Wstęp do działu „**Promieniowanie świetlne i barwniki”**

Autor - dr Anna Dzierżyńska

Światło ma **podwójną naturę**, ujawniając właściwości falowe i zachowując się jak strumień cząstek, które nazywamy fotonami.

Właściwością falową jest **długość fali świetlnej**. Światło białe jest widzialne dla człowieka w zakresie około 380 - 780nm. Zakres PAR jest nieco węższy i obejmuje promieniowanie, od długości fali 400nm do 700nm. Właściwością opisującą strumień fotonów jest **energia fotonu**, odwrotnie proporcjonalna do długości fali.

Cechy promieniowania PAR **ważne biologicznie** to ilość, jakość promieniowania, czas napromieniowania i kierunek padania światła.

Ilość promieniowania docierającego do roślin wyraża intensywność napromienienia PAR, która opisywana być może na dwa sposoby:

kwantowy - jako strumień fotonów z zakresu 400-700nm, padający na jednostkę powierzchni w jednostce czasu [µmole PAR m^{-2} s^{-1}]
energetyczny - jako energia niesiona przez fotony z zakresu 400-700nm, padająca na jednostkę powierzchni w jednostce czasu [W m^{-2}] gdzie wat W = J s^{-1}
Jakość promieniowania rozumiana jest jako długość fali i odpowiadająca jej barwa (fioletowa 400 - 450nm , niebieska 450 - 500nm, zielona 500-550nm, żółta 550-600nm, pomarańczowa 600 – 650nm, czerwona 650 – 700nm).

Czas napromienienia decyduje o sumarycznej ilości PAR pochłoniętej przez organy fotosyntetyczne roślin w ciągu doby i wpływa na tempo przyrostu biomasy.

Kierunek padania światła względem powierzchni blaszki liściowej wpływa na ilość pochłanianego promieniowania. Ma także znaczenie jako bodziec kierunkowy wywołujący ruchy roślin.

Radiacja słoneczna pełni w życiu roślin **różne funkcje**. W procesie fotosyntezy rolę energetyczną, ale oprócz tego spełnia także funkcje sygnalne w procesach fotomorfogenezy i ruchach roślin. Fotomorfogeneza to regulacja sposobu wzrostu i rozwoju roślin przez światło. Radiacja słoneczna jest także źródłem długofalowego promieniowania cieplnego. Nadmierne promieniowanie z zakresu ultrafioletu (UV) jak i PAR jest czynnikiem stresowym dla rośliny i może działać fotodestrukcyjnie. Nadmiar długofalowego promieniowania cieplnego może powodować stres termiczny. Pomiar ilości i jakości światła docierającego do roślin jest ważny zarówno ze względu na proces fotosyntezy i przebieg procesów wzrostu i rozwoju roślin.

Jakość światła do fotosyntezy determinowana jest właściwościami spektralnymi **barwników asymilacyjnych**. Barwniki asymilacyjne są odpowiedzialne za pochłanianie promieniowania elektromagnetycznego z zakresu **fotosyntetycznie czynnej radiacji (PAR**), jako energii do asymilacji dwutlenku węgla w procesie fotosyntezy. Barwniki asymilacyjne **absorbują radiację PAR w sposób selektywny**, w zakresie zależnym od rodzaju barwnika. Widmo optyczne inaczej spektrum promieniowania PAR to obraz uzyskany w wyniku rozłożenia światła na składowe monochromatyczne o różnych długościach fal (różnych barwach). Część widma PAR, odpowiadającą własnej barwie, barwniki odbijają i przepuszczają. Poznanie właściwości spektralnych barwników asymilacyjnych, wpływających na widmo promieniowania wykorzystywanego do fotosyntezy, ma istotne znaczenie przy doborze **źródeł światła** do sztucznego doświetlania roślin. Dostarcza też informacji o tym, jak absorpcja PAR przez listowie przyczynia się do zmiany składu spektralnego radiacji przepuszczonej przez listowie, **w selektywnym cieniu liści.** Zmiana

ilości i jakości lokalnej radiacji stosunku do pełnego oświetlenia otwartej przestrzeni obserwowana jest wewnątrz łanu roślin przy gruncie lub w dolnych warstwach lasu pod baldachimem koron drzew. Zaznacza się nawet w obrębie korony pojedynczego drzewa na zewnątrz i wewnątrz korony lub od strony południowej i północnej.

Barwniki asymilacyjne **zlokalizowane są** w błonach wewnętrznych chloroplastów, wchodząc w skład systemów zbierających światło. W roślinach wyższych występują barwniki asymilacyjne z dwóch grup strukturalnych: chlorofili i karotenoidów.

Podstawę cząsteczki **chlorofili** stanowi pierścień porfirynowy utworzony z czterech pierścieni pirolowych. W centrum cząsteczki znajduję się Mg^{2+} połączony wiązaniami koordynacyjnymi z dwoma atomami z pierścieni pirolowych i kowalencyjnie związany z dwoma z czterech atomów N. Pierścień porfirynowy jest połączony estrowo z fitolem- alkoholem 20-węglowym, jednowodorotlenowym, nadającym cząsteczce chlorofilu silnie hydrofobowy charakter. Chlorofil b ma przy drugim pierścieniu pirolowym, zamiast grupy metylowej występującej w chlorofilu a, grupę aldehydową. Chlorofile pełnią podstawową rolę w pochłanianiu PAR do fotosyntezy.

Karotenoidy, zwykle maskowane w liściach przez chlorofile, należą do tetraterpenoidów utworzonych z 4 jednostek izoprenowych. Pełnią w fotosyntezie rolę pomocniczą i ochronną w stosunku do chlorofili.

Widmo absorpcji promieniowania przez barwnik to zakres fal z całego widma światła, które pochłania dany rodzaj barwnika. Fale najlepiej pochłaniane wyznaczają maksima absorpcji. Chlorofil a różni się nieco pod względem widma absorpcji od chlorofilu b a karotenoidy różnią się widmem absorpcji od chlorofili. Długości fal przypadających na maksima absorpcji chlorofilu oznaczane w roztworze mogą się różnić w zależności od rodzaju zastosowanego rozpuszczalnika. Cząstki chlorofilu w kompleksach z białkami wykazują widmo absorpcji PAR dosyć znacznie różniące się od widma oznaczonego w roztworze.

Zdolność barwników asymilacyjnych **do pochłaniania światła** wiąże się z ich budową chemiczną. Naprzemienne występowanie wiązań pojedynczych i podwójnych w pierścieniu chlorofilu i łańcuchu karotenoidów wpływa na łatwość pochłonięcia kwantu promieniowania odpowiedniej długości fali i w efekcie wzbudzenia cząsteczki barwnika.

Stan wzbudzenia, polegający na obecności w cząsteczce barwnika elektronu wysokoenergetycznego, jest stanem bardzo nietrwałym. Powrót do podstawowego stanu energetycznego wiązać się może z przekazaniem energii wzbudzenia drogą **rezonansu magnetycznego** do kolejnej cząsteczki barwnika w antenie fotosyntetycznej a docelowo do centrum aktywnego fotosystemu. Może się także wiązać z wypromieniowaniem zwrotnym energii wzbudzenia w postaci świecenia i rozproszeniem w formie energii cieplnej. Oddając energię wzbudzenia w **formie fluorescencji** chlorofil świeci na czerwono. Pomiar wskaźników fluorescencji chlorofilu a stał się szybką, nie destrukcyjną, przyżyciową metodą pozwalającą na ocenę aparatu fotosyntetycznego roślin za pomocą przyrządów pomiarowych nazywanych **fluorymetrami.** Szczególnie szerokie zastosowanie pomiary fluorescencji chlorofilu znalazły w badaniach stanu fizjologicznego roślin w warunkach stresowych.

Cząsteczki chlorofilu a z centrum aktywnego fotosystemów, oddając wysokoenergetyczny elektron na przenośniki elektronów fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów i ulegając **utlenieniu**, kontynuują proces przemiany energii PAR w energię chemiczną ATP i potencjał redukcyjny NADPH w fazie fotochemicznej fotosyntezy. Nukleotydy **ATP i NADPH** są konieczne do asymilacji CO_2 w fazie biochemicznej fotosyntezy i z tego powodu nazywane są „siłą asymilacyjną”.

Zawartość barwników w liściach Zawartość barwników w liściach oznaczana jest **metodami** destrukcyjnymi i nieinwazyjnymi.

Oznaczanie ilości barwników w tkankach roślinnych ma zarówno aspekt naukowy jak i praktyczny. Wynika to z kilku powodów. Po pierwsze ilość zaabsorbowanej przez liść energii PAR jest w dużej mierze funkcją zawartości w liściu barwników asymilacyjnych, zatem niskie stężenia chlorofilu mogą bezpośrednio ograniczać intensywność fotosyntezy i zmniejszać pierwotną produkcję biomasy. Po drugie duża część azotu liściowego jest wbudowana w cząsteczki chlorofilu, stąd oznaczanie zawartości chlorofilu jest pośrednią miarą stanu odżywiania mineralnego rośliny azotem. Po trzecie zabarwienie liścia może być wskaźnikiem jego stanu fizjologicznego. W warunkach stresowych i w trakcie procesu starzenia zawartość karotenoidów generalnie zwiększa się a chlorofili zmniejsza. I w końcu po czwarte zawartość barwników i ich względne proporcje zmieniają się w zależności od warunków oświetlenia, na przykład w liściach z pełnego nasłonecznienia i z zacienienia, dostarczając informacji o oddziaływaniu środowiska na rośliny (Richardson, Duigan, Berlin, 2002. New Phytologist 153: 185–194).
Ilość chlorofilu w liściu wyrażana jest zwykle jako jego stężenie (np. mg Chl x g świeżej masy liścia) lub jako zawartość (np. µg Chl x cm^{-2}), w zależności od potrzeb. Stosuje się także przeliczenie stężenia lub zawartości chlorofilu na mole Chl na jednostkę masy lub powierzchni liścia, przyjmując masę cząsteczkową chla równą 892 a chlb równą 906.
Tradycyjne metody bezpośredniego pomiaru ilości chlorofilu w liściu wymagają ekstrakcji barwników za pomocą rozpuszczalników nie polarnych, co wiąże się ze zniszczeniem liścia, a następnie spektrofotometrycznego oznaczenia absorbancji roztworu i wyliczenia na tej podstawie zawartości chlorofilu za pomocą standardowych równań, opublikowanych w literaturze przedmiotu.

Nowe metody optyczne, oparte na pomiarze odbicia lub przepuszczenia światła przez nienaruszony liść, pozwalają na pomiar przyżyciowy, nie destrukcyjny. Dobrze sprawdzają się w warunkach masowych pomiarów polowych. Wynik takich pomiarów wyraża względną zawartość chlorofilu jako wskaźnik ilości chlorofilu w liściu.
Ręczne mierniki oparte na absorbancji promieniowania dokonują pomiaru absorbancji przez liść dwu długości fal, zwykle 660nm (czerwień) i 730nm lub 940 nm (bliska podczerwień). Fala czerwieni jest silnie absorbowana przez chlorofil a fala podczerwieni służy jako odniesienie i pozwala uwzględnić różnice w strukturze liścia.
Zdalnie mierzone wskaźniki odbicia są znacznie mniej dokładne niż mierzone miernikami ręcznymi . Największą dokładność stwierdza się dla wskaźnika Chl NDI (Richardson, Duigan, Berlin, 2002. New Phytologist 153: 185–194) .

Flawonoidy nie biorą udziału w absorpcji światła do fotosyntezy. Jest to grupa barwnych związków organicznych metabolizmu wtórnego roślin o żółtym kolorze (flavus z łaciny oznacza żółty). Te polifenole ($C_6C_3C_6$), zawierające szkielet węglowy flawonu, pełnią **różną rolę fizjologiczną**.
Rola fizjologiczna flawonoidów może być związana z funkcją barwnego **atraktanta** w płatkach kwiatów, przywabiającego organizmy zapylające. Do tej grupy związków należą m.in. czerwone, niebieskie i purpurowe barwniki antocyjanowe.
Flawonoidy pełnią funkcję **komunikacyjną** w nawiązaniu kontaktu rośliny motylkowej z bakteriami symbiotycznie wiążącymi azot atmosferyczny.
Funkcja **ochronna** flawonoidów jako filtru przeciw szkodliwemu promieniowaniu UV wynika z absorpcji promieniowania w tym zakresie.
Niektóre flawonoidy hamują aktywność chorobotwórczą patogenów i odgrywają istotną rolę antyoksydacyjną. Mogą być toksyczne dla owadów i zabezpieczać rośliny przed szkodnikami. Odgrywają zatem rolę w reakcjach **obronnych** roślin w warunkach stresowych.