

EDMUND NOWACKI

ZASTOSOWANIE IZOTOPÓW W FIZJOLOGII I BIOCHEMII ROŚLIN

Motto

... und nun sind sie voll von
Glück dass der Geiger Müller
tickt *

Moda czy konieczność

Pierwsze prace z zastosowaniem promieniotwórczych izotopów zostały wykonane jeszcze przed II wojną światową. Dopiero po roku 1950 zaczyna jednak wzrastać ilość publikacji naukowych, w których do badań metabolizmu roślin użyto substancji ze znaczonymi atomami. W okresie od 1950 do 1960 r. we wszystkich rozwiniętych krajach zwiększa się podaż prostych substancji zawierających znaczone pierwiastki, równocześnie poprawia się jakość aparatury umożliwiającej wykrycie promieniotwórczych izotopów.

Śledząc wzrost udziału prac biochemicznych i fizjologicznych, do których wykonania użyto substancji znaczonej izotopowo w latach 1950—1960 obserwuje się prosty przyrost arytmetyczny. Gdyby tendencja ta zachowała się obecnie, nie powinno być w ogóle publikacji bez stosowania izotopów. Rzeczywistość jest jednak inna. Po osiągnięciu szczytu w 1961 r. udział prac wykonanych z zastosowaniem izotopów przestał wzrastać, utrzymuje się zasadniczo na stałym poziomie. Spowodowane to jest z jednej strony poznaniem ograniczonych możliwości metod izotopowych, z drugiej ich spowszechnieniem. Izotopy przestały być modą i są obecnie stosowane tam, gdzie to jest konieczne. Stosowanie izotopów narzuca dodatkowe rygory na prace naukowe, abstrahując od tego, że zwiększa się zagrożenie zdrowia pracowników bezpośrednio zatrudnionych, wprowadza więcej elementów chemii i fizyki do badań.

* ... Wielka radość ich przenika, że im Geiger-miler tika. Gazetka Inst. Biochemii Roślin Akad. Nauk NRD w Halle.

O ile kilkanaście lat temu każde czasopismo z chęcią przyjęło pracę, w której na przykład umieszczono rośliny w komorze z pleksiglasu z radioaktywnym dwutlenkiem węgla i stwierdzono, że po pewnym czasie rośliny stawały się radioaktywne (patrz motto), to w chwili obecnej wymaga się szczegółowego podania takich parametrów jak radioaktywność właściwa podanej substancji w mCi/mMol. Takie same dane są wymagane dla izolowanych substancji. Kilka lat temu wystarczyło podać radioaktywność w impulsach na gram substancji stwierdzoną przez licznik Geigera, obecnie wymaga się aby radioaktywność podawać w rzeczywistej liczbie rozpadów, a nie w zarejestrowanych impulsach. Nie wszystkie pracownie były w stanie sprostać tym wymaganiom, stąd zahamowanie udziału prac z izotopami w czasopiśmie powszechnie uznanych i jednocześnie wzrost publikacji w różnych materiałach seminaryjnych, sprawozdaniach z kongresów czy różnego typu zeszytach instytutów prac, w których stosowano izotopy. Prace te nawet o ile wnoszą cokolwiek do postępu wiedzy o roślinie, giną niezauważone przez szerszy ogół czytelników.

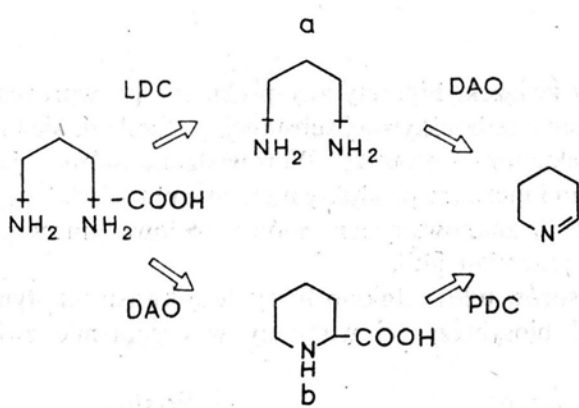
Badanie biosyntezy

Dziedzina, w której izotopy znalazły najwcześniej zastosowanie to badanie biosyntezy i metabolizmu wybranych substancji. Od samego początku pojawiła się kontrowersja do chwili obecnej jeszcze nie rozstrzygnięta. Zaczęto stosować dwie różne metody. Pierwszą była metoda „prekursorów”, na podstawie dostępnych danych tworzy się hipotezę roboczą, konstrukcję hipotetyczną drogą biosyntezy i metabolizmu interesującej substancji. Następnie zakupuje się lub syntezuje w laboratoriach substancje, które powinny być hipotetycznymi prekursorami [11, 12, 19, 20, 24—32].

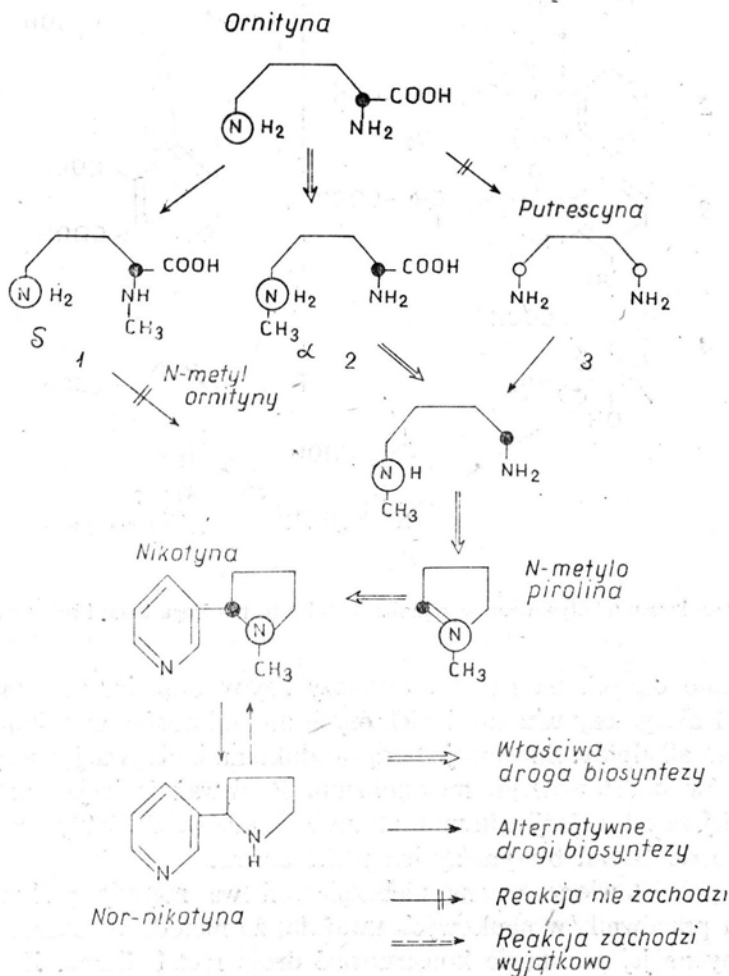
Znając rozmieszczenie radioaktywnych atomów w prekursorze możemy przewidzieć ich rozmieszczenie w substancji pochodnej. W oparciu o te dane możemy następnie po wyizolowaniu substancji, której biosyntezę chcieliśmy poznać, wyizolować z niej na drodze reakcji chemicznych określone atomy i stwierdzić czy są radioaktywne czy też nie. Stwierdzenie, że rozmieszczenie radioaktywnych atomów jest zgodne z hipotezą roboczą zazwyczaj jest ostatecznym dowodem na jej poprawność. Metoda prekursorów ma jednak kilka pułapek, można na jej podstawie wyciągnąć zbyt pochopne wnioski.

1. Wprowadzony do rośliny prekursor nie dotarł do centrów (rybosomy, wakuole itp.) gdzie mógłby zostać przekształcony. Negatywny wynik nie może być interpretowany, że hipotetyczny prekursor nie jest nim rzeczywiście. (Nowacki, Nowacka, Byerrum) (ryc. 1) [25].

2. Hipotetyczny prekursor nie jest rzeczywistym prekursorem lecz dotarł do centrum przemiany i przez niespecyficzny system enzymatyczny został przekształcony w substancje pochodne, wniosek jest nieprawdziwy. Należy wykonać serię badań z różnymi prekursorami i stwierdzić, który z nich jest wbudowany w badany związek z najwyższą wydajnością i z zachowaniem specyficzności znakowania (ryc. 2), [20, 12, 11].



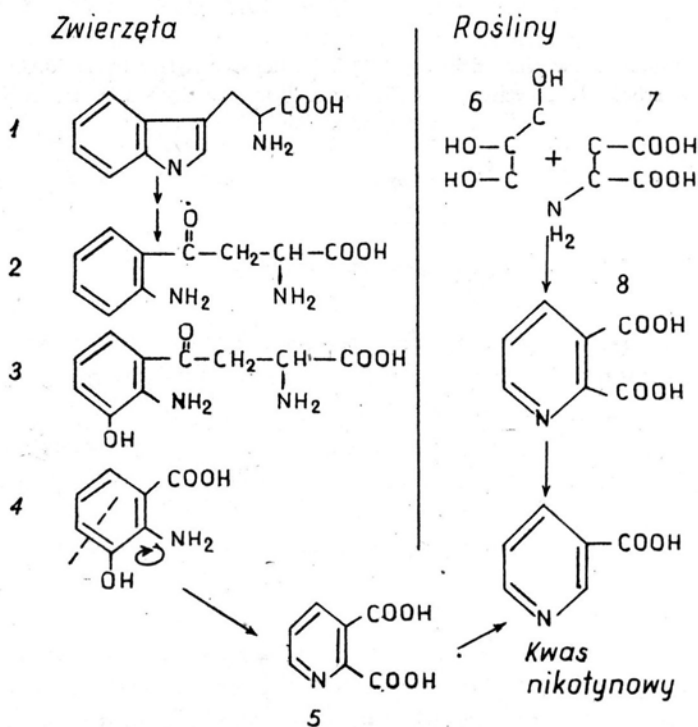
Ryc. 1. Przekształcanie lizyny w piperydinę wg [25] LDC dekarboksylaza lizyny DAO. Oksydaza dwuaminowa, PDC dekarboksylaza kwasu pipekolinowego. Tylko na drodze a zachodzi przekształcenie lizyny w lúbienie



Ryc. 2. Poznanie drogi biosyntezy pierścienia pirolidynowego nikotyny metodą znakowania ^{14}C , ^{13}H i ^{15}N .
 $^{14}\text{C} = \text{O}$ lub \bullet ; $^{15}\text{N} = \text{N}$

3. Gdy badany związek, hipotetyczny prekursor po wprowadzeniu do rośliny spowodował powstanie radioaktywnej substancji pochodnej, nie koniecznie świadczy to o stosunku prekursor — produkt. Wprowadzona substancja mogła podlegać różnym przemianom i nieznanne produkty metabolizmu są właściwymi prekursorami. Analiza rozmieszczenia znakowanych atomów w izolowanym związku może wyjaśnić rzeczywistą drogę przemian [45].

Metodą prekursorów udowodniono biosyntezę kwasu nikotynowego w roślinie, zupełnie różną od biosyntezy tej witaminy w organizmie zwierzęcym (ryc. 3).

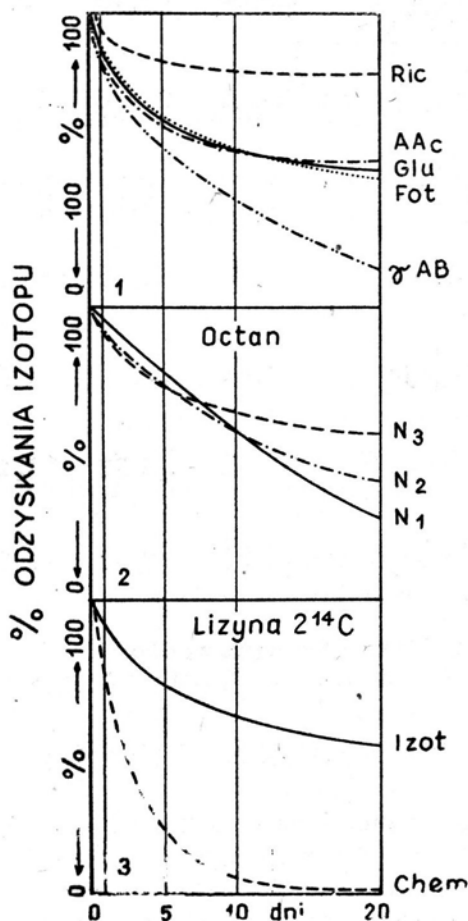


Ryc. 3. Biosynteza kwasu nikotynowego w organizmie zwierzęcym (droga 1—5) i roślinnym (droga 6—8)

Dostarczono danych na temat biosyntezy lizyny oraz innych aminokwasów. W badaniach biosyntezy witamin i niektórych aminokwasów w roślinie, wykorzystuje się często alkaloidy. Substancje te są produktami inaktywacji wyżej wymienionych związków podstawowego metabolizmu. Ponieważ izolacja alkaloidów jest o wiele łatwiejsza od izolacji witamin lub aminokwasów, alkaloidy z powodzeniem wykorzystano do badań biosyntezy ich prekursorów.

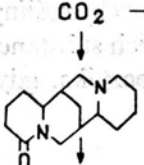
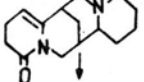
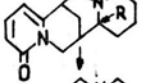
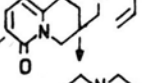
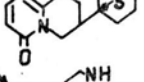
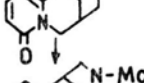
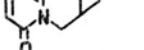
Powyżej przedstawiono pewne niebezpieczeństwa metody prekursorów. Poważna grupa pracowników naukowych uważała, że metoda prekursorów jest zbyt zawodna, aby na jej podstawie konstruować drogi metaboliczne. Zaproponowali więc inną zupełnie technikę, mianowicie, aby zamiast specyficznego prekursora do rośliny wprowadzać substancję, która wchodzi w ogólny metabolizm. Były to CO₂,

mocznik, kwas octowy $U^{14}C$, glukoza $U^{14}C$, $HCN^{14}C$ (ryc. 4). Substancje te powodują dość jednolite zaznakowanie podstawowych substancji metabolicznych rośliny. Najlepszym jest dwutlenek węgla, gdyż jego piętno wchodzi do wszystkich substancji powstałych w wyniku fotosyntezy. Podobnie wygląda przemiana mocznika, gdyż



Ryc. 4. Specyficzne i niespecyficzne substancje, odzyskiwania izotopu. 1. Do roślin wprowadzenie ^{14}C jako Ric — rycynina; AAC. kwas octowy; Glu — glukoza AB; kwas aminomasłowy; Fot. na drodze fotosyntezy. Pozostałości izotopu po 5, 10 i 20 dniach. 2. Do roślin rozwijających się przy różnym nawożeniu azotowym wprowadzono octan N_1 najniższe nawożenie N_3 najwyższe. 3. Odzyskanie izotopu — izot. i substancji chem. E. Nowacki, D. Ditrych-Szóstak. Konf. ESNA. Cadarache 1975

podlega on działaniu ureazy i w substancję roślinną węgiel zostaje wbudowany w wyniku fotosyntezy. Octan, glukoza i HCN wykazuje już pewną specyficzność. Wprowadzona znakowana substancja powoduje powstanie radioaktywnych związków, kolejność pojawienia się piętna izotopowego i właściwa radioaktywność izolowanych substancji powinna według tej hipotezy dać odpowiedź na prawdziwą kolejność przekształceń. Metoda ta ze względu na pracochłonność jest jednak niezbyt często stosowana (ryc. 5).

	Czas /godz.	0-2	4 6	22-24	28-30	48
	DPM/rośl. $\times 10^3$	21,5	56-3	99,8	220,9	
	%					
	Lupanina	<u>59,64</u>	62,10	9,07	19,32	2,68
	Dehydrolupanina	24,98	22,56	11,53	22,05	4,85
	Anagiryna	1,45	9,71	<u>58,99</u>	23,51	26,72
	Rombifolina	1,50	1,15	14,59	22,72	<u>49,56</u>
	Termopsyna	1,46	0,56	3,48	6,10	10,15
	Cytyzyna	1,36	0,53	0,24	2,49	3,17
	N-Metylocytyzyna	9,57	3,33	2,06	3,77	2,85

Ryc. 5. Kolejność przemian alkaloidów w *Thermopsis* wg Cho i Martina. Badano metodą pojawienia się piętna ^{14}C po krótkiej fotosyntezie. DPM/rośl. $\times 10^3$ = radioaktywność mieszaniny alkaloidów

Niedoskonałość badań biosyntezy

Podstawową reakcją, w której dwutlenek węgla wbudowany zostaje w substancję organiczną rośliny jest fotosynteza. Seria reakcji chemicznych prowadzona poprzez karboksylację i fotoredukcję od gazowego CO_2 do prostych cukrów wydawała się najłatwiejsza do badań. Teoretycznie wystarczyło umieścić zdrowe rośliny w pudle z pleksiglasu, wyzwolić w nim pewne ilości radioaktywnego CO_2 aby po tym stwierdzić czy roślina ta asymilowała CO_2 czy nie.

Badania te zakładały, że karboksylacja równa się fotosyntezie. W miarę postępu badań należało się z niektórymi stwierdzeniami wycofać. Stwierdzono, że po krótkiej ekspozycji zielone liście soi w ciemności i na świetle są prawie równo radioaktywne (tabela I). W badaniach autora nad wbudowaniem mieszaniny ^{13}C i ^{14}C w procesie fotosyntezy stwierdzono, że o ile temperatura komory do badań przekroczy 25°C to może zdarzyć się, że radioaktywność tkanki roślinnej będzie niewiele wyższa, aniżeli radioaktywność kawałka wilgotnej tkaniny bawełnianej pozostawionej w tej samej komorze. Na początku badań nad asymilacją węgla z zastosowaniem $^{14}\text{CO}_2$ przypuszczano, że metoda ta może dać bardzo użyteczne wyniki dla hodowli roślin. Zakładano bowiem, że im wyższa będzie radioaktywność rośliny po ekspozycji

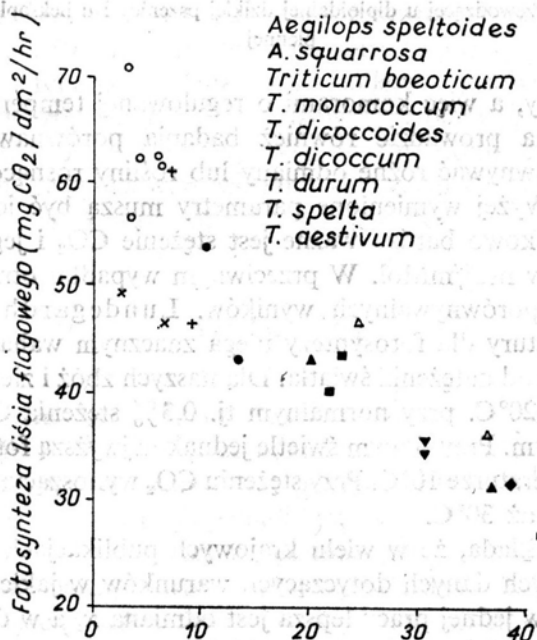
TABELA I

Wiązanie $^{14}\text{CO}_2$ przez liście soi w ciemności i na świetle,
czas ekspozycji 1 godzina (wg Rinne i Canvin 39)

	Warunki	
	ciemność	światło
Procent podanego CO_2 związany w tłuszczach	1,2	1,8
w frakcji rozpuszczalnej w wodzie	25,1	44,9
Rozdział frakcji rozpuszczalnej w wodzie = 100		
% w obojętnych	0	2,3
% w kw. organicznych	92,6	90,4
% w aminokwasach	7,9	6,4

zycji w radioaktywnym dwutlenku węgla, tym większa powinna być produktywność tych roślin. Badania Evansa nad różnymi formami pszenicy i kozięncy wykazały jednak coś zupełnie innego. Mianowicie, im roślina wydawała większy plon użyteczny, tym niższa była jej fotosynteza w przeliczeniu na dm^2 powierzchni liścia (ryc. 6), [33].

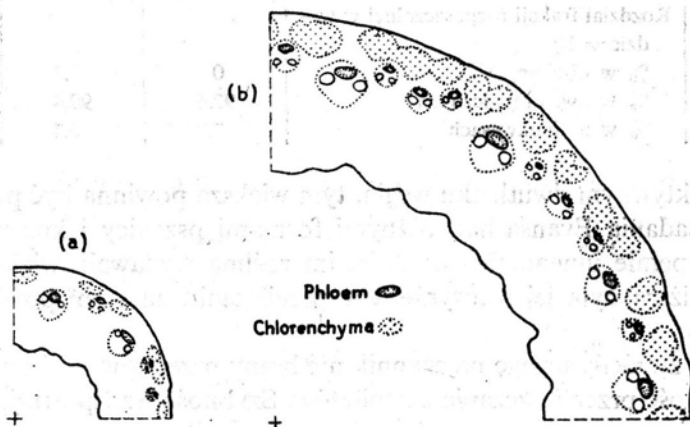
Badania te zwróciły uwagę na czynnik nie brany przed tym pod uwagę, a mianowicie na szybkość przemieszczania asymilatów. Szybkość transportu jak się okazuje



Ryc. 6. Fotosynteza różnych gatunków z rodzaju *Aegilops* i *Triticum* wg Evansa. Najlepsze formy *T. durum*, *spelta* i *aestivum* wykazują najniższą asymilację w przeliczeniu na powierzchnię liścia. Evans Aust. J. Biol. Sc. 1970, 23, 725

jest wprost proporcjonalna do wielkości tkanki floemowej to znaczy bez względu na wydajność fotosyntetyczną liścia, użyteczna fotosynteza mierzona w plonie nasion będzie zależała — w pierwszym rzędzie od stopnia rozbudowania tkanki przewodzącej łądzbla (ryc. 7), [3, 17, 18, 35, 41, 42].

Nieprzydatność analizy intensywności fotosyntezy do badań produktywności roślin nie oznacza jednak, że badając asymilację węgla znakowanego ^{14}C lub ^{13}C nie możemy otrzymać ważnych dla rolnictwa wyników. Wystawiając np. tylko jeden liść na działanie radioaktywnego dwutlenku węgla możemy następnie śledzić przemieszczanie się asymilatów w roślinie. O ile dysponujemy odpowiednią aparaturą



Ryc. 7. Budowa tkanki przewodzącej u diploidalnej dzikiej pszenicy i u heksaploidalnej formy wysoko-plennej

do badań fotosyntezy, a więc komorami o regulowanej temperaturze, oświetleniu i wilgotności, można prowadzić również badania porównawcze intensywności fotosyntezy np. porównywać różne odmiany lub rośliny rosnące przy różnym poziomie nawożenia. Wyżej wymienione parametry muszą być jednak szczegółowo kontrolowane, dodatkowo bardzo ważne jest stężenie CO_2 i jego radioaktywność właściwa wyrażona w mCi/mMol . W przeciwnym wypadku otrzyma się serię niepowtarzalnych i nieporównywalnych wyników. Lundegardh (1960) stwierdził, że optimum temperatury dla fotosyntezy ulega znacznym wahaniom w zależności od stężenia CO_2 oraz od natężenia światła. Dla naszych zbóż i ziemniaków optimum temperatury wynosi 20°C . przy normalnym tj. $0,3\%$ stężeniu CO_2 i przy pełnym oświetleniu słonecznym. Przy słabym świetle jednak najwyższą fotosyntezę wykazują te gatunki przy temperaturze 10°C . Przy stężeniu CO_2 wynoszącym $1,2\%$, optymalna temperatura wynosi aż 30°C .

Niestety tak się składa, że w wielu krajowych publikacjach dotyczących fotosyntezy nie ma pełnych danych dotyczących warunków w jakich przeprowadzono doświadczenie, stąd w jednej pracy lepsza jest odmiana x, a w drugiej y. W jednej nawożenie azotowe zmniejszało intensywność fotosyntezy, a w drugiej fotosynteza wzrastała pod jego wpływem. Zarówno dziedziczność jak i stan odżywiania rośliny zmieniają intensywność fotosyntezy w określonych warunkach. Dla przykładu

pszenica meksykańska i polska mogą mieć zupełnie różne optima fotosyntezy, tak samo roślina rosnąca przy niedoborze azotu i luksusowo zaopatrzona w ten składnik będzie na pewno inaczej asymilowała dwutlenek węgla w temperaturze 10° i 30° oraz przy jego stężeniu 0,03% i 1,2%, [53—58].

Powyżej wspomniano, że do badania przemieszczania asymilatów stosować można metodę wystawienia jednego organu np. liścia w kontakt z radioaktywnym CO₂. Ostatnio metoda ta jest częściowo zastępowana wprowadzaniem na liść roztworu radioaktywnej substancji organicznej lub nieorganicznej, są to z reguły: kwas octowy, glukoza ¹⁴C, mocznik, cyjanek sodu, węglan sodu, lub mrówczan sodu. Przy dostępnych w handlu radioaktywnościach właściwych tych substancji rzędu 10 mCi/mMol, wprowadzając na liść w kropli wody 0,1 uCi substancji, wprowadzamy jej nie więcej aniżeli 1 μg. Ta ilość nie narusza normalnej puli, w przypadku glukozy, octanu czy mrówczanu. Mocznik zostaje momentalnie rozłożony przez ureazę i z asymilowany jak CO₂. Cyjanek po kilku minutach w całości znajduje się w związkach organicznych, a przede wszystkim w asparaginie [36, 34, 39, 40].

Półokres trwania pospolitych metabolitów jest w roślinie bardzo krótki i wynosi od kilku minut do kilku godzin, stąd po godzinie liść w który wprowadzono radioaktywną substancję ma podobne właściwości radioaktywne izolowanych związków chemicznych jak liść, który asymilował radioaktywny dwutlenek węgla.

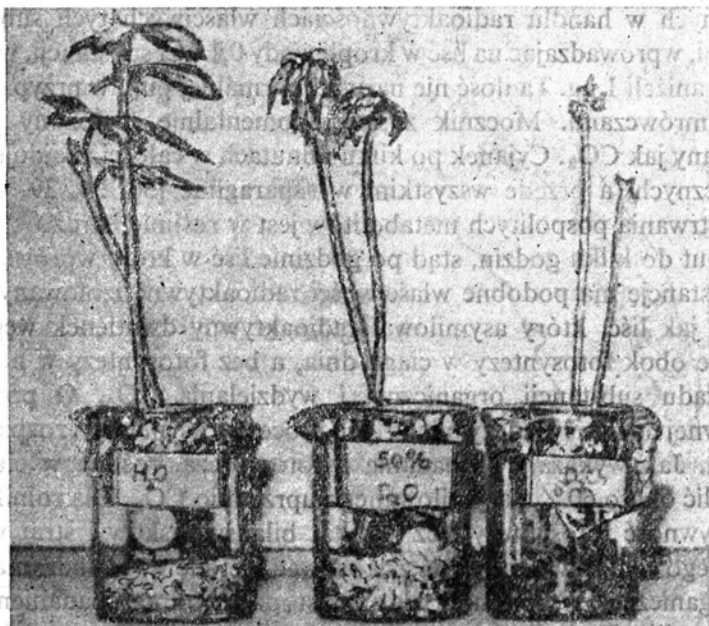
W roślinie obok fotosyntezy w ciągu dnia, a bez fotosyntezy w nocy przebiega proces rozkładu substancji organicznej i wydzielania CO₂. O produktywności rośliny w pewnej mierze świadczy bilans tych procesów asymilacji i rozpadu związków organicznych. Jak wykazały to badania z fotosyntezą, roślina w ciągu tygodnia może wydzielić około 60% z asymilowanego uprzednio CO₂. Dla rolnika ważna jest więc nie aktywność fotosyntezy lecz rezultat bilansu zysków i strat w przemianie materii. Do tego celu również można zastosować metodę wprowadzania znakowanej substancji organicznej. Wyniki są w wysokim stopniu zgodne z badaniem fotosyntezy i oddychania roślin. Technika wprowadzania substancji jest natomiast bardzo prosta i może być masowo stosowana np. w selekcji roślin.

Ciężkie izotopy

Ani azot, ani tlen nie mają użytecznego izotopu promieniotwórczego, gdyż okres półtrwania dla ¹³N wynosi nieco ponad 9 min. ¹⁶N i ¹⁷N rozpadają się w ciągu kilku sekund, podobnie z tlenem, okres półtrwania ¹⁴O, ¹⁵O i ¹⁹O jest krótszy od minuty. Obydwa pierwiastki mają jednak izotopy ciężkie. W przypadku azotu jest to ¹⁵N, a tlenu ¹⁸O. Technika pracy z ciężkimi izotopami jest jednak inna. Przede wszystkim do rośliny należy wprowadzić dość duże ilości izotopu, aby było można stwierdzić obecność ciężkich atomów. Wykrywanie ich następuje również pewne trudności. Potrzebna aparatura jest z reguły droższa, aniżeli aparatury do wykrywania promieniowania. Najczęściej używane są spektrografy masowe. Do badań zawartości ¹⁵N można również zastosować aparat rejestrujący stężenie tego izotopu

w mieszaninie ^{14}N i ^{15}N na zasadzie luminescencji. O ile pracownia posiada spektrograf masowy nic nie stoi na przeszkodzie, aby do badań biologicznych wziąć ciężkie izotopy innych pierwiastków, w pierwszym rzędzie będzie to deuter ^2H i ciężki węgiel ^{13}C .

Czynnikiem ograniczającym rozpowszechnienie badań z niepromieniotwórczymi izotopami są ich ceny, za wyjątkiem D_2O wszystkie ciężkie izotopy są bardzo drogie. Natomiast stosowanie deuteru w badaniach biologicznych ograniczone jest jego znacznym efektem izotopowym (ryc. 8).



Ryc. 8. Rośliny rącznika rosnące na H_2O , 50% D_2O i 99% D_2O

Najpospoliciej stosowanym ciężkim izotopem jest ^{15}N . Stosuje się go do badań nad pobieraniem różnych soli azotowych z gleby, w metabolizmie bakterii brodawkowych oraz w badaniach biosyntezy aminokwasów i alkaloidów, w tych ostatnich jednak z reguły podaje się organiczne związki zawierające ten izotop. Ponieważ aby wykryć wzbogacenie w ^{15}N należy wprowadzić do rośliny dość dużo prekursora, bez istotnego naruszenia stężenia badanej substancji, z reguły się to nie udaje. Stąd badania obarczone są błędem podobnym do tego jaki obserwuje się gdy do rośliny wprowadzi się radioaktywny prekursor o niskiej promieniotwórczości w mCi/mMol .

Można z powodzeniem śledzić jednak biosyntezę nawożącej rośliny mineralnym azotem wzbogaconym w ^{15}N badając kolejność wzbogacenia w izotop. Założenie jest podobne jak przy badaniu biosyntezy z $^{14}\text{CO}_2$. Ze względu na cenę ^{15}N stosuje się

zazwyczaj nawożenie znakowanymi nawozami pod rośliny uprzednio zubożone w azot. Technika ta ma jednak swoje wady, gdyż roślina cierpiąca brak azotu, która w pewnym momencie otrzymuje jego większe porcje może uruchomić nietypowy metabolizm. Przykład taki zaobserwowano badając biosyntezę rycyniny [2, 13, 14, 34, 37, 61].

Makro i mikroelementy

Fosfor i siarka mają promieniotwórcze izotopy o dostatecznie długim okresie półtrwania, aby je stosować w badaniach nawozowych. Potas zawiera stały składnik radioaktywnego izotopu ^{40}K . Obecność tego izotopu w pewnym stopniu utrudnia pracę, jego bardzo długi półokres trwania $1,3 \times 10^9$ lat uniemożliwia otrzymanie wysokich radioaktywności właściwych. Praktycznie użyteczny jest tylko izotop ^{42}K .

Ze względu na duże znaczenie przemian w glebie oraz na funkcje w przemianie materii w DNA, RNA, ATP itp. szeroko stosowany jest fosfor ^{32}P . O wiele mniej pospolite są prace z ^{35}S , dotyczą one z reguły pobierania siarki w formie tlenków, siarkowodoru czy związków organicznych oraz metabolizmu aminokwasów siarkowych. Ze względu jednak na dość krótki okres półtrwania wynoszący 87 dni, izotop ten jest stosowany niechętnie gdyż wymaga dobrej koordynacji badań i sprawnie działającej dostawy.

Pobieranie mikroelementów przez rośliny przy dokarmianiu doliściowym.

Badanie zachowania się tych pierwiastków w różnych typach gleb jest ułatwione przez istnienie dużej gamy izotopów przydatnych do tego rodzaju badań. Mogłyby one znacznie ułatwić pracę, co więcej, rzucić wiele światła na procesy zachodzące w glebie powodujące często pozorny niedobór mikroelementów powstający bądź to w wyniku konkurencji jonów, bądź też wiązaniu ich w nierozpuszczalne kompleksy. W intensywnej produkcji roślinnej dużego znaczenia nabiera doliściowe żywienie roślin. Stosuje się je zarówno w przypadku mikroelementów takich jak: azot, potas, fosfor czy siarka jak i całego szeregu makroelementów.

Bez stosowania izotopów nie jest możliwym rozdzielenie części pierwiastków, które rośliny pobrały z gleby poprzez system korzeniowy od części, którą zaadsorbowały w wyniku oprysku. W ostatnich latach dużego znaczenia nabrały prace nad pobieraniem przez rośliny pierwiastków szkodliwych [1, 4, 5, 9, 10, 23, 51].

W zanieczyszczeniach przemysłowych, w spalinach samochodowych znajdują się takie pierwiastki jak: ołów, chrom, nikiel, cyna, które są szkodliwe dla roślin i zwierząt. Pobieranie tych pierwiastków można łatwo śledzić stosując izotopy. Poważne znaczenie mają również izotopy, którymi zanieczyszczono atmosferę, wody i glebę w wyniku prób z bronią jądrową. Część badań z tymi izotopami jest okryta tajemnicą, część jest publikowana. Razem z badanymi, zanieczyszczenia przez przemysł stanowią swojego rodzaju nową dziedzinę fizjologii roślin.

LITERATURA

- [1] Abebe M. 1972. Wiedeń IAEA-SM-151/13, 507—517.
- [2] Andersen A. J. 1972. Wiedeń IAEA-SM-151/12, 21—39.
- [3] Audley B. G., Tan C. H. 1968. *Phytochemistry* 7, 1999—2000.
- [4] Barber S. A., Elgawhary S. M., Malzer G. L. 1970. Wiedeń IAEA-SM-151/33, 11—18.
- [5] Broeschart H., Nethsinghe D. A. 1972. Wiedeń IAEA-SM-151/59, 453—462.
- [6] Cho Y. D., Martin R. O., Anderson J. N. 1971. *Jour. Amer. Chem. Soc.* 93, 2087—2089.
- [7] Cho Y. D., Martin R. O. 1971. *Canad. Jour. of Biochemistry* 49, No 8, 971—977.
- [8] Cho Y. D., Martin R. O. 1971. *Canad. Jour. of Chemistry* 49, No 2, 265—270.
- [9] D'Souza T. J., Kirchmann R., Lehr J. J. 1972. Wiedeń IAEA-SM-151/4, 595—604.
- [10] Faller N. 1972. Wiedeń IAEA-SM-151/39, 51—57.
- [11] Griffith T., Griffith G. D. 1966. *Phytochemistry* 5, 1175—1179.
- [12] Gupta R. N., Spenser I. D. 1969. *Jour. of Biol. Chemistry* 241 No 1, 88—94.
- [13] Ivanko S. 1972. Wiedeń IAEA-SM-151/44, 483—497.
- [14] Ketcheson J. W., Jakovljević M. 1968. IARA-SM-106/43, 125—129.
- [15] Kline J. R., Stewart M. L., Jordan C. F., Kovac P. 1972. Wiedeń IAEA-SM-151/34, 419—438.
- [16] Koc F. K. S., Cuevas-Ruizo J., Gutierrez-Colon G. 1970. Wiedeń IAEA-SM-132/36, 367—379.
- [17] Koivistoinen P., Aalto H. 1970. Wiedeń IAEA-PL-309/2, 11—23.
- [18] Korte F., 1970. Wiedeń IAEA-PL-309/3, 23—39.
- [19] Kuschmuradov J. K., Gross D., Schütte H. R. 1972. *Phytochemistry* 11, 3441—3445.
- [20] Leete E., Chedelok M. R. 1972. *Phytochemistry* 11, 2751—2756.
- [21] Lopez Martinez de Alva L. 1970. Wiedeń IAEA-SM-132/22, 419—429.
- [22] Lundegardh H. 1960. *Pflanzenphysiologie*. VEB, Fischer-Verlag.
- [23] Morard P., Bur R. 1972. Wiedeń IAEA-SM-151/15, 59—65.
- [24] Nowacki E. 1962. Zastosowanie izotopów w botanice. *Wiad. Bot.* 6, z. 4, 305—314.
- [25] Nowacki E., Nowacka D., Byerrum R. U. 1965. *Bull. de L'Acad. Polon. des Sci. Cl. V, XIV*, No 2, 97—102.
- [26] Nowacki E. K., Waller G. R. 1973. *Z. Pflanzenphysiol.* 69, 228—241.
- [27] Nowacki E., Waller G. R. 1973. *Flora* 162, 108—117.
- [28] Nowacki E. K., Waller G. R. 1975. *Phytochemistry* 14, 161—164.
- [29] Nowacki E. K., Waller G. R. 1975. *Phytochemistry* 14, 165—171.
- [30] Nowacki E. K., Waller G. R. 1975. *Phytochemistry* 14, 155—159.
- [31] Nowacki E., Jurzysta M., Górski P., Nowacka D., Waller G. R. 1976. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 169, 231—240.
- [32] Nowacki E., Jurzysta M., Dietrych-Szóstak D. 1976. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 156, 183—186.
- [33] Nowacki E. 1976. *Post. Nauk Roln.*, 3, 37—56.
- [34] Nye P. H. 1972. Wiedeń IAEA-SM-151/51, 3—8.
- [35] Oberländer H. E., Roth K. 1968. Wiedeń IAEA-SM-106/4, 251—262.
- [36] Panak H., Kozdroń J. 1974. *Rocz. Nauk Roln. ser. A*, 100, z. 2, 7—15.
- [37] Popovic' B., Nömmik H. 1972. Wiedeń IAEA-SM-151/57, 359—368.
- [38] Rennie D. A., Paul E. A., Johns L. E. 1974. Wiedeń IAEA-PL-539/9, 77—91.
- [39] Rinne R. W., Canvin D. T. 1971. *Plant Cell Physiol.* 12, 387—393.
- [40] Saurbeck D., Führ F. 1968. Wiedeń SM-106/8, 2—3.
- [41] Scheffer F., Kickuth R., Aldag R. 1968. *Plant and Soil* 28, No 3, 442—451.
- [42] Scheffer F., Kickuth R., Schlimme E. 1968. *Plant and Soil* 28, No 3, 453—459.
- [43] Schütte H. R., Schäfer Ch. 1961. *Naturwissenschaften*. 1—2.
- [44] Schütte H. R., Kelling K. L., Knöfel D., Mothes K. 1964. *Phytochemistry* 3, 249—252.
- [45] Schütte H. R., Maier W., Mothes K. 1966. *Acta Bioch. Polon.* XIII, No 4, 401—404.
- [46] Smith R. L., Shoukry K. S. M. 1968. Wiedeń IAEA-SM-106/24, 397—409.
- [47] Söchting H. G. R., Harms H., Haider K. 1968. Wiedeń IAEA-SM-106/14, 531—539.
- [48] Tang Van Hai, Fageria N. K., Laudelout H. 1972. Wiedeń IAEA-SM-151/3, 81—85.

- [49] Tyler V. E., JR. 1960. *Lloydia* 23, No 2, 51—62.
- [50] Waller G. R., Yang K. S. 1957. *Phytochemistry* 6, 1637—1641.
- [51] Witkamp M. 1972. *Wiedź IAEA-SM-151/38*, 341—348.
- [52] Winteringham F. P. W. 1974. *Wiedź IAEA-PL-539/1*, 3—7.
- [53] Wojcieszka U. 1973. *Pam. Puł.* 56, 8—30.
- [54] Wojcieszka U. 1973. *Pam. Puł.* 56, 31—50.
- [55] Wojcieszka U. 1973. *Pam. Puł.* 56, 51—74.
- [56] Wojcieszka U., Ślusarczyk M., Nowacki E. 1974. *Bull. de L'Acad. Pol. des Sci.* XXII, no 10, 741—745.
- [57] Wojcieszka U., Wolska E. 1975. *Pam. Puł.* 62, 23—39.
- [58] Wojcieszka U., Szczypa E. 1975. *Pam. Puł.* 62, 51—69.
- [59] Wray J. L., Ries S. K., Filner P. 1970. *Wiedź IAEA-SM-132/24*, 403—409.
- [60] Yang K. S., Waller G. R. 1965. *Phytochemistry* 4, 881—889.
- [61] Zoschke M., 1970. *Wiedź IAEA-SM-132/15*, 345—355.