in detached wheat leaves by a period of wilting*. *Nature*, 224, 719—720.
- Yamashita T., 1952. *Influences of potassium supply upon various properties and movement of the guard cell*. *Sieboldia*, 1, 51—70.
- Zelitch I., 1969. *Stomatal control*. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 20, 329—350.
- Zielińska D., 1970. *Mechanizm ruchu komórek szparkowych w świetle dawnych i nowych hipotez*. *Wiad. bot.*, 14, 13—25.