Badania nad dziennymi zmianami w stężeniu chlorofilu w liściach roślin stanowisk nizinnych i górskich

*Studies on the diurnal fluctuations of chlorophyll concentration
in leaves of plants from montane and lowland habitats*

S. WIĘCKOWSKI

WSTĘP

Wiadomo powszechnie, że organizmy, tak zwierzęce jak i roślinne, w różny sposób przystosowują się do środowiska zewnętrznego. Rośliny, rosnące na stanowiskach alpejskich, podobnie jak i na nizinnych, przystosowały się do panujących warunków nie tylko pod względem anatomicznym, ale i pod względem fizjologicznym. Tak na przykład Bonnier (1895) zauważył, że asymilacja roślin alpejskich jest mniej więcej dwukrotnie większa (przy równej powierzchni liścia) od asymilacji tych samych gatunków rosnących na nizinach. Bonnier stwierdził również, że u roślin alpejskich stężenie chlorofilu rośnie wraz z wysokością. Wzrasta ono jednak tylko do pewnej granicy, którą określa jako granicę optymalną. Powyżej tej granicy stężenie chlorofilu maleje — zjawisko to uważał on za patologiczne (cyt. wg M. Henrici). Bardziej szczegółowo stężeniem chlorofilu w liściach roślin nizinnych i alpejskich zajmowała się M. Henrici (1919, 1927). Badała ona również dzienne zmiany w stężeniu barwików. W pierwszej swej pracy nie stwierdziła żadnych zmian dobowych i przypuszcza, że gdy część chlorofilu ulega rozkładowi, to na jego miejsce tworzą się nowe ilości barwika i dlatego nie można stwierdzić widocznych zmian. Natomiast w publikacji ogłoszonej w 1927 roku stwierdza znaczne dzienne wahania w stężeniu barwików w liściach traw stepów Południowej Afryki. Willstätter i Stoll (1918) badali również stężenie chlorofilu w liściach w ciągu jednego dnia, zmian w stężeniu jednak nie stwierdzili.

W roku 1939 F. Bukatsch ogłosił pracę nad dziennymi zmianami w stężeniu chlorofilu w liściach roślin alpejskich, a rok później opubli-

kowe zostały prace F. Bukatscha i K. Wendela nad dziennymi zmianami ilości barwików u roślin nizinnych. Autorzy ci stwierdzili zachodzenie dobowych wahań w stężeniu barwików asymilacyjnych. U roślin alpejskich maksimum nagromadzenia chlorofilu ma przypadać na godziny ranne i wieczorowe, a minimum na południowe. Odwrotny przebieg zmian stwierdzili w liściach roślin stanowisk nizinnych. Maksimum nagromadzenia barwików przypada w nich na godziny południowe. Wahania te mają istnieć niezależnie od temperatury otoczenia, od intensywności oświetlenia, a nawet od jakości światła (prowadzono doświadczenia na roślinach, które były trzymane pod filtrami przepuszczającymi określone długości fal światła). Podobne zmiany w stężeniu barwików zachodzą nawet w liściach roślin trzymanych okresowo w ciemności. Zmiany te stwierdzili tylko dla sumarycznej ilości chlorofilu, bez rozdziału na chlorofil *a* i *b*. Natomiast podobnych zmian nie obserwowano dla ksantofilu i karotenu. Według Bukatscha następuje jedynie pewien nieznaczny wzrost karotenoidów w liściach, osiągający maksimum w godzinach wieczornych. Wendel stwierdził nawet, że u *Polygonum sachalinense* zachowanie się barwików jest inne w liściach zewnętrznych krzewinki niż w liściach położonych wewnątrz. W pierwszym przypadku maksimum nagromadzenia barwików przypada na godziny południowe, w drugim na ranne i wieczorne. Bukatsch twierdzi, że te zmiany są wyrazem pewnej wewnętrznej rytmiczności, ewentualnie są wynikiem działania jeszcze nie zbadanych czynników. Seybold (1942) wątpi w prawdziwość tych wyników, przypuszcza, że w doświadczeniach Bukatscha chlorofil w różnym stopniu uległ rozkładowi.

Z tego przeglądu wynika, że prace nad zmianami w ilości barwików w ciągu dnia dają wyniki sprzeczne. W przekonaniu naszym przyczyn tych rozbieżności należy przede wszystkim szukać w: 1) różnych metodach pracy, 2) braku dokładnej oceny wielkości błędów doświadczalnych. Zgodnie z tym stanowiskiem celem niniejszej pracy było:

1) krytyczne zbadanie (w oparciu o wyniki badań nad dokładnością metody), czy istotnie zachodząienne wahania w stężeniu barwików chlorofilowych w liściach, oraz prześledzenie osobno zmian dotyczących chlorofilu *a* i *b*,

2) w wypadku istnienia tych wahań, porównanie pod tym względem roślin ze stanowisk nizinnych i górskich.

METODA I MATERIAŁ

Oznaczano ilość barwików przypadających na jednostkę powierzchni liścia. Oznaczanie ilości barwików na jednostkę świeżej wzgl. suchej masy wydaje się, że jest mniej dokładne. Najpierw zbadano, czy stężenie

barwików jest różne w różnych częściach liścia. Miejsca pobierania próbek uwidocznione są na ryc. 4, 6, 7. Następnie przystąpiono do zasadniczego badania. Przy ekstrakcji i rozdzielaniu barwików wzorowano się na metodzie, którą stosował B u k a t s c h. Opierała się ona na zasadzie chromatografii kolumnowej. Różniły się jednak szczegóły metodyczne.

Zebrany materiał (krążek, wycięty z liścia, o powierzchni 530,66 mm²) dokładnie roztarto w moździerzu, następnie zalano 1 ml alkoholu metylowego i rozcierano dalej. Gdy materiał został już dobrze roztarty dolewano benzyny (temp. wrz. 45—80°C) tak długo (ciągle rozcierając), aż nastąpiło całkowite zmieszanie się metanolu z benzyną. Wyciąg następnie zlewano do zlewki. Czynności te powtarzano tak długo, aż mieszanina benzyna-metanol, zlewana z moździerza, stała się zupełnie bezbarwna. Następuje to najczęściej po 10—15 min. ekstrakcji. Do około 25 ml wyciągu barwików dodawano 1—2 kropli etanolu 96%. Tak otrzymany wyciąg barwików przepuszczano przez kolumnę skrobiową (dł. około 17 cm, średnica 1 cm). Kolumnę utworzono nie przez ubijanie skrobi, ale przez sedymentację zawiesiny skrobiowej w benzynie, przy użyciu pompy próżniowej, wodnej. Ten sposób postępowania ma dwie zalety: kolumna zbudowana jest bardzo równomiernie, oraz czas potrzebny do przygotowania kolumny jest krótki, mianowicie 2 do 4 min. Wyciąg barwików przepuszczano przez kolumnę, posługując się pompą próżniową wodną. Chromatogram rozwijano mieszaniną benzyna + eter etylowy, zmieszanych ze sobą w stosunku 25 : 1,5, do chwili utworzenia się dwóch warstw chlorofilów (na karotenoidy nie zwracano uwagi). Po wypchaniu kolumny warstwę skrobi z chlorofilem *a* oddzielono mechanicznie przy pomocy skalpela od warstwy skrobi z chlorofilem *b*. Barwiki wymywano eterem, używając sączka Schotta 11G3. Wyciągi eterowe barwików doprowadzano do stałej objętości, tzn. roztwór chlorofilu *a* do 15 ml, a roztwór chlorofilu *b* do 5 ml. Procent przepuszczalności światła mierzono w fotometrze typu Pulfricha, przy użyciu filtra S-61. Wartości bezwzględne (w mg/litr) odczytano z krzywej wzorcowej. Krzywą wzorcową nie posługiwano się jedynie przy określaniu trwałości wyciągów.

Materiał pobierany z Ogrodu Botanicznego rozcierano w laboratorium, natomiast pobierany z Lasku Wolskiego i z Tatr rozcierano na miejscu i wyciągi benzynowo-metanolowe barwików przywożono w łódce do Zakładu. Dalej postępowano w sposób wyżej opisany.

Badania prowadzono na następujących roślinach:

Asarum europaeum L. Liście z tego gatunku brano z osobników rosnących w Lasku Wolskim (ok. 200 m n.p.m.), w podszyciu lasu bukowego w domieszką brzozy, klonu i jaworu, na zboczu nachylonym pod kątem około 40° i ekspozycji południowo-wschodniej. Zwartość koron około 85%.

Rumex alpinus L. Materiał pobierano z osobników hodowanych od dłuższego czasu w Ogrodzie Botanicznym (ok. 200 m n.p.m.).

Homogyne alpina (L.) Cass. Roślina ta rosła na stanowisku naturalnym w Tatrach w gęstym skupieniu kosodrzewiny (Uhrocie Kasprowe — ok. 1690 m n.p.m.).

KRZYWE WZORCOWE

Konieczność rozporządzania czystymi preparatami barwików dla wykreślenia krzywych wzorcowych ominięto za pomocą niżej opisanej procedury. Przygotowano szereg eterowych roztworów chlorofilu *a* oraz chlorofilu *b*, o różnych stężeniach. Określono w fotometrze Pulfricha ich procent przepuszczalności światła, używając filtru S-61. Stężenia te tak do-

Ryc. 1. Krzywe wzorcowe

—— chlorofil *a*; - - - - - chlorofil *b*

Standard curves

—— chlorophyll *a*; - - - - - chlorophyll *b*

brano, aby odczyty na fotometrze leżały w dość szerokich granicach. Następnie zmierzono procent przepuszczalności światła dla tych roztworów na spektrofotometrze Uvispek-Hilger, używając światła o długości fali 6130 Å. Stały współczynnik absorpcji przy tej długości fali światła wynosi dla chlorofilu *a* — 15,6 i dla chlorofilu *b* — 8,05 (Comar a. Zscheile 1942). Stężenie chlorofilu w jednostkach bezwzględnych obliczano ze wzoru Beer—Lamberta:

$$\log \frac{J_e}{J} = a \cdot c \cdot l \quad (1)$$

gdzie J_e — natężenie światła padającego

J — natężenie światła, które przeszło przez roztwór absorbujący

- a — stały współczynnik absorpcji
 c — stężenie w gramach na litr
 l — długość warstwy absorbującej w cm.

Odczytane procenty przepuszczalności światła na fotometrze Pulfricha oraz wartości obliczone według wzoru (1) naniesiono na wykres (ryc. 1).

ANALIZA BŁĘDÓW OBSERWACJI

Na błędy zniekształcające wyniki składają się przede wszystkim: 1) błąd związany z ekstrakcją, 2) błąd związany z rozdziałem barwików, 3) niedokładność odczytów na fotometrze Pulfricha, 4) wpływ karotenoidów na absorpcję światła, przy używaniu filtru S-61 oraz 5) błąd wynikający z nietrwałości wyciągów.

1. *Błąd ekstrakcji.* Dwa krążki, wycięte symetrycznie z jednego liścia *Primula* sp., posiekano drobno. Posiekany i zmieszany materiał z dwóch krążków liścia rozdzielono wagowo na dwie równe części. Z każdej części osobno ekstrahowano barwiki i wyciąg przepuszczano przez kolumnę chromatograficzną. Po oddzieleniu się części karotenoidów wypychano kolumnę i barwiki chlorofilowe wymyivano eterem. Następnie mierzono procent przepuszczalności światła przez roztwór eterowy chlorofilu a i b razem. Wyniki pomiarów przedstawiono na tabeli 1. Jak wynika

Tabela 1
Pomiar wielkości błędu ekstrakcji
Measurements of extraction error

Lp. No.	Procent przepuszczalności światła przez roztwór w: Percentage of transparence to light of solution:		Różnica Difference
	Próbka I Sample I	Próbka II Sample II	
1	15,63	16,13	0,50
2	14,25	13,88	0,37
3	15,75	15,88	0,13
4	14,25	14,38	0,13
5	14,50	14,75	0,25
6	20,15	20,50	0,35

z tej tabeli, różnica przepuszczalności światła między dwoma podobnymi próbami leży w granicach od 0,13 do 0,50. Przyjmując największą różnicę i zakładając, że stosunek chlorofilu a do b jest 2,5, można ocenić z krzywej wzorcowej maksymalne odchylenie, które dla chlorofilu a , podobnie jak i dla chlorofilu b , wynosi około 1,5%.

Aby się przekonać, czy cały chlorofil został wyekstrahowany — wycierano móżdziej, w którym materiał rozcierano, strzępkiem waty. Watę tę w zlewce zalewano alkoholem etylowym i pozostawiono na pewien okres czasu, po czym roztwór filtrowano przez sączek szklany i w fotometrze mierzono procent przepuszczalności światła.

Okazuje się, że znikome ilości barwników pozostają nie wyekstrahowane. Jednak odczyty z dwóch tak zrobionych prób nie różnią się od siebie. Błąd ten przy pomiarach względnych nie odgrywa więc roli. Ilość nie wyekstrahowanego chlorofilu powiększa się pod koniec okresu wegetacji (ilościowych pomiarów nie robiono).

2. Błąd rozdziału barwników. Przy rozdzielaniu barwników na kolumnie skrobiowej może powstać pewien błąd, a to na skutek pozostania pewnej ilości barwników na ściankach używanych naczyń oraz niekompletnego wymycia barwników ze skrobi. Dla oszacowania wielkości błędu, który powstaje przy tych manipulacjach, wykonano specjalne doświadczenie w niżej opisany sposób. Przygotowano większą ilość ekstraktu barwników. Do dwóch prób odmierzono takie same ilości tego ekstraktu. Następnie w każdej próbce oddzielono chlorofil *a* od *b* i po zmierzeniu procentu przepuszczalności światła z krzywych wzorcowych odczytano stężenie. Wyniki przedstawione są w tabeli 2. Widać, że błąd rozdziału dla chlorofilu *a* waha się w granicach od 0,31 do 1,40%, a dla chlorofilu *b* od 0,00 do 1,68%, zawartości barwników.

3. Dokładność odczytów na fotometrze typu Pulfricha. Wiadomo, że najdokładniejszy odczyt na fotometrze typu Pulfricha jest wtedy, gdy procent przepuszczalności światła wynosi od około

Tabela 2

Różnice w stężeniu barwników, powstałe na skutek istnienia błędu rozdziału na kolumnie chromatograficznej

Difference in concentration of pigments caused by the error of separation in the chromatographic column

Lp.	Stężenie w próbce I w mg/l Concentration in sample I in mg/l		Stężenie w próbce II w mg/l Concentration in sample II in mg/l		Różnica w % Difference in %	
	chlorofil <i>a</i> chlorophyll <i>a</i>	chlorofil <i>b</i> chlorophyll <i>b</i>	chlorofil <i>a</i> chlorophyll <i>a</i>	chlorofil <i>b</i> chlorophyll <i>b</i>	chlorofil <i>a</i> chlorophyll <i>a</i>	chlorofil <i>b</i> chlorophyll <i>b</i>
1	11,49	4,70	11,39	4,78	0,87	1,68
2	15,70	8,55	15,48	8,55	1,40	0,00
3	6,93	9,30	6,85	9,35	1,15	0,53
4	9,67	14,10	9,70	14,00	0,31	0,71

18 do 50. Duże i bardzo małe stężenia powodują duży błąd odczytu. Dlatego tak dobrano stałe objętości dla roztworu eterowego chlorofilu *a* i *b*, aby odczyty leżały w tych granicach. Celem dalszego zmniejszenia błędów dla każdego roztworu robiono sześć odczytów (trzy odczyty na prawym bębnie i trzy na lewym), na podstawie których obliczano średnią arytmetyczną.

4. Wpływ obecności karotenoidów na pomiary ilości chlorofilu przy zastosowaniu filtra S-61. Zależność ta została dokładnie opracowana przez Comar i Zscheile (1942). Jak wynika z ich rozprawy, karotenoidy wywierają znaczny wpływ na odczyty, ale gdy są dodane do wyciągu chlorofilu w większych ilościach lub gdy używane jest światło do pomiaru o krótszych falach, np. 5460 Å. Wprowadzili oni nawet pewne współczynniki absorpcji ze względu na obecność karotenoidów.

W wyżej opisanej metodzie pracy ilość karotenoidów, jaka pozostaje w roztworze z chlorofilem, jest tak mała, że praktycznie nie wpływa na jakość odczytów i dlatego nie stosowano żadnych poprawek.

5. Trwałość wyciągów. Niemożliwość analizowania materiału natychmiast po zebraniu (z przyczyn technicznych) nasunęła pytanie: jak długo wyciągi barwików pozostają niezmienione? Dwa czynniki prawdopodobnie wpływają zasadniczo na trwałość wyciągów z liścia,

Ryc. 2. Trwałość wyciągów benzynowo-metanolowych w zależności od długości czasu przechowywania w temp. 36—40°C

— chlorofil a; - - - - - chlorofil b

(liczby w nawiasie odnoszą się do chlorofilu b)

Durability of methanol-benzine extracts in respect to time of preservation at 36—40°C

— chlorophyll a; - - - - - chlorophyll b

(Numbers in brackets refer to chlorophyll b)

mianowicie światło i temperatura. Już dawno zauważono, że wyciągi z liścia zawierające chlorofil, trzymane na świetle, stosunkowo szybko brunatnieją w porównaniu z wyciągami trzymanymi w ciemności (M. Henrici 1918 i in.). Szkodliwy wpływ światła wykluczono przez owinięcie naczyń, w których przechowywano próbki, czarnym papierem.

Aby się przekonać, jak wpływa temperatura, określono trwałość wyciągów przechowywanych w temperaturze 36—40° oraz w temperaturze około 0°C (w lodzie). Materiał pobrano z liści *Primula* sp. oraz *Asarum europaeum*. Wyniki przedstawiono na ryc. 2 i 3. Wynika z nich, że zanik

Ryc. 3. Trwałość wyciągów benzynowo-metanolowych chlorofilów w zależności od długości czasu przechowywania w temp. 0°C
 — chlorofil a; - - - - - chlorofil b

Durability of methanol-benzene extracts in respect to time of preservation at temp. 0°C
 — chlorophyll a; - - - - - chlorophyll b

pewnej części chlorofilu przechowywanego w temperaturze 36—40° następuje już w ciągu pierwszych 24 godzin przechowywania. Widocznych zmian nie można zauważyć jedynie w ciągu pierwszych 8 godzin. Natomiast wyciągi przechowywane w lodzie (temp. około 0°) wykazują większą trwałość. Jeszcze po 61 godzinach przechowywania nie następuje zanik barwników zielonych. Analiza próbek następowała zwykle w ciągu pierwszych 48 godzin po ekstrakcji.

Widać z powyższej analizy, że niektóre błędy metodyczne nie odgrywają zasadniczej roli (nie wpływają specjalnie na jakość pomiarów). Dlatego też nie brano pod uwagę: błędu wynikającego z niedokładności odczytów na fotometrze, błędu wynikającego z obecności pewnej ilości karotenoidów w wyciągach chlorofilowych oraz zaniku chlorofilu w ekstrakcie z upływem czasu. Za istotne należy uważać błędy wynikające z ekstrakcji i z manipulacji podczas rozdzielania barwników na kolumnie chromatograficznej.

Jak już wspomniano, maksymalny błąd ekstrakcji wynosi 1,5%, a maksymalny błąd rozdzielu 1,4% dla chlorofilu a i 1,7% dla chlorofilu b. Należy stąd wnosić, że maksymalne błędy opisanej metodyki pracy nie przekraczają 3,5% ilości barwników (tak dla chlorofilu a, jak również i dla chlorofilu b).

WYNIKI BADAŃ

Asarum europaeum. Przed przystąpieniem do badań nad zmianami w stężeniu barwików zielonych w liściu konieczne było oznaczenie stężenia tych barwików w różnych częściach liścia. W tym celu brano po trzy próbki: z jednego liścia rano (godz. 6.30), z innego liścia w południe (godz. 13.00), jeszcze z innego wieczorem (godz. 19.00). Miejsca, z których brano próbki, objaśnia ryc. 4, wyniki streszcza tabela 3.

Tabela 3

Stężenie chlorofilu *a* i chlorofilu *b* w różnych częściach liścia *Asarum europaeum* (mg/l)

Concentration of chlorophyll *a* and chlorophyll *b* in various parts of leaf in *Asarum europaeum* (mg/l)

Data	Godzina	Stężenie w poz. 1* Concentration at position 1*		Stężenie w poz. 2 Concentration at pos. 2		Stężenie w poz. 3 Concentration at pos. 3	
		chloro- fil <i>a</i> chloro- phyll <i>a</i>	chloro- fil <i>b</i> chloro- phyll <i>b</i>	chloro- fil <i>a</i> chloro- phyll <i>a</i>	chloro- fil <i>b</i> chloro- phyll <i>b</i>	chloro- fil <i>a</i> chloro- phyll <i>a</i>	chloro- fil <i>b</i> chloro- phyll <i>b</i>
29.V	6.00	8,74	14,00	9,13	14,04	8,64	13,83
	13.00	8,71	13,09	9,38	13,69	8,74	13,08
	19.00	9,83	13,41	8,93	13,12	9,56	13,49
27.VI	6.30	7,98	15,00	8,24	16,64	7,92	18,05
	13.00	9,88	16,01	9,77	19,65	9,43	15,32
	19.00	9,88	15,14	9,88	15,49	10,00	19,60

* cyfry oznaczają miejsca w liściu, z których pobrano próbki (patrz ryc. 4).

* the numbers indicate the part of the leaf from which the sample was taken (c. f. fig. 4).

Na podstawie wyników przedstawionych w tabeli 3 należy stwierdzić, że stężenie barwików w różnych częściach liścia jest na ogół różne. W zasadzie więcej barwików zielonych, przypadających na jednostkę powierzchni, znajduje się bliżej nerwu środkowego. Im bardziej peryferycznie jest brana próbka z liścia, tym mniej zawiera chlorofilu. Stężenia w próbkach 1 i 3 są takie same w pięciu przypadkach na sześć przebadanych (odchylenia leżą w granicach błędów). Im lepiej wyrosnięte są liście, tym stężenia chlorofilu w różnych częściach liścia są bardziej do siebie zbliżone (wskazane są jednak dokładniejsze badania). Wahania w jednym liściu, w skrajnych przypadkach, mogą dochodzić dla chlorofilu *a* do 8,1%, a dla chlorofilu *b* do 22%. Natomiast wahania przeciętne, przebadane na sześciu liściach, wynoszą dla chlorofilu *a* 6,8%, a dla chlorofilu *b* 5,1%. Różnicę skrajną w stężeniu chlorofilu *b* wynoszącą 22% należy uważać raczej za anormalną.

W tabeli 4 i ryc. 5, zebrane są wyniki pomiarów stężenia chlorofilu w liściach, lecz próbki z jednego liścia pobierane były w różnych porach dnia (jedna rano, druga w południe, trzecia wieczorem). Jak wynika z tej

Tabela 4

Stężenie chlorofilów w liściach *Asarum europaeum*. Próbkę z jednego liścia pobierane były w różnych porach dnia (mg/l)

Concentration of chlorophyll in leaves of *Asarum europaeum*. Samples from one leaf were taken at various times of the day (mg/l)

Data Date	Pomiar ranny (godz. 6.30) Morning measurement (6.30 a. m.)			Pomiar połud. (godz. 13.00) Noon measurement (1.00 p. m.)			Pomiar wiecz. (godz. 19.00) Evening measurement (7.00 p. m.)		
	Poz. Pos.	chloro- fil a chloro- phyll a	chloro- fil b chloro- phyll b	Poz. Pos.	chloro- fil a chloro- phyl a	chloro- fil b chloro- phyl b	Poz. Pos.	chloro- fil a chloro- phyll a	chloro- fil b chloro- phyll b
27.V	1	8,86	13,49	2	10,80	16,61	3	9,69	13,80
	2	9,20	13,04	3	8,93	12,39	1	8,87	12,50
	3	9,00	15,20	1	9,02	13,27	2	11,21	15,82
13.IX	1	10,75	15,14	2	11,18	15,13	3	9,67	13,14
	2	8,38	11,69	3	10,06	13,65	1	10,53	14,12
	3	11,04	13,89	1	10,38	14,78	2	10,18	13,60

tabeli, szczególnie w obserwacjach z dnia 17.V., dana próbka niezależnie od tego, w jakiej porze dnia została pobrana — wzięta z miejsca 2 (patrz ryc. 5) — wykazuje nieco większe stężenie chlorofilu a i b w sto-

Ryc. 4. Miejsca pobierania próbek z liścia *Asarum europaeum*

Parts of the leaf of *Asarum europaeum* from which samples were taken

sunku do prób pobranych z miejsc, które oznaczono przez 1 i 3. Maksymalne wahania w jednym liściu w stężeniu chlorofilu a wynoszą 19,6 i chlorofilu b 18,8%.

Różnice w stężeniach barwików są większe wtedy, kiedy próbki pobierano z jednego liścia w różnych porach dnia. Wychylenia te są jednak bezkierunkowe.

Ryc. 5. Stężenie chlorofilu w liściach *Asarum europaeum* obserwowane w ciągu dnia. a — chlorofil a; b — chlorofil b; ○ próbka z poz. 1; ◐ próbka z poz. 2; ● próbka z poz. 3

Concentration of chlorophylls in leaves of *Asarum europaeum*. Samples from one leaf were taken at various times of the day. a — chlorophyll a; b — chlorophyll b; ○ sample from pos. 1; ◐ sample from pos. 2; ● sample from pos. 3

Ryc. 6. Miejsca pobierania próbek z liścia *Rumex alpinus*

Parts of the leaf of *Rumex alpinus* from which samples were taken

Ryc. 7. Miejsca pobierania próbek z liścia *Homogyne alpina*

Parts of the leaf of *Homogyne alpina* from which samples were taken

Na podstawie tych danych nie można powiedzieć, że istnieją jakiekolwiek okresowe wahania w ciągu dnia w stężeniu chlorofilu a i b w liściach kopytnika.

Warto zaznaczyć, że na 100 cm² powierzchni liścia kopytnika przypada około 2,57 mg chlorofilu a i 1,27 mg chlorofilu b. Stosunek chlorofilu a do chlorofilu b wynosi 2,07 (obserwacje z dnia 29.V.) — jest on charakterystyczny dla roślin, które rosną w głębokim cieniu.

Tabela 5

Stężenie chlorofilu a i chlorofilu b w różnych częściach liścia *Rumex alpinus* (mg/l)
Concentration of chlorophyll a and chlorophyll b in various parts of leaf in *Rumex alpinus* (mg/l)

Data Date	Godz. Time in hours	Stężenie w poz. 1 Concentration at pos. 1		Stężenie w poz. 2 Concentration at pos. 2		Stężenie w poz. 3 Concentration at pos. 3	
		chloro- fil a chloro- phyll a	chloro- fil b chloro- phyll b	chloro- fil a chloro- phyll a	chloro- fil b chloro- phyll b	chloro- fil a chloro- phyll a	chloro- fil b chloro- phyll b
5.VIII	5.30	8,50	9,76	8,94	9,60	8,76	9,94
	12.00	9,13	9,60	10,26	12,15	9,83	11,13
	19.00	9,74	11,69	9,58	10,80		11,80
8.VIII	5.30	8,68	10,17	8,87	10,68	9,28	10,80
	12.00	8,27	9,22	8,55	8,97	8,85	9,87
	19.00	8,20	9,88	9,20	11,72	9,48	11,22

Rumex alpinus. Podobnie jak w doświadczeniach na liściach *Asarum europaeum* konieczne było stwierdzenie, jakie są różnice w stężeniu chlo-

Tabela 6

Stężenie chlorofilów w liściach *Rumex alpinus*. Próbkę z jednego liścia pobierane były w różnych porach dnia (mg/l)
Concentration of chlorophylls in leaves of *Rumex alpinus*. Samples from one leaf were taken at various times of the day (mg/l)

Data Date	Pomiar ranny (godz. 5.30) Morning measurement (5.30 a. m.)			Pomiar połud. (g. 12.00) Noon measurement (12.00)			Pomiar wiecz. (19.00) Evening measurement (7.00 p. m.)		
	Poz. Pos.	chloro- fil a chloro- phyll a	chloro- fil b chloro- phyll b	Poz. Pos.	chloro- fil a chloro- phyll a	chloro- fil b chloro- phyll b	Poz. Pos.	chloro- fil a chloro- phyll a	chloro- fil b chloro- phyll b
5.VIII	1	10,92	13,14	2	10,74	11,68	3	10,17	11,44
	2	9,48	11,60	3	9,02	10,25	1	9,98	11,38
	3	9,28	11,10	1	9,51	11,25	2	9,00	10,27
9.VIII	1	7,65	7,97	2	9,20	10,13	3	9,78	10,62
	2	8,84	8,84	3	9,80	12,18	1	7,46	8,80
	3	8,10	10,44	1	8,14	9,30	2	8,68	10,38

rofilów w różnych częściach tego samego liścia. Wyniki przedstawione są w tabeli 5. Okazuje się, że maksymalne wahania w ilości zielonych barwików w jednym liściu są następujące: dla chlorofilu *a* 13,50‰, a dla chlorofilu *b* 26,67‰. Natomiast wahania średnie, między próbami zbranymi z miejsc oznaczonych przez 1, 2, 3 (ryc. 6), wynoszą dla chlorofilu *a* 5,31‰ i dla chlorofilu *b* 7,31‰. Największe przeciętne stężenie jest w próbkach 3 (dla chlorofilu *a* 9,24 mg/litr, a dla chlorofilu *b* 10,79 mg/litr), a najmniejsze w próbkach 1 (dla chlorofilu *a* 8,75 mg/litr, dla chlorofilu *b* 10,50 mg/litr). Podobnie jak w liściach kopytnika — im bliżej nerwu głównego, tym jest większe stężenie barwików zielonych.

Jak wynika z tabeli 6, niezależnie od tego, czy dana próbka pobrana była rano, w południe lub wieczorem stężenie barwików jest charakterystyczne dla danej części liścia (z nielicznymi wyjątkami). Maksymalne różnice w stężeniu chlorofilu są następujące: dla chlorofilu *a* 21,8‰, dla chlorofilu *b* 27,3‰.

Na 100 cm² powierzchni liścia przypada około 2,58 mg chlorofilu *a* i około 0,97 mg chlorofilu *b*. Stosunek chlorofilu *a* do *b* wynosi 2,67 (obserwacje z dnia 5.VIII).

Homogyne alpina. Obserwacje przeprowadzone na liściach tej rośliny są niekompletne. Zbliżająca się jesień utrudniła zebranie materiału w większych ilościach.

Tabela 7

Stężenie chlorofilu *a* i chlorofilu *b* w różnych częściach liścia *Homogyne alpina* (mg/l)

Concentration of chlorophyll *a* and chlorophyll *b* in various parts of leaf in *Homogyne alpina* (mg/l)

Data Date	Godzina Time in hours	Stężenie w poz. 1 Concentration at pos. 1		Stężenie w poz. 2 Concentration at pos. 2		Stężenie w poz. 3 Concentration at pos. 3	
		chloro- fil <i>a</i> chloro- phyll <i>a</i>	chloro- fil <i>b</i> chloro- phyll <i>b</i>	chloro- fil <i>a</i> chloro- phyll <i>a</i>	chloro- fil <i>b</i> chloro- phyll <i>b</i>	chloro- fil <i>a</i> chloro- phyll <i>a</i>	chloro- fil <i>b</i> chloro- phyll <i>b</i>
30.VIII	6.30	9,00	15,85	8,75	15,90	8,87	15,65
	12.00	7,07	13,67	7,36	16,40		
5.IX	17.00	8,60	13,54	9,35	13,60	8,60	13,22

Na podstawie skąpych danych należy przypuszczać, że i w liściach tej rośliny, rosnącej na wysokości około 1690 m n.p.m., nie istnieją wahania dzienne w stężeniu barwików zielonych (tabela 7 i 8 oraz ryc. 7).

Tabela 8

Stężenie chlorofilów w liściach *Homogyne alpina*. Próbkę z jednego liścia pobierane były w różnych porach dnia (mg/l)

Concentration of chlorophylls in leaves of *Homogyne alpina*. Samples from one leaf were taken at various times of the day (mg/l)

Data	Pomiar ranny (godz. 6.30) Morning measurement (6.30 a. m.)			Pomiar połud. (g. 12.00) Noon measurement (12.00)			Pomiar wiecz. (19.00) Evening measurement (7.00 p. m.)		
	Poz. Pos.	chloro- fil a chloro- phyll a	chloro- fil b chloro- phyll b	Poz. Pos.	chloro- fil a chloro- phyll a	chloro- fil b chloro- phyll b	Poz. Pos.	chloro- fil a chloro- phyll a	chloro- fil b chloro- phyll b
30.VIII	1	6,42	13,22	2	8,50	14,67			
	2	7,45	13,60	3	6,85	12,88	1	6,72	13,04

DYSKUSJA

Bukatsch (1939, 1940) oraz Wendel (1940) stwierdzili znaczne dzienne zmiany w stężeniu chlorofilu w liściach roślin stanowisk nizinnych i górskich. Wg Bukatscha maksymalne wahania w stężeniu chlorofilu mogą dochodzić do 50%. Nie ulega wątpliwości, że tych rozmiarów dzienne zmiany powinny być dostrzegalne dla oka. Tymczasem dotychczas ich nie stwierdzono. Nie wyklucza to istnienia wahań mniejszych.

W wyżej omówionych obserwacjach, po uwzględnieniu wielkości błędów związanych z metodyką, nie stwierdzono u roślin przebadanych widocznych zmian dziennych w stężeniu chlorofilu. Bukatsch stwierdził wahania dzienne z minimum w południe w liściach *Adenostyles alliariae* (Gouan) Kern. i *Rumex alpinus* L. rosnących na wysokości około 1800 m n.p.m. W ramach niniejszej pracy wymienionych roślin z takiej wysokości wprawdzie nie badano, ale trudno przypuszczać, aby te wahania nie istniały u *Homogyne alpina* (z wysokości około 1690 m n.p.m.), a istniały u innych gatunków. Górna granica zasięgu poszczególnych gatunków w Tatrach nie dochodzi do takich wysokości jak w Alpach. Również otrzymano wyniki sprzeczne z doniesieniami Bukatscha i Wendela odnośnie dziennych zmian w stężeniu barwików w liściach roślin, rosnących na stanowiskach nizinnych. Bukatsch przeprowadzał obserwacje na wysokości około 500 m n.p.m. na *Rumex alpinus* i *Helianthus annuus*. Natomiast Wendel prowadził obserwacje na innych roślinach z tej samej wysokości (*Senecio clivorum*, *Aristolochia sipho*, *Polygonum sachalinense*). Obaj badacze otrzymali zgodne wyniki. Stwierdzili oni, że u roślin, które rosną na nizinach (500 m n.p.m.), ma-

ksimum nagromadzenia barwików zielonych w liściach przypada w południe, a minimum na rano i wieczór.

U *Rumex alpinus*, podobnie jak u *Asarum europaeum*, nie stwierdzono w omówionych wyżej obserwacjach widocznych zmian w ilości chlorofilu w liściach.

Naszym zdaniem, stwierdzone przez Bukatscha i Wendelaienne wahania w stężeniu chlorofilu są wynikiem nieuwzględnienia różnic, jakie zachodzą w stężeniu barwików w zależności od miejsca w blaszce. Te różnice są tak znaczne, że nieuwzględnienie ich może nasuwać przypuszczenie, że istotnie zachodzą w ciągu doby wahania w stężeniu barwików. Co prawda badając zmianyienne w stężeniu barwików można było zaobserwować, że wahania między różnymi częściami liścia są większe wtedy, kiedy bierze się próbki nie wszystkie trzy naraz, ale jedną próbkę rano, drugą w południe, trzecią wieczorem. Fakt ten sugerowałby zachodzenie zmian dziennych, periodycznych. Jednak odchylenia te są bezkierunkowe, sporadyczne. Prawdopodobnie są one związane z metodyką (przy pobieraniu próbki z liścia, nie oddzielonego od rośliny macierzystej, trzeba uważać, aby liść ten nie został za bardzo uszkodzony, przez co może nastąpić jego niedokładne rozplaszczanie).

Czy u innych roślin, rosnących w jeszcze skrajniejszych warunkach klimatycznych,ienne wahania w zawartości barwików mogą zachodzić? Zmiany te są możliwe, ale mało prawdopodobne i trudne do wytłumaczenia na podstawie dotychczasowych wiadomości o chlorofilu. Zmiany w ilości zielonych barwików mogą nastąpić jedynie jako adaptacja do nowych warunków świetlnych (ale nie do warunków świetlnych zmieniających się w ciągu dnia). Adaptacja ta przebiega jednak powoli (Seybold A. und Egle K. 1937, Montfort C. 1950). Te zmiany, o ile istnieją, są tak małe, że wyżej opisaną metodą nie dadzą się stwierdzić i nie upoważniają do wyciągania wniosków o zachodzeniu dziennych wahań w stężeniu barwików chlorofilowych.

STRESZCZENIE

1. Przystosowano metodę chromatografii kolumnowej do dokładnego oddzielenia chlorofilu *a* od chlorofilu *b* oraz określono wielkość błędu, jaki powstaje przy tej metodzie pracy (może on dochodzić do 3,5%).

2. Wykazano, że stężenie chlorofilu jest różne w różnych częściach blaszki liściowej (prawdopodobnie zjawisko to związane jest z różną grubością liścia).

3. Stwierdzono, że nie istnieją dostrzegalne zmiany w stężeniu tak chlorofilu *a*, jak i chlorofilu *b*, które byłyby związane z porą dnia. Prze-

badano to w liściach rośliny rosnącej na stanowisku górskim (*Homogyne alpina* (L.) Cass.) oraz w liściach roślin stanowisk nizinnych (*Rumex alpinus* L., *Asarum europaeum* L.).

Serdecznie dziękuję prof. drowi Fr. Górskiemu oraz dr A. Zurzyckiej i doc. drowi J. Zurzyckiemu za cenne rady udzielane w czasie wykonywania i pisania niniejszej pracy. Dziękuję również Kierownictwu Instytutu Ekspertyz Sądowych w Krakowie za umożliwienie wykonania pomiarów na spektrofotometrze.

Zakład Fizjologii Roślin UJ
w Krakowie

(Wpłynęło dn. 5.3.1956)

SUMMARY

F. Bukatsch (1939, 1940), and K. Wendel (1940) report that they observed diurnal changes in the concentration of chlorophyll pigments in the leaves of montane and lowland plants. According to Bukatsch in montane plants the highest chlorophyll concentration occurs in the morning and in the evening, whereas at noon the concentration is lowest. In plants from lowland habitats the course of fluctuations in the concentration of chlorophyll is reversed, i. e. the highest level of chlorophyll occurs at noon and the lowest in the morning and in the evening.

The aim of the present research has been to verify the results of the experiments of these two workers.

The first step was to adapt the method of chromatography to an accurate separation of chlorophyll *a* from chlorophyll *b* with the omission of carotenoids and the evaluation of the inherent errors.

The highest errors were caused by insufficient crushing of the leaves in the mortar and inaccurate handling during the separation of the pigments in the chromatographic column. The resulting error was estimated at 3,5 per cent.

The species used for the experiments were as follows: *Rumex alpinus* (about 200 m above sea level), *Asarum europaeum* (about 200 m above sea level) and *Homogyne alpina* (about 1690 m above sea level). First the chlorophyll concentrations in various parts of a leaf were defined. It was found that on the whole the concentration of chlorophyll per unit area of the leaf increased as the distance from the central vein decreased (Tables 3, 5, 7).

In samples taken from one leaf at various times of the day the concentration of chlorophyll was almost always characteristic for that part of the leaf (Tables 4, 6, 8 and fig. 5). No diurnal fluctuations in the concentration of chlorophyll pigments were recorded in the plants used for the present experiments.

LITERATURA

- Bukatsch F., 1939, Tagesschwankungen des Blattgrüngehaltes alpinen Pflanzen, Zeitschr. f. d. gesamte Naturwissenschaft 5: 263—272.
- Bukatsch F., 1940, Tagesschwankungen des Blattgrüngehaltes alpinen Pflanzen II, Zeitschr. f. d. gesamte Naturwissenschaft 6: 197—198.
- Comar C. L. and Zscheile F. P., 1942, Analysis of plant extracts for chlorophylls *a* and *b* by a photoelectric spectrophotometric method, Plant Physiol. 17: 198—209.
- Henrici M., 1918, Chlorophyllgehalt und Kohlensäure-Assimilation bei Alpen- und Ebenen-Pflanzen, Verh. d. natf. Ges. Basel 30: 43—136.
- Henrici M., 1926, The chlorophyll-content of grasses in Bechuanaland, 11. a. 12. reports of Dir. of Veterin. Educat. and Research. Pretoria 1: 227 (cyt. wg Bukatsch F. 1939).
- Montfort C., 1950, Photochemische Wirkungen des Höhenklimas auf die Chloroplasten photolabiler Pflanzen im Mittel- und Hochgebirge, Z. f. Naturforschung. 5b: 221—226.
- Seybold A. und Egle K., 1937, Lichtfeld und Blattfarbstoffe I, Planta 26: 491—515.
- Seybold A., 1942, Weist der Chlorophyllgehalt der Blätter Tagesschwankungen auf?, Bot. Archiv: 43: 71—77.
- Wendel K., 1940, Tagesschwankungen des Blattgrüngehaltes ebener Standorte, Zeitschr. f. d. gesamte Naturwissenschaft 6: 327—329.
- Willstätter R. und Stoll A., 1918, Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure, Berlin.