

OKREŚLENIE WPLYWU STYMULACJI ŚWIATŁEM  
MONOCHROMATYCZNYM NASION NA PROCES KIELKOWANIA  
PSZENŻYTA METODĄ SPEKTROSKOPOWĄ

*Marek Jan Kasprowicz*

Zakład Fizyki, Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie  
Al. Mickiewicza 21, 31-120 Kraków  
e-mail: mjkasprowicz@tlen.pl

**Streszczenie.** Stosowanie światła do stymulacji nasion w celu poprawy ilości i jakości plonów jest coraz częściej stosowane w polskim rolnictwie. Niestety większość przeprowadzonych badań ograniczało się do pomiarów efektów naświetlania, a nie zajmowało się określeniem procesów wywołanych biostymulacją zachodzących w samych nasionach. Celem pracy było pokazanie metody badań określających w ilościowy sposób te procesy. Przedstawiono metodę pomiaru widm transmisji światła podczerwonego przez preparaty przygotowane z mąki uzyskanej z nasion pszenżyta odmiany Matejko z 2005 r. Na podstawie analizy tych widm określono zmiany ilości enzymów w nasionach. Opisano metodę analizy porównawczej ilości skrobi w nasionach naświetlanych i nienaświetlanych.

**Słowa kluczowe:** alfa-amylaza, stymulacja laserowa, pszenżyto, spektroskopia IR

WSTĘP

Ekologiczne metody produkcji żywności oraz ochrona środowiska wymagają poszukiwania nowych metod zwiększania plonów roślin bez użycia środków chemicznych. Coraz częściej stosowane są metody fizyczne powodujące poprawienie jakości materiału siewnego. Jedną z takich metod jest zastosowanie światła monochromatycznego jako stymulatora nasion. Badania dotyczące biostymulacji światłem (w szczególności światłem koherentnym) prowadzone są od kilkunastu lat na wielu gatunkach i odmianach roślin, np. jęczmieniu (Szajsner 2003, Rybicki 2000), pszenicy (Szajsner 2003, Makarska in. 2004), pszenżycie (Katańska i in. 2003), bobiku (Podlesny 2002), rzepaku (Starzycki 2005), marchwi (Mikos-Bielak 2003), koniczynie (Dziwulska 2004, Wilczek 2006) i wielu innych. Większość badań dotyczy pomiarów szybkości i energii kielkowania, długości korzeni, suchej i mokrej masy oraz wielkości plonów z hektara.

W wielu przypadkach badania są obciążone błędami wynikającymi z większego wpływu czynników biologicznych, takich jak pleśnienie roślin, niż wpływu stymulacji laserowej. Tradycyjne badania wymagają licznych próbek nasion, co powoduje długie i pracochłonne pomiary. Niestety niewiele badań dotyczy poznania procesów zachodzących w samych nasionach w trakcie oraz po naświetlaniu (Drozd 2003, Makarska 2004).

Przedstawiane w literaturze modele biostymulacji (Karu 1988, Tsivunchyk 2003, Popp 1984) opisywane są jako ciąg zdarzeń rozpoczętych przez absorpcję fotonów przez fotoreceptory. Energia zabsorbowanego fotonu może aktywować enzymy, zwiększać szybkość syntezy ATP i liczebność mitochondriów w komórce. Celem pracy jest pokazanie metod określających w sposób ilościowy procesy zachodzące w nasionach. Przedstawiona zostanie metoda badania ilości i aktywności alfa-amylazy oraz ilości skrobi.

#### MATERIAŁ I METODY

Materiałem badawczym były nasiona pszenżyta odmiana Matejko z 2005 roku. W trakcie eksperymentu wykorzystano laser diodowy bazujący na diodzie Mitsubischi ML101J27 o długości fali światła 660 nm i maksymalnej gęstości mocy  $40 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Dioda laserowa zasilana i stabilizowana przez sterowniki firmy Thorlabs TED200 i LDC205B pracowała w trybie wielomodowym. Wiązka lasera została rozszerzona do powierzchni około  $12,5 \text{ cm}^2$ , tak aby możliwe było naświetlanie 30 nasion pszenżyta równocześnie. Czas naświetlania wynosił w zależności od pomiaru od 10 do 500 s.

Nasiona wykorzystywane w eksperymencie wybierano w celu eliminacji uszkodzonych nasion i sortowano po 30 sztuk. Po stymulacji laserowej nasiona przechowywano na dwa sposoby: dla próbek zwanych w dalszej części, jako „suche” nasiona przechowywano w szalkach Petriego w temperaturze  $21^\circ\text{C}$ ; dla próbek zwanych, jako „mokre” nasiona wysiewano na mokrych bibułach w szalkach Petriego i przechowywano w temperaturze  $21^\circ\text{C}$  i wilgotności 100%. Wysiewanie nasion następowało natychmiast po naświetlaniu. Dla każdego czasu naświetlania oraz dla nasion kontrolnych sporządzono po 4 próbki nasion. Po 30 godzinach od chwili naświetlania, nasiona danej serii próbek (zarówno dla próbek „suchych” jak i „mokrych”) były łączone i ucierane w młynku, a następnie przesiewane przez sito. Dodatkowo próbki mokre przed ucieraniem były suszone w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Otrzymana mąka służyła do badań zarówno w podczerwieni jak i w świetle widzialnym. Czystą skrobię z nasion otrzymano na podstawie metody opisanej w artykule Czuchajowska 2005.

### **Spektroskopia w podczerwieni**

Badanie ilości enzymów alfa-amylazy zostało przeprowadzone przy użyciu dwuwiązkowego spektrofotometru Specord M80 firmy Carl Zeiss Jena wyposażonego w kartę umożliwiającą transfer danych do komputera firmy Medson.

W celu przygotowania pastylek do pomiarów w spektrofotometrze, 3 mg mąki z danej serii próbek mieszano z 200 mg wcześniej wysuszonego bromku potasowego – KBr (suszenie w temperaturze 130°C przez co najmniej 48h). Mieszaninę wsypywano do tabletkarki i poddawano ciśnieniu 90 MPa przez 180s w prasie hydraulicznej. Tabletkarka i prasa hydrauliczna wykonane zostały w Zakładzie Fizyki, Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie. Otrzymane pastylki przechowywano w eksykatorze do czasu pomiaru w celu ochrony przed wilgocią. Dla każdej serii próbek wykonane zostały 3 pastylki. Pomiarów wykonywano przy użyciu referencyjnej pastylki wykonanej z czystego KBr.

### **Spektroskopia w świetle widzialnym**

Badanie aktywności enzymów alfa-amylazy wykonywano poprzez pomiar ilości związków skrobi z jodem mierząc absorpcję światła w zakresie 450 do 750 nm. W literaturze metoda ta znana jest jako pomiar wielkości „blue value” skrobi (Tsivunchyk 2003).

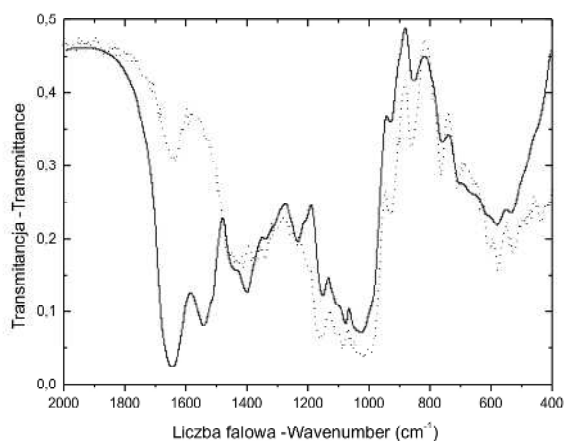
W celu przygotowania próbek do pomiarów najpierw sporządzono roztwory bazowe wsypując do kolb miarowych 200 mg mąki z danej serii próbek i dolewając 2 ml czystego etanolu. Próbkę mieszano w celu uzyskania jednorodnej zawiesiny. Następnie dodawano 10 ml roztworu NaOH w wodzie o stężeniu 1 N i ponownie mieszano. Otrzymany roztwór odstawiono w ciemne miejsce na co najmniej godzinę w celu uzyskania jednorodnego żelu. Roztwór uzupełniano 85 ml wody destylowanej i ponownie pozostawiono w ciemnościach co najmniej na godzinę. Dobrze przygotowany roztwór był przezroczysty i nie zawierał żadnych zanieczyszczeń z mąki.

Próbki do pomiarów otrzymywano poprzez wlanie do kolb miarowych 4,5 ml roztworu bazowego, 50 ml wody i 1 ml roztworu HCL 0,5N w wodzie. Następnie dodawano 4 ml płynu lugola rozcieńczonego w wodzie w stosunku 1:20. Otrzymane w ten sposób roztwory miały kolor ciemnoniebieski. Zabarwienie roztworu było wynikiem pojawienia się związków skrobi z jodem.

Pomiary ekstynkcji w zakresie od 500 do 700 nm wykonywano przy użyciu spektrofotometru Specord M40 firmy Carl Zeiss Jena również wyposażonego w kartę firmy Medson umożliwiającą przesyłanie danych do komputera. Pomiarów wykonywano w kuwetach o grubości 1 cm.

## WYNIKI I DYSKUSJA

Na rysunku 1 przedstawiono porównanie widma transmisji światła w zakresie podczerwieni dla czystej skrobi otrzymanej z nasion pszenżyta oraz enzymu alfa-amylazy (SDBS 2007). Można zauważyć znaczne zróżnicowanie natężeń linii widmowych dla liczb falowych 1650, 1548, 1404 i 680  $\text{cm}^{-1}$  (odpowiednio 6060, 6460, 7120 i 14700 nm). W szczególności zauważalny jest brak linii widmowej w skrobi dla 6460 nm. Istniejące różnice można wykorzystać w celu określenia ilości enzymu występującego w mące nasion pszenżyta.



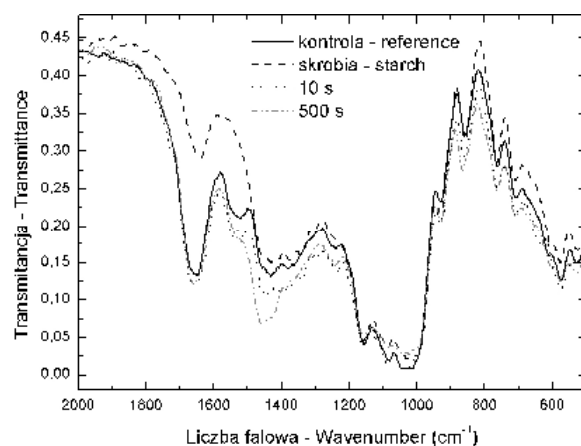
**Rys. 1.** Widmo transmisji podczerwieni przez skrobię uzyskaną z nasion pszenżyta – linia kropkowana – i przez alfa-amylazę (SDBS 2007) – linia ciągła

**Fig. 1.** IR transmission spectrum of pure triticale starch – dotted line – and alpha-amylase (SDBS 2007) – solid line

W trakcie badań zmierzono widmo transmisji światła podczerwonego dla wcześniej przygotowanych próbek. Dla próbek naświetlanych przez 10 i 500 s, dla nasion kontrolnych, oraz czystej skrobi wykonano pomiary dla trzech różnych pastylek. Wyniki uśredniono w celu eliminacji przypadkowych błędów pomiarowych.

Na rysunku 2 pokazane jest widmo w zakresie od 500 do 2000  $\text{cm}^{-1}$  dla próbek suchych. Dla długości fali światła odpowiadającej liczbie falowej 1548  $\text{cm}^{-1}$  można zauważyć znaczne różnice w natężeniu linii widmowych w zależności od rodzaju próbki. Podobna sytuacja występuje dla linii 1404 i 680  $\text{cm}^{-1}$ . Przyjmując, że stosunek natężeń poszczególnych linii widmowych odpowiada stosunkowi ilości enzymu, nasiona stymulowane światłem zawierają większe ilości alfa-amylazy niż próbka kontrolna. Istnieją także różnice pomiędzy pomiarami dla różnych czasów naświetlania. Nasiona naświetlane dłużej wytworzyły większą

ilość enzymów. Ponieważ alfa-amylaza jest podstawowym czynnikiem katalicznym przy rozkładzie skrobi, zapoczątkowującym jej rozkład, zwiększona ilość tego enzymu może przyspieszyć kiełkowanie nasion i wzrost siewek.



**Rys. 2.** Widmo transmisji podczerwieni przez próbki „suche” z nasion stymulowanych światłem i próbki kontrolne w zakresie od 500 do 2000  $\text{cm}^{-1}$ : linia ciągła – próbka kontrolna (nasiona nienaświetlane); linia przerywana – czysta skrobia otrzymana z nasion pszenżyta; linia wykropkowana – nasiona naświetlane przez 10 s; linia przerywano-kropkowana – nasiona naświetlane przez 500 s

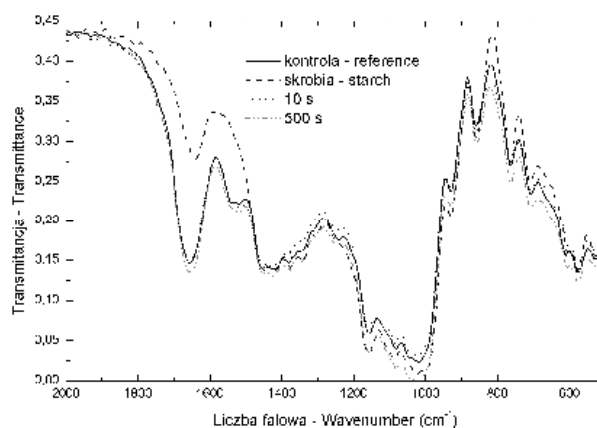
**Fig. 2.** IR transmission spectrum of illuminated “dry” samples and reference samples (500-2000  $\text{cm}^{-1}$ ): solid line – reference sample (not illuminated); dashed line – starch from triticale seeds; dotted line – seeds illuminated for 10 s; dashed-dotted line – seeds illuminated for 500 s

W próbkach „mokrych” (rys. 3), czyli takich, w których nasiona były wysiewane na mokrych bibułach w szalkach Petriego, w okresie pomiędzy naświetlaniem a pomiarami rozpoczęty został proces kiełkowania. W części nasion (około 10%) widoczne były kiełki. Proces kiełkowania miał istotny wpływ na zmianę ilości alfa-amylazy. Dla widm na rysunku 3 widzimy dużo mniejsze różnice w natężeniu linii widmowych, ale efekt w dalszym ciągu jest zauważalny. Efekt dla czasu naświetlania 500 s jest dużo większy niż dla 10 s.

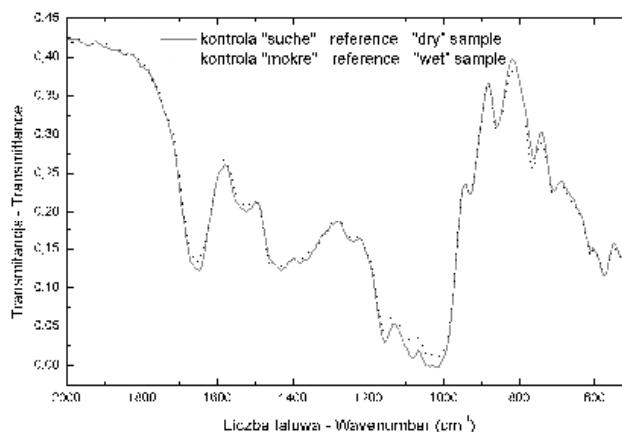
Porównując widma kontrolne dla próbek suchych i mokrych (rys. 4) możemy także zauważyć różnice w absorpcji promieniowania przez próbki. Dla długości fal światła 6060 i 6460 nm (dwie pierwsze pokazane linie absorpcyjne w alfa-amylazie) absorpcja w próbkach mokrych jest mniejsza. Może to być wynikiem wykorzystania amylazy w procesie kiełkowania.

Na rysunkach 5 i 6 pokazane są pomiary dla zakresu długości fal od 2500 do 4000 nm dla próbek suchych i mokrych. Dobrze widoczna linia absorpcyjna w okolicach 3400  $\text{cm}^{-1}$  (2940 nm) związana jest z oddziaływaniem światła z wiązaniami O-H substancji chemicznych znajdujących się w preparatach. W próbkach

biologicznych największy wkład do tej linii ma woda. Możemy więc na podstawie tej linii określić ilość wody pochłanianej przez nasiona. Z wykresów widać, że zarówno dla próbek suchych jak i mokrych dla nasion naświetlanych przez 500 s mamy duże różnice w ilości wody w porównaniu do próbek kontrolnych.

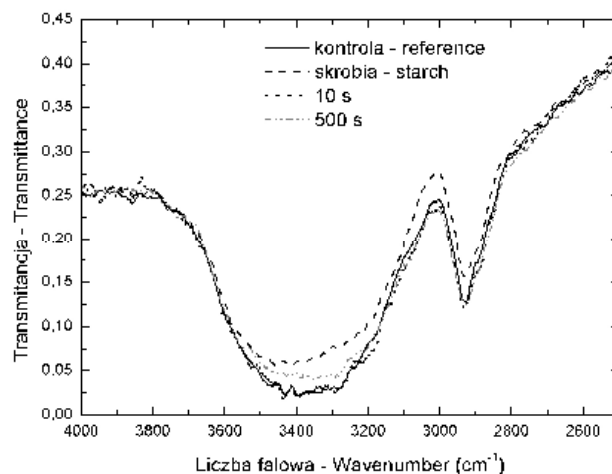


**Rys. 3.** Widmo transmisji podczerwieni przez próbki „mokre” z nasion stymulowanych światłem i próbki kontrolne w zakresie od 500 do 2000  $\text{cm}^{-1}$ : linia ciągła – próbka kontrolna (nasiona nienaświetlane); linia przerywana – czysta skrobia otrzymana z nasion pszenżyta; linia wykropkowana – nasiona naświetlane przez 10 s; linia przerywano-kropkowana – nasiona naświetlane przez 500 s  
**Fig. 3.** IR transmission spectrum of the illuminated “wet” samples and reference samples (500-2000  $\text{cm}^{-1}$ ): solid line – reference sample (not illuminated); dashed line – starch from triticale seeds; dotted line – seeds illuminated for 10 s; dashed-dotted line – seeds illuminated for 500s

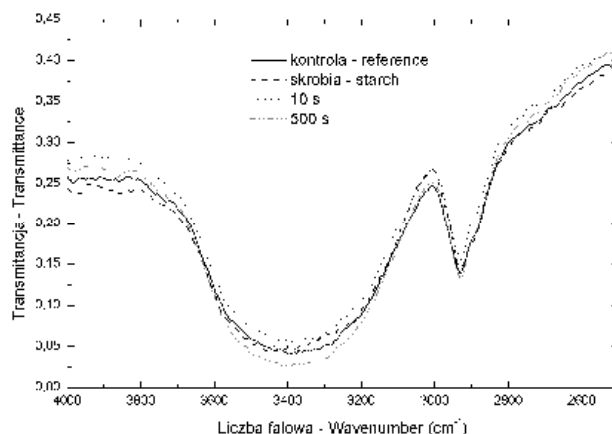


**Rys. 4.** Porównanie widm referencyjnych dla próbek „mokrych” (linia wykropkowana) i „suchych” (linia ciągła)

**Fig. 4.** Spectrum comparison between “wet” (dotted line) and “dry” (solid line) reference samples



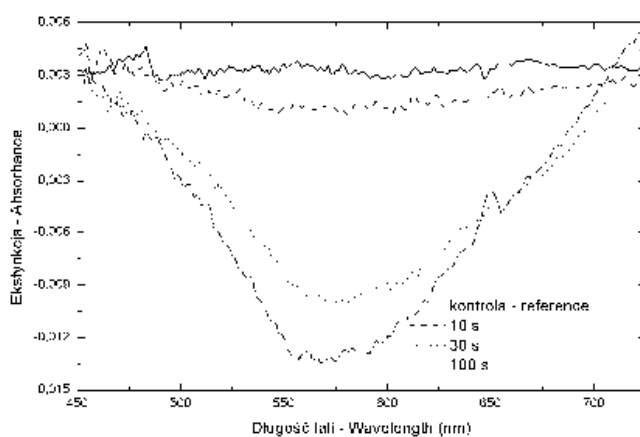
**Rys. 5.** Widmo transmisji podczerwieni przez próbki „suche” w zakresie od 4000 do 2500  $\text{cm}^{-1}$   
**Fig. 5.** IR transmission spectrum of the illuminated “dry” samples (4000-2500  $\text{cm}^{-1}$ )



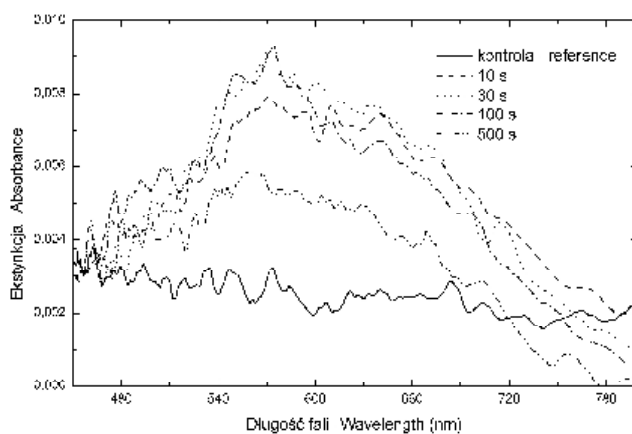
**Rys. 6.** Widmo transmisji podczerwieni przez próbki „mokre” w zakresie od 4000 do 2500  $\text{cm}^{-1}$   
**Fig. 6.** IR transmission spectrum of the illuminated “wet” samples and reference samples (4000-2500  $\text{cm}^{-1}$ )

W celu uzupełnienia wyników badań widm w podczerwieni przeprowadzono pomiary względnej różnicy ilości skrobi metodą pomiaru wielkości „blue value” czyli pomiaru absorpcji światła o długości fali 600 nm przechodzącego przez związki skrobi z jodem. Pomiary były wykonywane przy wykorzystaniu możliwości spektrofotometru do mierzenia różnicy transmisji światła przez próbkę referencyjną i materiał badawczy. Zarówno dla próbek suchych i mokrych jako

referencję użyto roztwór otrzymany z nienaświetlanych nasion. Wyniki pomiarów przedstawione są na rysunkach 7 i 8 odpowiednio dla próbek suchych i mokrych. Na podstawie linii referencyjnej możemy określić błędy pomiaru. W idealnych warunkach uzyskanym wynikiem pomiaru powinna być prosta. W obu przypadkach widzimy różnicę w porównaniu do pomiaru referencyjnego.



**Rys. 7.** Referencyjne widmo absorpcyjne dla próbek suchych  
**Fig. 7.** Absorption spectrum for the “dry” samples



**Rys. 8.** Referencyjne widmo absorpcyjne dla próbek mokrych  
**Fig. 8.** Absorption spectrum for the “wet” samples



## WNIOSKI

1. Badania wykazały możliwość zastosowania spektroskopii w podczerwieni oraz spektroskopii w świetle widzialnym do ilościowych badań wpływu światła na procesy zachodzące w nasionach (badanie zmian ilości i aktywności alfa-amylazy oraz ilości skrobi w nasionach).
2. Mierząc względne natężenia linii widmowych w widmie transmisji lub absorpcji podczerwieni możemy określić ilość enzymu alfa-amylaza w porównaniu do próbek kontrolnych.
3. Przewidywana stymulacja nasion światłem o długości fali 660 nm powoduje zwiększenie ilości enzymu alfa-amylazy w nasionach.

## PODZIĘKOWANIA

Dziękuję dr Zbyszkowi Karkuszewskiemu za udostępnienie spektrofotometru Speccord M80, dr hab. Barbarze Ścigalskiej za udostępnienie nasion oraz dr Mateuszowi Su-chankowi za staranne przeczytanie manuskryptu.

## PIŚMIENNICTWO

- Czuchajowska Z., Paszczyńska B., Nowotna A., Gambuś H., 2005. Wykorzystanie metody frakcjonowania do pozyskania glutenu i czystej skrobi z mąki pszenżytniej. *Acta. Sci. Pol., Technol. Aliment.*, 4(2), 17 – 24.
- Drozd D., Szajsner H., Bielecki K., 2003. Wpływ przedsewnej biostymulacji laserowej na aktywność alfa-amylazy w ziarniakach zbóż. II Międzynarodowa konferencja naukowa "Oddziaływanie pól elektromagnetycznych na środowisko rolnicze", Lublin 2003.
- Dziwulska A., Koper R., Wilczek M., 2004. Ocena wpływu światła lasera He-Ne na zdolność kiełkowania nasion koniczyny białej odmiany Anda. *Acta Agrophysica*, 3(3), 435-441.
- Karu T.I., 1988. Molecular mechanism of therapeutic effect of low-intensity laser radiation, *Laser Life Sci.*, 1988 (2), 53-74.
- Katańska A., Rybiński W., Broda Z., 2003. Wpływ światła lasera helowo-neonowego na adrogenezę wybranych odmian pszenżyta ozimego. *Acta Agrophysica*, 2 (3), 559-566.
- Makarska E., Michalak M., Wesołowska-Trojanowska M., 2004. Wpływ światła lasera na wartość siewną oraz poziom antyoksydantów wybranych odmian pszenicy ozimej. *Acta Agrophysica*, 4(2), 509-518.
- Mikos-Bielak M., Koper R., 2003. Wpływ biostymulacji laserowej nasion marchwi na właściwości sprężyste i wybrane składniki chemiczne korzeni. *Acta Agrophysica*, 2(4), 823-832.
- Podleśny J., 2002. Effect of laser irradiation on the biochemical changes in seeds and the accumulation of dry matter in the faba bean. *Int. Agrophysics*, 16(3), 209-213.
- Popp F.A., 1984. *Biologia światła*. Wiedza Powszechna, Warszawa 1992.
- Rybiński W., 2000. Influence of laser beams on the variability of traits in spring barley. *Int. Agrophysics*, 14(2), 141-147.
- SDBS, 2007. Spectral Database for Organic Compounds, free site organized by National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST).

- Starzycki M., Rybiński W., Starzycka E., Pszczoła J., 2005. Światło lasera jako fizyczny czynnik wspomagający odporność rzepaku ozimego na suchą zgniliznę roślin kapustnych. *Acta Agrophysica*, 5(2), 441-446.
- Szajsner H., 2003. Porównanie reakcji form jarych i ozimych pszenicy zwyczajnej na przedsięwną biostymulację laserową. *Acta Agrophysica*, 2(3), 639-643.
- Szajsner H., Drozd D., 2003. Możliwość zastosowania przedsięwnej biostymulacji laserowej do poprawy wartości siewnej wybranych odmian jęczmienia. *Acta Agrophysica*, 2(4), 851-856.
- Tsivunchyk O., 2003, Influence of low intensity laser radiation on different biological systems, praca doktorska. Philipps-Universität Marburg, Marburg/Lahn 2003.
- Wilczek M., Ćwintal M., Kornas-Czuczwar B., Koper R., 2006. Wpływ laserowej stymulacji nasion na plonowanie di- i tetraploidalnej koniczyny czerwonej w roku siewu. *Acta Agrophysica*, 8(2), 527-536.

#### DETERMINATION OF THE INFLUENCE OF MONOCHROMATIC LIGHT STIMULATION ON GERMINATION PROCESS OF TRITICALE SEEDS USING IR AND VIS SPECTROSCOPY

*Marek Jan Kasprowicz*

Department of Physics, University of Agriculture in Krakow  
Al. Mickiewicza 21, 31-120 Kraków  
e-mail: mjkasprowicz@tlen.pl

**Abstract.** The use of pre-sowing light stimulation of seeds to increase growth and improve the quality of cultivated plants has become popular in Poland. Unfortunately, most of the research describing stimulation effect of light is aimed at showing the final effect of biostimulation, without describing the inner biochemical processes in illuminated seed. Presented methods of research will show these processes as defined in a quantitative manner. The method of measurements of infrared transition spectrum through the samples of triticale seeds (Matejko 2005) is shown. The amount of alpha-amylase enzyme and the amount of starch in illuminated seeds is analysed compared to not illuminated ones.

**Key words:** alpha-amylase, laser stimulation, triticale, IR spectroscopy