Zmiany w zawartości chlorofilu *a* i *b* w liściach różnego wieku niektórych roślin dwuliściennych

*Changes in chlorophyll *a* and *b* content in leaves of different age in some dicotyledon plants*

B. GEJ

W literaturze naukowej znane są liczne prace na temat zmian w różnych właściwościach liści w zależności od wieku i od rozmieszczenia ich na łodydze u wielu gatunków roślin (np. Guszczin 1946; Zabłuda i Prostiewa 1947; Shiroya i in. 1961; Gej 1962; Bielikow i Czietwierikowa 1964; Lizandr i Browcyna 1964). Znane są też różnice w ogólnej zawartości chlorofilu (*a*+*b*) występujące w kolejnych liściach rośliny w ontogenezie (Willstätter i Stoll 1918), Dastur i Buharivalla 1928; Zajcewa 1939, 1940; Giubbieniet i Lermanowa 1945; Jeffrey i Griffith 1947; Giubbieniet 1952; Mołotkowski i Izmajłow 1957; Šestak i Čatský 1962; Šestak 1963; Birecka i Dakić-Włodkowska 1964). Natomiast zmiany w wielkości stosunku chlorofilu *a* do chlorofilu *b* w poszczególnych kolejnych liściach tej samej rośliny prawie nie były dotychczas systematycznie badane i na ten temat są tylko nieliczne wzmianki (Seybold i Egle 1937, 1938 oraz Costes i Coïc 1957). Tymczasem wielkość tego stosunku przypuszczalnie może mieć jakiś związek — bezpośredni lub pośredni — z niejednakową intensywnością fotosyntezy tych liści.

Według Rabinowitcha (1953) jedynie chlorofil *a* zdolny jest bezpośrednio przemieniać energię świetlną w energię chemiczną w procesie fotosyntezy. Jest on ponadto podstawowym receptorem energii świetlnej w zielonych liściach (Duy-sens 1956).

Wiadomo również, że jedynie chlorofil w formie związanej z białkiem (i być może z lipidami) w chloroplastach odznacza się aktywnością fotosyntetyczną (Kupke i French 1960). Stąd też poznanie trwałości tego związku w liściach różnego wieku może mieć istotne znaczenie przy interpretacji niejednakowej aktywności fotosyntetycznej tych liści.

Niniejsza praca miała na celu poznanie zmian w zawartości chlorofilu *a* i chlorofilu *b* w kolejnych liściach roślin różnego wieku u fasoli, gorczycy, gryki i słonecznika. Ponadto próbowano określić ilościowo zawartość frakcji tzw. „niezwiązanego” chlorofilu *a* i *b* w tych liściach.

Praca ta jednocześnie jest częścią obszerniejszych badań nad intensywnością fotosyntezy poszczególnych liści wyżej wymienionych roślin.

MATERIAŁ I METODYKA DOŚWIADCZEŃ

Do doświadczeń użyto rośliny fasoli zwykłej (*Phaseolus vulgaris* L.) odmiany „Saxa”, gorczycy jasnej (*Sinapis alba* L.) z majątku SGGW w Wolicy, gryki zwykłej (*Fagopyrum esculentum* Much.) z IUNG w Puławach i słonecznika zwykłego (*Helianthus annuus* L.) odm. „Borowski IHAR”. Rośliny te rosły w hali vegetacyjnej SGGW w wazonach o pojemności 0,95 litra. Wazony te napełniano piaskiem wiślanym (po 1,70 kg) z dodatkiem 0,40 g NH_4NO_3^* , 0,136 g KH_2PO_4 , 0,123 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ i 0,055 g CaCl_2 — na wazon.

Nasiona wysiano w trzech terminach: 9.V., 20.V. i 1.VI. 1963 roku, pozostawiając po skiełkowaniu 1—2 rośliny w wazonie. W zależności od daty siewu poszczególne serie roślin oznaczono kolejnymi liczbami. W trzeciej dekadzie maja wystąpiło dość znaczne 5 dniowe ochłodzenie atmosfery. W dniu sprzętu (24.VI.) wiek roślin (liczony od dnia wschodów) oraz ich fazy rozwojowe były następujące:

fasola 1—16 dni, faza 2—3 pięter liści,
fasola 2—30 dni, początek wykształcania się kwiatostanów,
fasola 3—43 dni, wykształcanie się strąków;
gorczyca 1—18 dni, faza 4—5 liści,
gorczyca 2—32 dni, początek kwitnienia,
gorczyca 3—43 dni, faza przekwitania i początek wykształcania się strąków;
gryka 1—18 dni, faza 2—3 liści,
gryka 2—31 dni, początek kwitnienia,
gryka 3—43 dni, koniec kwitnienia i początek wykształcania się nasion;
słonecznik 1—18 dni, faza 2—3 pięter liści,
słonecznik 2—31 dni, początek wykształcania kwiatostanów.

W czasie wegetacji rośliny podlewano codziennie wodą wodociągową utrzymując wilgotność podłoża na poziomie 60% kapilarnej pojemności wodnej. Jednocześnie rejestrowano daty rozwijania się kolejnych liści na roślinach, terminy zakwitania itp.

W dniu sprzętu, w jednej grupie roślin oznaczono zawartość wody i suchej masy (w 105°C) w poszczególnych liściach, w drugiej grupie — powierzchnię analogicznych liści (metodą „odbitek” na papierze amoniakalnym wg Rożniatowskiego, 1954); liście te zamrożono w atmosferze suchego lodu (ok. -60°C), a następnie przechowywano w zamrażarce (w temp. -12°C) do chwili wykonania analiz na zawartość chlorofilu.

Wydobywanie chlorofilu przeprowadzono w dwóch równoległych seriach (analizując całe blaszki liściowe bez ogonków), tj. za pomocą ekstrakcji w 85% — i w 60% acetonie.

Ekstrakcja chlorofilu stężonym acetonem przebiega bardzo szybko, natomiast za pomocą rozwodnionego acetonu (60%) następuje znacznie wolniej i tylko część zielonych barwników przechodzi do roztworu, dając frakcję tzw. „niezwiązanego” chlorofilu (Osipowa 1947). Dlatego też, zgodnie z metodyką zaproponowaną przez Godniewa i opracowaną przez Osipową, dla uzyskania tej frakcji poszczególne liście rozcierano (z dodatkiem CaCO_3) zawsze możliwie do jednakowego

* Rośliny fasoli otrzymały 0,20 g NH_4NO_3 — na wazon.

stopnia rozdrobnienia, zalewano 60% acetonem i pozostawiano je w ciemności na 30 min. Następnie ekstrakt ten, podobnie jak i ekstrakt w 85% acetonie, odsączano na sączku szklanym Schotta G3 (w zacienionej osłonie, przy temp. ok. 5°C) i rozcieńczano do objętości odpowiedniej dla pomiarów na spektrofotometrze SF-4. Odczytu ekstynkcji dokonywano przy długościach fal: 663 i 645 mμ. Całą procedurę ilościowej analizy chlorofilu *a* i *b* oraz obliczanie ich zawartości oparto na metodyce opisanej przez Bruinsma (1963).

Ze względu na różnice anatomo-morfologiczne kolejnych (licząc od podstawy rośliny) liści — wyniki analiz przeliczano zarówno na jednostkę ciężaru ich świeżej, jak i suchej masy oraz na 1 cm² powierzchni blaszki liściowej (Egle 1960; Kachnowicz i Chodorenko 1964). Wyniki te, przedstawione w tabelach i na rysunkach, są średnimi z 2–3 liści tego samego piętra rośliny.

Błąd oznaczeń całkowitej zawartości zielonych barwników w równorzędnych próbkach nie przekraczał 4–5%, natomiast różnice w zawartości „niezwiązanego” chlorofilu w analogicznych próbkach wynosiły 9–11%.

WYNIKI DOŚWIADCZEŃ

W tabelach 1, 3, 5 i 7 oraz na rys. 1 i 2 przedstawione są wyniki analiz całkowitej zawartości chlorofilu *a* i *b* w kolejnych liściach badanych roślin różnego wieku, natomiast w tabelach 2, 4, 6 i 8 — zawartość tzw. „niezwiązanego” chlorofilu w tych liściach. Ponadto u fasoli — 3, w kacie liścia młodocianego, znajdował się w chwili sprzętu jeden pęd boczny (liść trójdzielny), którego świeża masa wynosiła 320 mg, a powierzchnia blaszek liściowych — 20,2 cm². Zawierał on 368 μg chlorofilu *a* i 171 μg chlorofilu *b*. Rośliny zaś gryki 2 i 3 miały wykształcone następujące ulistnione pędy boczne zawierające chlorofil (średnio z 1 rośliny):

Roślina	Nr pędu bocznego	Świeża masa liści (w mg)	Pow. liści (cm ²)	Zawartość chlorofilu (w μg)	
				<i>a</i>	<i>b</i>
Gryka-2	1	57	5	95	42
	2	158	13	239	117
	3	64	5	86	42
Gryka-3	1	512	35	822	405
	2	716	46	984	472
	3	407	28	532	244

Żaden z badanych gatunków roślin nie wyróżniał się specjalnie pod względem zawartości zielonych barwników w odniesieniu do takiej samej masy czy powierzchni liści.

W większości przypadków najwyższą względną zawartość chlorofilu (*a*+*b*) stwierdzono w środkowych i podwierzchołkowych piętrach liści, przy czym z reguły w badanych fazach rozwojowych wyrosnięte już liście określonego piętra miały

Tabela 1 — Table 1

Zawartość chlorofilu *a* i *b* oraz wody w liściach fasoli (na 1 roślinę)
Chlorophyll *a* and *b* and water content in bean plant leaves (per plant)

Liść — leaf					Chlorofil — chlorophyll				
Nr No (from the base of plant)	Wiek w dniach Age days	Świeża masa w mg	Pow. w cm ²	Zawartość wody w %	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i> + <i>b</i>		$\frac{a}{b}$
		mg of fresh weight	Lamina surface area cm ²	Water content %	w µg/liść µg per leaf	w % św. m. % of fr. w.	w mg/dcm ² liścia mg per dcm ² of leaf		
Fasola — Bean plant 1 (16 dni — days)									
II	6	603	30,2	83,5	768	342	0,18	3,68	2,25
I*	13	2510	110,4	86,1	3235	1310	0,18	4,12	2,47
Fasola — Bean plant 2 (30 dni — days)									
III	10	1290	61,5	83,6	1889	861	0,21	4,47	2,19
II	17	2185	98,4	84,0	3583	1710	0,24	5,38	2,09
I*	26	2530	109,2	85,1	2810	1397	0,17	3,85	2,01
Fasola — Bean plant 3 (43 dni — days)									
V	6	545	29,3	82,2	578	255	0,15	2,84	2,27
IV	17	1730	89,7	82,9	2145	917	0,17	3,41	2,34
III	25	2410	102,9	83,4	2228	963	0,13	3,10	2,31
II	31	2570	109,6	83,9	2224	965	0,12	2,91	2,30
I*	38	2630	104,8	85,0	1427	620	0,08	1,95	2,30

*) Dwa liście młodociane — Two primary leaves.

Tabela 2 — Table 2

Zawartość „niezwiązanego” chlorofilu *a* i *b* w liściach fasoli
The content of “not bound” chlorophyll *a* and *b* in bean plant leaves

Nr liścia No of leaf (from the base of plant)	Chlorofil — chlorophyll (<i>a</i> + <i>b</i>)				Chlorofil Chlorophyll $\frac{a}{b}$
	w µg/liść µg per leaf	w % św. m. % of fr. weight	w mg/dcm ² mg per dcm ²	w % w stos. do całkow. zaw. % of total content	
Fasola — Bean plant 1					
II	298	0,05	0,98	26,9	1,27
I*	1122	0,04	1,02	24,7	1,33
Fasola — Bean plant 2					
III	756	0,06	1,23	27,5	1,42
II	974	0,05	0,99	18,4	1,34
I*	972	0,04	0,89	23,1	1,36

Fasola — Bean plant 3					
V	173	0,03	0,59	20,8	1,38
IV	398	0,02	0,44	13,0	1,32
III	472	0,02	0,46	14,8	1,34
II	516	0,02	0,47	16,2	1,29
I*	393	0,01	0,37	19,2	1,26

*) Dwa liście młodociane — Two primary leaves.

Tabela 3 — Table 3

Zawartość chlorofilu *a* i *b* oraz wody w liściach gorczycy (na 1 roślinę)
 Chlorophyll *a* and *b* and water content in white mustard leaves (per plant)

Liść — leaf					Chlorofil — chlorophyll				
Nr No (from the base of plant)	Wiek w dniach Age days	Świeża masa w mg mg of fresh weight	Pow. w cm ² Lamina surface area cm ²	Zawartość wody w % Water content %	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i> + <i>b</i>		$\frac{a}{b}$
					w µg /liść µg per leaf	w % św. m. % of fr. w.	w mg/dcm ² liścia mg per dcm ² of leaf		
Gorczyca — White mustard 1 (18 dni — days)									
V	4	51	2,6	85,2	60	25	0,17	3,27	2,40
IV	7	262	13,0	87,3	340	141	0,18	3,70	2,41
III	9	427	18,3	88,9	540	228	0,18	4,20	2,37
II	11	422	17,9	89,6	485	204	0,16	3,85	2,38
I	13	521	22,1	90,1	565	241	0,15	3,65	2,34
α*	17	363	8,9	93,0	197	96	0,08	3,29	2,05
Gorczyca — White mustard 2 (32 dni — days)									
VII	8	34	1,9	83,7	54	23	0,23	4,05	2,35
VI	13	111	6,1	84,9	178	75	0,23	4,15	2,37
V	15	258	13,8	86,2	438	187	0,24	4,53	2,34
IV	18	315	16,9	87,0	493	224	0,23	4,24	2,20
III	20	401	18,0	89,4	427	197	0,16	3,47	2,17
II	23	414	18,2	91,3	227	107	0,08	1,85	2,12
I	25	512	19,8	91,8	185	88	0,05	1,38	2,10
Gorczyca — White mustard 3 (43 dni — days)									
IX	17	42	2,0	86,3	41	18	0,14	2,95	2,28
VIII	19	88	4,3	86,5	89	39	0,15	2,98	2,28
VII	21	185	8,7	87,0	176	78	0,14	2,92	2,26
VI	24	380	17,1	87,4	328	145	0,13	2,77	2,26
V	27	510	23,3	87,5	437	196	0,12	2,72	2,23
IV	30	894	37,8	87,8	670	306	0,11	2,58	2,19
III	34	577	25,8	88,2	345	171	0,09	2,00	2,02

*) Dwa liścienie — Two cotyledons.

Tabela 4 — Table 4

Zawartość „niezwiązanego” chlorofilu *a* i *b* w liściach gorczycyThe content of “not bound” chlorophyll *a* and *b* in white mustard leaves

Nr liścia No of leaf (from the base of plant)	Chlorofil — Chlorophyll (a+b)				Chlorofil Chlorophyll $\frac{a}{b}$
	w $\mu\text{g}/\text{liść}$ $\mu\text{g per leaf}$	w % św. m. % of fr. weight	w mg/dcm^2 mg per dcm^2	w % w stos. do całk. zaw. % of total content	
Gorczyca — White mustard 1					
IV	159	0,06	1,22	33,0	1,50
III	262	0,06	1,43	34,1	1,40
II	196	0,05	1,09	28,5	1,36
I	211	0,04	0,95	26,2	1,35
α^*	98	0,03	1,10	33,4	1,30
Gorczyca — White mustard 2					
V	170	0,07	1,23	27,2	1,52
IV	132	0,04	0,78	18,4	1,43
III	130	0,03	0,72	20,8	1,35
II	77	0,02	0,42	23,1	1,24
I	83	0,02	0,42	30,3	1,20
Gorczyca — White mustard 3					
VII	97	0,05	1,11	38,1	1,61
VI	177	0,05	1,03	37,5	1,52
V	272	0,05	1,17	43,0	1,48
IV	451	0,05	1,19	46,2	1,43
III	245	0,04	0,95	47,6	1,25

*) Dwa liścienie — Two cotyledons.

Tabela 5 — Table 5

Zawartość chlorofilu *a* i *b* oraz wody w liściach gryki (na 1 roślinie)Chlorophyll *a* and *b* and water content in buckwheat leaves (per plant)

Liść — leaf					Chlorofil — chlorophyll				
Nr No (from the base of plant)	Wiek w dniach Age days	Świeża masa w mg mg of fresh weight	Pow. w cm ² Lamina surface area cm ²	Zawartość wody w % Water content %	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i> + <i>b</i>		$\frac{a}{b}$
					w μg/liść μg per leaf	w % św. masy % of fr. w.	w mg/dcm ² liścia mg per dcm ² of leaf		
Gryka — Buckwheat 1 (18 dni — days)									
III	3	47	3,1	84,3	43	20	0,13	2,03	2,15
II	6	241	13,6	85,8	277	118	0,16	2,90	2,35
I	10	386	18,9	87,3	416	174	0,15	3,12	2,39
α*	16	320	12,8	88,8	298	141	0,14	3,43	2,11

Gryka — Buckwheat 2 (31 dni — days)									
VI	4	20	1,4	83,8	15	7	0,11	1,57	2,14
V	9	71	4,7	84,3	67	28	0,13	2,02	2,39
IV	14	233	14,1	85,8	353	153	0,22	3,59	2,31
III	17	480	26,3	86,7	710	311	0,21	3,88	2,28
II	22	491	26,9	87,3	610	277	0,18	3,30	2,20
I	26	400	22,6	88,0	433	200	0,16	2,80	2,17
α^*	30	247**	8,8	73,1	38	19	0,02	0,65	2,00
Gryka — Buckwheat 3 (43 dni — days)									
VIII	8	44	3,5	81,7	59	26	0,19	2,43	2,27
VII	10	81	5,6	81,5	110	48	0,20	2,82	2,29
VI	16	157	9,8	82,8	228	98	0,21	3,33	2,33
V	20	289	15,1	84,7	379	160	0,19	3,57	2,37
IV	23	448	23,6	85,6	557	240	0,18	3,38	2,32
III	27	564	26,5	87,2	610	272	0,16	3,33	2,24
II	33	530	25,3	87,0	522	257	0,15	3,08	2,03
I	37	484	22,0	87,5	230	112	0,07	1,55	2,05

*) Dwa liścienie — Two cotyledons

**) Liścienie żółknące — Cotyledons become yellow.

Tabela 6 — Table 6

Zawartość „niezwiązanego” chlorofilu *a* i *b* w liściach grykiThe content of “not bound” chlorophyll *a* and *b* in buckwheat leaves

Nr liścia No. of leaf (from the base of plant)	Chlorofil — chlorophyll (<i>a</i> + <i>b</i>)				Chlorofil Chlorophyll $\frac{a}{b}$
	w $\mu\text{g}/\text{liść}$ $\mu\text{g per leaf}$	w % św. m. % of fr. weight	w mg/dcm^2 mg per dcm^2	w % w stos. do całk. zaw. % of total content	
Gryka — Buckwheat 1					
II	105	0,04	0,77	26,6	1,06
I	187	0,05	0,99	31,8	1,24
α^*	184	0,06	1,43	42,0	1,21
Gryka — Buckwheat 2					
IV	139	0,06	0,98	27,6	1,19
III	183	0,04	0,70	17,9	1,28
II	167	0,03	0,62	18,8	1,09
I	165	0,04	0,73	26,1	1,13
Gryka — Buckwheat 3					
VI	59	0,04	0,61	16,8	0,96
V	85	0,03	0,56	15,7	0,98
IV	167	0,03	0,71	21,0	1,02
III	183	0,03	0,69	20,8	1,24
II	137	0,03	0,54	17,6	1,07
I	117	0,02	0,53	34,2	1,07

*) Dwa liścienie — Two cotyledons.

Tabela 7 — Table 7

Zawartość chlorofilu *a* i *b* oraz wody w liściach słonecznika (na 1 roślinę)
Chlorophyll *a* and *b* and water content in sunflower leaves (per plant)

Liście — leaves*					Chlorofil — chlorophyll				
Nr No (from the base of plant)	Wiek w dniach Age days	Świeża masa w mg	Pow. w cm ²	Zawartość wody w %	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i> + <i>b</i>		$\frac{a}{b}$
		mg of fresh weight	Lamina surface area cm ²	Water content %	w µg/liść. µg per leaf		w % św. masy % of fr. w.	w mg/dcm ² liścia mg per dcm ² of leaf	
Słonecznik — Sunflower 1 (18 dni — days)									
II	9	662	33,5	86,0	998	472	0,22	4,39	2,11
I	14	1266	52,3	88,5	1568	718	0,18	4,36	2,18
α	17	712	12,3	93,1	313	151	0,07	3,77	2,07
Słonecznik — Sunflower 2 (31 dni — days)									
IV	7	201	9,6	81,5	162	71	0,12	2,59	2,28
III	17	847	44,3	82,3	1220	520	0,21	3,93	2,35
II	24	1750	82,6	84,1	2217	971	0,18	3,86	2,28
I	27	1100	40,6	87,6	792	374	0,11	2,87	2,12

*) Dwa liście (lub liścienie — α) na każdym pięttrze rośliny — Two leaves (or cotyledons — α) of different position on the stem.

Tabela 8 — Table 8

Zawartość „niezwiązanego” chlorofilu *a* i *b* w liściach słonecznika
The content of “not bound” chlorophyll *a* and *b* in sunflower leaves

Nr liścia (od podstawy rośliny) No. of leaf (from the base of plant)	Chlorofil — chlorophyll (a + b)				Chlorofil chlorophyll $\frac{a}{b}$
	w µg/liść µg per leaf	w % św. masy % of fr. weight	w mg/dcm ² mg per dcm ²	w % w stos. do całk. zaw. % of total content	
Słonecznik — Sunflower 1					
II	520	0,08	1,55	35,4	1,34
I	690	0,05	1,32	30,2	1,29
α*	95	0,01	0,77	20,5	1,32
Słonecznik — Sunflower 2					
IV	75	0,04	0,78	32,1	1,16
III	306	0,04	0,69	17,6	1,22
II	637	0,04	0,77	20,0	1,19
I	266	0,02	0,65	22,8	1,17

*) Dwa liścienie — Two cotyledons.

większe stężenie zielonych barwników w roślinie młodszej niż w starszej. Prawdopodobnie ta w zasadzie występowała niezależnie od sposobu przeliczania — na jednostkę świeżej czy suchej masy, czy też na dm^2 powierzchni liści.

Układ względnych zawartości chlorofilu ($a+b$) w kolejnych liściach rośliny miał więc kształt krzywej jednowierzchołkowej. Podobny charakter można stwier-

Rys. 1. Zawartość chlorofilu ($a+b$) w kolejnych liściach gorczycy i gryki u roślin różnego wieku. Odcięte: n-ry liści od podstawy rośliny; rzędne: zawartość chlorofilu w % suchej masy

Fig. 1. Amount of chlorophylls ($a+b$) in successive leaves of white mustard and buckwheat plants of different age. Abscissa: sequence of leaves from the base of plant; ordinate: amount of chlorophylls in % of dry weight

A — gorczyca (white mustard); B — gryka (buckwheat)

dzić w odniesieniu i do zawartości chlorofilów w całej roślinie w jej ontogenezie. Wynika to głównie ze znanych zmian szybkości syntezy i rozkładu tych barwników w czasie wzrostu poszczególnego liścia, jak i całej rośliny.

Względna zawartość „niezwiązanego” (wydobytego 60% acetonem) chlorofilu ($a+b$) w badanych liściach była w większości przypadków tym większa, im liść był młodszy i położony na wyższym piętrze rośliny. Zależność ta jednak nie zaznaczała się wyraźnie w liściach gryki (tab. 6) i gorczycy — 3 (tab. 4), chociaż i w tych roślinach względna zawartość „niezwiązanych” zielonych barwników w analogicznych liściach była tym większa, im roślina była młodsza.

Ilość chlorofilu ($a+b$) wydobytego 60% acetonem wahała się w granicach 13,0–47,6% całkowitej zawartości chlorofilu (wydobytego 85% acetonem). Wa-

hania te zależały od piętra liści i od gatunku rośliny. Najwyższy procentowy stosunek zawartości „niezwiązanego” chlorofilu ($a+b$) do chlorofilu ogółem stwierdzono w liściach gorczycy — 3 (tab. 4). Nie stwierdzono natomiast wyraźnej zależności między wielkością tego stosunku a wiekiem liści, czy też wiekiem roślin w badanym okresie wegetacji.

Wszystkie analizowane liście odznaczały się wyższym stężeniem chlorofilu a niż chlorofilu b . We frakcji zielonych barwników wydobywanych 85% acetonem (tabele 1, 3, 5 i 7) wartość stosunku chlorofilu a do b wahała się od 2,00 do 2,47 —

Rys. 2. Zawartość chlorofilu ($a+b$) w kolejnych liściach fasoli i słonecznika u roślin różnego wieku. Odcięte: n -ry liści od podstawy rośliny; rzędne: zawartość chlorofilu w % suchej masy

Fig. 2. Amount of chlorophylls ($a+b$) in successive leaves of bean and sunflower plants of different age. Abscissa: sequence of leaves from the base of plant; ordinate: amount of chlorophylls in % of dry weight

A—fasola (bean plant); B—słonecznik (sunflower)

w zależności od piętra liści i od wieku rośliny. Stosunek ten w większości przypadków był tym większy, im liście były wyżej położone na łodydze względnie im były młodsze (tj. liście tego samego piętra lecz u roślin różnego wieku — z wyjątkiem liści wierzchołkowych).

Względnie niski stosunek chlorofilu $a:b$ miały liście fasoli — 2 (tabl. 1), u której w tym czasie występowało intensywne brodawkowanie (*Rhizobium*) korzeni. Ponadto u fasoli — 3, a także u gorczycy — 3 (z wyjątkiem dwóch liści dolnych) nie stwierdzono istotnych różnic w wielkości tego stosunku w poszczególnych liściach.

Należy podkreślić, że wartości stosunku chlorofilu *a* do *b* we frakcji barwników ekstrahowanych 60% acetonem (tab. 2, 4, 6 i 8) były znacznie niższe w porównaniu z wartościami tego stosunku omówionymi wyżej i wynosiły od 0,96 do 1,61. Najniższe wartości stwierdzono w liściach gryki, a najwyższe w liściach gorczycy. Ponadto, jedynie w liściach gorczycy (tab. 4) zaznaczyła się wyraźna tendencja do tym większego udziału „niezwiązanego” chlorofilu *a* w ogólnej zawartości „niezwiązanych” zielonych barwników, im wyższe było piętro liści. W pozostałych badanych gatunkach roślin tendencja tego rodzaju była bardzo słaba, względnie różnice w wielkości stosunku „niezwiązanego” chlorofilu *a* do *b* między poszczególnymi liśćmi były w granicach błędu.

Oprócz zmian w zawartości zielonych barwników stwierdzono również niejednakową zawartość wody (wyrażoną w %% w stosunku do świeżej masy liści) w kolejnych liściach badanych roślin (tab. 1, 3, 5 i 7). Zawartość ta była tym większa, im liść był niżej położony na łodydze. W analogicznych piętrach liści względna zawartość wody utrzymywała się na ogół albo bez wyraźnych zmian w miarę starzenia się roślin (w badanych fazach ich wzrostu), albo nawet zwiększała się nieco (np. liście V piętra u gorczycy, lub liście III piętra u gryki). Należy podkreślić więc, że w badanych roślinach zmiany w zawartości wody występowały w kolejnych piętrach liści w odwrotnym kierunku do zmian w zawartości chlorofilu (*a+b*). Przytoczone również w niniejszej pracy dane odnośnie świeżej masy i powierzchni poszczególnych liści wykazują, że wielkości te zmieniały się w zależności od wieku i szybkości wzrostu tych liści oraz od gatunku rośliny. Różny więc był stan fizjologiczny poszczególnych liści.

DYSKUSJA

Stopniowy wzrost koncentracji chlorofilu (*a+b*) wraz ze wzrostem roślin w kolejnych liściach od pięter dolnych ku górnym (z wyjątkiem liści wierzchołkowych) może być związany ze zmianami, jakie występują wraz z wiekiem zarówno organu, jak i całej rośliny, przy czym rozwój tych roślin przebiegał w nieco innych warunkach klimatycznych ze względu na trzy różne terminy wysiewu. W fazie intensywnego wzrostu następuje intensywna (choć nieproporcjonalnie) synteza i zwiększanie się zawartości chlorofilów. Po osiągnięciu maksimum tej zawartości zaczyna przeważać rozkład nad syntezą i stężenie zielonych barwników stopniowo spada. Otrzymane wyniki dotyczące zmian zawartości chlorofilu (*a+b*) znajdują potwierdzenie w pracach badaczy, cytowanych na wstępie. Prace te jednak wykonane były z innymi roślinami, głównie ze zbożowymi lub drzewiastymi. Mołotkowski i Izmałow (1957) wiążą różnice w zawartości chlorofilu (*a+b*) w poszczególnych piętrach liści gałęzi „zwisających” nie z wiekiem tych liści, lecz z powszechnie występującym zjawiskiem polarność (biegunowości).

Dość trudna jest interpretacja stwierdzonego w niniejszych badaniach wzrostu stosunku chlorofilu *a* do chlorofilu *b* w kolejnych liściach, licząc od podstawy ku wierzchołkowi rośliny. Wyższy ten stosunek w liściach młodszych niż starszych może być wynikiem zarówno szybszej syntezy chlorofilu *a* niż *b*, szybszego rozpadu

chlorofilu *b* niż *a*, jak i zmieniających się warunków otoczenia w czasie wzrostu tych liści.

Wydaje się, że pierwsza możliwość jest najbardziej prawdopodobna w górnych piętrach liści, natomiast w liściach dolnych przeważa szybszy rozkład chlorofilu *a* w porównaniu z rozkładem chlorofilu *b*. Można się o tym przekonać na podstawie obliczeń zmian zawartości poszczególnych barwników w liściach górnych i dolnych. Zmiany te mogą być jednocześnie związane z niejednakowym stanem fizjologicznym tych liści, wynikającym — między innymi — z różnego uwodnienia komórek liści i ich wieku; wielkość bowiem komórek i stosunek objętości cytoplazmy do objętości wakuoli w komórkach liści różnego wieku na roślinie są różne (Gej 1962).

Z badań nad syntezą zielonych barwników w bardzo młodych, zaledwie wykształcających się liściach bądź też w liściach starszych uprzednio etiolowanych wynika, że w tych przypadkach intensywniejsza jest synteza chlorofilu *a* niż chlorofilu *b* (Goodwin i Owens 1947; Blaauw-Jensen i in. 1950; Więckowski 1959, 1960; Sisler i Klein 1963; Augustinussen 1964). Nie należy wykluczać jednak i wpływu warunków otoczenia. W czasie wzrostu roślin bowiem górne piętra liści mogły mieć z pewnością lepsze nasłonecznienie, zmienione stosunki wodne itp. Według Seybolda i Egle'a (1937) liście z miejsc słonecznych i z miejsc ocienionych mają różny stosunek chlorofilu *a* do *b*; chlorofil *b* został nazwany „barwnikiem typowo cienistym”.

Występujące wraz z wiekiem poszczególnych liści i przede wszystkim z wiekiem całej rośliny zmniejszanie się stosunku chlorofilu *a* do *b* zależy prawdopodobnie od trwałości tych barwników w okresie wegetacji. Zdaniem Wolfa (1956) oraz Costes'a i Coïc (1957) w wyniku starzenia się liści spada głównie zawartość chlorofilu *a*, podczas gdy stężenie chlorofilu *b* utrzymuje się prawie na niezmiennym poziomie. Chlorofil *a* jest przeto mniej trwałym komponentem niż chlorofil *b*.

Odmienny nieco obraz układu stosunków chlorofilu *a:b* stwierdzony np. w liściach II-go piętra roślin fasoli różnego wieku (tabl. 1) mógł być spowodowany przypuszczalnie zaburzeniami fizjologicznymi związanymi z zakażaniem się korzeni bakteriami *Rhizobium*.

W niniejszej pracy próbowano także oznaczyć w liściach różnego wieku zmiany w zawartości tzw. „niezwiązanego” chlorofilu. Na podstawie wyników przedstawionych w tabelach 2, 4, 6 i 8 nie można jednak stwierdzić bez wątpliwości, czy stopień trwałości wiązania chlorofilu (*a+b*) z kompleksem lipidowo-białkowym w chloroplastach zmniejsza się wraz z wiekiem roślin, o czym świadczą dane Osipowej (1947) lub Witkowskiej i Baranowa (1963). Być może, iż zastosowana metodyka ekstrakcji chlorofilu (*a+b*) za pomocą 60% acetonu, obarczona dość dużym błędem, nie pozwala na uzyskanie takiego stwierdzenia. Ostatnie doniesienia o zmniejszaniu się trwałości wiązania chlorofilu (*a+b*) z kompleksem białkowo-lipidowym w miarę starzenia się liści oparte są na wynikach ekstrakcji „niezwiązanego” chlorofilu za pomocą rozpuszczalników niepolarnych, np. benzenu, eteru naftowego (Osipowa 1957; Masłowa 1958; Sapożnikow (red.) 1964). Obecnie można uważać za udowodnione stwierdzenie, że jedynie chlorofil związany z białkiem i lipidami w chloroplastach odznacza się trwałą aktywnością foto-

syntetyczną. Niestety kompleks taki, występujący *in vivo* w postaci tzw. „chlorofilu naturalnego”, nie został dotychczas wyodrębniony w czystej formie. Wg nowych badań Thirkella (1964) wiązanie białka z barwnikiem jest raczej fizyczne niż chemiczne.

Należy zwrócić uwagę również na fakt niskiego stosunku chlorofilu *a*:*b* we frakcji barwników wydobywanych 60% acetonem. Najwyższa stwierdzona wartość tego stosunku wynosiła 1,61. Fakt ten przypuszczalnie jest wynikiem słabszej w tych warunkach ekstrakcji chlorofilu *a*, przy równocześnie względnie łatwiejszym przechodzeniu do roztworu acetonu chlorofilu *b*. Może to przemawiać na korzyść silniejszego związania chlorofilu *a* — niż chlorofilu *b* — w granach chloroplastów, zakładając że struktura molekularna barwników nie ulega zmianom w czasie 30 minutowej ekstrakcji. Jeśli jednak takie zmiany występują, to otrzymane wyniki świadczyłyby wówczas o szybszym rozkładzie molekuł chlorofilu *a* i powstawaniu jego pochodnych, których maksimum absorpcji charakteryzowało się inną długością fali niż długości, przy których mierzono wartość ekstrakcji w niniejszych oznaczeniach. Zagadnienie to jednak dotychczas nie jest wyjaśnione.

Liście poszczególnych pięter badanych roślin były zróżnicowane nie tylko pod względem stężenia zielonych barwników, ale i pod względem procentowej zawartości wody. Należy podkreślić, że do obecnej chwili — poza badaniami Dastura i Buharivalla (1928) oraz Giubbienietta (1952) — prawie nie ma prac, w których by jednocześnie analizowano zawartość chlorofilu i wody w liściach.

Streszczenie

W kolejnych liściach roślin różnego wieku fasoli, gorczycy, gryki i słonecznika, które rosły w warunkach hali wegetacyjnej, przebadano jednocześnie zmiany w zawartości chlorofilu *a* i chlorofilu *b* oraz w zawartości wody.

Oznaczano zarówno ogólną zawartość poszczególnych zielonych barwników (wydobywanych 85% acetonem), jak i zawartość tzw. „niezwiązanego” chlorofilu *a* i *b* (ekstrahowanych 60% acetonem w ciągu 30 minut). Analizy ilościowe wykonano za pomocą spektrofotometru SF-4 (przy dł. fal: 663 m μ i 645 m μ).

W wyniku przeprowadzonych analiz stwierdzono, że najwyższą zawartością chlorofilu (*a*+*b*) odznaczały się liście ze środkowych i podwierzchołkowych pięter roślin, w przeliczeniu zarówno na jednostkę świeżej czy suchej masy, jak i na dcm² pow. liścia. Zmiany w zawartości zielonych barwników były związane prawdopodobnie ze zmianami wynikającymi z niejednakowego wieku poszczególnych liści.

Stosunki zawartości chlorofilu *a* do chlorofilu *b* we frakcji wydobywanej 85% acetonem wynosiły od 2,00 do 2,47. Stosunki te u roślin różnego wieku — były wyższe w liściach młodszych; w poszczególnych zaś roślinach były na ogół większe w każdym następnym piętrze liści — w porównaniu z poprzednim (tabele 1, 3, 5 i 7). We frakcji „niezwiązanego” chlorofilu wartości tych stosunków były niższe (0,96—1,61) i wahania między poszczególnymi wartościami zależały w większym stopniu od gatunku rośliny niż od wieku własnego badanych liści (tabele 2, 4, 6 i 8).

Przedyskutowano niektóre możliwe przyczyny zmian różnej ogólnej zawartości chlorofilu *a* i chlorofilu *b* w kolejnych piętrach liści na roślinie oraz przyczyny niskiego stosunku chlorofilu *a*:*b* we frakcji „niezwiązanych” barwników.

Składam serdeczne podziękowanie pani prof. dr H. Bireckiej za konstruktywny krytycyzm przy czytaniu rękopisu niniejszej pracy.

*Katedra Fizjologii Roślin SGGW
w Warszawie*

(Wpłynęło: dn. 8.7.1965 r.)

SUMMARY

The changes in chlorophyll *a* and *b* and water content at the same time in the successive leaves in various plants of different age: bean plants, white mustard, buckwheat and sunflower, grown in pots, were studied. The contents of total particular green pigments (extracted with 85 % acetone) as well as of what is called “not bound” chlorophyll *a* and *b* (extracted with 60% acetone for 30 minutes) were determined. Quantitative analyses were made with an SF-4 spectrophotometer at $\lambda = 663$ and $645 \text{ m}\mu$.

The analyses proved that the leaves of the middle and sub-top positions on the stem had the highest content of chlorophyll (*a*+*b*) — in reference to one unit of fresh or dry weight and to leaf surface area. The changes in green pigments content were connected probably with changes resulting from the different age of the particular leaves.

In the fraction of pigments extracted with 85% acetone, the ratios chlorophyll *a*: chlorophyll *b* varied from 2.00 to 2.47. In plants of different age these ratios were higher in younger leaves and in the individual plants they increased at each successive position on the stem (Tables 1, 3, 5 and 7). In a fraction of “not bound” chlorophyll the values of those ratios were smaller (i.e. 0.96—1.61) and variation among these particular values depended in a greater degree on the plant species than on the age of investigated leaves (Tables 2, 4, 6 and 8).

Some possible reasons for the changes in chlorophyll *a* and chlorophyll *b* content in leaves at various positions on the plant as well as reasons for the low ratio of chlorophyll *a* to *b* in the fraction of “not bound” pigments are discussed.

LITERATURA

- Augustinussen E., 1964, On the formation of chlorophyll *a* and chlorophyll *b* in etiolated leaves, *Physiol. Plantar.* 17: 403—406.
- Bielikow I. F., Czieterikowa N. I., 1964, O wkluczeniu radioaktywnego węgla (C^{14}) w rozliczne grupy wieszczeń w listkach różnych jarosów w ontogeniezie soi, *Izw. Sib. Otd. AN SSSR, sier. biol.-mied. n.* 1: 33—40.
- Birecka H., Dakić-Włodkowska L., 1964, Photosynthesis, translocation and accumulation of assimilates in cereals during grain development IV, *Acta Soc. Bot. Pol.* 33 (2): 407—426.
- Blaauw-Jansen G., Komen J. G., Thomas J. B., 1950, On the relation between the formation of assimilatory pigments and the rate of photosynthesis in etiolated oat seedlings, *Bioch. et Biophys. Acta* 5: 179—185.
- Bruinsma J., 1963, The quantitative analysis of chlorophylls *a* and *b* in plant extracts, *Photochem. and Photobiol. (Chlor. Metabol. Symp.)* 2: 241—249.
- Costes C., Coïc Y., 1957, Variations des pigments foliaires en fonction de la carence en azote et du vieillissement chez le Tabac, *C. R. Acad. Sci. Paris* 244 (10): 1398—1401.
- Dastur R. H., Buharivalla N. A., 1928, Water and chlorophyll content in some tropical plants, *Ann. of Bot.* 42: 949—964.

- Duysens L. N. M., 1956, Energy transformation in photosynthesis, *Ann. Rev. of Plant Physiol.* 7: 25—50.
- Egle K., 1960, Menge und Verhältnis der Pigmente, *Handbuch der Pflanzenphysiologie* (W. Ruhland) V (1): 444—496, Berlin Spring. Verlag.
- Gej B., 1962, Dynamika zawartości wody i intensywność oddychania liści u pszenicy jarej, *Acta Soc. Bot. Pol.* 31 (4): 603—619.
- Giubbieniet J. R., Lerman R. I., 1945, Nakoplenije chlorofilla w ontogieniez "Perilla ocy-moides", *Sow. Bot.* 13 (5): 22—25.
- Giubbieniet J. R., 1952, Chlorofil *a* roślina, (tłum. z ros.), Warszawa, PWRiL.
- Goodvin R. H., Owens Olga H., 1947, The formation of chlorophyll *a* in etiolated oat seedlings, *Plant Physiol.* 22 (2): 197—200.
- Guszczin I. W., 1946, Wodnyj reżim listjew razlicznych jarusow jarowej pszenicy, *Dokł. AN SSSR* 51 (4): 317—319.
- Jeffrey R. N., Griffith R. B., 1947, Changes in the chlorophyll and carotene contents of curing burley tobacco cut at different stages of maturity, *Plant Physiol.* 22: 34—41.
- Kachnowicz L. W., Chodorenko Ł. A., 1964, O metodikie wzjatija prob i piereszczeta so-dierżanija chlorofilla, *Fiziol. Rast.* 11 (5): 933—936.
- Kupke D. W., French C. S., 1960, Relationship of chlorophyll to protein and lipoids, *Handbuch der Pflanzenphysiologie* (W. Ruhland) V (1): 298—322, Berlin Springer Verlag.
- Lizandr A. A., Browcyna W. Ł., 1964, Fiziologiczeskaja rol stieblewych listjew risa w formi-rowanii i sozrewanii ziarnowok, *Fiziol. Rast.* 11 (3): 391—397.
- Masłowa T. G., 1958, K woprosu o sostojanii chlorofilla w plastidach zielonych rastienij, *Bot. Żurn.* 43 (1): 103—106.
- Mołotkowski T. Ch., Izmałow A. F., 1957, Soderżanije chlorofilla, askorbinowej kisłoty i aktiwnost' katalazy w listjach niekotorych plakuczich form drowiesnych rastienij w swjazi s jawleniem polarnosti, *Dokł. AN SSSR* 113 (5): 1165—1167.
- Osipowa O., 1947, Ob izwlekajemosti chlorofilla iz zielonych rastienij, *Dokł. AN SSSR* 57 (8): 799—801.
- Osipowa O. P., 1957, K woprosu o sostojanij chlorofilla w chloroplastach, *Fiziol. Rast.* 4 (1): 28—32.
- Rabinowitch E., 1953, Fotosintiez t. II (tłum. z ang.), Moskwa Izd. I. L.
- Rożniatowski I. I., 1954, Opriedielenije płoszczadi lista s primienieniem swietoczustwitelnoj bumagi, *Bot. Żurn.* 39 (3): 419—420.
- Sapożnikow D. I., (red.), 1964, Pigmenty plastid zielonych rastienij i metodika ich issledowa-nija, Moskwa—Leningrad, Izd. „Nauka”.
- Šestak Z., Čatský J., 1962, Intensity of photosynthesis and chlorophyll content as related to leaf age in *Nicotiana sanderae* hort., *Biol. Plantar.* (Praha) 4 (2): 131—140.
- Šestak Z., 1963, Changes in the chlorophyll content as related to photosynthetic activity and age of leaves, *Photochem. and Photobiol.* (Chlor. Metabol. Sympos.) 2: 101—110.
- Seybold A., Egle K., 1937, Lichtfeld und Blattfarbstoffe I, *Planta* (Berl.) 26: 491—515.
- Seybold A., Egle K., 1938, Lichtfeld und Blattfarbstoffe II, *Planta* (Berl.) 28: 87—123.
- Shiroya M., Lister G. R., Nelson C. D., Krotkov G., 1961, Translocation of C^{14} in tobacco at different stages of development following assimilation of $C^{14}O_2$ by a single leaf, *Canad. J. of Bot.* 39 (4): 855—864.
- Sisler E. C., Klein W. H., 1963, The effect of age and various chemicals on the lag phase of chlorophyll synthesis in dark grown bean seedlings, *Physiol. Plantar.* 16: 315—322.
- Thirkell D., 1964, Investigation of a chlorophyll-lipoprotein complex, *Phytochemistry* 3 (2): 301—305.
- Więckowski S., 1959, The relation between of growth of leaves and synthesis of chlorophyll, *Acta Biol. Crac. Ser. Bot.* 2 (1): 1—11.
- Więckowski S., 1960, Relation between of increase of dry and fresh weights and chlorophyll formation in the leaf, *Bull. Acad. Pol. Sci. Cl. II.*, 8 (8): 357—362.

- Willstätter R., Stoll A., 1918, Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure, Berlin Springer-Verlag.
- Witkowska W. W., Baranow A. A., 1963, Wlijanije wozrasta listjew i razwitija rastienij na procnost' swjazi chlorofilla s lipoprotiednym kompleksom, Bot. Žurn. 48 (4): 578—580.
- Wolf F. T., 1956, Changes in chlorophylls *A* and *B* in autumn leaves, Amer. J. of Bot. 43 (9): 714—718.
- Zabluda T. W., Prostiewa M. I., 1947, Wlijanije listjew raznych jarusow na rost i razwitije rastienij, Dokl. AN SSSR 57 (7): 723—726.
- Zajcewa A. A., 1939, Soderżanije chlorofilla w swjazi s razwitjem pszenicy, Dokl. AN 25 (8): 696—700.
- Zajcewa A. A., 1940, O zawisimosti mieźdu nakoplenijem chlorofilla i razwitjem rastienija, Dokl. AN 27 (8): 854—857 (cyt. wg Giubbienieta 1952).