Wpływ manganu na fotosyntezę u wyższych roślin

*The effect of manganese on the intensity of photosynthesis
in higher plants*

M. RUSZKOWSKA

WSTĘP

Udział manganu w fotosyntezie jest już dziś sprawą bezsporną. Wykazały to badania E. Hiltnera (1924), F. C. Gerretsen (1949, 1950, 1951), A. Pirsona i in. (1937, 1952), oraz L. Bergmanna (1955).

Według E. Kesslera (1955, 1957), H. C. Eystera i in. (1956), a następnie wg H. Habermanna (1960), mangan bierze udział w procesie powstawania nadtlenu przy fotolitycznym wytwarzaniu tlenu. Nie wiadomo tylko jeszcze, czy mangan działa tu jako wolny jon, czy też jest związany z białkiem enzymu. Nie jest również sprawą rozstrzygniętą, czy mangan w tej reakcji ulega zmianie wartościowości.

Ponadto są pewne wzmianki o udziale manganu i w redukującej części procesu fotosyntezy (A. Pirson, 1960; G. Richter, 1961). Wiadomości na ten temat są jeszcze bardzo skąpe. Zagadnienie jest trudne do rozwiązania, ponieważ zalega się z udziałem manganu w różnych reakcjach enzymatycznych, nie związanych bezpośrednio z fotosyntezą.

Większość badań nad rolą manganu w fotosyntezie była przeprowadzana na organizmach jednokomórkowych (*Chlorella*, *Ankistrodesmus* i in.). Wobec tego istnieje konieczność potwierdzenia wyników i na roślinach wyższych. W poprzedniej pracy nad fizjologiczną rolą manganu (M. Ruszkowska 1960) autorka wywnioskowała pośrednią drogą, że przy niedoborze tego elementu następuje w roślinach silne zaburzenie działalności aparatu fotosyntetycznego. Niniejsza praca stanowi kontynuację tych badań i ma na celu:

- 1) oznaczenie intensywności fotosyntezy u roślin wyższych przy różnym poziomie nawożenia manganem,
- 2) zbadanie wpływu infiltracji roztworu $MnSO_4$ do liści bezpośrednio przed pomiarem intensywności fotosyntezy.

Badania zostały przeprowadzone w 1961 i 1962 roku.

METODYKA

1. Doświadczenia wazonowe

Materiału roślinnego do badań dostarczyły cztery doświadczenia wazonowe, założone:

- a) z pomidorami (odm. 'Karzełek Puławski') — od 19.V do 15.VII. 1961 r.,
- b) z pomidorami (odm. 'Karzełek Puławski') — od 11.VIII. do 10.X. 1962 r.,
- c) z tytoniem (odm. 'Virginia Kaznowskiego') — od 12.VII. do 3.XI. 1961 r.,
- d) z fasolą (odm. 'Saxa') — od 29.VI. do 25.IX. 1962 r.

Wybór roślin wziętych do doświadczeń podyktowany był następującymi względami:

- 1) pomidor — jest rośliną szczególnie czułą na niedobór manganu i był stosowany do doświadczeń w poprzednich badaniach (R u s z k o w s k a 1960),
- 2) tytoń — ma bardzo duże blaszki liściowe, co ułatwia pobieranie reprezentatywnych próbek do pomiarów intensywności fotosyntezy.
- 3) fasola — ma liść złożony z trzech listków o stosunkowo dużych blaszkach, co ułatwia pobieranie reprezentatywnych próbek do pomiarów. Poza tym dość sztywna tkanka liścia jest mało wrażliwa na ewentualne uszkodzenia w czasie pomiarów.

Doświadczenia założono w hali wegetacyjnej w doniczkach jedno- lub dwukilogramowych, napełnionych piaskiem płukany w HCl. Piasek mieszano z 2 g CaCO_3 na 1 kg piasku w celu utrzymania odczynu na poziomie ok. pH 7,2, co sprzyja wystąpieniu objawów niedoboru manganu u roślin. Przy zakładaniu doświadczenia dano pożywkę mineralną wg C. Olsena (1950), sporządzoną z soli czystych do analiz. Skład pożywki na jedną doniczkę: 0,42 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0,06 g KH_2PO_4 , 0,253 g MgSO_4 , 0,372 g KNO_3 , 2,5 ml 1% roztworu cytrynianu żelazowego, 0,2 mg H_3BO_3 , 0,1 mg CuSO_4 , 0,2 mg ZnSO_4 i 0,05 mg molibdenianu amonu. Taką samą dawkę pożywki powtarzano co 3—4 tygodnie, w miarę wyczerpywania składników odżywczych. Rośliny po dwie na doniczkę pikowano z rozsadnika piaskowego zaraz po ich wzejściu. Rośliny podlewano wodą dwukrotnie destylowaną do 60% całkowitej pojemności wodnej piasku. W każdym z przeprowadzonych doświadczeń zróżnicowano nawożenie manganem:

- a) 0 mg Mn,
- b) 0,45 mg Mn na 1 kg piasku,
- c) 4,5 mg Mn na 1 kg piasku.

Każda seria składała się z 8—12 powtórzeń. Rośliny z serii a) (0 mg Mn)

Ryc. 1. Liście pomidorów żywionych różnymi dawkami manganu (1962 r.)

a — 0 mg Mn — silne objawy niedoboru manganu; *b* — 0,45 mg Mn na 1 kg piasku — objawy niedoboru manganu na wierzchołkach listków; u nasady listki zielone; *c* — 4,5 mg Mn na 1 kg piasku — liść normalnie zielony

Tomato leaves grown with different levels of manganese (1962)

a — 0 mg Mn — the severe symptoms of manganese deficiency; *b* — 0,45 mg Mn per 1 kg of sand — the manganese deficiency symptoms on the leaf tops; the bases of the leaves are green; *c* — 4,5 mg Mn per 1 kg of sand — the normal green leaf.

przez cały czas trwania doświadczenia wykazywały typowe objawy niedoboru manganu w postaci tzw. „siateczki“ (ryc. 1), pąki kwiatowe zupełnie się nie wykształciły. Rośliny z serii *b*) (0,45 mg Mn) były wyższe niż rośliny wyrosłe przy braku manganu w pożywce, miały większe blaszki liściowe i ciemniejszą zieleń. Wykazywały jednak przy tym nieznaczne objawy niedoboru manganu. Rośliny wyrosłe przy 4,5 mg Mn (seria *c*) miały zdrową, ciemną zieleń i dały najwyższy plon (patrz tab. 2).

2. Pobieranie próbek liści do pomiarów intensywności fotosyntezy

Pomiary intensywności fotosyntezy przeprowadzano na skrawkach liści w okresie przed kwitnieniem i na początku kwitnienia roślin. Do pomiarów wybierano liście młode, ale całkowicie już wyrosnięte. Obcinano je żyłką tuż przy łodydze, wkładano do szalek Petriego z wilgotnym wacikiem i niezwłocznie przenoszono do laboratorium. Próbkę pobierano zawsze między godz. 8 a 9 rano. Zwracano uwagę, by liście były w pełni turgoru.

3. Infiltracja liści roztworem MnSO_4

W celu wprowadzenia do liści roztworu MnSO_4 bezpośrednio przed pomiarami, odcięte liście poddawano infiltracji.

a) Infiltracja próżniowa

Infiltrację próżniową liści roztworem MnSO_4 przeprowadzano wg metody podanej przez W. Brzeskiego i Z. Kaniugę (1956) w eksykatorze podłączonym do pompy próżniowej. Do eksykatora wstawiano mensurki z roztworem MnSO_4 , do których wkładano liście. Liście kontrolne, a w przypadku tytoniu połówki liści, zalewano wodą destylowaną. Z początku infiltrację przeprowadzano przy podciśnieniu 20 mmHg przez 15 minut. Potem czas infiltracji skrócono do 5 minut i stosowano podciśnienie 40 mmHg; w obu przypadkach ilości infiltrowanego płynu były takie same i wynosiły ok. 50—70% początkowej wagi liścia. Po infiltracji liście suszono na bibule pod chłodnym fenem przez ok. 1,5 do 2 godzin, do chwili uzyskania przez liść początkowej wagi. Na podstawie prób metodycznych ustalono, że najbardziej odpowiednim zakresem stężeń roztworu jest 1—10 mg MnSO_4 na litr. Przy takich stężeniach uzyskiwano najwyższe wyniki w pomiarach intensywności fotosyntezy. Próbowano również buforować roztwór MnSO_4 0,05 M buforem fosforanowym o pH 5,9 (pH soku komórkowego pomidorów), przekonano się jednak, że bufor ten wpływał ujemnie na intensywność fotosyntezy.

Tabela 1 - Table 1

Wpływ procesu infiltracji próżniowej na intensywność fotosyntezy
(średnie z 19 pomiarów)

The effect of vacuum infiltration on the photosynthesis intensity
(average of 19 measurements)

Liście tytoniu Tobacco leaves	$\mu\text{l O}_2$	%
1 Nie infiltrowane Non infiltrated	16,6	100
2 Infiltrowane wodą Infiltrated with water	9,2	55

Mimo dołożenia wielu starań, by infiltrację próżniową przeprowadzać jak najbardziej prawidłowo, przy stosowaniu tego zabiegu uzyskiwano prawie zawsze znaczne obniżenie intensywności fotosyntezy. Świadczą o tym pomiary kontrolne, przeprowadzone na liściach infiltrowanych wodą destylowaną (tab. 1). Ze względu na to ujemne działanie, infil-

tracę próżniową zarzucono i w 1962 roku wprowadzano roztwór MnSO_4 od liści za pomocą tzw. „infiltracji transpiracyjnej“.

b) „Infiltracja transpiracyjna“

Mianem „infiltracji transpiracyjnej“ określono tu sposób wprowadzania roztworu MnSO_4 do liści pod normalnym ciśnieniem, za pomocą wzmożonego prądu transpiracyjnego.

Odcięte od łodygi liście fasoli (lub pomidorów) wstawiano ogonkami do wodnego roztworu MnSO_4 o stężeniu 10 mg MnSO_4 na litr. Równocześnie liście kontrolne wstawiano do wody destylowanej. W celu zwiększenia transpiracji i przyspieszenia pobierania manganu przez rośliny brano liście o nieco zmniejszonym turgorze i po włożeniu ogonkami do roztworu MnSO_4 ustawiano je pod chłodnym fenem na przeciąg jednej godziny. Następnie liście o pełnym turgorze brano niezwłocznie do pomiarów intensywności fotosyntezy. Przy opisanym tu zabiegu zostały eliminowane ujemne skutki infiltracji próżniowej, a także uległ znacznemu skróceniu czas od chwili odcięcia liści od łodygi do rozpoczęcia pomiarów. Prawdopodobnie wszystkie te momenty przyczyniły się w znacznym stopniu do bardziej wyrównanych wyników w pomiarach manometrycznych. Ujemną stroną tej metody była jednak trudność skontrolowania, ile manganu zostało wprowadzone od liścia w czasie zabiegu. Dlatego też tym więcej uwagi poświęcono staraniu, by warunki, w jakich się „infiltracja transpiracyjna“ odbywała, były możliwie wyrównane.

Przy metodzie infiltracji wymagane są pomiary kontrolne. Są one przeprowadzane na liściach infiltrowanych wodą jako tzw. „ślepa próba wodna“ (patrz K. Mothes 1933; A. C. Chibnall 1939; W. Brzeski i Z. Kaniuga 1956 str. 285). W związku z tym zabiegiem może być wysunięty zarzut, że woda destylowana wywiera niekiedy toksyczne działanie na komórki roślinne. O. F. Curtis i D. G. Clark (1958) tłumaczą to zjawisko:

- a) brakiem soli mineralnych, działających buforująco,
- b) obecnością minimalnych ilości jonów metali ciężkich (głównie Cu, Pb i Zn),
- c) działaniem jonów wodorowych i działaniem kwasu węglowego w przypadku, gdy woda destylowana posiada niskie pH.

W badaniach autorki zarzut toksyczności wody destylowanej byłby jednak nieistotny, ponieważ:

- a) autorka stosowała wodę dwukrotnie destylowaną w aparacie cynowanym (cyna jest mniej toksyczna od innych metali ciężkich),
- b) pH wody było ok. 6,7 — była to więc woda niezakwaszona,
- c) przy wprowadzaniu wody destylowanej do liści za pomocą prądu

transpiracyjnego jej toksyczność byłaby osłabiona buforującym działaniem soli mineralnych obecnych w wiązkach naczyniowo-sitowych.

Według obserwacji autorki ujemne działanie infiltracji próżniowej (patrz tab. 1) należałoby tłumaczyć nie tyle toksycznym działaniem wody destylowanej, lecz raczej całą procedurą związaną z zabiegiem infiltracji, a szczególnie wielokrotnie stwierdzonym nierównomiernym wysychaniem tkanki liściowej po zabiegu.

4. Pomiary intensywności fotosyntezy

Pomiary intensywności fotosyntezy przeprowadzano manometryczną metodą Warburga z użyciem buforu węglanowego (metoda opisana przez W. W. Umbreita i in. 1949 oraz przez R. H. Kentena 1956). W metodzie tej intensywność fotosyntezy mierzy się ilością tlenu wydzielonego przez oświetlone rośliny w zamkniętym układzie gazometrycznym, czyli tzw. respirometrach Warburga. Metoda ta opiera się na założeniu, że stosowany tu bufor węglanowy utrzymuje na stałym poziomie ciśnienie cząsteczkowe CO_2 w naczynkach pomiarowych, a obserwowane zmiany ciśnienia są wynikiem wyłącznie zmian ilości O_2 . Ponieważ u roślin na świetle zachodzi podwójna wymiana gazowa: 1) pobieranie CO_2 i wydzielanie O_2 jako wynik procesu fotosyntezy, oraz 2) pobieranie O_2

Ryc. 2. Krążki liści w naczynku pomiarowym Warburga; krążki liści pływają po powierzchni buforu węglanowego

The discs of a leaf in the vessel of Warburg's apparatus; the discs of a leaf are swimming on the surface of the carbonate buffer.

i wydzielanie CO_2 przy oddychaniu — przy pomiarach intensywności fotosyntezy metodą manometryczną istnieje konieczność wniesienia poprawki na oddychanie. Określa się ją jako średnią z oddychania w czasie dwóch okresów ciemnych: poprzedzającego okres świetlny i następującego po nim. Zakłada się tu, że w określonych warunkach światło nie wpływa na stopień oddychania roślin (A. H. Brown 1953 cyt. za Kentenem 1956).

Przyjmując powyższą metodę mierzono intensywność fotosyntezy na 6 krążkach o średnicy 10 mm, wyciętych szklaną sztancą z liści: a) nie infiltrowanych, b) infiltrowanych roztworem MnSO_4 lub c) infiltrowanych wodą destylowaną. Powierzchnia 6 krążków wynosiła 471 mm^2 , a ich waga ok. 0,1 g świeżej masy. Do naczynek pomiarowych (bez studzienek) wlewano 1,9 ml buforu węglanowego Warburga Nr 11, będącego mieszaniną 95 ml 0,1 M roztworu kwaśnego węglanu sodu z 5 ml 0,1 M roztworu węglanu sodowego, posiadającego pH 8,69 i zawierającego $33 \cdot 10^{-5}$ mola CO_2/l . Na powierzchni tego buforu umieszczano 6 krążków wierzchnią stroną liścia ku górze (ryc. 2). Prócz naczynek pomiarowych dołączano 3 naczynka kontrolne — z samym buforem, pozwalające obliczyć poprawkę na termobarometryczne zmiany. Naczynka podłączano do manometrów, czyli tzw. respirometrów Warburga i zanurzano w łaźni wodnej o temp. 25°C . Szybkość wytrząsania naczynek wynosiła ok. 120 wahań na minutę. Przy pomiarach stosowano tzw. „światło dzienne“, pochodzące z dziesięciu świetlówek firmy Telam, umieszczonych częściowo nad aparatem Warburga, a częściowo pod łaźnią wodną. Natężenie światła padającego z góry wynosiło ok. 4—5,5 tysięcy luksów na powierzchni lustra wody łaźni wodnej, a natężenie światła z dołu odpowiadało ok. 1 tysiącowi luksów. Jako miarę intensywności fotosyntezy przyjęto ilość mikrolitrów (μl) O_2 wydzielonego w czasie 20 minut przez naświetlone krążki liści, po uwzględnieniu poprawki na oddychanie. Pomiary były przeprowadzone wg ogólnie przyjętych zasad metodyki manometrycznej (patrz W. Brzeski i Z. Kaniuga 1956). Harmonogram pomiaru przedstawiono na ryc. 3. Strzałki na harmonogramie wskazują czas, kiedy zapisywano poziom płynu Brodiego na skali manometrów (w mm). Po uwzględnieniu poprawek na termobarometryczne zmiany intensywności fotosyntezy obliczano wg wzoru:

$$\text{intensywność fotosyntezy} (+\mu\text{l O}_2) = \left[(d - c) - \frac{(a - b) + (f - e)}{2} \right] \cdot S,$$

gdzie $(d - c)$ — różnica poziomu płynu Brodiego przy pomiarach na świetle,

$(a - b)$ i $(f - e)$ — różnicami w poziomie płynu Brodiego przy pomiarach w ciemności,

S — stała naczynkowa.

Wyniki pomiarów dotyczące poszczególnych kombinacji podano jako średnie z trzech powtórzeń (tzn. z trzech naczyniek pomiarowych), każdorazowo stosowanych przy pomiarach i ustawionych w aparacie Warburga metodą systematyczną. Obliczono przedziały ufności dla poszczególnych wyników.

Obrana w badaniach metoda manometryczna pomiarów intensywności fotosyntezy wymaga przedyskutowania jej poprawności. Metoda ta opracowana po raz pierwszy przez O. Warburga (1919, 1920) jest dotąd

Ryc. 3. Harmonogram pomiaru intensywności fotosyntezy

Scheme of measurement of photosynthesis intensity.

z różnymi modyfikacjami dość często stosowana przy badaniach nad fotosyntezą, szczególnie wtedy, gdy obiektem doświadczalnym są jednokomórkowe glony lub drobne części tkanek wyższych roślin (patrz m.in. T. E. Brown i in. 1958; G. Richter 1961). W stosunku do tej metody wysuwa się szereg zarzutów, m.in. ten, że bufor węglanowy o wysokim pH stanowi нефизjologiczne środowisko dla roślin. Poza tym, przy badaniu wyższych roślin istnieje konieczność krajania, a nawet miażdżenia liści — zabiegów w wysokim stopniu wpływających na procesy metaboliczne w roślinach. Pod tym względem metodę manometryczną znacznie przewyższają inne metody pomiarów intensywności fotosyntezy, które pozwalają badać całe, nie naruszone rośliny. Nie mając chwilowo możliwości wyboru autorka przeprowadziła badania metodą manometryczną, planując sprawdzenie wyników w przyszłości przy pomocy także i innych metod.

Biorąc pod uwagę wszystkie ujemne strony obranej metody, przeprowadzono na wstępie szereg prób metodycznych w celu zmniejszenia do minimum błędów pomiarów i uzyskania możliwości wyciągnięcia z badań poprawnych wniosków. W szczególności zwrócono uwagę na następujące czynniki:

1. Usiłowano ujednolicić i skrócić do minimum czas od chwili odcięcia liści od łodygi do rozpoczęcia pomiarów. Warunek ten był nie-

zbędny, by móc mierzyć intensywność fotosyntezy bezpośrednio po wprowadzeniu manganu do liści (w przeciwnym wypadku należałoby się liczyć z szeregiem reakcji wtórnych). Pomiary rozpoczynano po 2, a nawet po 1 godzinie od zerwania liści i „infiltrowania” ich manganem, a w 15 minut po wycięciu z nich krążków.

Kwestię czasu przygotowywania próbek należy rozpatrzyć w świetle badań W. Starzeckiego (1961). Mierzył on intensywność oddychania i fotosyntezy na krążkach liści w różnych odstępach czasu od chwili ich wycięcia. Stwierdził, że oddychanie było najsilniejsze w pierwszej godzinie po wycięciu krążków, potem proces ten słabł, lecz po 3 godzinach następowała stabilizacja i zarówno intensywność oddychania, jak i fotosyntezy pozostawały nie zmienione przez 3 dni. Wynikałoby z tego, że autorka przeprowadzała pomiary w okresie nie ustabilizowanym. O ile jednak Starzecki uzyskał najwyższe wyniki po 1 godzinie od chwili wycięcia krążków, to w badaniach autorki I pomiar oddychania przeprowadzony już po 30 minutach wyniósł średnio — $3,84 \mu\text{l O}_2$, a II pomiar, po 90 minutach dał wartość — $5,82 \mu\text{l O}_2$ (średnie z 18 pomiarów). Być może jednak, że rozbieżność wyników jest tylko pozorna, ponieważ Starzecki nie mierzył intensywności oddychania w okresie krótszym niż 1 godzina. Z drugiej strony, autorka nie mogłaby czekać na ustabilizowanie procesu oddychania w krążkach liściowych, gdyż, jak już wspomniano, badany przez nią problem wymagał przeprowadzenia pomiarów w jak najkrótszym czasie. Autorce wydawało się jednak, że ujednolicenie czasu pomiarów odgrywało tu najważniejszą rolę.

2. W celu jak najmniejszego ranienia tkanki roślinnej, zarzucono krajanie liści w paski, a wprowadzono wybijanie krążków ostrą szklaną sztańcą; miało to i tę zaletę, że porównywano próbki liści zawsze o takiej samej powierzchni.

3. Usiłowano uniknąć нефизjologicznego wpływu buforu węglanowego o pH 8,6. Krążki liścia umieszczano na powierzchni buforu, wierzchnią stroną liścia ku górze. Zapewniało to dostatecznie dobry kontakt buforu z liściem, ważny ze względu na wymianę gazową. Z drugiej strony utrzymywanie się krążków liścia na powierzchni płynu utrudniało jego wnikiwanie do wnętrza tkanki. Po zakończeniu pomiarów tkanki liścia miały świeży, nie zmieniony wygląd, a bufor był bezbarwny, co świadczyło o tym, że liść nie ulegał maceracji. Obserwacje te potwierdzał również fakt, że nie stwierdzono spadku intensywności wymiany gazowej u liści w czasie pomiarów, co miało np. miejsce przy użyciu homogenatów tkankowych.

4. Intensywność fotosyntezy może się zmieniać wraz z wiekiem liścia. Dlatego do pomiarów brano liście jednakowego wieku: młode, lecz całkowicie już wyrosnięte. Z myślą o porównywalności wyników do infiltracji brano dwie połówki liścia (tytoń), z których jedną infiltrowano

wodą, a drugą — roztworem MnSO_4 . Analogicznie przy fasoli brano dwa naprzeciwległe listki z tego samego liścia.

5. Do pomiarów brano liście o pełnym turgorze, gdyż przekonano się, że u liści z niedosytem wody są znaczne zaburzenia w wymianie gazowej (zarówno przy oddychaniu, jak i fotosyntezie).

6. Oświetlenie. Przy pomiarach fotosyntezy w warunkach laboratoryjnych najlepsze byłoby światło o takim składzie widma, jak światło słoneczne i o dającym się regulować natężeniu. Stosowane świetlówki firmy Telam dawały światło o zadowalającym składzie widma, gdyż wydzielanie tlenu przez oświetlone krążki liści było bardzo wyraźne i pomiary fotosyntezy odbywały się zdecydowanie powyżej punktu kompensacyjnego. Stosowane światło miało i tę zaletę, że nie zmieniało temperatury łaźni wodnej, co przy analizach gazometrycznych ma pierwszorzędne znaczenie. Z drugiej strony autorka nie była w możności uregulować całkowicie intensywności światła i w czasie pomiarów stwierdzono zmiany w jego natężeniu od 4 do 5,5 tysięcy luksów. Tym można prawdopodobnie tłumaczyć różnice w intensywności fotosyntezy obserwowane z dnia na dzień u liści z tych samych kombinacji (patrz tab. 4 i 5).

Biorąc pod uwagę wszystkie wyszczególnione względy autorce udało się uzyskać zadowalającą dokładność pomiarów. Dowodem tego był duży procent zgodnych wyników w równoległych próbkach i zasadnicze różnice między próbkami z różnych kombinacji, czego odbiciem są obliczone przedziały ufności (tab. 4 i 5).

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

1. Intensywność fotosyntezy przy różnym poziomie nawożenia manganem

Przeprowadzone pomiary manometryczne wykazały zasadnicze różnice w intensywności fotosyntezy u roślin wyrosłych przy różnym poziomie nawożenia manganem. Wyniki te przedstawia wykres (ryc. 4). U wszystkich badanych roślin — pomidorów, tytoniu i fasoli — przy silnym niedoborze manganu (0 mg Mn) intensywność fotosyntezy była 20—50% niższa w porównaniu z roślinami, które otrzymały mangan w pożywce. Zależności między kombinacjami 0,45 mg Mn i 4,5 mg Mn układały się różnie: w dwóch przypadkach (pomidory, 1962 r. i tytoń, 1961 r.) przy małej dawce manganu otrzymano, tak jakby należało oczekiwać, mniejszą intensywność fotosyntezy, niż przy dużej dawce; w dwóch innych doświadczeniach (pomidory, 1961 r. i fasola, 1962 r.) było odwrotnie, jednak różnice leżały tu w granicach błędu.

Zestawiając wyniki dwóch doświadczeń z pomidorami widać, że różnice w intensywności fotosyntezy, zależne od poziomu nawożenia roślin manganem, pokrywają się z różnicami w plonach tych roślin (tab. 2).

Mianowicie, przy niedoborze manganu (0 mg Mn) plony suchej masy, a także zawartość cukrów redukujących były dużo niższe, niż przy dawce 4,5 mg Mn; plony roślin przy dawce 0,45 mg dały pośrednie wyniki. Przy porównaniu tych dwóch doświadczeń na uwagę zasługuje jeszcze fakt, że zarówno intensywność fotosyntezy, jak i intensywność oddychania, a także plony roślin z doświadczenia letniego (maj — lipiec, 1961) były dużo wyższe niż w doświadczeniu jesiennym (sierpień — październik, 1962). (Wyniki dotyczące oddychania będą omówione dalej).

Niska intensywność fotosyntezy u roślin z niedoborem manganu nie jest jednak dostatecznym dowodem na bezpośredni udział manganu w fotosyntezie. Należy pamiętać, że brane do pomiarów liście roślin z kombinacji 0 mg Mn wykazywały typowe objawy niedoboru manganu: były pożółkłe, a tylko wzdłuż wiązek naczyniowo-sitowych zachowała się normalna zieleń (patrz ryc. 1). Fakt ten sprawiał, że rośliny „niedoborowe“ miały dużo gorsze warunki fotosyntezy niż rośliny normalnie odży-

Ryc. 4. Wpływ manganu na intensywność fotosyntezy liści

A — pomidorów (VII. 1961); B — pomidorów (IX. 1962); C — tytoniu (IX. 1961); D — fasoli (VIII. 1962). A — średnie z 2 pomiarów; B — 1 pomiar; C — średnie z 6 pomiarów; D — średnie z 2 pomiarów; (B i D — wyniki dotyczące infiltracji $MnSO_4$ do liści są podane w tab. 4 i 5.) 0; 0,45 i 4,5 mg Mn na 1 kg piasku — trzy poziomy nawożenia manganem; 1 — liście nie infiltrowane; 2 — liście infiltrowane roztworem $MnSO_4$ na 3 godziny przed pomiarem

The effect of manganese on photosynthesis intensity

A — tomato leaves (July, 1961); B — tomato leaves (September, 1962); C — tobacco leaves (September, 1961); D — bean leaves (August, 1962). A — average of 2 measurements; B — 1 measurement; C — average of 6 measurements; D — average of 2 measurements; (B and D — the results of $MnSO_4$ infiltration into the leaves are given in tab. 4 and 5.) 0; 0.45 and 4.5 mg Mn per 1 kg of sand — three different levels of manganese in sand culture; 1 — uninfiltrated leaves; 2 — leaves infiltrated with $MnSO_4$ solution (10 mg $MnSO_4$ /liter) 3 hours before the measurement.

Tabela 2 - Table 2

Wyniki doświadczeń z pomidorami (1961 i 1962 rok)
The results of experiments with tomato plants (1961 i 1962)

Kombinacja Treatment	Doświadczenie I - Experiment I (19.V.-15.VII.1961)					Doświadczenie II - Experiment II (11.VIII.-10.X.1962)		
	średni plon s.m. z 1 donicz. mean total yield of dry matter (per pot) g	intensywność fotosyntezy intensity + μ l O ₂	intensywność oddychania respiration intensity - μ l O ₂	średni plon s.m. z 1 donicz. mean total yield of dry matter (per pot) g		zawartość cukrów redukują- cych w 1 g masy reducing sugars contents in 1 g of green matter mg	intensywność fotosyntezy intensity + μ l O ₂	intensywność oddychania respiration intensity - μ l O ₂
0 mg Mn	1,93	13,8	12,6	1,40		0,86	7,5	2,9
0,45 mg Mn na 1 kg piasku per 1 kg of sand	6,84	22,0	5,2	2,19		3,15	10,7	2,5
4,5 mg Mn na 1 kg piasku per 1 kg of sand	7,76	18,5	6,0	3,10		6,78	15,6	0,6
Przedział ufności (P _{0,05}) Confidence interval (P _{0,05})	0,993	8,74	2,62	0,290			3,95	2,83

T a b e l a 3 - T a b l e 3
 Zawartość chlorofilu* w liściach pomidorów (1962 r.)
 (w liczbach względnych)
 Chlorophyll content* in tomato leaves (1962)
 (in relative values)

Kombinacja Treatment		Chlorofil a Chlorophyll a	Chlorofil b Chlorophyll b
1	0 mg Mn	59	73
2	0,45 mg Mn na 1 kg piasku per 1 kg of sand	73	86
3	4,5 mg Mn na 1 kg piasku per 1 kg of sand	100	100

* Zawartość chlorofilu oznaczano metodą S. Więkowskiego (1957).

Chlorophyll content was determined according to the method described by S. Więkowski (1957).

wione manganem. Potwierdza to analiza liści na zawartość chlorofilu (tab. 3). W przypadku liści niedoborowych zawartość chlorofilu a i b była dużo niższa, niż u roślin wyrosłych przy 4,5 mg Mn na 1 kg piasku. Dawka 0,45 mg Mn dała pośrednie wyniki. Już niższa zawartość chlorofilu mogła być więc dostatecznym powodem słabej intensywności fotosyntezy u roślin z niedoborem manganu.

2. Wpływ infiltracji roztworu $MnSO_4$ na intensywność fotosyntezy

Bezpośredni wpływ manganu na fotosyntezę badano przy pomocy infiltracji roztworu $MnSO_4$ do liści, dokonanej na 1—3 godziny przed pomiarami. W tak krótkim czasie nie mogło być mowy o zaniku chlorozy bezmanganowej i ewentualny dodatni wpływ soli manganu mógłby świadczyć o bezpośrednim włączeniu manganu w aparat fotosyntetyczny roślin. Badania przeprowadzone metodą infiltracji próżniowej dały wyniki przedstawione na wyżej podanym wykresie (ryc. 4).

U pomidorów z niedoborem manganu (doświadczenie z 1961 r.) infiltracja roztworu $MnSO_4$ do liści wpłynęła na zwiększenie intensywności fotosyntezy, podczas gdy równocześnie u roślin z kombinacji 0,45 mg i 4,5 mg Mn nastąpiło niewielkie jej zmniejszenie. Pomiary przeprowadzone na liściach tytoniu dały mniej przekonujące wyniki. Pod wpływem infiltracji próżniowej roztworu $MnSO_4$ do liści we wszystkich kombinacjach nastąpiło obniżenie intensywności fotosyntezy i jedynie wielkość względna tego obniżenia była najmniejsza u liści z niedoborem manganu (ryc. 4).

Ponieważ stwierdzono, że sam proces infiltracji próżniowej wpływał ujemnie na fotosyntezę badanych roślin (patrz tab. 1), w roku 1962 wy-

Tabela 4 - Table 4

Wpływ "infiltracji transpiracyjnej" roztworu $MnSO_4$ na intensywność fotosyntezy u liści fasoli (1962)The effect of $MnSO_4$ "infiltration" (at enhanced transpiration) on the photosynthesis intensity in bean leaves (1962)

Data pomiaru Day of measurement		intensywność fotosyntezy - photosynthesis intensity																średnio average			
Kombinacja - treatment		5.IX		6.IX		7.IX		12.IX		17.IX		19.IX		20.IX		21.IX		22.IX			
		pl O ₂	%	pl O ₂	%	pl O ₂	%	pl O ₂	%	pl O ₂	%	pl O ₂	%	pl O ₂	%	pl O ₂	%	pl O ₂	%	pl O ₂	%
I. Liście z objawami niedoboru manganu, wyrosłe bez dodatku Mn do piasku: The manganese deficient leaves, grown without manganese in sand:																					
1) infiltrowane wodą infiltrated with water		17,80	100	14,90	100	11,85	100	8,76	100	13,70	100	8,10	100	10,20	100	12,80	100	12,46	100	12,29	100
2) infiltrowane roztworem manganu (10 mg MnSO ₄ /l) infiltrated with manganese solution (10 mg MnSO ₄ per liter)		19,76	111	16,36	113	13,36	113	13,23	152	13,96	102	14,50	179	13,26	130	15,43	121	15,96	128	15,16	123
Wynik - The result *		+		+		+		+		+		+		+		+		+			
II. Liście normalnie zielone, wyrosłe przy dawce 4,5 mg Mn na 1 kg piasku: The normal green leaves grown with 4,5 mg Mn per 1 kg of sand:																					
1) infiltrowane wodą infiltrated with water		18,70	100	16,80	100	13,70	100	11,56	100	22,40	100	13,70	100	11,20	100	13,40	100	20,60	100	15,78	100
2) infiltrowane roztworem manganu (10 mg MnSO ₄ /l) infiltrated with manganese solution (10 mg MnSO ₄ per liter)		15,13	81	16,16	96	13,06	95	10,36	90	24,90	111	13,26	97	10,60	95	12,20	91	21,23	103	15,21	96
Wynik - The result *		—		—		—		—		+		—		—		—		+			
Przedział ufności (P _{0,05}) Confidence interval (P _{0,05})		3,125		3,695		1,646		3,962		4,195		5,541		4,693		4,047		2,922			

* + lub — - wpływ w granicach błęd.
or - the effect nonsignificant at the level 5%.+ lub — - wpływ udowodniony statystycznie.
or - the effect significant at the level 5%.

Tabela 5 - Table 5

Wpływ "infiltracji transpiracyjnej" roztworu $MnSO_4$ na intensywność fotosyntezy u liści pomidorów (1962)
 The effect of $MnSO_4$ "infiltration" (at enhanced transpiration) on the photosynthesis intensity in tomato leaves (1962)

Data pomiaru - Day of measurement kombinacja - treatment	27.IX		28.IX		5.X		Średnio Average	
	intensywność fotosyntezy - photosynthesis intensity							
	$\mu l O_2$	%	$\mu l O_2$	%	$\mu l O_2$	%		$\mu l O_2$
I. Liście z objawami niedoboru manganu, wyrosłe bez dodatku Mn do piasku: The manganese deficient leaves, grown without manganese in sand: 1) infiltrowane wodą infiltrated with water 2) infiltrowane roztworem manganu (10 mg $MnSO_4$ na litr) infiltrated with manganese solution (10 mg $MnSO_4$ per liter)	11,13 15,96 +	100 143	9,00 12,23 +	100 136	11,56 15,76 +	100 136	10,56 14,65	100 139
Wynik* - The result*								
II. Liście normalnie zielone, wyrosłe przy dawce 4,5 mg Mn na 1 kg piasku: The normal green leaves grown with 4,5 mg Mn per 1 kg of sand: 1) infiltrowane wodą infiltrated with water 2) infiltrowane roztworem manganu (10 mg $MnSO_4$ na litr) infiltrated with manganese solution (10 mg $MnSO_4$ per liter)	20,53 23,83 +	100 116	15,60 13,50 —	100 87	20,90 24,30 +	100 116	19,01 20,54	100 108
Wynik* - The result*								
Przedział ufności ($P_{0,05}$) Confidence interval ($P_{0,05}$)	3,148		2,843		1,160			

* + lub — — wpływ w granicach błęd.
 or — the effect nonsignificant at the level 5%.
 + lub — — wpływ udowodniony statystycznie.
 or — the effect significant at the level 5%.

próbowano inny sposób wprowadzania manganu do liści — przy pomocy wzmożonego prądu transpiracyjnego (patrz opis na s. 489). Wyniki uzyskane z szeregu pomiarów podane są w tabeli 4 i 5. We wszystkich przeprowadzonych analizach wprowadzenie MnSO_4 do liści niedoborowych pod względem manganu wpłynęło na zwiększenie intensywności fotosyntezy: u fasoli średnio o 23%, a u pomidorów — średnio 39% w porównaniu z liśćmi kontrolnymi („infiltrowanymi“ wodą destylowaną). Część tych różnic leży w granicach błędu, pozostałe jednak (u fasoli 4 wypadki na 9, a u pomidorów we wszystkich 3 przypadkach) są statystycznie udowodnione. U analizowanych równocześnie liści normalnie zielonych (wyrosłych przy 4,5 mg Mn na 1 kg piasku) „infiltracja transpiracyjna“ roztworu MnSO_4 wpłynęła:

a) ujemnie na intensywność fotosyntezy (u fasoli średnio 4% niżki w porównaniu z liśćmi „infiltrowanymi“ wodą),
lub też

b) była pewna zwyżka, lecz mniej efektywna, niż przy liściach „niedoborowych“ (patrz tab. 5).

Na uwagę zasługuje szybki efekt infiltracji MnSO_4 . Z obserwacji autorki wynikałoby, że im krótszy był czas wprowadzania manganu do liści, tym wpływ manganu na fotosyntezę u roślin niedoborowych był bardziej wyraźny. Ta szybka i wyraźna reakcja niedoborowych roślin na wprowadzenie MnSO_4 do liści, a równocześnie jej brak u roślin dostаточно zaopatrzonych w mangan, byłyby dowodem na bezpośredni udział manganu w fotosyntezie. Do podobnych wniosków doszli A. P i r s o n i i n. (1952), którzy uzyskali wzrost intensywności fotosyntezy u niedoborowych kultur *Ankistrodesmus* po 1—2 godzinach od chwili dodania manganu do substratu.

Na poparcie swoistego działania manganu w procesie fotosyntezy należałoby przeprowadzić badania i z innymi mikroelementami. Orientacyjne próby wykazały, że infiltracja roztworu CuSO_4 i FeSO_4 (w stężeniach równoważnych do stężeń roztworów MnSO_4) nie wpłynęły na zwiększenie intensywności fotosyntezy u roślin z niedoborem manganu. Badania te będą jeszcze kontynuowane.

Jak już wspomniano, przy pomiarach intensywności fotosyntezy metodą manometryczną wnosi się poprawkę na oddychanie. W obecnych badaniach oświetlenie aparatu Warburga było na tyle silne, że pomiary odbywały się zdecydowanie powyżej punktu kompensacyjnego: ilość tlenu pobieranego w czasie oddychania stanowiła zazwyczaj ok. 25—33% ilości tlenu, wydzielonego w takim samym przeciągu czasu w procesie fotosyntezy.

U liści pomidorów, a także fasoli nie infiltrowanych uzyskano wyniki, świadczące o silniejszym oddychaniu roślin niedoborowych pod względem manganu (patrz tab. 2). Wyniki te potwierdzają wcześniejsze bada-

nia autorki (Ruszkowska 1960). U liści tytoniu, a szczególnie u liści fasoli i pomidorów infiltrowanych przed pomiarami zależności tej jednak nie stwierdzono (tab. 6). U liści „transpiracyjnie infiltrowanych” wodą intensywność oddychania była taka sama, niezależnie od tego, czy liście wykazywały objawy niedoboru manganu, czy też były normalnie zielone. „Infiltracja transpiracyjna” roztworu $MnSO_4$ wpłynęła we wszystkich przypadkach na nieznaczne zwiększenie oddychania.

Różnice w wynikach dotyczących oddychania w zależności od tego, czy przed pomiarami liście były infiltrowane, należałoby prawdopodobnie tłumaczyć różnym stopniem nasycenia tkanek wodą. Stosunki wodne mają duży wpływ na oddychanie roślin. Infiltracja liści przed pomiarami manometrycznymi zapewniała równomierne uwilgotnienie tkanek —

Tabela 6 - Table 6

Intensywność oddychania liści pomidorów i fasoli w $\mu l O_2$
doświadczenia 1962 r.

The intensity of respiration of tomato and bean leaves ($\mu l O_2$)
experiments 1962

Kombinacja Treatment	Fasola (średnie z 9 pomiarów) Bean (average of 9 measurements)	Pomidory (średnie z 4 pomiarów) Tomato (average of 4 measurements)
I. Liście z objawami niedoboru manganu, wyrosłe bez dodatku Mn do piasku: The manganese deficient leaves, grown without manganese in sand:		
1) infiltrowane wodą* infiltrated with water*	4,5	3,4
2) infiltrowane roztworem manganu (10 mg $MnSO_4$ na litr)* infiltrated with manganese solution (10 mg $MnSO_4$ per liter)*	5,2	4,0
II. Liście normalnie zielone, wyrosłe przy dawce 4,5 mg Mn na 1 kg piasku The normal green leaves grown with 4,5 mg Mn per 1 kg of sand		
1) infiltrowane wodą* infiltrated with water*	4,9	3,4
2) infiltrowane roztworem manganu (10 mg $MnSO_4$ na litr)* infiltrated with manganese solution (10 mg $MnSO_4$ per liter)*	5,0	4,2

* Liście infiltrowane pod normalnym ciśnieniem przy pomocy wzmożonego prądu transpiracyjnego.

The leaves were infiltrated under a normal pressure but at enhanced transpiration.

a więc prawdopodobnie i równomierne ich oddychanie. U liści nie infiltrowanych mogły być różnice w uwilgotnieniu: liście normalnie zielone, prawdopodobnie silniej transpirujące niż rośliny niedoborowe, mogły mieć w chwili pomiaru pewien niedosyt wody w tkankach, ujemnie wpływający na oddychanie.

Należy wspomnieć, że w literaturze istnieją sprzeczne dane odnośnie do tego zagadnienia. A. Pirson i in. (1952) nie stwierdzili zmian w oddychaniu przy niedoborze manganu u *Ankistrodesmus*, natomiast E. Kessler (1957) doniósł o zmniejszonym pobieraniu tlenu u niedoborowych kultur tego glonu. H. C. Eyster i in. (1956) zaobserwowali znów, że komórki *Chlorella*, niedoborowe pod względem manganu, oddychały słabiej lub silniej niż komórki zaopatrzone w mangan, w zależności od czasu trwania autotroficznych warunków; im kultury dłużej rosły w warunkach autotroficznych, tym kultury z niedoborem manganu silniej oddychały. Zagadnienie to wymaga dalszych badań.

STRESZCZENIE I WNIOSKI

Celem badań było oznaczenie intensywności fotosyntezy u pomidorów, tytoniu i fasoli przy różnym poziomie manganu:

a) pobranego przez rośliny w czasie wegetacji, lub b) wprowadzonego do liści na drodze infiltracji bezpośrednio przed pomiarami.

Pomiary przeprowadzono na krążkach wyciętych z liści manometryczną metodą Warburga z użyciem buforu węglanowego. Na wstępie poczyniono szereg prób metodycznych. Ponieważ stwierdzono, że infiltracja próżniowa wpływała ujemnie na intensywność fotosyntezy, wypróbowano innych sposobów wprowadzania $MnSO_4$ do liści: pod normalnym ciśnieniem, za pomocą wzmożonego prądu transpiracyjnego. Przedyskutowano poprawność stosowanej metodyki.

Z przeprowadzonych badań wyciągnięto następujące wnioski:

1. Intensywność fotosyntezy u roślin z niedoborem manganu jest o 20—50% niższa, niż u roślin zaopatrzonych w mangan; odbija się to ujemnie na plonach roślin niedoborowych (ryc. 4, tab. 2).

2. Mangan wpływa na fotosyntezę u wyższych roślin pośrednio i bezpośrednio.

3. Pośredni wpływ manganu na fotosyntezę polega na prawidłowym wykształceniu chlorofilu: przy niedoborze manganu występuje charakterystyczna chloroza liści, stwierdzono wtedy również niższą zawartość chlorofilu a i b (ryc. 1, tab. 3).

4. O bezpośrednim wpływie manganu na fotosyntezę u badanych roślin świadczą wyniki „infiltracji transpiracyjnej“ roztworu $MnSO_4$:

a) „infiltracja transpiracyjna“ $MnSO_4$ do liści niedoborowych zwiększała intensywność fotosyntezy o ok. 20—40%;

b) natomiast równoczesne wprowadzenie MnSO_4 do liści normalnie zielonych wywoływało zmiany w intensywności fotosyntezy średnio od -4 do $+8\%$ (tab. 4 i 5).

Badania przeprowadzono w latach 1961 i 1962. Projektowane są dalsze badania z zastosowaniem metody izotopowej.

Pani Prof. dr Annie Nowotny-Mieczyskiej składam serdeczne pozdrowienie za temat pracy.

*Pracownia Fizjologii Żywienia Roślin
Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa
w Puławach*

(Wpłynęło: dn. 24.10.1963 r.)

SUMMARY

The effect of manganese on the intensity of photosynthesis in higher plants has been investigated during two vegetation seasons (1961 and 1962). The plants (tomatoes, bean, and tobacco) were grown in pots on pure sand enriched with mineral solution, at 3 levels of manganese: 0, 0.45 and 4.5 mg Mn per 1 kg of sand.

The Warburg's method with carbonate buffer was used to measure the intensity of photosynthesis on leaf discs of the plants. The leaves were infiltrated with MnSO_4 solution, 10 mg MnSO_4 per liter, immediately before the measurements. The control leaves were: a) infiltrated with distilled water, b) not infiltrated. The vacuum infiltration diminished the intensity of photosynthesis therefore another method was tried to introduce MnSO_4 into the leaves through the vessels under a normal pressure but at enhanced transpiration.

The main results may be summarized as follows:

1. The photosynthetic intensity of manganese deficient plants was from 20 to 50% lower than this of the normal plants supplied with manganese. The yield of manganese deficient plants was also reduced to some extent (Fig. 4, and Table 2).
2. The photosynthesis in higher plants was influenced by manganese indirectly and directly.

3. An indirect effect of manganese on the photosynthesis was expressed by production of chlorophyll: the chlorophyll content of the manganese deficient leaves was lower than that of the healthy ones (Fig. 1, Table 3).

4. A direct effect of manganese on the photosynthesis was obtained in the experiments with MnSO_4 infiltration:

- a) the photosynthetic intensity of manganese deficient leaves was increased from 20 to 40% by MnSO_4 infiltration.

- b) there was a little effect of MnSO_4 infiltration on the photosynthesis of the plants supplied with manganese (table 4, and 5).

The methods of both MnSO_4 infiltration and photosynthetic intensity measurements were discussed. Some further experiments with use of ^{14}C are needed.

*Laboratory of Plant Nutrition Physiology
of the Institute for Soil Cultivation
Fertilizing, and Soil Science — Puławy*

LITERATURA

- Bergmann L., 1955, Stoffwechsel und Mineralsalzernährung einzelliger Algen. II. Vergleichende Untersuchungen über den Einfluss mineralischer Faktoren bei heterotropher und mixotropher Ernährung, *Flora* 142: 493—539.
- Brown A. H., 1963, *Amer. J. Bot.* 40: 719 — cyt. za Kentenem R. H., 1956 — w *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse* von K. Paech und M. V. Tracey, Springer Verlag, Berlin, 1: 425.
- Brown T. E., Eyster H. C., Tanner H. A., 1958, *Physiological Effects of Manganese Deficiency*, w: „Trace Elements“ ed. by C. A. Lamb, O. G. Bentley, and J. M. Beattie, New York, Academic Press Inc. p.p.135—155.
- Brzeski W., Kaniuga Z., 1956, *Ćwiczenia z biochemii roślin*, Warszawa, PWN.
- Chibnall A. C., 1952, *Metabolizm białek w roślinie*, Warszawa PWRiL.
- Curtis O. F., Clark D. G., 1958, *Wstęp do fizjologii roślin*, Warszawa PWRiL.
- Eyster H. C., Brown T. E. and Tanner H. A., 1956, Manganese requirement with respect to respiration and the Hill reaction in *Chlorella pyrenoidosa*, *Arch. Biochem. Biophys.* 64: 240—241.
- Gerretsen F. C., 1949, Manganese in relation to photosynthesis. I. Carbon dioxide assimilation and the typical symptoms of manganese deficiency in oats, *Plant and Soil* 1(4): 346—358.
- Gerretsen F. C., 1950, Manganese in relation to photosynthesis. II. Redox potentials of illuminated crude chloroplast suspensions, *Plant and Soil* 2(2): 159—193.
- Gerretsen F. C., 1950, Manganese in relation to photosynthesis. III. Uptake of oxygen by illuminated crude chloroplast suspensions, *Plant and Soil* 2: 323—343.
- Gerretsen F. C., 1951, Studies in photosynthesis. IV. Redoxpotentials and corresponding pH changes in illuminated crude chloroplast suspensions, *Plant and Soil* 3: 1—31.
- Habermann Helen M., 1960, Light-dependent oxygen metabolism of chloroplast preparations, II. Stimulation by manganous ions. *Plant Physiology* 35: 307—312.
- Hiltner E., 1924, Dörrfleckenkrankheit des Hafers und ihre Heilung durch Mangan, zugleich ein Beitrag zur Kohlensäurefrage, *Land, Jahrb.* 60: 689—769.
- Kenten R. H., 1956, Gasometric Analysis in Plant Investigation — w: „Moderne Methoden der Pflanzenanalyse“ von K. Paech und M. V. Tracey, Springer Verlag, Berlin, I: 415—451.
- Kessler E., 1955, On the role of manganese in the oxygen-evolving system of photosynthesis, *Arch. Biochem. Biophys.* 59: 527—529.
- Kessler E., 1957, Über die Rolle des Mangans bei Photoreduktion und Photosynthese, *Planta* 49: 435—454.
- Mothes K., 1933, Die Vacuuminfiltration im Ernährungsversuch (dargestellt an Untersuchungen über die Assimilation des Ammoniaks), *Planta* 19: 117.
- Olsen C., 1950, The significance of concentration for the rate of ion absorption by higher plants in water culture, *Physiol. Plantarum* 3: 152.
- Pirson A., 1937, Ernährungs- und stoffwechselphysiologische Untersuchungen an *Fontinalis* und *Chlorella*, *Z. Bot.* 31: 193—267.
- Pirson A., 1960, Photosynthese und mineralische Faktoren, w: *Handbuch der Pflanzenphysiologie* von W. Ruhland, Springer Verlag, Berlin, V/2: 123—151.

- Pirson A., Tichy C., and Wilhelmi G., 1952, Stoffwechsel und Mineral-salznährung einzelliger Grünalgen. I. Vergleichende Untersuchungen an Mangelkulturen von *Ankistrodesmus*, *Planta* 40: 199—253.
- Richter G., 1961, Die Auswirkungen von Manganmangel auf Wachstum und Photosynthese bei der Blaualge *Anacystis nidulans*, *Planta* 57: 202—214.
- Ruszkowska M., 1960, Badania nad fizjologiczną rolą manganu w roślinach, „*Acta Soc. Botanicorum Pol.*“ 29(4): 553—579.
- Starzecki W., 1961, An improved microrespirometer and extension of its application over plants with big leaves, „*Acta Soc. Botanicorum Pol.*“, 30(2): 327—343.
- Umbreit W. W., Burris R. H., and Stauffer J. F., 1949, Manometric techniques and tissue metabolism, 2nd ed. Minneapolis, Burgess Publishing Co.
- Warburg O., 1919, Über die Geschwindigkeit der photochemischen Kohlen-säurezersetzung in lebenden Zellen, *Biochem. Z.* 100: 230—262.
- Warburg O., 1920, Über die Geschwindigkeit der photochemischen Kohlen-säurezersetzung in lebenden Zellen. II. *Biochem. Z.* 103: 188—211.
- Więckowski S., 1957, Badania nad dziennymi zmianami w stężeniu chlorofilu w liściach roślin stanowisk nizinnych i górskich, „*Acta Soc. Botanicorum Pol.*“ 26(4): 657—673.