

WPLYW STYMULACJI NASION *SCORZONERA HISPANICA* L.
ŚWIATŁEM LASERA NA ZAWARTOŚĆ BARWNIKÓW
FOTOSYNTETYCZNYCH W LIŚCIACH

*Agata Dziwulska-Hunek*¹, *Marcela Krawiec*², *Bożena Boron*³, *Arkadiusz Matwijczuk*¹

¹Katedra Fizyki, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin

²Katedra Nasiennictwa i Szkółkarstwa Ogrodniczego, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Leszczyńskiego 58, 20-068 Lublin

³Instytut Fizyki im. Chełkowskiego, Uniwersytet Śląski, ul. Uniwersytecka 4, 40-007 Katowice
e-mail: agata.dziwulska-hunek@up.lublin.pl

Streszczenie. Przedstawione wyniki badań dotyczyły efektów stymulacji nasion światłem lasera He-Ne na zawartość barwników fotosyntetycznych w liściach skorzonery odmiany 'Maxima'. Sprawdzone również, czy naświetlanie nasion może wpływać na długość czasu życia fluorescencji chlorofilu *a* w liściach i w ekstrakcie z liści. Materiał badawczy stanowiły liście roślin wyrosłych z nasion zebranych w latach 2009, 2010, 2011, 2012. Zdolność kiełkowania tych nasion wynosiła odpowiednio 50,8; 71,0; 93,0; 79,3%. Przed siewem nasiona poddano stymulacji elektromagnetycznej światłem lasera He-Ne o długości fali 632,8 nm i powierzchniowej gęstości mocy $3 \text{ mw}\cdot\text{cm}^{-2}$ – w czasie 1, 5, 10 i 30 minut. Nasiona niestymulowane traktowano jako kontrolę. Zawartość chlorofilu *a* i *b* oraz karotenoidów w liściach skorzonery była większa w roślinach wyrosłych z nasion młodszych (zebranych w latach 2011 i 2012) niż z nasion starszych (zebranych w latach 2009 i 2010). Stymulacja nasion młodszych światłem lasera wpłynęła na zmniejszenie zawartości tych barwników w liściach. Czas życia fluorescencji chlorofilu w ekstrakcie z liści był dłuższy niż w liściach. Nie stwierdzono istotnego wpływu stymulacji laserowej nasion na czas życia fluorescencji chlorofilu w ekstrakcie z liści skorzonery. Parametr ten był wyższy w ekstrakcie liści roślin wyrosłych z nasion młodszych (ze zbioru w latach 2011, 2012) niż starszych (ze zbioru w latach 2009, 2010).

Słowa kluczowe: skorzonera, nasiona, barwniki fotosyntetyczne, fluorescencja chlorofilu, stymulacja elektromagnetyczna

WSTĘP

Skorzonera (zwana inaczej czarne korzonki, wężymord, czarny korzeń) jest warzywem pochodzącym z Europy Południowej i Afryki Północnej (Chwil i in. 2015, Krawiec i in. 2015). Gatunek ten należy do rodziny *Asteraceae* (Coşkunçelebi i in.

2012). W pierwszym roku uprawy tworzy rozetę liści oraz korzeń o czarnej skórce, kremowym miąższu i długości do 0,5 m. Korzeń spożywany jest po ugotowaniu, nadaje się również do mrożenia i konserwowania (Nuez i Bermejo 1994, Krawiec i in. 2015). Na Sycylii występuje gatunek *Scorzonera deliciosa*, który ze względu na bardzo słodki korzeń znalazł zastosowanie do produkcji cukierków (Nowiński 1970). Młode liście skorzonery, zwłaszcza we Francji i Hiszpanii, używane są do sporządzania sałatek (Nuez i Bermejo 1994, Kilian i in. 2009). Skorzonere stosuje się także w tradycyjnej medycynie w Europie oraz Azji (Coşkunçelebi i in. 2012). Gatunek ten, ze względu na duże walory odżywcze (zawartość potasu, sodu, wapnia, magnezu, fosforu, żelaza, karotenu, witamin C, B₁, B₂, kwasów polifenolowych, licznych glikozydów: koniferyny, asparaginy, inuliny, choliny, laktuciny) oraz dietetyczne (Wierzbicka 2000, Kelly 2008, Patkowska i Konopiński 2008) stanowi cenne źródło dodatków do żywności. Na szczególną uwagę zasługuje wysoka zawartość inuliny, która jest wartościowym prebiotykiem. Jest to polimer fruktozy, występujący w korzeniach i bulwach wielu roślin gatunków jadanych z rodziny *Asteraceae* (topinambur, cykoria korzeniowa, skorzonera, mniszek pospolity, oman wielki, dalia oraz karczoch) (Rumińska 1983). Pierwszy raz wykryto ten składnik w korzeniu omanu wielkiego (Ożarowski i Jaroniewski 1989).

Światło odgrywa ważną rolę w procesie fotosyntezy (Puternicki 2010, Sarijeva i in. 2007), a chlorofil determinuje intensywność tego procesu. Jego zawartość w roślinach zależy od poziomu stresu, jakości nawożenia oraz kondycji roślin (Golian i in. 2012, Liu i in. 2014). Chlorofil jest barwnikiem, dzięki któremu następuje absorpcja energii słonecznej w zakresie światła widzialnego ($\lambda = 400-700$ nm). W roślinach istnieją dwa rodzaje chlorofilu: *a* i *b*. Chlorofil *a* ma dwa typy centrów reakcji: fotosystem I i II. Chlorofil *b* jest głównym składnikiem kompleksów gromadzących energię świetlną (Willows 2004). Ilość chlorofilu w liściach może świadczyć o istniejącym procesie starzenia (Gitelson i in. 2003). W roślinach występują również barwniki pomocnicze, na przykład karotenoidy. Składają się one z żółtych i żółtopomarańczowych ksantofili oraz pomarańczowoczerwonych karotenów. Barwniki te absorbują energię świetlną w innym zakresie długości fali niż chlorofil. Następnie przekazują energię na cząsteczki chlorofilu, co jest istotne z punktu widzenia procesu fotosyntezy. Jako przeciwutleniacze są wartościowym składnikiem w codziennej diecie (Willows 2004).

Pomiary czasu życia fluorescencji chlorofilu *a* stają się coraz bardziej popularną metodą pomiarową w różnych dziedzinach nauki i gospodarki: fizyka, chemia, biologia, medycyna, rolnictwo, inżynieria materiałowa, itp. (Berezin i Achilefu 2010). Fluorescencja polega na emisji fotonów przy przejściu elektronu ze stanu wzbudzonego (S_1) do stanu podstawowego (S_0). Czas życia fluorescencji określa się jako średni czas przejścia między stanami wzbudzonym a podstawowym (Lakowicz 2006). Od strony technicznej fluorescencję chlorofilu bada się za

pomocą specjalistycznych fluorymetrów. Metoda ta może być wskaźnikiem ogólnego stanu fizjologicznego roślin (Pedrós i in. 2008, Starck 2014). W uprawie roślin pomiary fluorescencyjne mogą być stosowane w celu wykrycia w nich różnego rodzaju zmian wynikających z warunków stresowych (np. niekorzystnych zmian temperatury, szkodliwego działania pestycydów, wpływu pola magnetycznego itd.) (Matwiczuk i in. 2012). Metody te służą raczej do wykrycia zmian bez określenia charakteru stresu (Kalaji i Guo 2008). Prowadzone badania na zawartość chlorofilu w roślinach uprawnych i leśnych są ważnym wskaźnikiem, oceniającym ogólny rozwój i kondycję roślin (Wu i in. 2008).

Laser, skonstruowany ponad 50 lat temu przez Maiman'a, znalazł wiele zastosowań w różnych dziedzinach życia i nauki. W rolnictwie światło lasera jest wykorzystywane jako bezpieczny dla środowiska sposób uszlachetniania nasion (Hernandez i in. 2010). Z danych literaturowych wiadomo, że stymulacja nasion wiązką lasera zwiększa ich zdolność kiełkowania, wschody oraz jakość plonu różnych gatunków roślin uprawnych (Hernandez i in. 2006, Krawiec i Dziwulska-Hunek 2009, Ćwintal i Dziwulska-Hunek 2013, Podleśny 2007). Stymulacja światłem lasera wpływa także na wzrost zawartości barwników fotosyntetycznych w nadziemnych częściach siewek kukurydzy, amarantusa, łubinu i lucerny oraz w liściach buraków cukrowych w różnych terminach zbioru (Hernandez i in. 2008, Dziwulska-Hunek i in. 2013, Sacała i in. 2012, Sujak i in. 2013).

Celem przeprowadzonych badań było sprawdzenie, czy stymulacja nasion skorzonery światłem lasera He-Ne (o długości fali 632,8 nm) wpływa na zawartość barwników fotosyntetycznych oraz długość czasu życia fluorescencji chlorofilu w liściach podczas wegetacji.

MATERIAŁ I METODYKA

Badania przeprowadzono w Uniwersytecie Przyrodniczym w Lublinie w 2013 roku. Materiałem badawczym były liście skorzonery odmiany 'Maxima', zebrane z roślin wyrosłych z nasion pochodzących ze zbioru w latach 2009, 2010, 2011, 2012. Nasiona te charakteryzowały się różną zdolnością kiełkowania, która wynosiła odpowiednio 50,8; 71,0; 93,0; 79,3%. Wszystkie użyte do badań nasiona przechowywane były w lodówce w temperaturze 5°C. Nasiona przed siewem zostały poddane stymulacji światłem lasera o powierzchniowej gęstości mocy 3 mW·cm⁻² i czasie ekspozycji: 0 (kontrola), 1, 5, 10 i 30 min (kombinacje w tabelach oznaczono odpowiednio: C, L1, L5, L10, L30). Wiązka lasera była skierowana z góry na pojedynczą warstwę nasion w naczyniu. Urządzenie użyte do badań zostało zbudowane na bazie patentu prof. Romana Kopera (1996), gdzie nasiona stymulowane są światłem lasera He-Ne podczas swobodnego spadku. Eksperyment polowy został założony metodą bloków losowych w czterech powtórzeniach w Gospodarstwie

Doświadczalnym Felin (51°13'21,9"N, 22°37'55,85"E), na glebie kompleksu pszennego dobrego (klasa bonitacyjna III a). Poletko miało powierzchnię 1 m². Próbki liści zostały pobrane losowo z każdej kombinacji w połowie września 2013 r., czyli cztery tygodnie przed zbiorem korzeni. Do badań wybierano zawsze piąty liść, licząc od środka rozety.

Chlorofil *a* i *b* został wyizolowany z liści w ciemności przy użyciu acetonu z dodatkiem 0,01% w/V BHT (butanolan hydroksytoluen). Widma UV-Vis mierzono za pomocą spektrofotometru Carry Bio 300 i analizowano zgodnie z procedurą opublikowaną przez Lichtenthaler i Buschmann (2001).

Czas życia fluorescencji chlorofilu *a* został zmierzony odbiciowo w liściach oraz w ekstrakcie z liści. Ekstrakt przygotowano poprzez rozpuszczenie liści w acetonie z dodatkiem BHT. Pomiar czasu życia fluorescencji zostały wykonane na spektrofluorymetrze Chronos BH (ISS, USA) (wykorzystującym pomiary w domenie czasowej). Do wzbudzenia fluorescencji w liściach i w ekstrakcie z nich użyto diody laserowej o długości fali 478 nm z czasem trwania impulsu 74 ps i mocą wyjściową 103 mW. Jako ośrodek rozpraszający użyto rozcieńczonego w wodzie dejonizowanej roztworu mleka. Sygnał fluorescencyjny rejestrowano przy użyciu fotopowielacza H7422P-50 (Hamamatsu, Japan). Wysokość sygnału od próbki i od roztworu rozpraszającego była utrzymywana na podobnym poziomie. Zamiast filtra emisyjnego użyto monochromatora ustawionego na 673 nm. Użyto przesłony szerokości 2 mm, która kierowała światło od próbki do monochromatora, oraz przesłony o takiej samej szerokości, która znajdowała się za monochromatorem i kierowała wiązkę światła do fotopowielacza. Podczas pomiarów polaryzator światła emitowanego przez próbkę ustawiony był na kąt magiczny (54,7 stopni), aby uniknąć dodatkowych wpływów do sygnału pochodzących od anizotropii i dyfuzji rotacyjnej molekuł w próbce. Krzywe zaniku fluorescencji dopasowywano w programie Vinci2, dostarczonym przez producenta Chronos BH. Pomiar prowadzono w 10 mm kuwecie kwarcowej w temperaturze pokojowej.

Dopasowywanie krzywej teoretycznej do danych eksperymentalnych

Krzywe zaniku fluorescencji są złożeniem trzech czynników: (1) funkcji odpowiedzi próbki na światło wzbudzające (fluorescencja), (2) kształtu impulsu wzbudzającego i (3) funkcji aparaturowej, charakterystycznej dla danego sprzętu. Kształt impulsu wzbudzającego oraz funkcja aparaturowa składają się na sygnał IRF (ang. *Instrument Response Function*), który jest sygnałem uzyskiwanym po przepuszczeniu światła wzbudzającego przez ośrodek rozpraszający. Program Vinci2 automatycznie uwzględnia wkład funkcji IRF do całości sygnału pochodzącego od próbki. Najlepsze wyniki uzyskuje się, gdy intensywność sygnału od próbki i od roztworu rozpraszającego jest zbliżona. Sygnał odpowiedzi od próbki jest złożeniem kilku (lub jednej) funkcji eksponentyjnej, z której wykładnika obliczany jest czas życia fluorescencji. W przypadku, gdy zanik fluorescencji jest

łożeniem kilku krzywych eksponentialnych, podaje się w wyniku nie tylko obliczone czasy życia (tyle ile krzywych eksponentialnych zastosujemy, tyle czasów życia otrzymamy), ale także wkłady procentowe poszczególnych czasów życia do całości sygnału – nazywane frakcjami, które mogą być utożsamiane z ilością molekuł w roztworze o poszczególnych czasach życia fluorescencji. O dokładności dopasowania krzywej teoretycznej do danych eksperymentalnych mówi parametr dopasowania chi kwadrat χ^2 , wyliczony przez program Vinci2. Powinien on być jak najbliższy jedności, jednak nie mniejszy od niej. Jeżeli parametr chi-kwadrat wychodzi mniejszy od jedności, wówczas dane są uznawane za źle dopasowane.

Otrzymane wyniki opracowano statystycznie z użyciem analizy wariancji ANOVA (STATISTICA 13.1.). Przedziały ufności określono testem Tukey'a przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$, oddzielnie dla każdej partii nasion.

WYNIKI I DYSKUSJA

W niniejszej pracy analizowano widma absorpcji do wyznaczenia zawartości barwników fotosyntetycznych w ekstrakcie z liści skorzonery (tab. 1). Największą zawartość chlorofilu *a* zanotowano w liściach roślin wyrosłych z nasion kontrolnych pochodzących z 2012 roku (najmłodszych). Im starsze były nasiona niestymulowane, tym mniej chlorofilu *a* zawierały liście. Stymulacja nasion pochodzących z lat 2011 i 2012 (o wyższych wartościach zdolności kiełkowania) spowodowała spadek zawartości tego składnika w liściach. Wzrost zawartości chlorofilu *a* zanotowano w efekcie napromieniowania nasion z 2010 r. w każdym czasie stymulacji i nasion z 2009 r., w czasie 5 i 30 minut. Maksymalny wzrost uzyskano dla nasion L5 z 2009 roku i L30 z 2010, który wyniósł odpowiednio: 87 i 48% w stosunku do kontroli. W pracy Ćwintala i in. (2016) stwierdzono, że więcej było chlorofilu *a* w roślinach lucerny pochodzących z plantacji 1-2 letniej niż z plantacji 5-6 letniej. Pod wpływem elektromagnetycznej stymulacji zanotowano wzrost zawartości tego barwnika, zarówno w roślinach starych, jak i młodych.

Podobnie, jak w przypadku zawartości chlorofilu *a*, największą zawartością chlorofilu *b* cechowały się liście roślin otrzymanych z nasion kontrolnych z 2012 roku. Im starsze były nasiona niestymulowane, tym mniej chlorofilu *b* zawierały liście. Istotny wzrost zawartości chlorofilu *b* zanotowano w liściach roślin wyrosłych z nasion z 2009 r., traktowanych światłem lasera przez 5 i 30 minut oraz z nasion z 2010 r. naświetlanych przez 5, 10 i 30 minut.

Z przedstawionych danych wynika, że większą zawartością chlorofilu *a* i *b* charakteryzowały się liście roślin uzyskanych z partii nasion 2012 i 2011 w porównaniu z liśćmi roślin uzyskanych z partii nasion z lat 2010 i 2009. Niektórzy autorzy stwierdzili, że wraz z procesem starzenia się liści oraz całej rośliny zmniejsza się zawartość chlorofilu *a*, zaś zawartość chlorofilu *b* ulega tylko nieznacznym

zmianom (Costes i Coïc 1957, Gej 1966, Ćwintal i in. 2016). Niestety w dostępnej literaturze brak jest informacji na temat zależności między wiekiem (jakością) nasion a zawartością chlorofilu w liściach roślin z nich wyrosłych.

Tabela 1. Wpływ stymulacji nasion światłem lasera na zawartość barwników fotosyntetycznych w liściach skorzonery ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ masy zielonej)

Table 1. Effect of laser light seed stimulation on content of photosynthetic pigments in scorzonera leaves ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of green mass)

Partia nasion Seed lots	Stymulacja światłem lasera Stimulation with laser light	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Chl <i>a+b</i>	Chl <i>a/b</i>	Car
2009	C	392c±2,9	129c±4,3	521b±7,1	3,04a±0,01	58c±6,3
	L1	349d±0,6	111d±1,5	460c±1,5	3,14a±0,04	58c±2,2
	L5	732a±9,2	232a±4,1	964a±13,2	3,16a±0,02	128a±2,2
	L10	382c±8,7	119d±2,7	501c±11,3	3,21a±0,01	80b±8,1
2010	L30	415b±20,8	151b±8,1	566b±28,7	2,74b±0,04	62c±3,2
	C	432c±8,1	150c±2,9	582c±10,9	2,88a±0,01	55d±4,0
	L1	437c±5,4	143c±3,3	580c±8,7	3,06a±0,04	68c±7,1
	L5	526b±6,2	178b±1,1	704b±7,3	2,95a±0,02	81b±6,8
2011	L10	526b±26,9	168b±9,3	694b±6,1	3,13a±0,01	78b±3,7
	L30	639a±2,9	204a±1,3	844a±3,4	3,13a±0,02	104a±10,4
	C	947a±2,6	324a±4,7	1272±10,6	2,92a±0,02	153a±2,6
	L1	560c±10,0	192b±2,4	752b±12,2	2,91a±0,02	82c±10,6
2012	L5	888b±10,5	311a±18,5	119a±73,2	2,85a±0,01	107b±10,5
	L10	865b±5,3	303a±1,00	1169a±6,2	2,85a±0,01	74c±53,4
	L30	935a±2,6	326a±28,5	1261a±26,0	2,88a±0,25	139a±12,7
	C	1034a±12,4	343a±3,8	1376a±16,1	3,02a±0,01	145a±14,0
2012	L1	827d±43,8	278c±13,7	1105c±57,4	2,97a±0,02	113b±15,3
	L5	911b±20,9	310b±7,4	1222b±28,3	2,93a±0,00	133a±13,3
	L10	870c±9,1	308b±3,2	1178b±12,0	2,82a±0,02	115b±23,8
	L30	987a±48,8	371a±18,9	1358a±30,0	2,66b±0,26	145a±25,2

C – kontrola, niestymulowane nasiona / control, untreated seeds; L1, L5, L10, L30 – nasiona stymulowane światłem lasera He-Ne o długości fali 632,8 nm i powierzchniowej gęstości mocy 5 mW·cm⁻² oraz czasie ekspozycji 1, 5, 10 i 30 minut / L1, L5, L10, L30 – seeds subjected to laser stimulation with He-Ne laser light of $\lambda = 632.8$ nm and density power of 5 mW cm⁻² and exposure times of 1, 5, 10 and 30 minutes; ± odchylenie standardowe / ± standard deviation; a → e różne litery w kolumnie oznaczają istotne różnice statystyczne przy użyciu testu Tukey'a, $\alpha = 0,05$ / a → e means with different letters in the same column are statistically different compared to control using Tukey's test, $\alpha = 0.05$; Chl *a* – chlorofil *a* / chlorophyll *a*; Chl *b* – chlorofil *b* / chlorophyll *b*; Chl *a+b* – chlorofil *a+b* / chlorophyll *a+b*; Chl *a/b* – chlorofil *a/b* / chlorophyll *a/b*; Car – karotenoidy / carotenoids

W liściach roślin otrzymanych z partii nasion 2011 i 2012 występowało znacznie więcej chlorofilu *a+b* niż w roślinach wyrosłych z nasion zebranych w latach 2009 i 2010 (nasion starszych). Stymulacja laserowa nasion pochodzących z lat 2011 i 2012 wpłynęła na zmniejszenie sumarycznej zawartości chlorofilu *a+b* w liściach. W przypadku nasion pochodzących z 2009 r. istotny wzrost zawartości chlorofilu w liściach zanotowano po naświetlaniu nasion przez 5 minut, zaś w przypadku nasion z 2010 r. po stymulacji nasion przez 5, 10 i 30 min. Przedstawione

badania są częściowo potwierdzeniem wyników Hernandez i in. (2009) o pozytywnym wpływie stymulacji laserowej nasion kukurydzy na wzrost zawartości chlorofilu w liściach.

Chlorofil *a* i *b* występuje w roślinach najczęściej w stosunku ilościowym 3:1 (Kırca i in. 2006, Śledź i Witrowa-Rajchert 2012). U roślin rosnących w cieniu stosunek chlorofilu *a* do *b* waha się od 2,0 do 2,8, zaś u roślin rosnących w miejscach nasłonecznionych 3,5-4,9 (Willows 2004). W przeprowadzonych w niniejszej pracy badaniach stosunek chlorofilu *a* do *b* wahał się od 2,66:1 (L30 partia nasion z 2012) do 3,21:1 (L10 partia nasion z 2009). Wyniki te są potwierdzeniem badań innych autorów. Sánchez i in. (2014) wykazali, że stosunek chlorofilu *a* do *b* w roślinach brokuła, szpinaku i zielonego pieprzu wynosił odpowiednio: 2,8:1; 2,7:1; 2:1.

Porównanie zawartości barwników w liściach roślin uzyskanych z nasion niepoddanych stymulacji wskazuje, że więcej karotenoidów zawierały liście roślin wyrosłych z nasion zebranych w 2011 i 2012 r. (odpowiednio 152,8 i 145,47 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) niż z nasion zebranych w latach 2009 i 2010 (odpowiednio 58,34 i 54,91 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Pod wpływem światła lasera He-Ne zanotowano wzrost zawartości karotenoidów w liściach roślin wyrosłych z nasion 2009 i 2010 w porównaniu do kontroli, zaś dla partii nasion 2011 i 2012 – ich wyraźne zmniejszenie. W przypadku nasion pochodzących z 2009 r. istotny wzrost zawartości karotenoidów w liściach zanotowano po naświetlaniu nasion przez 5 minut, zaś w przypadku nasion z 2010 r. po stymulacji nasion przez 1, 5, 10 i 30 min. Z doniesień literatury (Ćwintal i in. 2016) wynika, że zawartość karotenoidów w lucernie wyrosłej z nasion stymulowanych przed siewem była niewiele większa w lucernie młodej niż w starej. Stymulacja elektromagnetyczna spowodowała wzrost tego barwnika zarówno u roślin młodych, jak i starych w porównaniu do kontroli.

Przedstawione badania dotyczą pomiarów długości czasu życia fluorescencji chlorofilu *a* w ekstrakcie z liści (tab. 2), oraz w liściu (tab. 3). W badanych liściach występowały dwie formy czasu t_1 i t_2 oraz ich udziały, odpowiednio f_1 i f_2 . Udział czasu życia wahał się od 33 do 48% (f_1) i od 55 do 67% (f_2) w ekstrakcie z liści. Średni czas życia fluorescencji chlorofilu *a* w ekstrakcie liści był dłuższy niż w liściach skorzonery. Różnice te mogą być związane zarówno z metodyką pomiarową, jak również z większą dostępnością poszczególnych frakcji chlorofilu w próbce ekstraktu niż w liściu. Czas życia fluorescencji chlorofilu w ekstrakcie z liści roślin wyrosłych z nasion młodszych (ze zbioru w latach 2011 i 2012) był dłuższy niż roślin wyrosłych z nasion starszych (tab. 2). Nie stwierdzono istotnego wpływu naświetlania nasion na długość czasu życia fluorescencji chlorofilu w ekstrakcie z liści. Największe wydłużenie czasu życia fluorescencji chlorofilu t_1 w stosunku do kontroli zanotowano pod wpływem naświetlania nasion partii 2011 przez 30 minut (wzrost o 7,8%). W przypadku ekstraktu z liści roślin wyrosłych z nasion 2012 odnotowano skrócenie czasu życia fluorescencji we wszystkich wariantach

naświetlania w stosunku do kontroli. Wydaje się, że mogłoby to świadczyć o bardziej zaawansowanym stadium dojrzałości tych roślin w stosunku do kontroli. Z niektórych badań wynika, że przedsewne naświetlanie nasion laserem przyspiesza dojrzewanie roślin uprawnych (Podleśny 2007).

Tabela 2. Wpływ stymulacji nasion światłem lasera na czas życia fluorescencji chlorofilu *a* w ekstrakcie z liści skorzonery (ns)

Table 2. Effect of laser light seed stimulation on the lifetime of chlorophyll *a* fluorescence in the extract from scorzonera leaves (ns)

Partia nasion Seed lots	Stymulacja Stimulation with laser light	Stymulacja			
		t_1	t_2	f_1	f_2
2009	C	7,37a±0,65	3,21b±0,19	0,40b±0,06	0,60b±0,06
	L1	7,62a±0,37	3,29b±0,06	0,33c±0,03	0,67a±0,03
	L5	7,76a±0,06	3,43a±0,03	0,45a±0,01	0,55c±0,01
	L10	7,30a±0,22	3,24b±0,06	0,38b±0,03	0,62b±0,03
	L30	7,39a±0,20	3,28b±0,05	0,37b±0,02	0,63b±0,02
2010	C	7,69a±0,34	3,32a±0,10	0,35b±0,04	0,65a±0,04
	L1	7,13a±0,16	3,18a±0,08	0,41a±0,03	0,59b±0,03
	L5	7,43a±0,12	3,29a±0,02	0,41a±0,01	0,59b±0,01
	L10	7,68a±0,21	3,39a±0,05	0,39a±0,02	0,61a±0,02
	L30	7,84a±0,14	3,39a±0,03	0,39a±0,01	0,61a±0,01
2011	C	8,10a±0,42	3,58a±0,18	0,48a±0,05	0,52b±0,05
	L1	7,48b±0,07	3,31b±0,04	0,44a±0,01	0,56b±0,01
	L5	8,51a±0,33	3,69a±0,08	0,42b±0,03	0,58a±0,03
	L10	8,54a±0,35	3,69a±0,12	0,41b±0,04	0,59a±0,04
	L30	8,73a±0,25	3,74a±0,09	0,41b±0,03	0,58a±0,03
2012	C	8,85a±0,25	3,77a±0,09	0,42a±0,03	0,60a±0,02
	L1	8,68a±0,23	3,68a±0,07	0,41a±0,02	0,59a±0,01
	L5	8,68a±0,14	3,70a±0,05	0,41a±0,01	0,58a±0,01
	L10	8,47a±0,10	3,66a±0,04	0,42a±0,01	0,56a±0,03
	L30	8,69a±0,30	3,73a±0,11	0,44a±0,03	0,56a±0,04

Wyjaśnienie jak w tabeli 1 / Explanations as in the table 1

Czas życia fluorescencji chlorofilu *a* w liściu wynosił od 0,09 do 2,60 ns (t_1) oraz od 0,77 do 2,77 ns (t_2), zaś ich udział od 16 do 100% (f_1) i od 22 do 84% (f_2) (tab. 3). Stymulacja laserowa nasion z 2009 i 2010 wpłynęła na skrócenie czasu życia t_2 w stosunku do kontroli. W pracy Berezin i Achilefu (2010) czas życia w liściach chlorofilu *a* w PSII wynosił 0,17-3,00 ns. Według dostępnych aktualnie danych literaturowych, skrócenie średniego czasu życia fluorescencji chlorofilu poniżej 3,00 ns informuje o spadku żywotności roślin. W przedstawionym doświadczeniu liście do badań zostały pobrane we wrześniu, czyli pod koniec wegetacji roślin. Skrócenie czasu życia fluorescencji chlorofilu może być związane z rozpoczynającym się procesem starzenia liści. Jak wskazują niektórzy autorzy, stymulacja laserowa nasion może przyspieszać dojrzewanie roślin związane z ich starzeniem

(Koper 1994, Podleśny 2007). Zmniejszenie zawartości chlorofilu w liściach na skutek stymulacji laserowej nasion także może być związane z przyspieszonym dojrzewaniem skorzonery.

Tabela 3. Wpływ stymulacji nasion światłem lasera na czas życia fluorescencji chlorofilu *a* liściach skorzonery (ns)

Table 3. Effect of laser light seed stimulation on the lifetime of chlorophyll *a* fluorescence in scorzonera leaves (ns)

Partia nasion Seed lots	Stymulacja światłem lasera Stimulation with laser light	Stymulacja			
		t ₁	t ₂	f ₁	f ₂
2009	C	0,47d±0,01	1,78a±0,01	0,26c±0,01	0,74c±0,01
	L1	0,71c±0,09	1,72a±0,06	0,20d±0,05	0,80b±0,05
	L5	0,09e±0,01	0,89b±0,01	0,16e±0,001	0,84a±0,08
	L10	1,36a±0,00	–	1,00a±0,00	–
	L30	0,73b±0,03	1,73a±0,05	0,65b±0,03	0,35d±0,03
2010	C	0,78e±0,04	2,04a±0,12	0,71b±0,04	0,29c±0,10
	L1	1,23d±0,00	–	1,00a±0,00	–
	L5	1,54c±0,01	–	1,00a±0,00	–
	L10	2,60a±0,08	0,94b±0,01	0,28d±0,01	0,72a±0,11
	L30	1,64b±0,02	0,77c±0,02	0,63c±0,02	0,37b±0,04
2011	C	0,97d±0,01	–	1,00a±0,00	–
	L1	1,61a±0,01	–	1,00a±0,00	–
	L5	1,30b±0,01	–	1,00a±0,00	–
	L10	1,24c±0,01	–	1,00a±0,00	–
	L30	0,62e±0,02	1,56±0,04	0,52b±0,02	0,48±0,08
2012	C	1,10c±0,01	2,77±0,03	0,78b±0,00	0,22±0,01
	L1	1,34a±0,01	–	1,00a±0,00	–
	L5	1,15c±0,00	–	1,00a±0,00	–
	L10	1,23b±0,02	–	1,00a±0,00	–
	L30	1,17c±0,02	–	1,00a±0,00	–

Wyjaśnienie jak w tabeli 1. / Explanations as in the table 1.

WNIOSKI

1. Czas życia fluorescencji chlorofilu *a* w ekstrakcie z liści był dłuższy niż w samym liściu. Nie stwierdzono istotnego wpływu stymulacji laserowej nasion na czas życia fluorescencji chlorofilu w ekstrakcie z liści skorzonery. Parametr ten był wyższy w ekstrakcie liści roślin wyrosłych z nasion młodszych (ze zbioru w latach 2011, 2012) niż z nasion starszych (ze zbioru w latach 2009, 2010).

2. Zawartość chlorofilu *a* w liściach skorzonery uzyskanych z nasion 2011 i 2012 była znacznie większa niż w liściach roślin wyrosłych z nasion z lat 2009 i 2010. Światło lasera wpłynęło istotnie na wzrost zawartości tego barwnika w liściach jedynie w przypadku nasion z 2010 roku.

3. Stymulacja nasion wszystkich partii światłem lasera przez 30 minut wpłynęła na wzrost zawartości chlorofilu *b* w liściach w porównaniu do kontroli.

4. Stosunek chlorofilu *a* do *b* w liściach wahał się od 2,66 do 3,21 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Dla nasion z 2010 roku odnotowano niewielki jego wzrost pod wpływem wszystkich wariantów naświetlania laserem w porównaniu do kontroli, natomiast zmniejszenie tego stosunku zanotowano w przypadku nasion młodszych (2011 i 2012).

5. W wyniku stymulacji nasion wiązką światła laserowego zanotowano znaczny wzrost zawartości karotenoidów w liściach roślin otrzymanych z partii nasion z 2009 i 2010 roku w stosunku do kontroli. Natomiast zawartość karotenoidów w liściach roślin wyrosłych z nasion z lat 2011 i 2012 traktowanych światłem lasera uległa zmniejszeniu.

Podziękowanie

Dla prof. Leszka Fiedora z Uniwersytetu Jagiellońskiego za udostępnienie sprzętu spektrofotometrycznego Chronos BH (ISS, USA) (wykorzystujący pomiary w domenie czasowej).

LITERATURA

- Berezin M.Y., Achilefu S., 2010. Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging. Chem. Rev., 110, 2641-2684, doi: 10.1021/cr900343z.
- Chwil M., Krawiec M., Krawiec P., Chwil S., 2015. Micromorphology of the epidermis and anatomical structure of the leaves of *Scorzonera hispanica* L. Acta Soc. Bot. Pol., 84(3), 357-367, doi: 10.5586/asbp,2015,033.
- Coşkunçelebi K., Makbul S., Gültepe M., Onat D., Güzel M.F., Okur S., 2012. A new *Scorzonera* (Asteraceae) species from South Anatolia, Turkey, and its taxonomic position based in molecular data. Turk. J. Bot., 36, 299-310.
- 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.
- Ćwintal M., Dziwulska-Hunek A., 2013. Effect of electromagnetic stimulation of alfalfa seeds. Int. Agrophys., 27, 391-401, doi: 10.2478/intag-2013-0009.
- Ćwintal M., Dziwulska-Hunek A., Sujak A., 2016. Yield parameters of old and Young lucerne plants upon pre-sowing electromagnetic seed stimulation. Acta Agroph., 23(1), 15-29.
- Dziwulska-Hunek A., Sujak A., Kornarzyński K., 2013. Short-Term Exposure to Pre-Sowing Electromagnetic Radiation of Amaranth Seeds Affects Germination Energy but not Photosynthetic Pigment Content. Pol. J. Environ. Stud., 22(1), 93-98.
- Gej B., 1966. Zmiany w zawartości chlorofilu *a* i *b* w liściach różnego wieku niektórych roślin dwuliściennych. Acta Societatis Botanicorum Poloniae, XXXV(2), 209-224.
- Gitelson A.A., Gritz Y., Merzlyak M.N., 2003. Relationships between leaf chlorophyll content and spectral reflectance and algorithms for non-destructive chlorophyll assessment in higher plant leaves. J. Plant Physiol., 160, 271-282.
- Golian J., Anyszka Z., Kohut M., 2012. Effectiveness of different methods of weed management in celeriac (*Apium Graveolens* L. var. *Rapaceum* (Mill.) Gaud.). Journal of Research and Applications Engineering, 57(3), 110-114.
- Hernandez A.C., Carballo A.C., Artola A., Michtchenko A., 2006. Laser irradiation effects on maize seed field performance. Seed Sci. Technol., 34, 193-197.

- Hernandez A.C., Carballo A.C., Cruz O.A., Ivanov R., Dominguez A.P. 2008. The carotenoid content in seedlings of maize seeds irradiated by a 650 nm diode laser: Qualitative photoacoustic study. *Eur. Physical J. Spec. Top.* 153, 515. doi: 10.1140/epjst/e2008-00497-1
- Hernandez, A.C., Dominguea P.A., Cruz O.A., Ivanov R., Carballo C.A., Zepeda B.R., 2010. Laser in agriculture. *Int. Agrophys.*, 24, 407-422.
- Kalaji H.M., Guo P., 2008. Chlorophyll fluorescence: a useful tool in barley plant breeding programs. W: *Photochemistry Research Progress* (Eds. A. Sánchez, S.J. Gutierrez). Nova Science Publishers, New York, 439-463.
- Kelly G., 2008. Inulin-type prebiotics – a review: part 1. *Alternat. Med. Rev.*, 14(4), 315-329.
- Kirca A., Yemiş O., Özkan M. 2006. Chlorophyll and colour changes in grapevine leaves preserved by passive modification. *Eur Food Res Technol* 223, 387-393. DOI 10.1007/s00217-005-0216-6.
- Kilian N., Gemeinholzer, B., Lack H.W. 2009. Cichorieae – Chapter 24, Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae. International Association for Plant Taxonomy (IAPT), Vienna.
- Koper R., 1994. Pre-sowing laser biostimulation of seeds of cultivated plants and its results in agrotechnics. *Int. Agrophys.*, 8, 593-596.
- Koper R., 1996. Urządzenie do przedsewnej laserowej biostymulacji nasion metodą ich naświetlania nastawnymi dawkami energii. Patent RP, 296303.
- Krawiec M., Dziwulska-Hunek A., Sujak A., Palonka S., 2015. Laser irradiation effects on scorzonera (*Scorzonera hispanica* L.) seed germination and seedling emergence. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 14(2), 145-158.
- Krawiec M., Dziwulska-Hunek A., 2009. Effect of pre-sowing laser stimulation on germination of pea seeds (*Pisum sativum* L.) and field emergence (in Polish). *ZPPN*, 539, 359-364.
- Lakowicz J.R., 2006. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3rd edition, Springer Science+Business Media LLC, New York, USA.
- Liu B., Yue Y.M., Li R., Shen W.J., Wang K.L., 2014. Plant leaf chlorophyll content retrieval based on a field imaging spectroscopy system. *Sensors*, 14, 19910-19925, doi:10.3390/s141019910
- Matwijczuk A., Kornarzyński K., Pietruszewski S., 2012. Effect of field on seed germination and seedling growth of sunflower. *Int. Agrophys.*, 26, 271-278.
- Nowiński M., 1970. Dzieje upraw i roślin uprawnych. PWRiL, Warszawa, 295.
- Nuez F., Bermejo J.E.H., 1994. Neglected Crops: 1492 from a Different Perspective, Hernando Bermejo J.E., León J. (eds). *Plant Prod, Protect.*, ser.26, FAO, Rome, Italy, 303-332.
- Ożarowski A., Jaroniewski W., 1989. Rośliny lecznicze i ich praktyczne zastosowanie. Instytut Wydawniczy Związków Zawodowych, 274-277.
- Patkowska E., Konopiński M., 2008. Pathogenicity of selected soil-borne microorganisms for scorzonera seedlings (*Scorzonera hispanica* L.). *Folia Hortic. Ann.*, 20(1), 31-42,
- Pedrés R., Moya I. Goulas Y., Jacquemoud S., 2008. Chlorophyll fluorescence emission spectrum inside a leaf. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 7, 498-502, doi: 10.1039/B719506K.
- Podleśny J., 2007. Wpływ napromieniowania nasion laserem i desykcji roślin na plonowanie i cechy jakościowe nasion łubinu białego. *Acta Agroph.*, 9(3), 733-745.
- Puternicki A., 2010. Zastosowanie półprzewodnikowych źródeł światła do wspomagania wzrostu roślin. *Prace Instytutu Elektrotechniki*, 245, 69-86.
- Rumińska A., 1983. Rośliny lecznicze. PWN, Warszawa, 33.
- Sacała E., Demczuk A., Grzyś E., Prośba-Białczyk U., Szajner H., 2012. Impact of presowing laser irradiation of seeds on sugar beet properties, *Int. Agrophys.*, 26, 295-300, doi: 10.2478/v10247-012-0042-6.

- Sánchez C., Baranda A.B., Martínez de Marañón I., 2014. The effect of high pressure and high temperature processing on carotenoids and chlorophylls content in some vegetables, *Food Chem.*, 163, 37-45, doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.041
- Sarijeva G., Knapp M., Lichtenthaler H.K., 2007. Differences in photosynthetic activity, chlorophyll and carotenoid levels, and in chlorophyll fluorescence parameters in green sun and shade leaves of *Ginkgo* and *Fagus*. *J. Plant Physiol.*, 164, 950-955.
- Starck Z., 2014. Fizjologia roślin: jak było wczoraj, jak jest dziś, a co przyniesie jutro? *Kosmos Problemy Nauk Biologicznych*, Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika, 63(4), 569-689.
- Sujak A., Dziwulska-Hunek A., Reszczyńska E., 2013. Effect of Electromagnetic Stimulation on Selected *Fabaceae* Plants. *Pol. J. Environ. Stud.*, Vol. 22, No 3, 893-898.
- Starzycki M., Rybiński W., Starzycka E., Pszczoła J., 2005. Laser light as a physical factor enhancing rapeseed resistance to blackleg disease. *Acta Agroph.*, 5(2), 441-446.
- Śledź M., Witrowa-Rajchert D., 2012. Składniki biologiczne czynne w suszonych ziołach – czy ciągle aktywne? *Kosmos Problemy Nauk Biologicznych Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika*, 61(2), 319-329.
- Wierzbicka B., 2000. Skorzonera. *Polowa uprawa warzyw*. Praca zbiorowa pod redakcją M. Orłowskiego. Wyd. BRASIKA, Szczecin, 285-289.
- Willows R.D., 2004. Chlorophylls, In: *Plant pigments and their manipulation* (Ed. K.M. Davies). Blackwell Publishing. Oxford, UK, pp. 23-46.
- Wu Ch., Niu Z., Tang Q., Huang W. 2008., Estimating chlorophyll content from hyperspectral vegetation indices: Modeling and validation, *Agr. Forest Meteorol.*, 148, 1230-1241, doi: 10.1016/j.agrformet.2008.03.005.

EFFECT OF LASER LIGHT STIMULATION OF *SCORZONERA HISPANICA* L. SEEDS ON THE CONTENT OF PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS IN LEAVES

Agata Dziwulska-Hunek¹, Marcela Krawiec², Bożena Boron³, Arkadiusz Matwijczuk¹

¹Department of Physics, University of Life Sciences, Akademicka 13, 20-950 Lublin, Poland

²Department of Seed Sciences and Nursery, University of Life Sciences
Leszczyńskiego 58, 20-068 Lublin, Poland

³Chelkowski Institute of Physics, University of Silesia, Uniwersytecka 4, 40-007 Katowice, Poland
e-mail: agata.dziwulska-hunek@up.lublin.pl

Abstract. The results of the research concerned the effect of seed stimulation with He-Ne laser light on the content of photosynthetic pigment in scorzonera leaves of the Maxima cultivar. It was also examined whether the exposure of the seeds could affect the lifetime of chlorophyll a fluorescence of scorzonera leaves extract and scorzonera leaves. The research material were leaves which came from plants grown from seeds harvested in 2009, 2010, 2011 and 2012. The germination capacity of the seeds was 50.8, 71.0, 93.0 and 79.3%. Prior to sowing, the seeds were subjected to electromagnetic stimulation with He-Ne laser light with a wavelength of 632.8 nm and a surface power density of 3 mW cm⁻² for 1, 5, 10 and 30 minutes. Untreated seeds were the control. The content of chlorophyll *a* and *b* and carotenoids in leaves was higher in plants grown from younger seeds (harvested in 2011 and 2012) than from older seeds (harvested in 2009 and 2010). Stimulation of younger seeds with laser light caused a reduction of the content of these pigments. The lifetime of chlorophyll a fluo-

rescence of the leaves extract was longer than that of the leaves. There was no significant effect of laser stimulation of seeds on chlorophyll a fluorescence lifetime in leaves extract of scorzonera. This parameter was higher in leaves extract of plants grown from younger seeds (harvested in 2011, 2012) than from older seeds (harvested in 2009, 2010).

Key words: scorzonera, seeds, photosynthetic pigment, chlorophyll fluorescence, electromagnetic stimulation