

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Luka JAN

**BLIŽNJE ELEKTRIČNO POLJE KOT KAZALNIK
FIZIOLOŠKEGA STANJA
PRI FIŽOLU (*Phaseolus vulgaris*)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**NEAR ELECTRIC FIELD AS A MONITOR
OF PHYSIOLOGICAL STATE
OF COMMON BEAN (*Phaseolus vulgaris*)**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega dodiplomskega študija biologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Vse raziskave so bile opravljene na inštitutu BION, Inštitutu za bioelektromagnetiko in novo biologijo d.o.o. v Ljubljani.

Komisija za dodiplomski študij, oddelka za biologijo je dne 18.9.2008 odobrila diplomsko delo z naslovom Bližnje električno polje kot kazalnik fiziološkega stanja pri fižolu (*Phaseolus vulgaris*). Za mentorja je bil imenovan prof. dr. Igor Jerman, za somentorja pa prof. dr. Marjana Regvar.

Mentor: prof. dr. Igor Jerman

Somentor: prof. dr. Marjana Regvar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Marina Dermastia
Nacionalni inštitut za biologijo in
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Barbara Vilhar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Igor Jerman
Inštitut BION d.o.o.

Član: prof. dr. Marjana Regvar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 13.10.2008

To diplomsko delo je plod lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo diplomskega dela v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je diplomsko delo, ki sem ga oddal v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Luka Jan

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	581.1:537.212(042.2)=163.6
KG	elektromagnetno polje / bližnje električno polje / fiziološko stanje / <i>Phaseolus vulgaris</i> / fižol
AV	Jan Luka
SA	Jerman Igor (mentor) / Regvar Marjana (somentor)
KZ	SI- 1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2008
IN	BLIŽNJE ELEKTRIČNO POLJE KOT KAZALNIK FIZIOLOŠKEGA STANJA PRI FIŽOLU (<i>PHASEOLUS VULGARIS</i>)
TD	Diplomska naloga (Univerzitetni dodiplomski študij)
OP	XI, 46 str., 6 pregl., 15 sl., 4 pril., 40. vir.
IJ	sl
JJ	sl / en
AI	V diplomski nalogi smo ugotavljali povezave med absorbcijo, transmisijo in emisijo (ATE) bližnjega električnega polja in fiziološkim stanjem fižola (<i>Phaseolus vulgaris</i>). Za merjenje ATE smo uporabili metodo EMADDEL, po kateri je mlada rastlina delovala kot posrednik med oddajnim sistemom, ki je bil vir zunanega bližnjega električnega polja in med detekcijskim sistemom, ki je oddano bližnje električno polje organizma prestregel oz. izmeril. Primerjali smo vrednosti ATE kontrole in rastlin izpostavljenih temperaturnemu stresu. Rastline smo za 40 min izpostavili 42 °C in primerjali vrednosti ATE pred, takoj po in 40 min po izpostavitvi stresu. Vrednosti ATE so se tekom dni spreminjale, nekoliko višje vrednosti ATE smo izmerili pri rastlinah izpostavljenih temperaturnemu stresu. Neparametrična Kruskal – Wallis ANOVA je pokazala statistično značilne razlike med skupinama, analiza pa je izpostavila tudi značilne razlike med meritvami znotraj iste skupine kar kaže na nezanesljivost rezultatov. Približno 50% razlike med skupinama je bilo na račun razlik med samimi rastlinami znotraj skupine, ostalo razliko pa lahko dejansko pripišemo razliki med skupinama. Korelacija ATE od premera stebela živih rastlin je bila izredno nizka ($k = 0,13$), to pa je bistveno drugače od opažene korelacije med ATE in premerom neživih objektov ($k = 0,94$) zato ugotavljamo, da se živi organizmi aktivno odzivajo na bližnje električno polje in bi metoda ob ustrezni izpopolnitvi postopka lahko bila primerna za ugotavljanje fiziološkega stanja rastlin.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN dn
 DC 581.1:537.212(042.2)=163.6
 CX electromagnetic field / near electric field / physiologic state / *Phaseolus vulgaris* / common bean
 AU Jan Luka
 AA Jerman Igor (supervisor) / Regvar Marjana (co-supervisor)
 PP SI- 1000 Ljubljana, Večna pot 111
 PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of biology
 PY 2008
 TI NEAR ELECTRIC FIELD AS A MONITOR OF PHYSIOLOGICAL STATE OF COMMON BEAN (*PHASEOLUS VULGARIS*)
 DT Graduation Thesis (University studies)
 NO XI, 46 p., 6 tab., 15 fig., 4 ann., 40. ref.
 LA sl
 AL sl / en

AB In my graduation thesis we've compared near electric field absorption, transmission and emission (ATE) of common bean (*Phaseolus vulgaris*) with plants physiological state. ATE measurements were done by special method named EMADDEL, by which the plant acts as the mediator between the emitting system, which acted as a source of near electric field and detection system which detected and measured the emitted near electric field by the organism. We compared ATE values of two groups of plants. One was the control and the other group was exposed to 42 °C for 40 min. ATE measurements were taken before right after and 40 min after applying high temperature stress. We've found higher ATE values of stress plants. Nonparametric Kruskal-Wallis ANOVA showed significant differences between both groups and also significant differences between measurements inside each group. This fact considerably reduced our certainty in results. Approximately 50% of the differences between groups can be attributed to difference between plants within the same group and about the same contribution can be attributed to actual differences between groups. Correlation coefficient between ATE and stems diameter was very small ($k = 0,13$), especially if we compare it to the correlation coefficient between ATE and diameter of inanimate objects which was almost 1 ($k = 0,94$). This led us to believe that organisms actively respond to near electric field, so this method could be useful for determining physiological status of plants if some critical changes and modifications of the technique are made.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1. UVOD	1
1.1 DELOVNE HIPOTEZE	1
2. PREGLED OBJAV	2
2.1 ELEKTROMAGNETNO VALOVANJE	2
2.1.1 Osnovni fizikalni parametri	2
2.1.2 Energija EM valovanja	3
2.1.3 Valovna koherenca	4
2.2 BLIŽNJE POLJE	5
2.3 INTERAKCIJE ZUNANJEGA EM VALOVANJA Z ORGANIZMI	6
2.3.1 Električno polje	7
2.3.2 Magnetno polje	7
2.3.3 Elektromagnetno polje	8
2.3.4 Atermalni učinki EM valovanja v bioloških sistemih	8
2.3.4.1 Vplivi na rastline	9
2.4 TEORIJE ENDOGENIH EM POLJ	12
2.4.1 Fröhlichova teorija koherentnih oscilacij	12
2.4.2 Kvantna teorija polja milanske skupine	13
2.4.3 Ultrašibka bioluminiscenca in biofotonsko polje	13
2.5 POSKUSNI OBJEKT IN ONTOGENEZA	15
2.6 STRES	16
2.6.1 Temperaturni stres	16
3. MATERIALI IN METODE	18
3.1 PRIPRAVA RASTLIN	18
3.2 OPIS EKSPERIMENTA	18
3.2.1 Razmere med eksperimentom	18
3.2.2 Merjenje ATE bližnjega električnega polja	19
3.2.2.1 Eksperimentalni sistem	19
3.2.2.2 Protokol meritev	21

3.2.3	Anatomske značilnosti	22
3.2.4	Mase rastlin ob koncu poskusa	22
3.2.5	Merjenje ATE neživih objektov	22
3.3	ANALIZA PODATKOV	24
4.	REZULTATI	25
4.1	MERITVE ATE BLIŽNJEGA ELEKTRIČNEGA POLJA RASTLIN	25
4.1.1	Razmere tekom poskusa	25
4.1.2	Normiranje vrednosti ATE s premerom stebila rastline	25
4.1.3	Časovno spreminjanje ATE pri mladih rastlinah	27
4.1.4	Primerjava faz skupin znotraj enega dne	29
4.1.4.1	Neparametrični test	29
4.1.4.2	ANOVA	30
4.1.5	Delež variance meritve ATE z vgnezdano ANOVO	31
4.2	SVEŽA IN SUHA MASA RASTLIN	34
4.3	MERITVE ATE NEŽIVIH OBJEKTOV	36
5.	RAZPRAVA IN SKLEPI	37
5.1	RAZPRAVA	37
5.1.1	Razmere med poskusom	37
5.1.2	Vrednosti ATE živih in neživih objektov	37
5.1.3	Vpliv fiziološkega stanja na vrednost ATE rastlin	37
5.1.4	Vpliv toplotnega stresa na rastline	39
5.1.5	Komentar k uporabljeni metodi	39
5.2	SKLEPI	40
6.	POVZETEK	41
7.	VIRI	43
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Osnovne količine EM valovanja in pripadajoče enote	4
Preglednica 2: Spekter elektromagnetnega valovanja (Prirejeno po: Giancoli, 2000: 798; Popp, 1994; Electromagnetic radiation..., 2008)	6
Preglednica 3: Primerjava faze K1 in faze S1 s t-testom za neodvisne vzorce po posameznih dneh.....	28
Preglednica 4: Kruskal – Wallis ANOVA – primerjava posameznih faz znotraj dneva	29
Preglednica 5: Rezultati Welch ANOVA po posameznih dneh.	31
Preglednica 6: Vgnezdena ANOVA – deleži variance.....	32

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema eksperimentalnega sistema; prirejeno po Škarja in sod. (2005).	20
Slika 2: Vezje vhodne stopnje (visokoupornostna predojačevalna stopnja); prirejeno po Škarja in sod. (2008).....	21
Slika 3: Primer izpisa vrednosti signala (napetost na senzorju v času).	23
Slika 4: Vrstni red opravljenih meritev na rastlinah po fazah.	23
Slika 6: Odvisnost izmerjenega signala ATE bližnjega električnega polja od premera stebela rastline.	26
Slika 7: Povprečna normirana vrednost ATE po fazah za vsak dan meritev.	27
Slika 8: Povprečna normirana vrednost ATE za vsak dan meritev.	28
Slika 9: Okvirji z ročaji za normirane vrednosti ATE po fazah.	30
Slika 10: Deleži variance normirane meritve ATE po metodi vgnezdene ANOVE a.	32
Slika 11 Deleži variance normirane meritve ATE po metodi vgnezdene ANOVE b.	33
Slika 12: Deleži variance normirane meritve ATE po metodi vgnezdene ANOVE c.	33
Slika 13: Okvirji z ročaji po skupinah za svežo maso rastlin.	34
Slika 14: Okvirji z ročaji po skupinah za suho maso rastlin.	35
Slika 15: Povprečne izmerjene vrednosti ATE v odvisnosti od višine kartonastih kvadrov iz 1 do 10 kartonskih plošč	36

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Premeri stebel rastlin

PRILOGA B: Povprečja normiranih vrednosti ATE po faza

PRILOGA C: Sveža in suha masa rastlin ob koncu eksperimenta

PRILOGA D: Vrednosti mase, višine in ATE kartonskih kvadrov

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AC – izmenični tok
A/D – izmenični tok / enosmerni tok
ATE – absorbcija, transmisija in emisija bližnjega električnega polja skozi organizem
B – magnetna indukcija ali gostota magnetnega polja
CD – koherentna domena
D – električna indukcija ali gostota električnega polja
DC – enosmerni tok
DNK – deoksiribonukleinska kislina
E – električno polje ali jakost električnega polja
En - energija
EHF – ekstremno visoke frekvence
ELF – ekstremno nizke frekvence
EM – elektromagnetno
F – sila
GA – Golgijev aparat
h – Planckova konstanta ($h = 4,1 \cdot 10^{-15} \text{ eV s}$)
H – magnetno polje
HF – visoke frekvence
IR – infrardeče valovanje
j – gostota električnega toka
LF – nizke frekvence
IL – longitudinalna koherentna dolžina
IT – transverzalna koherentna dolžina
LW – dolgi valovi
MF – srednje frekvence
MW – mikrovalovi
p - verjetnost
PSI – fotosistem 1
PSII – fotosistem 2
q – električni naboj
RF – radijski valovi
RNK – ribonukleinska kislina
RZV – relativna zračna vlažnost
s – dotok metabolne energije
S – gostota elektromagnetnega pretoka
SD – standardna deviacija
SE – standardna napaka

SHF – super visoke frekvence

SLF – super nizke frekvence

u – gostota energije elektromagnetnega polja

UHF – ultra visoke frekvence

ULF – ultra nizke frekvence

UV – ultravijolično valovanje

v - hitrost

VHF – zelo visoke frekvence

VLf – zelo nizke frekvence

ε – dielektričnost snovi

ε_0 – influenčna konstanta praznega prostora ($\varepsilon_0 = 8,8 \cdot 10^{-12} \text{ C}^2 \text{ N}^{-1} \text{ m}^{-2}$)

λ – valovna dolžina

μ – magnetna permeabilnost snovi

μ_0 – induksijska konstanta ($\mu_0 = 4\pi \cdot 10^{-7} \text{ Vs A}^{-1} \text{ m}^{-1}$)

v – frekvenca valovanja

σ – prevodnost snovi

τ_c – koherenčni čas

1. UVOD

Do danes obstaja veliko dokazov o vplivu zunanjih elektromagnetnih (naravnih ali tehnogenih) polj na organizme in o nastanku elektromagnetnih polj v živih organizmih. Za nas je pomembno, da spoznamo mehanizme vplivov EM valovanja na žive sisteme in morebitne škodljive učinke izpostavitve tovrstnim sevanjem, ki je v sodobnem svetu vse večja (Hyland, 2003a). Pri tem se je pokazalo, da je večino netermalnih učinkov vezanih na žive sisteme in verjetno ne gre za pojave izključno fizikalne narave. Raziskave zadnjih let namreč kažejo, da imajo organizmi izrazit endogeni elektromagnetni značaj (Liboff, 2004), saj vsebujejo polarne biološke molekule, ione, nabite skupine in delokalizirane elektrone/protone, ki omogočajo nastanek lokalnih električnih in EM polj. V zadnjem času se kopičijo teoretični in empirični dokazi, da omenjene lastnosti organizmov pod določenimi pogoji rezultirajo v nastanku koherentnih endogenih polj na nivoju celotnega organizma in bi naj služili kot mediatorji za povezavo med organizmom in okoljem, komunikacijo posameznih organizmov med sabo in nudili osnovo pri komunikaciji organizma z njegovimi fiziološkimi sistemi (Bischof, 1994).

Z metodo, ki bi nam dala podatke o endogenem polju, bi lahko dobili informacije o fiziološkem stanju organizma. V pričujoči diplomski nalogi smo preverjali možnost ugotavljanja fiziološkega stanja organizma z meritvami absorpcije bližnjega električnega polja v organizmih. Predpostavljamo, da bližnje električno polje interagira z endogenim elektromagnetnim poljem na način, ki ni odvisen le od klasičnih fizikalnih parametrov absorpcije, ampak tudi od fizioloških stanj organizma. Metodo so razvili na Inštitutu Bion, in jo razvijajo naprej. Uporabili so jo že pri ljudeh in živalih (*Tenebrio molitor*). V tej diplomski nalogi smo to metodo prvič uporabili za določanje fizioloških stanj na rastlinah, za poskusni objekt smo uporabili navadni fižol (*Phaseolus vulgaris*).

1.1 DELOVNE HIPOTEZE

Živa materija, ki jo prežema endogeno elektromagnetno polje, se na različne načine (atenuacija, absorpcija, transdukcija, emisija) aktivno odziva na zunanja EM polja, ki so lahko bodisi okoljski EM šum ali pa dodaten vir EM sevanja s točno določenimi parametri (ki po jakosti ne presega okoljskih EM polj).

Spremembe fizioloških stanj rastline do določene mere vplivajo na ta aktiven odziv.

2. PREGLED OBJAV

2.1 ELEKTROMAGNETNO VALOVANJE

2.1.1 Osnovni fizikalni parametri

EM valovanje lahko opišemo s štirimi vektorskimi polji: E, D, B in H (Popp, 1994):

E je električno polje (ali jakost električnega polja) in izvira iz električnega naboja. V električnem polju deluje na mirujoči naboj q električna sila $\vec{F}_e$ (Popp, 1994):

$$\vec{F}_e = q \vec{E} \quad \dots(1)$$

V snovi električno polje povzroči polarizacijo in tok prostih nabojev. Gostota električnega toka $\vec{j}$ je odvisna od prevodnosti snovi σ (Popp, 1994):

$$\vec{j} = \sigma \vec{E} \quad \dots(2)$$

D je električna indukcija in opisuje sposobnost E, da loči pozitivne in negativne naboje v snovi. Odvisna je od dielektričnosti snovi ϵ (Popp, 1994):

$$\vec{D} = \epsilon \vec{E} \quad \dots(3)$$

Gibajoči naboji ustvarja magnetno polje v katerem na gibajoče se naboje deluje magnetna sila $\vec{F}_m$ (Popp, 1994):

$$\vec{F}_m = q (\vec{v} \times \vec{B}) \quad \dots(4)$$

kjer je $\vec{v}$ hitrost naboja in $\vec{B}$ magnetna indukcija (ali gostota magnetnega polja). Magnetna sila je pravokotna na smer gibanja naboja in smer magnetne indukcije.

H je magnetno polje (ali jakost magnetnega polja) in je v snovi odvisno od magnetne permeabilnosti snovi μ (Popp, 1994):

$$\vec{H} = \frac{1}{\mu} \vec{B} \quad \dots(5)$$

Skupna sila, ki deluje na naboj q je vektorska vsota električne in magnetne sile (Popp, 1994):

$$\vec{F} = q (\vec{E} + \vec{v} \times \vec{B}) \quad \dots(6)$$

Maxwell je pokazal, da spreminjajoče električno polje ustvarja spreminjajoče magnetno polje in slednje ustvarja spreminjajoče električno polje. Tako dobimo elektromagnetno valovanje, ki se širi v prostor. Električna in magnetna komponenta sta v isti fazi, pravokotna druga na drugo in pravokotni na smer širjenja valovanja (Giancoli, 2000: 787 – 794).

Hitrost potovanja EM valov v praznem prostoru je enaka svetlobni hitrosti $3 \cdot 10^8 \text{ m/s}$, kar je bil eden glavnih dokazov, da je tudi svetloba EM valovanje (Giancoli, 2000: 787 – 797). V mediju z dielektričnostjo ϵ in magnetno permeabilnostjo μ je hitrost potovanja EM valovanja enaka (Giancoli, 2000: 800):

$$v = \frac{1}{\sqrt{\epsilon\mu}} \quad \dots(7)$$

2.1.2 Energija EM valovanja

Elektromagnetno valovanje prenaša energijo, ki je vezana na gibajoče električno in magnetno polje. Gostota energije elektromagnetnega polja u je enaka vsoti gostote energije električnega polja in gostoti energije magnetnega polja (Giancoli, 2000: 800):

$$u = \frac{1}{2} \epsilon_0 E^2 + \frac{1}{2} \frac{B^2}{\mu_0} \quad \dots(8)$$

kjer je ϵ_0 influenčna konstanta, μ_0 pa induksijska konstanta. Gostota energije nam pove koliko energije je shranjene v prostorninski enoti. Pogosto nas zanima tudi prenos energije v časovni enoti na enoto površine, kar izrazimo z gostoto elektromagnetnega pretoka S (Giancoli, 2000: 801):

$$S = \frac{1}{\mu_0} (E \times B) \quad \dots(9)$$

2.1.3 Valovna koherenca

EM valovanje je sestavljeno iz zaporedja sinusoidnih valovnih paketov s fiksno fazo in polarizacijo. Kljub enakim frekvencam posameznih paketov pa ti zaradi nekoreliranosti oscilatornih sistemov v viru niso v isti fazi in polarizacijski ravnini, tako, da EM valovanje ni monokromatsko. Zaradi interference, ki je lahko konstruktivna (povečanje amplitud) ali destruktivna (zmanjšanje amplitud) dobimo razpon valovnih dolžin (Δv) (Popp, 1994; Hyland, 2003a):

$$\Delta v = \frac{h}{\Delta t} \quad \dots(10)$$

kjer je Δt čas posameznega valovnega paketa in h Planckova konstanta.

Stabilnost oz. poravnanost posameznih valovnih paketov podamo s koherenco in jo lahko izrazimo s koherenčnim časom τ_c oz. z longitudinalno koherenčno dolžino l_L in transversalno koherenčno dolžino l_T . Koherenčni čas nam poda trajanje koherenčne stabilnosti od trenutka ko radiacija zapusti vir, longitudinalna koherenčna dolžina pa pove razdaljo od vira v smeri širjenja radiacije do katere je valovanje fazno stabilno. Transverzalna koherenčna dolžina nam pove do katere dolžine pravokotno na smer sevanja je valovanje fazno stabilno in je odvisna od velikosti vira sevanja transversalno na smer širjenja (a), razdalje od vira (d) in valovne dolžine (λ) (Hyland, 2003a).

Preglednica 1: Osnovne količine EM valovanja in pripadajoče enote

Simbol	Količina	Enota
q	Električni naboj	$C = As$
j	Gostota električnega toka	A/m^2
E	Električno polje	$N/C = V/m$
D	Električna indukcija (gostota električnega polja)	$As/m^2 = C/m^2$
H	Magnetno polje	$A/m = C/ms$
B	Magnetna indukcija (gostota magnetnega polja)	$T = Vs/m^2$
u	Gostota enrgije EM polja	J/m^3
S	Gostota EM pretoka	W/m^2
ν	Frekvenca valovanja	$Hz = s^{-1}$
λ	Valovna dolžina	m

2.2 BLIŽNJE POLJE

V bližini antene ali drugega vira EM valovanja se nahaja bližnje polje in ima drugačne lastnosti kot daljne polje, t.j. radiacijsko polje, ki se nahaja v večji oddaljenosti od vira EM valovanja (Giancoli, 2000: 793). Meja med bližnjim in radiacijskim poljem je v večji meri odvisna od valovne dolžine (Giancoli, 2000: 793) in je določena kot $\lambda/2\pi$. Dogovorno je doseg bližnjega polja 1λ (Capps, 2001).

Jakosti električnega in magnetnega polja, ki ga ustvarja električni dipol, so odvisne od naslednjih komponent (Capps, 2001):

$$E \sim \frac{1}{r}, \frac{1}{r^2}, \frac{1}{r^3} \quad \dots(11)$$

$$H \sim \frac{1}{r}, \frac{1}{r^2} \quad \dots(12)$$

Na razdalji $r \gg \lambda$ prevlada vpliv komponente $\frac{1}{r}$. Tu je realizirano daljne polje. Električno in magnetno polje sta v vsaki točki pravokotna eden na drugega in na smer širjenja elektromagnetne radiacije, sta v isti fazi in v dovolj veliki oddaljenosti od vira dobita obliko planarnih valov. Magnituda EM v daljnem polju pada sorazmerno z $\frac{1}{r}$ tako, da energija valovanja pada sorazmerno z $\frac{1}{r^2}$ (Giancoli, 2000: 793).

Na razdalji $r \ll \lambda$ od vira prevladujeta komponenti $\frac{1}{r^2}$ in $\frac{1}{r^3}$. Tu je realizirano bližnje polje, struktura EM polja je nelinearna in nehomogena. Električna in magnetna komponenta sta še vedno pravokotni ena na drugo, nista pa vedno pravokotni na smer širjenja in nista več v fazi ena z drugo (fazni zamik 90°). E je v fazi z naboji, H pa v fazi s tokom. Na nekaterih delih je polje pretežno električno in na drugih pretežno magnetno, razmerje med njima pa je odvisno od vira (Capps, 2001; Hyland, 2003a). Energija ostane ujeta v bližnjem polju in niha med virom in neposredno okolico. Če se v bližnjem polju nahaja prevoden objekt, le ta preko induktivnega in kapacitativnega prenosa absorbira energijo na račun oscilacijskega sistema (Hyland, 2003a).

2.3 INTERAKCIJE ZUNANJEGA EM VALOVANJA Z ORGANIZMI

Fizikalni parametri EM valovanja določajo njegove interakcije z živo materijo, pri čemer je najpomembnejši parameter frekvenca EM valovanja (ν) (Bistolfi, 1991: 153). Preglednica 2 prikazuje delitev EM spektra glede na frekvenco:

Preglednica 2: Spekter elektromagnetnega valovanja (Prirejeno po: Giancoli, 2000: 798; Popp, 1994; Electromagnetic radiation..., 2008)

ELF – ekstremno nizke frekvence, SLF – super nizke frekvence, ULF – ultra nizke frekvence, VLF – zelo nizke frekvence, LF – nizke frekvence, MF – srednje frekvence, HF – visoke frekvence, VHF – zelo visoke frekvence, UHF – ultra visoke frekvence, SHF – super visoke frekvence, EHF – ekstremno visoke frekvence, LW – dolgi valovi, RF – radijski valovi, MW – mikrovalovi, IR – infrardeče valovanje, UV – ultravijolično valovanje.

RAZRED		FREKVENCA	VALOVNA DOLŽINA	ENERGIJA FOTONA
LW	ELF	3 Hz – 3×10^1 Hz	100Mm – 10 Mm	12.4 feV – 124 feV
	SLF	3×10^1 Hz – 3×10^2 Hz	10 Mm – 1 Mm	124 feV – 1.24 peV
RF	ULF	3×10^2 Hz – 3×10^3 Hz	1 Mm – 100 km	1.24 peV – 12.4 peV
	VLF	3×10^3 Hz – 3×10^4 Hz	100 km – 10 km	12.4 peV – 124 peV
	LF	3×10^4 Hz – 3×10^5 Hz	10 km – 1 km	124 peV – 1.24 neV
	MF	3×10^5 Hz – 3×10^6 Hz	1 km – 100 m	1.24 neV – 12.4 neV
	HF	3×10^6 Hz – 3×10^7 Hz	100 m – 10 m	12.4 neV – 124 neV
	VHF	3×10^7 Hz – 3×10^8 Hz	10 m – 1 m	124 neV – 1.24 μ eV
MW	UHF	3×10^8 Hz – 3×10^9 Hz	1 m – 1 dm	1.24 μ eV – 12.4 μ eV
	SHF	3×10^9 Hz – 3×10^{10} Hz	1 dm – 1 cm	12.4 μ eV – 124 μ eV
	EHF	3×10^{10} Hz – 3×10^{11} Hz	1 cm – 1 mm	124 μ eV – 1.24 meV
IR		3×10^{11} Hz – $3,95 \times 10^{14}$ Hz	1 mm – 760 nm	1.24 meV – 1.63 eV
Vidna svetloba		$3,95 \times 10^{14}$ Hz – $7,69 \times 10^{14}$ Hz	760 nm – 390 nm	1.63 eV – 3,18 eV
UV		$7,69 \times 10^{14}$ Hz – 3×10^{16} Hz	390 nm – 10nm	3,18 eV – 124 eV
X - žarki		3×10^{16} Hz – 3×10^{19} Hz	10 nm – 10 pm	124 eV – 124 keV
γ - žarki		3×10^{19} Hz –	10 pm –	124 keV –

Narava interakcije EM valovanja in biološkega organizma je odvisna od energije, ki jo nosi posamezni foton valovanja in je sorazmerna s frekvenco ν (Bistolfi, 1991: 153):

$$E_n = h \nu \quad \dots(13)$$

kjer je E_n energija fotona in h Planckova konstanta.

Glede na količino energije, ki jo nosi foton, lahko EM valovanje razdelimo na ionizirno in neionizirno. Prvo ima dovolj energije, da izbije notranje ali zunanje elektrone iz molekule,

kar lahko povzroči hude poškodbe tkiva. V EM spektru so ionizirna sevanja poleg γ - in X-žarkov tudi zgornje območje ultravijoličnega sevanja. Vidna svetloba lahko spremeni energetska stanja zunanjih elektronov in običajno ni ionizirna (razen v fotosistemih). Ostali del EM spektra so neionizirna sevanja: IR valovi spremenijo vibracijsko stanje molekul, MW pa njihovo rotacijsko stanje (Bistolfi, 1991: 154).

Popp (1994) izpostavlja naslednje parametre, ki vplivajo na učinkovanje zunanjih EM polj na biološke sisteme: (1) postavitve biološkega sistema glede na polje, (2) katera komponenta deluje (električna ali magnetna ali obe), (3) amplituda polj, (4) frekvenca in faza, (5) gradient polja in (6) smer polarizacije. Že majhna sprememba kateregakoli od naštetih parametrov lahko dramatično spremeni biološki učinek. Ta izjemno širok spekter informacij omogoča visoko stopnjo regulacije v in med živimi sistemi in hkrati oteži sistematičnost, natančnost in ponovljivost raziskav elektromagnetnih interakcij.

2.3.1 Električno polje

Ob nizkih frekvencah električno polje ne vstopa globoko v tkivo. Biološki organizem je skoraj popoln prevodnik v primerjavi s suhim zrakom, zato se zunanje električno polje v okolici telesa popači, linije pa se postavijo pravokotno na površino telesa. (Polk, 1991).

Hyland (2003a) izpostavlja tri glavne posledice električnega polja v organizmih: inducira nastanek tokov prostih nabojev (J), ki je odvisno od prevodnosti tkiva (Enačba 2), povzroči polarizacijo vezanih nabojev in nastanek dipolov ter reorientacijo stalnih dipolov.

2.3.2 Magnetno polje

Magnetna permeabilnost tkiva (μ) je skoraj enaka magnetni permeabilnosti zraka, tako da magnetno polje prodira skozi organizem skoraj brez atenuacije (večina organskih substanc je diamagnetnih, nekatere železo vsebujoče molekule kot npr. hemoglobin pa so paramagnetne) (Polk, 1991).

Statično magnetno polje interagira z električnimi tokovi in magnetnimi momenti v organizmu (Hyland, 2003a), pri čemer je pomembna orientacija polja glede na smer toka, saj je sila, ki deluje na naboje, odvisna od kota med magnetnim poljem in smerjo toka (Enačba 4).

Oscilirajoče magnetno polje skladno s Faradayevim zakonom povzroči nastanek internega električnega polja, ki povzroči nastanek električnih tokov v tkivu (Popp, 1994).

2.3.3 Elektromagnetno polje

Absorbcija EM valovanja v tkivih je odvisna od frekvence in je zelo podobna absorpciji EM valov v vodi, ki narašča s frekvenco do prvega maksimuma v IR območju, sledi strm padec z zelo majhno absorpcijo v predelu vidne svetlobe in nato zopet doseže vrh v UV območju ter postopno pade z naraščajočo frekvenco ionizirajočega sevanja. (Bistolfi, 1991: 154, 155).

IR sevanje povečuje vibracijsko energijo molekul in vodi v neposredno segrevanje tkiv, MW in RF pa povečujejo rotacijsko energijo molekul in povzročajo posredno segrevanje preko dielektrične izgube, kjer notranja trenja med molekulami povzročijo razpršitev rotacijske energije v vibracijsko (Hyland, 2003a).

EM valovanje s frekvenco nižjo od 100 kHz in magnetna polja do 20 mT zaradi prešibke energije ne povzročajo temperaturnih sprememb tkiva (ICNIRP, 1998; Marino in Becker, 1977). Govorimo o atermalnih učinkih EM valovanja na tkiva. Do atermalnih učinkov pride tudi v primeru EM valovanj z višjo frekvenco in majhno intenziteto. Zanje je značilno, da učinke ne spremlja zaznaven dvig temperature in se jih ne da reproducirati s kakršnimi koli drugimi načini segrevanja. Pogosto so atermalni učinki celo nasprotni od učinkov klasičnega segrevanja (Hyland, 1998).

2.3.4 Atermalni učinki EM valovanja v bioloških sistemih

V nasprotju s termalnimi efekti imajo atermalni efekti resonančni značaj in tako izkazujejo visoko frekvenčno odvisnost (Hyland, 1998; Bistolfi, 1993: 105). Še več, ostrina resonančnega odgovora narašča z manjšanjem moči sevanja. Od termalnih učinkov se atermalni razlikujejo tudi po tem, da se učinki pojavijo šele po določenem času izpostavitve in samo, če presežemo prazno jakost dražljaja, sam odgovor pa ostaja relativno nespremenjen, če nato jakost dražljaja še povečujemo (Hyland, 1998).

Marino in Becker (1977) sta napravila obsežen pregled vplivov šibkih ELF EM sevanj na organizme. Med drugim omenjata raziskave Solov'eva iz leta 1967, ki je ugotovil, da je že nekajurna izpostavljenost 5 kV/cm pri 50 Hz letalna za miši in vinske mušice *Drosophila* sp., in vitro raziskave Riesena in sod., ki so pokazale, da izpostavitve možganskega tkiva piščancev in mačk sevanju 0,05 do 1 V/cm pri 1 do 75 Hz za 20 min statistično značilno zmanjša sproščanje kalcija iz tkiva v okoliški medij. Sevanje 1,55 V/cm pri 60 Hz je povzročilo popolno izgubo biokemijske funkcije mitohondrijev po 40 min. Marino in sod. (1976) so potrdili rezultate Knickerbockerja in sod. (1967), ko so tri zaporedne generacije miši kronično izpostavili 60Hz električnemu polju. Samci in samice

prve in druge generacije izpostavljene polju so bili manjši od kontrole (cit. po Marino in Becker, 1977). Marino je pokazal, da izpostavitve 150 V/cm pri 60 Hz za obdobje 1 meseca pri podganah povzroči različne značilne učinke, ki nakazujejo, da sevanje povzroča fiziološki stres na organizmu (zmanjšana telesna teža, manjša poraba vode, spremenjena vsebnost albumina in hidroksikortikosterona v serumu). Raziskavo je potrdil tudi Noval in sod., ki je podgane za 30 do 40 dni izpostavil 0,5 do 1 mV/cm pri 45 Hz (Marino, 1976b cit. po Marino in Becker, 1977).

Smith (1994) v pregledu vplivov šibkih EM sevanj na žive sisteme med drugimi navaja raziskave Devyatkova in sod. (1974), ki so ugotovili frekvenčno selektivne vplive na upad sinteze β -laktamaze v na penicilin odpornih sevih *E. coli* in *Staphylococcus aureus*. Frekvence, ki so vplivale na *S. aureus* niso imele vpliva na *E. coli* in raziskave Webba (1984), ki je v 25 letih raziskav izpostavitve kultur *E. coli* EM valovanjem od 59 GHz do 143 GHz pokazal vplive na stopnjo rasti in sintezo DNA, RNA ter proteinov, vsi pa so imeli frekvenčna okna in okna znotraj celičnega cikla.

Hyland (1998) navaja različne raziskave, kjer je prišlo do pozitivnih in negativnih vplivov na rast kulture *S. cerevisiae* pri 41 GHz in negativnih vplivov na rast *E. coli* pri 71 in 73 GHz. Pri kulturah *S. carlsbergensis* izpostavljenim MW je prišlo do sinhronizacije delitve celic, ugotovili so tudi frekvenčno, intenzitetno in časovno odvisnost indukcije kolicina in λ -profaga v lizogeni *E. coli*.

2.3.4.1 Vplivi na rastline

Prvi, ki je izvedel večje eksperimente o vplivu električnih polj na rastline je bil finski profesor fizike Karl Lemström. Opazil je, da je vegetacija na Arktiki kljub nizkim temperaturam in malo svetlobe zelena in vitalna. Ko je pogledal letni prirastek dreves je ugotovil, da je ta povečan v času največje aktivnosti severnega sija (aurora borealis) - takrat je v atmosferi največ šibkih električnih tokov. V številnih poskusih je nad polja obesil žico pod visoko napetostjo (električno polje je bilo okrog 10 kV/m) in v povprečju ugotovil 45% povečanje pridelka, rastline pa so bile bolj zelene in robustne od kontrol (Lemström, 1904 cit. po Goldsworthy, 2006).

Kasnejše raziskave Blackmana (1924) in Blackman in Legg (1924) (cit. po Goldsworthy, 2006) so pokazale, da je za efekte pomemben tok, ki se ob izpostavitvi električnemu polju, pojavi v rastlinah ječmena (*Hordeum vulgare*), pšenice (*Triticum aestivum*) in ovsa (*Avena sativa*). Tok med 10^{-11} in 10^{-8} A je stimuliral rast rastlin, večje vrednosti pa so povzročale poškodbe. Pri tem je pomembno poudariti, da je do stimulacije rasti prišlo v 14 od 18 primerov; Briggs (1926, cit. po. Goldsworthy, 2006) ni ugotovil nobenih efektov,

medtem ko je Murr (1963, cit. po Goldsworthy, 2006) opazil le bolj zeleno barvo izpostavljenih rastlin.

Pittmanove raziskave (1977) so pokazale, da izpostavitve semen ječmena (*Hordeum vulgare*) in pšenice (*Triticum aestivum*) magnetnemu polju pred sajenjem rezultira v večjih pridelkih, medtem ko izpostavitve semen ovsa (*Avena sativa*) ni imelo učinkov.

Goldsworthy (1996 cit. po Goldsworthy, 2006) predpostavlja, da rastline izkoriščajo močna elektrostatična polja kot signal za prihajajoče nevihte kar sproži sintezo novih proteinov v rastlini in pripravo na privzem vode in rast veliko prej, kot pa bi do tega prišlo šele ob signalu iz korenin. Schonland (1928 cit. po Goldsworthy, 2006) je pred nevihtami izmeril močna električna polja do 16 kV/m, kar povzroča podoben gradient kot že omenjeni poskusi na kulturah Lemströma in Blackmana. Podobne vplive na rastline dobimo tudi, če tkivne kulture stimuliramo z DC električnimi tokovi nekaj mikroamperov, kar kaže na mehanizme na celičnem nivoju (Goldsworthy, 2006). Glavni mehanizem bi naj bil spremenjen transmembranski potencial in odpiranje napetostno odvisnih kalcijevih kanalov na membrani, to pa bi sprožilo številne spremembe v celici in vplivalo na transkripcijo genov. To je še bolj očitno v primeru oscilirajočih EM polj, ki povzročijo tok ionov v in okoli celic, ki nato selektivno odstranjujejo kalcijeve ione. Kalcijevi ioni pomagajo stabilizirati celično membrano, v električnem polju jih na membrani lahko nadomestijo enovalentni ioni zaradi manjšega razmerja naboja proti masi (v glavnem kalijevi ioni). To pa povzroči nastanek por kar poveča prepustnost membrane. Ta se še poveča ob odprtju napetostno odvisnih kalcijevih kanalov (zaradi spremembe napetosti na membrani, ko organizem izpostavimo električnemu polju), kalcij, ki vstopi v celico pa sproži številne celične odgovore in spremeni metabolizem celice (Goldsworthy, 2006).

Selga in Selga (1996) sta odkrila vpliv RF EM polja (s frekvenco med 154 in 162 MHz) iz radarske postaje v Skrundi (Latvija) na rast in razvoj borovcev. Primerjala sta rastline na več lokacijah z različno izpostavljenostjo EM sevanju postaje, visoka količina sevanja je povzročila strukturne spremembe Golgijevega aparata (GA) ter vplivala na metabolizem, saj so v GA izpostavljenih dreves našli namesto prekurzorjev celične stene (lignini) povečano količino prekurzorjev smole, učinki pa so bili manjši pri manjši izpostavljenosti sevanju. Zaključila sta, da stres zaradi RF sevanja sproži nespecifični odgovor s povečano senescenco dreves in večjim izločanjem smole.

Freeman in sod. (1999) so primerjali liste iz soje (*Glycine max*) pod daljnovidni visoke napetosti. Listi v bližini daljnovoda so bili izpostavljeni pulzirajočemu magnetnemu polju od manj kot 0,3 do več kot 5 μT in so bili bolj asimetrični od listov rastlin 50 in 100 m stran od daljnovoda. Razlike niso bile posledica različnih velikosti rastlin ali napaki

meritve. Asimetrija kaže na razvojno nestabilnost oz. izpostavitve stresu, kar bi naj pokazala tudi raziskava Zvereve in sod. (1997 cit. po Freeman in sod., 1999), ki je ugotovila, da so listi na zunanjem delu krošnje *Ficus carica* bolj asimetrični kot listi v notranjem delu krošnje.

Monselise in sod. (2003) so vodno lečo (*Spirodela oligorrhiza*) v temi izpostavili šibkim sinusoidnim magnetnim poljem s frekvenco 60 in 100 Hz, kar je povzročilo akumulacijo alanina. Alanin je znan univerzalni signal za stres v rastlinah (anoksija, osmotski stres, ekstremne temperature, težke kovine). Ob dodatku vitamina C, ki uničuje radikale, se je proizvodnja alanina zmanjšala za 82%, kar nakazuje njihovo prisotnost ob stresu z šibkim magnetnim poljem. V odsotnosti magnetnega polja ni bilo produkcije alanina.

V znanstveni literaturi je moč zaslediti še številne vplive EM valovanj na žive organizme, vendar pa so rezultati pogosto medsebojno nasprotujoči ali pa neponovljivi (Poole, 1990 cit po Freeman in sod. 1999; Anderson, 1992 cit. po Freeman in sod., 1999). Razlog za različne rezultate pri poskusih z izpostavitvami EM poljem je lahko v mehanizmu preko katerega EM polja vplivajo na celice. Rezultati kažejo odvisnost od valovne dolžine, amplitude in faze (izenačenost faze EM polja s fazo celičnih oscilatorjev). Izenačitev faze je nekontroliran parameter, kar je lahko vzrok za včasih nasprotujoče si rezultate. (Kindzelskii in Petty, 1997 cit. po Freeman in sod., 1999; Kindzelskii in sod 1997 in 1998 cit. po Freeman in sod., 1999; Adachi in sod. 1998 cit. po Freeman in sod., 1999; Pettry 2000 cit. po Freeman in sod., 1999). Vpliv EM polja je sprememba oz. motnja biološkega sistema, ki povzroči prehod iz enega v drugo stanje (Marino in Becker, 1977) .

2.4 TEORIJE ENDOGENIH EM POLJ

2.4.1 Fröhlichova teorija koherentnih oscilacij

Herbert Fröhlich je v šestdesetih in sedemdesetih letih s teorijo endogenih koherentnih elektromagnetnih oscilacij v organizmu postavil teoretične osnove sodobnih konceptov endogenih polj (Jerman in Štern, 1999). V svoji teoriji je v organizmih predpostavil obstoj koherentnih oscilacij (elementi sistema oscilirajo v enakem ritmu in v isti fazi). Teorija izhaja iz treh bistvenih lastnosti živih sistemov: (1) so relativno stabilni in daleč od ravnotežja (metastabilno stanje), (2) kažejo kompleksen, nelinearen in dinamičen red in (3) imajo izredne dielektrične lastnosti, katerih osnova so močna električna polja čez membrano. Vse tri lastnosti rezultirajo v koherentnih oscilacijah endogenega celičnega EM polja (Hyland, 1998; Jerman in Štern, 1999). Fröhlich je pokazal, da se v določenem kritičnem intervalu dotoka metabolne energije, s , ($s_0 < s < s_1$) ta ne termalizira v celoti, ampak se del kanalizira v najnižjo frekvenco vibracijskega načina, vezanega na celoten makroskopski sistem identičnih dipolov znotraj katerega se shrani in se lahko uporabi v bioloških procesih (Hyland, 1998). Po določenem času se te vibracije sklopijo z elastičnimi vibracijami, tako da sistem postane močno mehnično vzburjen do vrednosti daleč od termodinamskega ravnovesja. Sistem deluje kot orjaški dipol in doseže makroskopski pomen kot koherentna ekscitacija elektromagnetne in mehanske narave (Hyland, 2003a).

Fröhlich (1978) kot najprimernejši sistem za vzpostavitev koherentnega režima navaja regije celične membrane z vezanimi proteini in kompleksne makromolekule z lastnostmi elektretov kot so npr. mikrotubuli. Pri tem izpostavlja pomen močnega transmembranskega električnega polja ($10^6 - 10^7$ V/m), ki povzroča visoko električno polarizacijo molekul. Nastale frekvenčne oscilacije molekul bi naj imele razpon med 10^9 in 10^{12} Hz, pri čemer so zaradi specifičnih lastnosti dipolov možni različni harmoniki (Fröhlich, 1975).

Sistemi s koherentnimi vibracijami enakih frekvenc v mediju z ustreznimi dielektričnimi lastnostmi se bodisi privlačijo, bodisi odbijajo, interakcija na daljavo pa je bistveno močnejša (sorazmerna z r^{-3} , kjer je r razdalja med sistemi) od van der Waalsovih interakcij (sorazmerne z r^{-6}) (Fröhlich, 1978). Predlagan model omogoča visokospecifično prepoznavanje celičnih komponent na velike razdalje na osnovi frekvence oscilacij. Vzpostavitev koherentnega režima je regulirana s stopnjo dotoka metabolne energije, potrebno energijo pa lahko priskrbijo tudi zunanja EM sevanja, zato je to eden od možnih načinov mehanizma interakcij zunanjih EM polj in organizmov (Fröhlich, 1975; Hyland, 2003b).

Poleg že omenjenega, je Fröhlich (1988, cit. po Jerman in Štern, 1996) predvidel še dva možna načina koherentnih oscilacij: (1) Vzpostavitev visoko polarnega (feroelektričnega) metastabilnega stanja in (2) vzpostavitev krožnega ciklusa v kompleksnih sistemih kemijskih interakcij.

2.4.2 Kvantna teorija polja milanske skupine

Italijanski znanstveniki zbrani okoli del Giudiceja so na podlagi Fröhlichove teorije razvili kvantno teorijo polja. Poudarjajo, da klasična fizika ne more pojasniti nekaterih pojavov, kot npr. visoko selektivnost in učinkovitost encimov, nizko električno upornost žive materije in visoko učinkovitost pretvorbe kemične energije v mehansko kljub majhnim temperaturnim razlikam (del Giudice in sod., 2005).

Po njihovi teoriji postanejo polarizacijske oscilacije ob ustrezni gostoti električnih dipolov in pri stalnem dotoku energije koherentne, tj. vse molekule enotno oscilirajo med osnovno in vzbujeno konfiguracijo skladno s frekvenco kvantne fluktuacije (del Giudice in sod., 2005). Osnovna prostorsko-časovna enota takega sistema je koherentna domena (CD), ki ima premer 1 valovne dolžine nastalega EM valovanja. Med posameznimi CD se ob prekrivanju silnic njihovih EM polj okrepijo disperzivne sile, tako se CD medsebojno privlačijo ali odbijajo. Tako se na mejnem območju CD dveh molekul med njima pojavi privlačna ali odbojna sila glede na frekvenci njunih CD (del Giudice in sod., 2005). Na ta način naj bi se tvorile celične membrane (del Giudice in Preparata, 1994), pospešile encimske in multienziemske reakcije preko interakcij molekul hitrejših od naključnega termičnega gibanja (del Giudice in sod., 2005).

CD pa obstajajo le kratek čas in neprestano prehajajo iz koherentne v nekoherentno fazo. Temperatura sistema se ob koherentnih oscilacijah molekul v EM polju ne spremeni. Če tak sistem postavimo v toplotno kopel, pa dotok toplote v sistem ruši koherentne oscilacije, saj se poveča število trkov molekul okolja z molekulami CD. Z naraščanjem temperature postaja vedno več molekul nekoherentnih, dokler se število koherentnih molekul ne zmanjša po kritično število in koherentni sistem razpade (del Giudice in sod., 2005).

2.4.3 Ultrašibka bioluminiscenca in biofotonsko polje

V dvajsetih letih 20. st. je ruski znanstvenik Aleksander Gurwitsch opazil, da se celice čebulnega stebela množijo hitreje, če stebelu v pravokotni smeri približamo koreninski vršiček druge čebule (Bischof, 2003). Ugotovil je, da učinek izgine, če namesto kvarčnega uporabi navadno steklo in predpostavil, da je učinek posledica UV svetlobe. Poimenoval

ga je mitogenetski učinek (Jerman in Štern, 1996; Mei, 1994). Kasneje je razvoj tehnologije fotopomnoževalk omogočil detekcijo šibkega sevanja fotonov iz tkiv organizmov. Colli in Facchini (1954, cit. po Bischof, 2003) sta s fotopomnoževalkami nedvoumno dokazala, da različni kalčki oddajajo svetlobo med zeleno in rdečo barvo intenzitete nekaj 100 fotonov/ cm² na sekundo, kar je $\sim 10^{-18}$ jakosti dnevne svetlobe (Jerman in Štern, 1996).

Med raziskovalci pojava je danes najbolj uveljavljen nemški biofizik Fritz A. Popp. Po njegovi teoriji izhajajo biofotoni iz delokaliziranega koherentnega EM polja v živem tkivu imenovanem biofotonsko polje (Jerman in Štern, 1996).

Popp je pokazal, da so emisije biofotonov močnejše v delečih se celicah kot v celicah v G₀ fazi (oddajanje biofotonov je najmočnejše med G₁ fazo), poškodovane in umirajoče celice oddajajo 100x več biofotonov, pri čemer vzrok smrti ne vpliva na moč emisije (Bistolfi, 1991: 93, 94).

Ultrašibka bioluminiscenca je popolnoma drugačen pojav kot klasična bioluminiscenca (npr. kresnic), ki je mnogo močnejša in izvira iz kemijske reakcije (Mei, 1994). Šibko biološko sevanje fotonov ima običajno valovno dolžino med 200 in 800 nm, fotonska emisija pa znaša le nekaj 10 do nekaj 100 fotonov/cm/s in so ga do danes odkrili v večini organizmov (Mei, 1994; Bistolfi 1991: 93,94). Kljub šibkosti bioluminiscence, pa bi naj bila svetloba v organizmih dokaj intenzivna, a se večina izsevanih fotonov takoj ponovno absorbira in sproži različne fotokemične procese v celici (Jerman in Štern, 1996). Na veliko lastnosti biofotonskega polja sklepajo iz poskusov z zakasnelo bioluminiscenco, kjer žive objekte obsevajo z močno svetlobo in nato merijo povečano bioluminiscenco, ki se lahko šele po dveh urah vrne na prvotno raven. Njen časovni potek ima hiperbolično naravo in kaže na koherentno naravo biofotonskega polja (Popp, 1984: 68-78 cit. po Jerman in Štern, 1996). To dokazuje tudi nizka stopnja statistične variabilnosti fotonskega štetja, ki za faktor 10 presega koherenco tehničnih laserjev (Jerman in Štern, 1996).

Slawinski in Popp (1986 cit. po Mei, 1994) sta pokazala, da je emisija fotonov lahko odgovor na temperaturni stres, pri čemer se je spremenila tudi spektralna sestava. Emisija fotonov je tako vezana na fiziološke procese, hkrati pa bi naj bili fotoni regulatorji procesov in so nosilci bioinformacije o procesih v organizmu (Popp in sod. 1994; Mei, 1994).

2.5 POSKUSNI OBJEKT IN ONTOGENEZA

Navadni fižol (*Phaseolus vulgaris* L.) je enoletnica, ki izvira iz Srednje in Južne Amerike, pri nas je pogosta kulturna rastlina. Uvrščamo ga v družino metulnjic (fam. Fabaceae), red stročnic (o. Fabales) (Jogan, 2001).

Uporabljen kultivar *Phaseolus vulgaris* 'Etna' spada po habitusu med nizke kultivarje in doseže višino od 45 do 60 cm (*Phaseolus vulgaris*..., 2008). Steblo fižola je okroglo, v poznejših fazah rasti rahlo šesterorobo. Primarna lista sta srčasta, celoroba in navidezno nasprotno nameščena. Ostali listi so spiralasto nameščeni in sestavljeni iz treh ploskev. Rastlina razvije metuljasto oblikovan cvet, plod je strok. Endosperm v semenu je skoraj popolnoma reduciran, embrio med kalitvijo črpa hranila iz kličnih listov. V ugodnih talnih razmerah se na koreninah razvijejo simbiotske bakterije *Rhizobium phaseoli*, ki vežejo atmosferski dušik (Jogan, 2001).

Razvojni cikel rastlin lahko v splošnem delimo v štiri faze: embriogenezo, kalitev, vegetativno rast in cvetenje. Med embriogenezo se vzpostavi polarnost embria, pojavijo se tudi ostali razvojni vzorci tkiv, razvijejo se zasnove organov, embrio se ob koncu pripravi na izsušitev ter vstop v dormanco. (Taiz in Zeiger, 2006: 382). Med kalitvijo semena embrio izstopi iz dormance, poveča se transkripcija genov, sinteza proteinov in stopnja celičnega dihanja. Med kalitvijo se močno spremenijo vsebnosti hormonov - upade vsebnost abscizinske kisline (ABA) in naraste vsebnost giberelinov, povečana je sinteza avksinov in citokininov. V začetnih fazah vegetativne rasti rastlina s pomočjo zaloga v kličnih listih preko delitev v rastnem vršičku stebela in rastnem vršičku korenine izoblikuje svojo osnovno formo (Taiz in Zeiger, 2006: 381). Podaljša se poganjek, nastanejo listni primordiji iz katerih se razvijejo prvi pravi listi, raste in razvija se koreninski sistem.

Iz proplastidov se pod vplivom svetlobe razvijejo kloroplasti in drugi plastidi, rastlina preide v avtotrofno stanje. Prehod med skotomorfogenezo (poteka v temi) in fotomorfogenezo (poteka na svetlobi) je zelo hiter. Že nekaj ur po izpostavitvi rastlinice svetlobi se upočasni rast poganjka, začne se ravnanje apikalnega zavoja poganjka in začne se sinteza pigmentov (Taiz in Zeiger, 2006: 417).

2.6 STRES

Stres je definiran kot zunanji faktor, ki ima negativne vplive na rastlino. V naravi stres povzročajo številni spreminjajoči se dejavniki okolja. Nekateri povzročijo stres že v nekaj minutah (npr. povečana temperatura zraka), drugi v nekaj dneh (npr. nasičenost prsti z vodo), spet tretji povzročijo stres po več mesecih (npr. pomanjkanje mineralov v prsti) (Taiz in Zeiger, 2006: 672).

Rastline so na različne načine prilagojene stresu, lahko gre za genetsko spremembo pridobljeno tekom generacij (adaptacija), ali pa za prilagoditev, ki je posledica predhodne izpostavitve stresu (aklimatizacija) (Taiz in Zeiger, 2006: 672).

Celični odzivi na stres zajemajo spremembe v celičnem ciklu, ekspresiji genov, sintezi proteinov in drugih metabolitov, spremembe v sintezi celične stene in drugo. Spremembe so usmerjene k dvigu tolerance na stres, pogosto pride po adaptaciji na eno vrsto stresa tudi do povečanja tolerantnosti na drugo vrsto stresa, kar nakazuje obstoj osnovnega mehanizma, ki sproži fiziološke odgovore na stres (Taiz in Zeiger, 2006: 672).

2.6.1 Temperaturni stres

Večina višjih rastlin ni sposobna preživeti dolgotrajne izpostavljenosti temperaturam nad 45 °C. Če imajo rastline dovolj vode in je omogočena zadostna evaporacija z listne površine, potem hladilni učinek izhlapevanja zmanjša negativni vpliv temperaturnega stresa (Taiz in Zeiger, 2006: 682). Kalice so brez dobro razvitih listov, zato ima učinek manjšo moč, visoke temperature pa večji negativni vpliv.

Ontogeneza in morfogeneza rastlin sta funkciji temperature (Morison in Lawlor, 1999). Povišane temperature vplivajo na večino fizioloških procesov, še posebno v času hitre rasti rastline. Spremeni se struktura membrane, stopnja in učinkovitost prenosa elektronov v PSII in PSI, sinteza proteinov, celično dihanje, stomatalna prevodnost in stopnja rasti (Georgieva, 1999; Morison in Lawlor, 1999; Yordanov, 1992 cit. po Lambreva in sod., 2005).

Navadni fižol (*Phaseolus vulgaris*) je prilagojen na relativno hladne klimatske razmere. Optimalne povprečne temperature v času cvetenja so med 20 in 25 °C (Wantanbe, 1953 cit. po Proch, 2006). Dnevne temperature višje od 30°C ali nočne višje od 20°C povzročajo zmanjšanje pridelka (Rainey in Griffiths, 2005 cit. po Porph, 2006). Porph (2006) izpostavlja ravno biomaso kot dober pokazatelj temperaturnega stresa.

Cowling in Sage (1998) sta primerjala fižol (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Black Turtle) gojen pri dnevno/nočni temperaturi 25/20 °C in 36/29 °C. Fižol gojen pri višjih temperaturah je imel 35% nižjo biomaso in nekoliko manjšo površino listov v primerjavi s fižolom gojenim pri nižjih temperaturah. Rast embriov fižolov (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Shiraginugasa) v tkivni kulturi pod optimalnimi koncentracijami nutrientov je pri temperaturah nad 30 °C močno upadla in bila skoraj popolnoma inhibirana pri temperaturi 40 °C (Ikeda in sod., 1999).

V C₃ rastlinah zaradi povišanega razmerja aktivnosti Rubisco oksigenaze / Rubisco karboksilaze pri povišanih temperaturah pade asimilacijska stopnja CO₂. Poviša se tudi razmerje med temotno respiracijo in stopnjo fotosinteze (Morison in Lawlor, 1999). Točko v kateri je količina fiksiranega CO₂ v procesu fotosinteze enaka količini sproščenega CO₂ zaradi respiracije imenujemo temperaturna kompenzacijska točka Taiz in Zeiger, 2006: 683).

Periodična kratka izpostavitve višjim temperaturam lahko inducira toleranco na sicer letalne temperature. Kot odgovor na nenadne dvige temperature za 5 do 10 °C rastline producirajo HSP proteine (heat shock proteins). Večina jih je v vlogi molekulskih šaperonov (spremljevalcev), ki preprečujejo denaturacijo in napačno zvijanje encimov ter drugih proteinov pomembnih za življenjske procese, pri čemer porabljajo ATP. Različne razrede HSP proteinov najdemo v jedru, mitohondrijih, kloroplastih, endoplazmatskem retikulumu in v citosolu (Taiz in Zeiger, 2006: 682 – 686).

3. MATERIALI IN METODE

3.1 PRIPRAVA RASTLIN

Semena fižola (*Phaseolus vulgaris* kul. Etna) smo zasadili v dva sobna rastlinjaka, vsak predeljen na 12 polj velikosti 6 x 6 cm, napolnjenih z zemljo za lončnice (Garden Trend®). Prvi, drugi in peti dan kalitve smo vsako polje zalili s 100 ml vodovodne vode. Deseti dan smo uspešno kaljene rastline (14 / 24) naključno prerazporedili v dve enaki skupini in označili posamezne rastline: kontrolna skupina (rastline K1 do K7) in tretma skupina (rastline S1 do S7).

3.2 OPIS EKSPERIMENTA

Izvedli smo dva časovno ločena dela eksperimenta. V prvem delu eksperimenta od 2. do 9. 3. 2007 smo izvedli pet serij meritev, vsaka je imela tri faze v 40 min razmaku, pri katerih smo med prvo in drugo fazo tretma skupino rastlin izpostavili temperaturnemu stresu. V drugem delu od 12. do 16. 3. 2007 smo prenehali z izvajanjem stresa na rastlinah, ostala procedura pa je ostala enaka.

Z eksperimentalnim sistemom lastne izdelave smo merili splošne značilnosti absorpcije, transmisije in emisije (ATE) bližnjega električnega polja rastlin in odvisnost ATE od fiziološkega stanja rastline ter fizikalnih parametrov. Meritev temelji na prevajanju bližnjega električnega polja skozi rastlino in detekcijo oddanega bližnjega polja. Poleg tega smo merili tudi nekatere anatomske parametre rastlin ter spremljali temperaturo in vlago v prostoru. Ob koncu poskusa smo rastlinam določili svežo in suho maso.

3.2.1 Razmere med eksperimentom

Rastline smo gojili v dobro osvetljenem prostoru, kjer smo s sobnim termometrom spremljali temperaturo, s higrometrom pa relativno zračno vlago. Vse rastline so bile v enakih pogojih. V času meritev smo vse rastline prenesli na delovno površino kjer so ostale do konca meritev (približno 4h na dan meritev).

3.2.2 Merjenje ATE bližnjega električnega polja

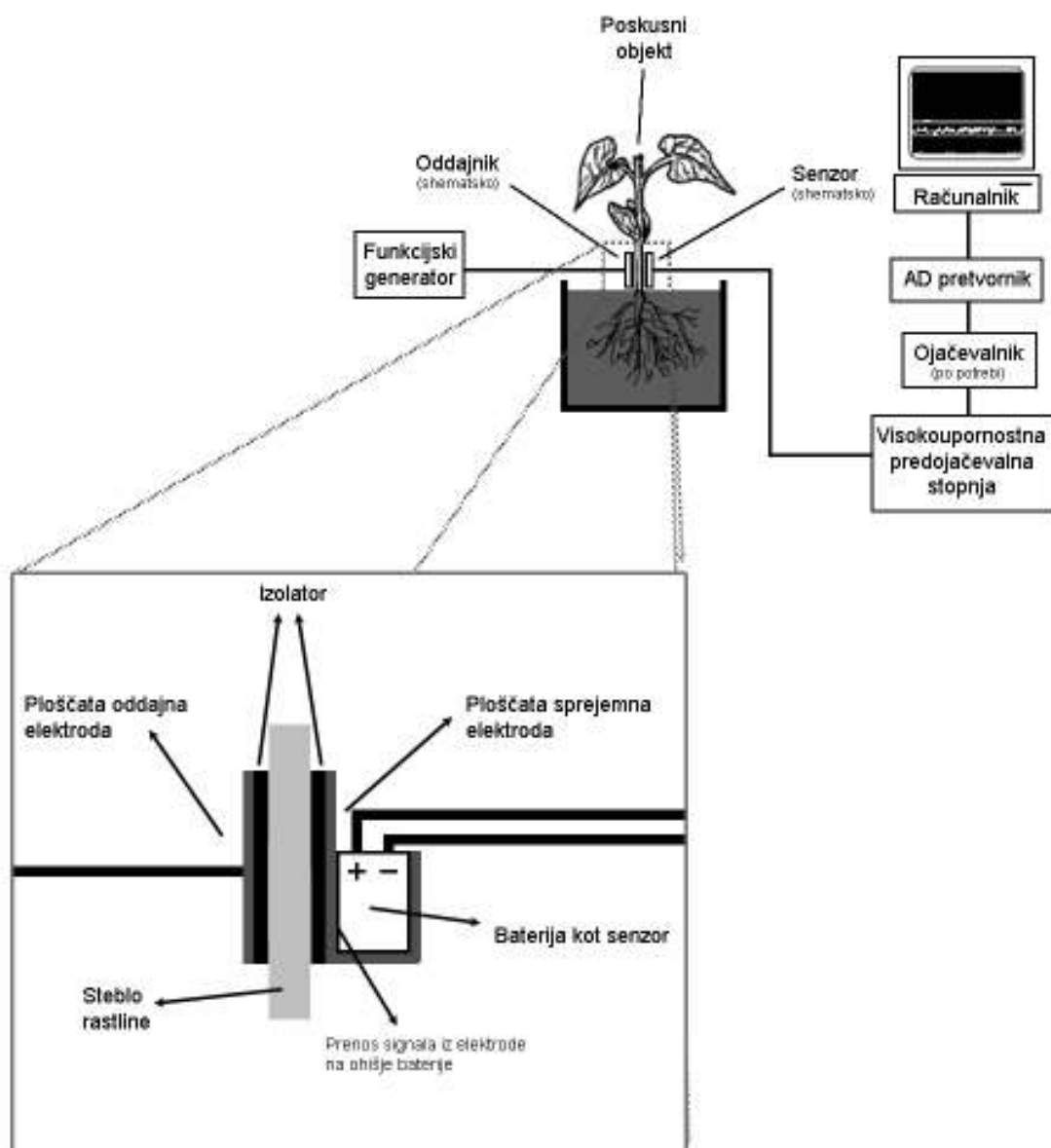
3.2.2.1 Eksperimentalni sistem

Z metodo EMADDEL, razvito na Inštitutu Bion, smo z eksperimentalnim sistemom lastne izdelave merili absorbcijo, transmisijo in emisijo (ATE) bližnjega električnega polja (Škarja in sod., 2008). Eksperimentalni sistem je bil sestavljen iz oddajnega in detekcijskega sistema (slika 1 in slika 2). Oddajni sistem so sestavljali funkcijski generator METEX® universal system MS-9150, bakrena ploščica dimenzij 1 cm x 1 cm x 1 mm in povezovalni kabli. Sinusno modelirani izmenični tok z efektivno napetostjo 4,3 V in frekvenco 20 kHz (VLF območje) se je iz generatorja prenašal na ploščato bakreno elektrodo, ki je delovala kot vir zunanjega bližnjega električnega polja. Čez bakreno ploščico je bila pritrjena 2 mm debela plast izolacijskega materiala, celoten sistem pa je bil dodatno izoliran z lepilnim trakom, kar je preprečevalo neposredni stik rastline s ploščo.

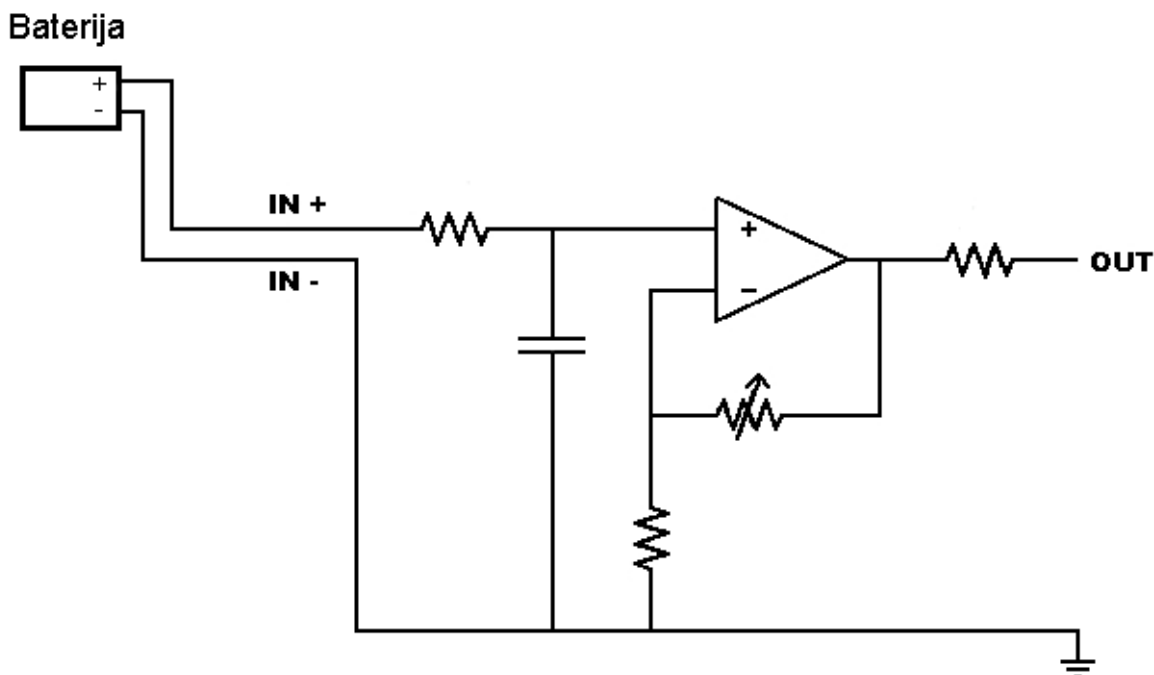
Detekcijski sistem je bil sestavljen iz: senzorja, vhodne stopnje s frekvenčnim filtrom in predojačevalnikom, ojačevalnika, A/D pretvornika (vse komponente lastne izdelave), računalnika in povezovalnih kablov. Senzor je bil zgrajen iz aktivnega prevodnega materiala obdanega z izolatorjem. V našem poskusu smo za senzor uporabili 1,5 V litijevo gumb baterijo, s predhodno zmanjšano napetostjo na 60 mV, ki smo jo povezali s ploščato bakreno elektrodo. Senzor je deloval kot antena, tj. prestregel je okoliško oscilirajoče EM polje, ki je v prevodnem materialu senzorja inducirala električni tok.

Signal se je iz senzorjev prenesel na predojačevalno stopnjo z vhodno upornostjo 1 T Ω , se po potrebi ojačal (pri poskusih ojačitev ni bila potrebna, v nekaterih primerih je bilo moč signala potrebno celo zmanjšati: uporabljena faktorja ojačitve $k_1 = 0,5$ in $k_2 = 0,98$) in pretvoril v digitalno obliko. Računalniško kontrolirano vezje (programska oprema: Meritve U in T, Bion 2004) je omogočalo elektronsko meritev signala v obliki električne napetosti in spremljanje relativne emisije bližnjega polja v realnem času, pri čemer je bila nastavljena časovna resolucija posamičnih detekcij 300 ms.

Senzor je občutljiv na elektrostatične učinke in druge zunanje motnje. Škarja in sod. (2005) so opravili analize vpliva elektrostatike na meritve. Izkazalo se je, da so statični učinki prehodne narave in hitro izginejo zaradi izenačitve naboja med vhodnim signalom senzorja in visoko upornostno stopnjo, zato smo jih lahko dobro ločili od vplivov bližnjega polja. Ker nismo uporabili Faradayeve kletke (odstrani RM motnje iz okolice), smo upoštevali le meritve, kjer je bila izmerjena vrednost ATE prostora na začetku meritev enaka vrednosti po končani meritvi.



Slika 1: Shema eksperimentalnega sistema; prirejeno po Škarja in sod. (2005).



Slika 2: Vezje vhodne stopnje (visokoupornostna predojačevalna stopnja); prirejeno po Škarja in sod. (2008).

3.2.2.2 Protokol meritev

Na stebelu vsake rastline smo 1 cm pod kličnima listoma označili točko namestitve merilnega sistema. Meritve znotraj vsake serije smo opravili v treh fazah v časovnem razmaku 40 min. V posamezni fazi smo za vsako rastlino opravili 9 meritev, pri čemer sta bili 1. in 9. meritev prostora (fiksna točka na delovni površini, kjer smo opravili vse nadaljnje meritve rastlin), 2. do 8. pa meritev ATE bližnjega električnega polja rastline. Vsaka od teh meritev je predstavljala povprečno izmerjeno vrednost v času 5 s (običajno 10 zaporedno zabeleženih vrednosti). Med vsako posamezno meritvijo smo merilni sistem sneli z rastline in ga ponovno namestili na označeno mesto. Na ta način smo vključili morebitno variabilnost meritev, zaradi netočne namestitve merilnega sistema. Slika 3 prikazuje primer ene meritve ATE na eni rastlini.

Za vsako fazo poskusa smo izvedli en set zgoraj opisanih meritev. Med posamezno fazo vsake skupine je preteklo 40 min (npr. med K7 prve in K1 druge faze). Meritve znotraj faz smo vedno izvedli v enakem vrstnem redu rastlin kot prikazuje slika 4. Med prvo in drugo fazo smo v času od 2. do 9.3.2007 tretma skupino izpostavili temperaturnemu stresu – rastline smo dali za 40 min v sušilnik na 42 °C, kontrolno skupino pa smo pustili v delovnem prostoru. Med drugo in tretjo fazo smo obe skupini rastlin pustili v delovnem prostoru. V času od 12.3. do 16.3. nismo izvajali stresa na nobeni skupini rastlin, zato smo

med prvo in drugo fazo obe skupini pustili v delovnem prostoru. Vrstni red meritev prikazuje slika 4.

3.2.3 Anatomske značilnosti

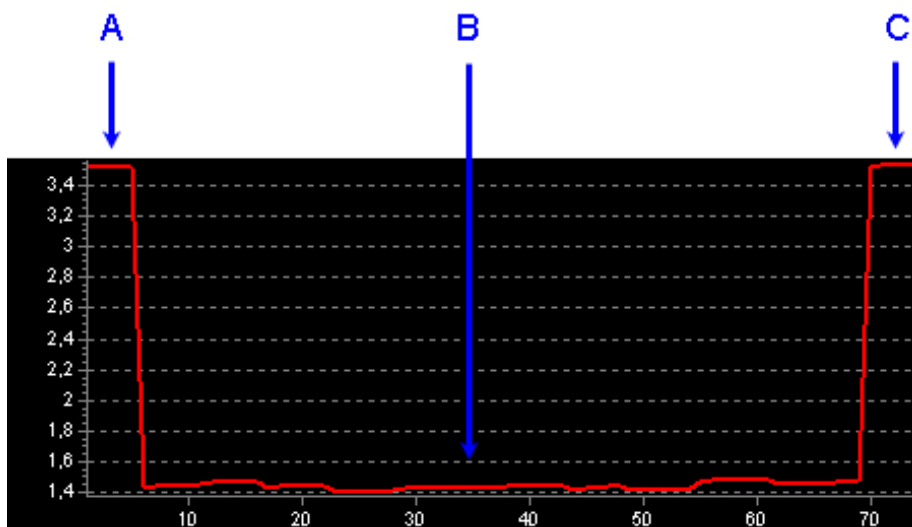
Vsako serijo meritev ATE smo pospremili tudi z meritvami premera poganjka posameznih rastlin. Na vsaki rastlini smo v točki namestitve merilnega sistema s kljunastim merilom opravili sedem meritev premera in izračunali povprečje. S pomočjo metra smo na vsaki rastlini izvedli sedem meritev višine poganjka od stika s prstjo do prvih pravih listov in izračunali povprečje.

3.2.4 Mase rastlin ob koncu poskusa

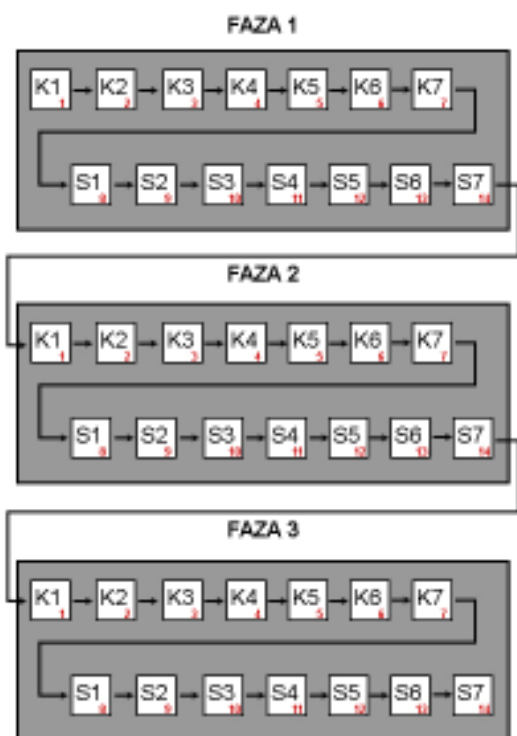
16. 3. 2007 smo po končanih meritvah določili mase rastlin. Ločili smo nadzemne in podzemne dele rastlin, jih očistili in stehtali. Tako smo dobili svežo maso posamezne rastline, nato pa smo dele rastlin za 24 ur dali v sušilnik na 105 °C in jim določili še suho maso. Dobljene vrednosti smo uporabili kot neodvisni kazalnik stresa na rastlinah.

3.2.5 Merjenje ATE neživih objektov

Za ugotavljanje odvisnosti ATE bližnjega električnega polja od premera neživih objektov smo uporabili isti merilni sistem kot v poskusu 3.2.2. Za poskusni objekt smo vzeli različne višine kvadra iz kartonskih plošč (š;d;v: 2,2 cm; 1,5 cm; N x 0,04 cm, kjer je N število kartonskih plošč), ki smo jih 24 ur namakali v vodovodni vodi. Kvadre, nasičene z vodo, smo položili v senzor in jim izmerili ATE bližnjega polja. Za posamezno višino kvadra smo opravili deset zaporednih meritev, nato pa smo kvader stehtali in mu s kljunastim merilom izmerili dejansko višino. Poskus smo izvedli dvakrat, pri čemer smo prvič postopoma večali debelino kvadrov, drugič pa postopoma manjšali debelino kvadrov.



Slika 3: Primer izpisa vrednosti signala (napetost na senzorju v času). Abscisa je časovna os (v sekundah), ordinata pa odgovarja napetosti na senzorju. Odseka A in C sta vrednosti signala prostora (1. In 9. meritev), odsek B pa vsebuje zaporedne meritve signala rastline (do 2. Do 8. meritve). Med posamezno meritvijo smo merjenje prekinili, ponovno namestili senzor in nadaljevali z merjenjem.



Slika 4: Vrstni red opravljenih meritev na rastlinah po fazah (K1-K7 rastline kontrole; S1-S7 rastline stresa). Časovni razmik med K7 prve faze in K1 druge faze je 40 min. Enako velja za S7 prve faze in S1 druge faze, K7 druge in K1 tretje faze ter S7 druge in S1 tretje faze.

3.3 ANALIZA PODATKOV

Pri analizi podatkov smo si pomagali s programoma SPSS 15.0. in MS Excel 2007.

Izmerjene vrednosti ATE smo najprej normirali s premerom poganjkov (poglavje 4.1.1), normirane vrednosti pa smo uporabili pri nadaljnjih obdelavah. Izračunali smo aritmetično sredino vrednosti ATE za posamezno rastlino v določeni fazi. Za vsak dobljen set podatkov znotraj ene faze smo preverili normalnost razporeditve (Shapiro-Wilk test) in homogenost varianc (Leveneov test) ter izračunali aritmetično sredino, standardno deviacijo in standardno napako.

Fazo K1 in S1 smo medsebojno primerjali s t-testom za neodvisne vzorce. Posamezne faze znotraj enega dne smo medsebojno primerjali s Kruskal – Wallis ANOVO za 6 vzorcev, saj razporeditev podatkov ni bila vedno normalna. V primeru statistično značilnih rezultatov smo kot post hoc analizo uporabili Mann – Whitney U test z bonferronijevim popravkom. Za dni z normalno razporejenimi podatki znotraj faz smo opravili tudi Welch ANOVO, ki je manj občutljiva na nehomogenost varianc od standardne ANOVE. Kot post hoc analizo smo uporabili Sidakov test.

Z metodo vgnezdene ANOVE (nested ANOVA) smo po Excelovi predlogi (McDonald, 2008b) izvedli analizo deležev varianc med skupinama, med fazami znotraj iste skupine in med rastlinami znotraj iste faze.

Sveže mase rastlin kontrolne in tretma skupine smo medsebojno primerjali s Mann – Whitney U neparametričnim testom, za primerjavo suhih mas pa smo poleg Mann – Whitney U testa uporabili tudi parni t-test za neodvisne vzorce.

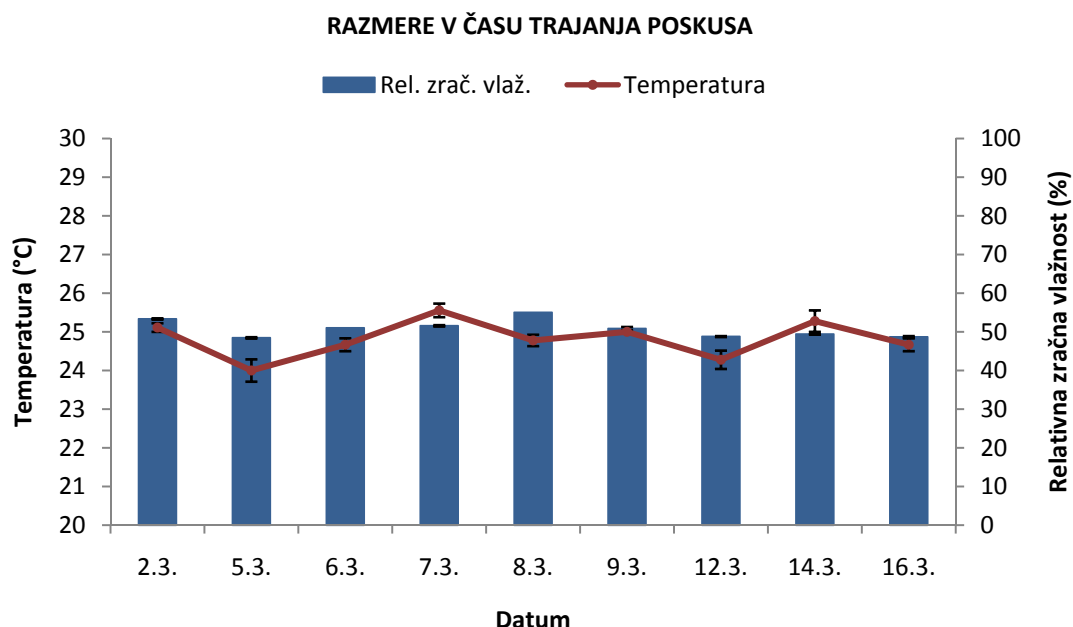
Vrednosti ATE neživih objektov – kartonastih kvadrov nasičenih z vodo – smo primerjali z višino kvadrov in izračunali korelacijski koeficient med višino in vrednostjo ATE kvadrov za oba poskusa posebej ter na koncu izračunali povprečno korelacijo.

4. REZULTATI

4.1 MERITVE ATE BLIŽNJEGA ELEKTRIČNEGA POLJA RASTLIN

4.1.1 Razmere tekom poskusa

Slika 5 prikazuje spreminjanje razmer tekom poskusa. Tako temperatura, kot tudi relativna zračna vlažnost se nista bistveno spreminjali. Najnižjo temperaturo smo zabeležili drugi dan (24 °C), najvišjo pa četrti dan meritev (25,6 °C). Relativna zračna vlaga je nihala med 48,4% (drugi dan) in 55,0% (peti dan meritev).



Slika 5: Razmere v času trajanja poskusa.

Prikazane so povprečne izmerjene vrednosti temperature in relativne zračne vlage (RZV) v prostoru izvajanja meritev ATE. Znotraj posameznega dneva smo opravili devet meritev temperature in devet meritev RZV, ki so bile enakomerno razporejene tekom trajanja izvajanja meritev ATE. Variabilnost znotraj posameznega dneva prikazujejo označene standardne napake. Ordinata za temperaturo ima izhodišče izbrano v 20 °C.

4.1.2 Normiranje vrednosti ATE s premerom stebila rastline

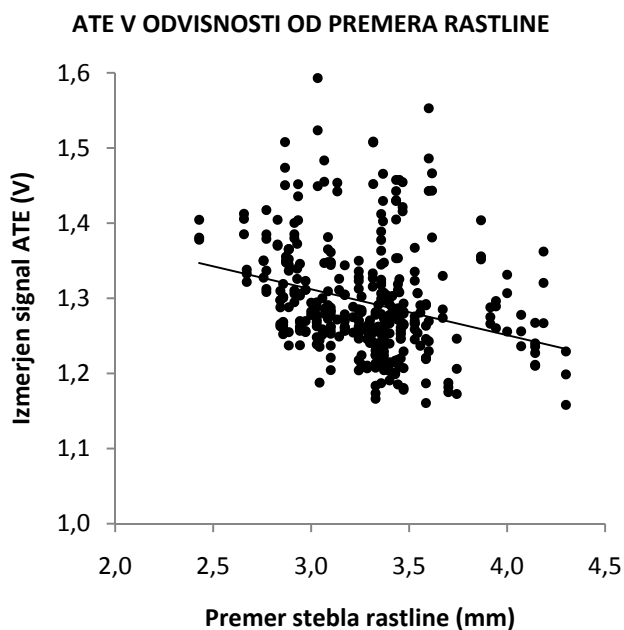
Analiza podatkov je pokazala, da je meritev ATE bližnjega električnega polja le delno odvisna od razdalje med oddajnim in detekcijskim sistemom, ki je bila odvisna od premera stebila v točki meritve. Kendallov tau-b korelacijski test (za neparametrične podatke) je podal statistično značilno negativno korelacijo med premerom stebila in izmerjenim signalom ATE ($\tau = -0,126$; $p = 0,012$). Slika 6 prikazuje zvezo med premerom stebila rastline in izmerjenim signalom ATE.

Premeri stebel rastlin kontrole in tretmaja se niso statistično značilno razlikovali (Mann – Whitney U test: $p = 0,655$), povprečen premer stebela rastline je bil v obeh skupinah enak (povprečje 3,3 mm; SD kontrole = 0,22, SD tretmaja 0,42). Premeri posameznih rastlin so zbrani v prilogi A.

Vpliv premera smo odstranili z normiranjem izmerjenih vrednosti po modelu:

$$U' = U \cdot kd^{\alpha} \quad (14)$$

kjer je U' normirana vrednost signala ATE, U izmerjena vrednost signala ATE, d premer stebela rastline, k in α pa parametra modela izbrana tako, da smo dobili najmanjšo korelacijo med U' in d . V našem primeru je $k=1$ in $\alpha=0,08$. Nov korelacijski koeficient ni bil statistično značilen ($\tau=-0,034$; $p=0,498$). V prilogi B so zbrane povprečne normirane vrednosti signala ATE v posameznih fazah glede na tretma.

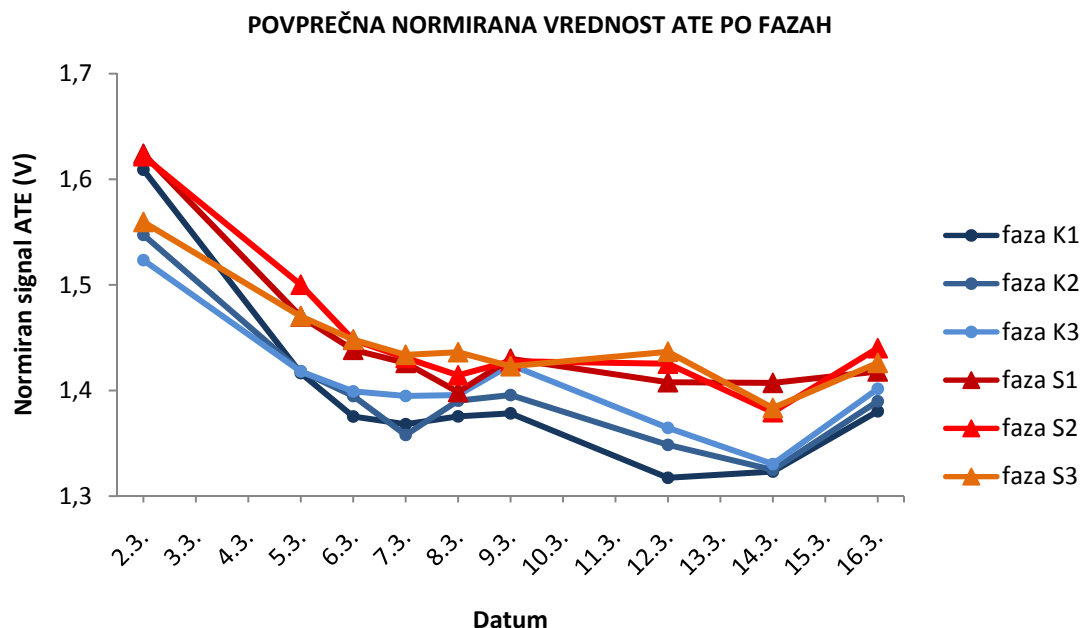


Slika 6: Odvisnost izmerjenega signala ATE bližnjega električnega polja od premera stebela rastline.

Posamezna točka ustreza povprečju 7 meritev premera stebela in povprečju 7 izmerjenih vrednosti signala ATE za posamezno rastlino v posamezni fazi na dan meritev. Vključenih je vseh 14 rastlin, vse 3 faze znotraj posameznega dne in vseh 10 dni izvajanja poskusa. Trendna črta nakazuje rahlo negativno korelacijo, kar je potrdil tudi Kendallov tau-b test ($\tau=0,126$; $p=0,012$). Izhodišče koordinatnega sistema je premaknjeno in se ne začne v (0,0).

4.1.3 Časovno spreminjanje ATE pri mladih rastlinah

Povprečne normirane vrednosti signala ATE v posamezni fazi so se tekom trajanja poskusa spreminjale. Skupno gledano so imele rastline tretmaja višje vrednosti normiranega signala v primerjavi z rastlinami kontrole (slika 7).



Slika 7: Povprečna normirana vrednost ATE po fazah za vsak dan meritev.

Posamezna točka je povprečna normirana vrednost ATE sedmih rastlin v posamezni fazi. Fazi K1 in S1 predstavljata vrednosti ATE rastlin kontrole in ATE rastlin izpostavljenih temperaturnemu stresu pred izvajanjem temperaturnega stresa, fazi K2 in S2 predstavljata vrednosti ATE rastlin kontrole in ATE rastlin takoj po izpostavitvi temperaturnemu stresu (40 min na 42 °C), fazi K3 in S3 pa predstavljata vrednosti ATE rastlin kontrole in ATE rastlin 40 min po prenehanju temperaturnega stresa. Izhodišče ordinate je premaknjeno in se ne začne v 0.

Primerjava skupin na začetku poskusa (vrednosti ATE faze K1 in S1 prvi dan poskusa) ni pokazala razlik med vzorcema (t-test za neodvisne vzorce je dal ob nehomogenih variancah statistično značilnost $p=0,675$). Enaka primerjava faze K1 in faze S1 za ostale dni poskusov je z izjemo 8.3. pokazala statistično značilno razliko med vzorcema ($p<0,05$) (Preglednica 3).

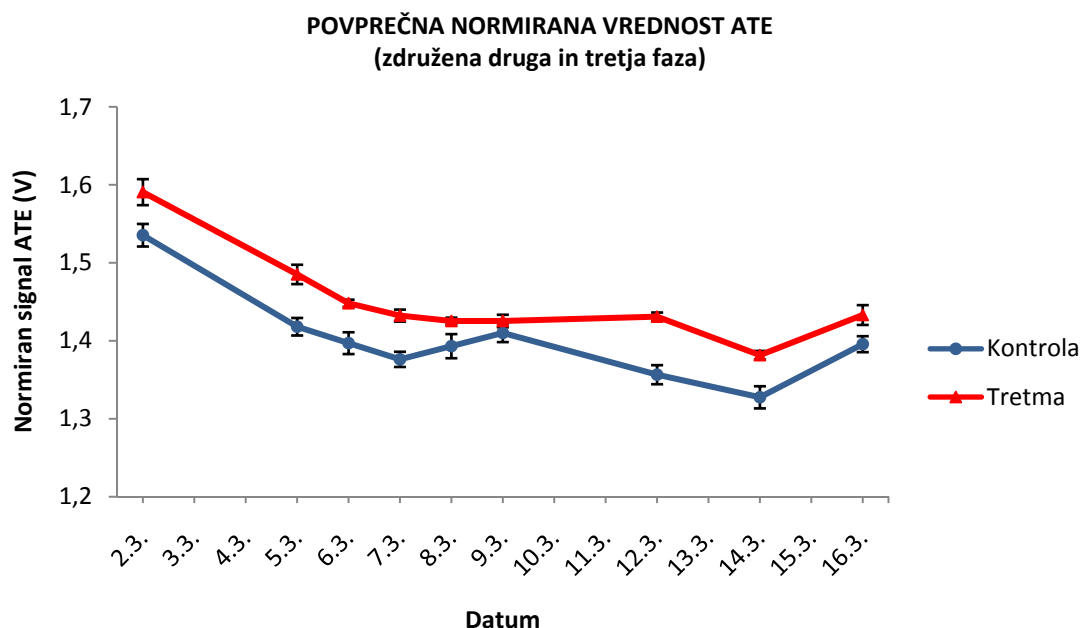
Če združimo meritve druge in tretje faze, opazimo, da so se rastline na katerih smo izvajali temperaturni stres večino dni statistično značilno razlikovale od kontrolnih rastlin (slika 8). Rastline kontrole so imele nižjo vrednost ATE kot rastline tretmaja. 8. In 9.3. je nastopil nenadni dvig vrednosti signala ATE pri rastlinah kontrole, tako, da se je povprečje kontrole

povsem približalo povprečju tretiranih rastlin, naslednje dni pa je bila med obema skupinama ponovno značilna razlika.

Preglednica 3: Primerjava faze K1 in faze S1 s t-testom za neodvisne vzorce po posameznih dneh.

Podane so p vrednosti za Leveneov test in t-test. K1 oz S1 je prva faza kontrolne skupine oz. skupine izpostavljene temperaturnemu stresu (40 min na 42 °C). Vsebuje povprečne normirane vrednosti ATE posamezne rastline (N=7) pred izpostavitvijo temperaturnemu stresu. Statistično značilne razlike ($p < 0,05$) med vzorcema so označene z odebeljeno pisavo.

Datum	2.3.	5.3.	6.3.	7.3.	8.3.	9.3.	12.3.	14.3.	16.3.
Leveneov test enakosti varianc	0,005	0,809	0,432	0,166	0,058	0,367	0,261	0,294	0,313
t-test za neodvisna vzorca	0,675	0,034	0,004	0,004	0,448	0,010	0,000	0,000	0,029



Slika 8: Povprečna normirana vrednost ATE za vsak dan meritev.

Vsaka točka predstavlja povprečno vrednost meritev ATE sedmih rastlin takoj po in 40 min po izpostavitvi temperaturnemu stresu (40 min na 42 °C). Označen je pripadajoč interval standardne napake (N = 14). Izhodišče ordinate je premaknjeno in se ne začne v 0.

4.1.4 Primerjava faz skupin znotraj enega dne

4.1.4.1 Neparametrični test

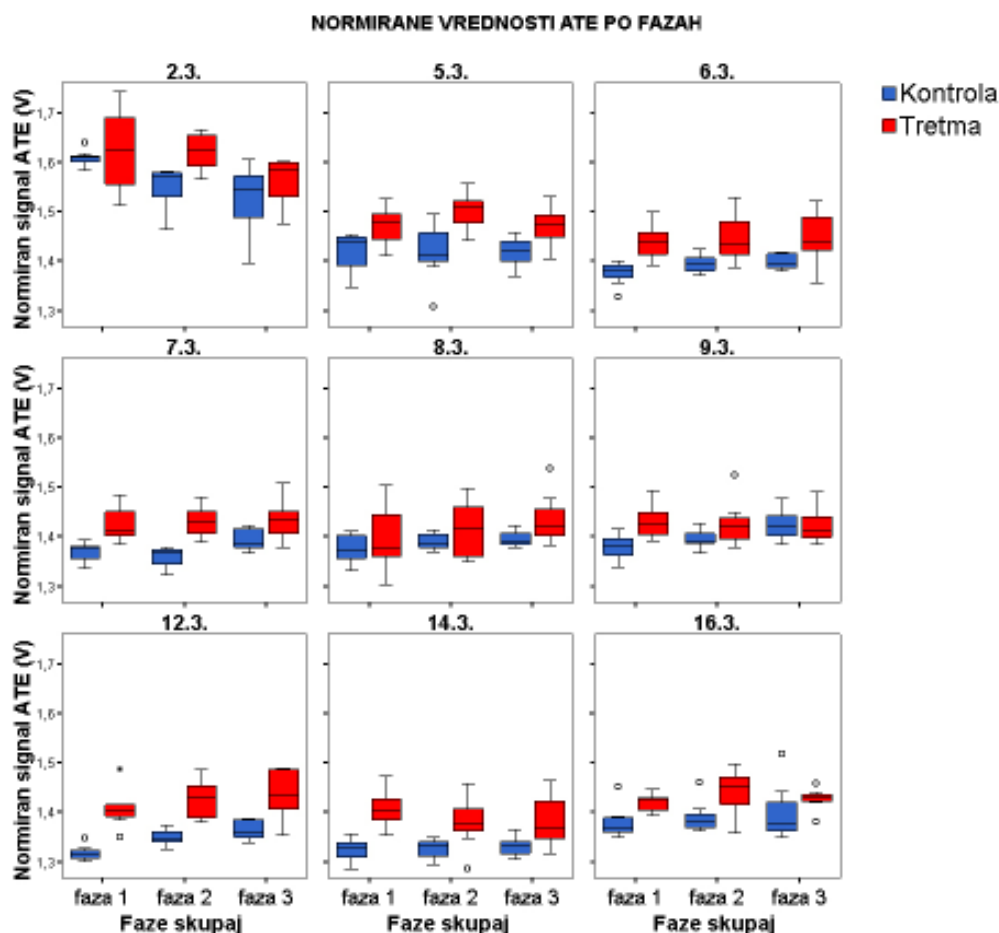
Za primerjavo faz skupin znotraj istega dne smo zaradi različno razporejenih podatkov (slika 9), uporabili Kruskal – Wallis ANOVO (preglednica 4). Vse, razen dne 8.3., smo dobili statistično značilne vrednosti testa, torej so se posamezne faze znotraj dneva razlikovale. Post hoc analiza je pokazala katere skupine se medsebojno razlikujejo. Večino dni so se medsebojno razlikovali ustrezni pari faz kontrolne in tretma skupine, pogosto pa so se razlikovale tudi faze znotraj iste skupine. Zavedati se moramo, da imajo neparametrični testi manjšo moč in nas lahko hitro privedejo do napake prvega tipa (»false positive«).

S slike (9) je razvidno, da so imele rastline tretmaja večji razpon vrednosti v primerjavi s kontrolo, opazimo pa tudi nihanje vrednosti med fazami znotraj iste skupine.

Preglednica 4: Kruskal – Wallis ANOVA – primerjava posameznih faz znotraj dneva.

V preglednici so p vrednosti Kruskal – Wallis ANOVE za posamezen dan. S Sig. so označene s post hoc analizo ugotovljene statistično značilne razlike med pari faz ($p < 0,05$). K1, K2 in K3 – 1., 2. in 3. faza kontrole; S1, S2 in S3 – 1., 2. in 3. faza skupine izpostavljenе temperaturnemu stresu.

		DATUM	2.3.	5.3.	6.3.	7.3.	8.3.	9.3.	12.3.	14.3.	16.3.
		p vrednost K-W ANOVE	0,005	0,005	0,005	0,000	0,184	0,054	0,000	0,001	0,053
POST HOC PRIMERJAVE PAROV FAZ (Mann – Whitney z bonf. pop.)	K1 : S1			Sig.	Sig.	Sig.		Sig.	Sig.	Sig.	Sig.
	K2: S2		Sig.	Sig.	Sig.	Sig.		Sig.	Sig.	Sig.	Sig.
	K3: S3			Sig.	Sig.	Sig.	Sig.		Sig.	Sig.	Sig.
	K1 : K2		Sig.						Sig.		
	K1: K3		Sig.		Sig.	Sig.		Sig.	Sig.		
	K2: K3					Sig.		Sig.			
	S1: S2			Sig.						Sig.	
	S1: S3		Sig.				Sig.			Sig.	
	S2: S3		Sig.	Sig.			Sig.				



Slika 9: Okvirji z ročaji za normirane vrednosti ATE po fazah.

Vsaj okvir z ročaji zajema povprečne normirane vrednosti ATE posamezne rastline v izbrani fazi ($N=7$). S prečno črto je označena mediana, meji okvirja sta spodnji in zgornji kvartil (Q_1 in Q_3), ročaji pa prikazujejo zadnje vrednosti, ki so za manj kot 1,5 kvartilnega razmika (Q_3-Q_1) oddaljeni od spodnjega in zgornjega kvartila. Vrednosti zunaj tega obsega so označene s $\circ$ (krog), ekstremne vrednosti, ki so za več kot 3 kvartilne razmike oddaljene od spodnjega oz. zgornjega kvartila, so označene z $*$ (zvezdica). Faza 1 zajema meritve ATE pred izvajanjem temperaturnega stresa, faza 2 zajema meritve ATE takoj po temperaturnem stresu (40 min na 42°C), faza 3 zajema meritve ATE 40 min po prenehanju temperaturnega stresa. Izhodišče ordinate je premaknjeno in se ne začne v 0.

4.1.4.2 ANOVA

Za dni, ko so bili podatki normalno razporejeni, smo naredili Welch ANOVO normiranih podatkov glede na faze poskusa. Welch ANOVA je podobna klasični ANOVI, a namesto t-testa uporabi Welch test, ki je manj občutljiv na nehomogenost varianc. Za post hoc analizo razlik med pari faz smo uporabili Sidakov test. Rezultati so predstavljeni v Preglednici 5.

Rezultati Welch ANOVE so potrdili rezultate Kruskal-Wallis ANOVE, saj smo dobili podobne značilne razlike. Razlikujejo se predvsem rezultati post hoc analize. Pri iskanju parov faz, ki bi naj povzročili značilno razliko med fazami je Sidak test predvsem pokazal manj razlik med fazami iste skupine, pa tudi manj značilnih razlik med vzporednimi fazami obeh skupin.

Preglednica 5: Rezultati Welch ANOVE po posameznih dneh.

V preglednici so p vrednosti Leavene testa in Welch ANOVE ter p vrednosti post hoc analize med posameznimi pari faz (K1, K2 in K3 – 1., 2. in 3. faza kontrole; S1, S2 in S3 – 1., 2. in 3. faza skupine izpostavljene temperaturnemu stresu). Statistično značilne razlike so označene z odebeljeno pisavo.

DATUM		5.3.	6.3.	8.3.	9.3.	12.3.	14.3.
Leavene test homogenosti varianc		0,816	0,039	0,008	0,495	0,024	0,083
Welch ANOVA (p vrednost)		0,006	0,012	0,292	0,040	0,000	0,002
POST HOC PRIMERJAVE PAROV FAZ (Sidak test)	K1 : S1	0,407	0,073	1,000	0,152	0,011	0,010
	K2: S2	0,182	0,419	0,999	0,919	0,029	0,466
	K3: S3	0,303	0,641	0,806	1,000	0,134	0,513
	K1 : K2	1,000	0,893	0,993	0,950	0,078	1,000
	K1: K3	1,000	0,621	0,918	0,198	0,008	1,000
	K2: K3	1,000	1,000	1,000	0,707	0,891	1,000
	S1: S2	0,955	1,000	1,000	1,000	1,000	0,995
	S1: S3	1,000	1,000	0,994	1,000	0,992	0,999
	S2: S3	0,961	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

4.1.5 Delež variance meritve ATE z vgnezdno ANOVO

S testom »vgnezden« ANOVE (nested ANOVA) smo preverili, kolikšen delež variance meritve ATE je bil posledica razlik med skupinama, kolikšen delež posledica variabilnosti faz znotraj posamezne skupine in kolikšen delež je prispevala variabilnost rastlin znotraj posamezne faze. Predpostavke testa so bile enake kot pri običajni ANOVI, tj. normalna razporeditev podatkov in homogenost varianc znotraj podskupin. Analizo variance smo izvedli le za dni, ki so zadostili obema pogojema. Rezultati testa so zbrani v preglednici 6 in grafično predstavljeni na sliki 10. Vidimo, da ni bilo statistično značilne variance med fazami znotraj posamezne skupine, visoka stopnja razlik med skupinama pa je izhajala iz razlik med rastlinami znotraj posamezne faze, (ta je 9.3. povzročila kar 77% variance).

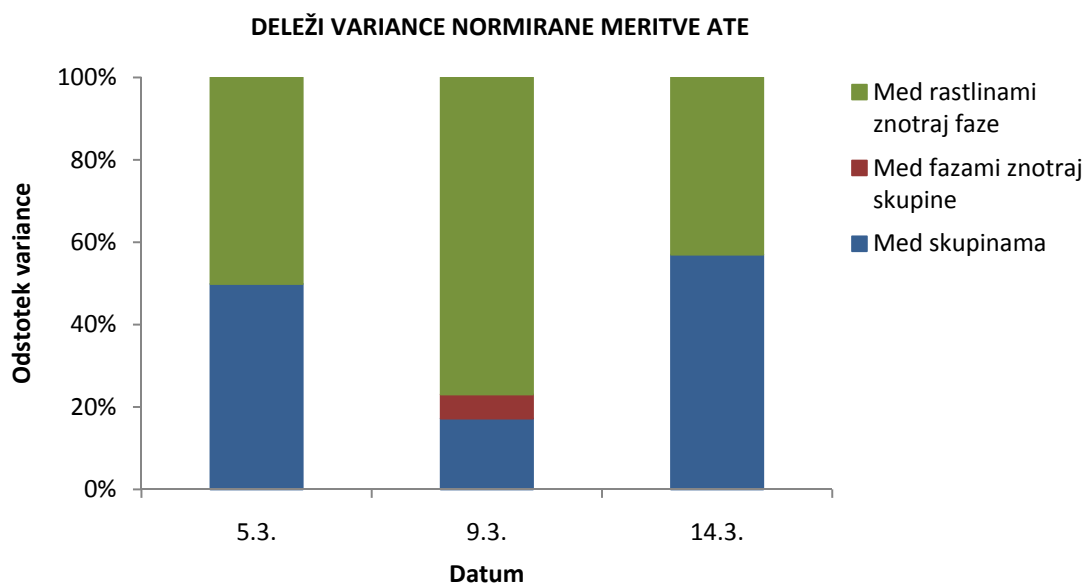
Na sliki 11 smo v analizo vključili še tri dodatne dni, za katere ne velja predpostavka homogenosti variance zato moramo biti pri interpretaciji rezultatov previdni. Opazimo zelo podobno delitev deleža varianc kot v prvem primeru. Na sliki 12 pa smo vključili še ostale

dni, vendar pa tem rezultatom ne moremo dati prevelike teže, saj znotraj dodanih dni ni veljala nobena od predpostavk ANOVE.

Preglednica 6: Vgnezdena ANOVA – deleži variance.

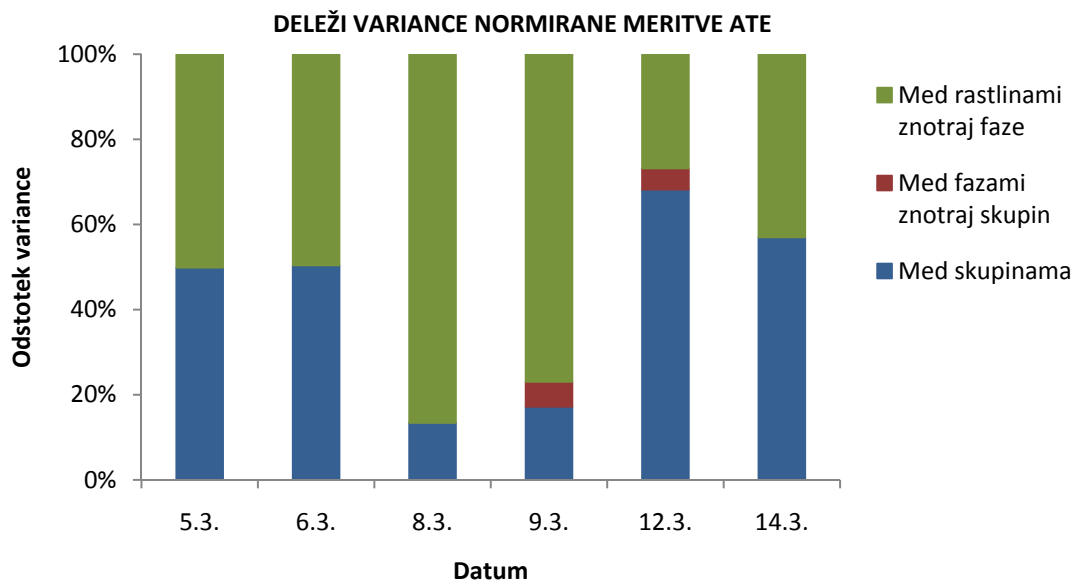
Primerjali smo sedem rastlin znotraj posamezne faze, faze znotraj posamezne skupine (pred, po in 40 min po izpostavitvi temperaturnemu stresu) in skupino kontrole s skupino izpostavljeno temperaturnemu stresu. V preglednici so zbrane P vrednosti ANOVE za posamezno primerjavo. Na podlagi primerjav skupin in podskupin so določeni deleži variance, ki povedo, kolikšen delež celotne variance med skupinama je posledica razlik med posameznimi rastlinami, kolikšen med fazami in kolikšen delež variance med skupinama je posledica razlik med njima. Statistično značilne razlike so označene z odebeljeno pisavo.

Datum	5.3.		9.3.		14.3.	
	Delež variance (%)		Delež variance (%)		Delež variance (%)	
Vgnezdena ANOVA	P		P		P	
Med skupinama	0,003	50	0,114	17	0,002	57
Med fazami znotraj skupine	0,701	0	0,214	6	0,704	0
Med meritvami znotraj faze		50		77		43



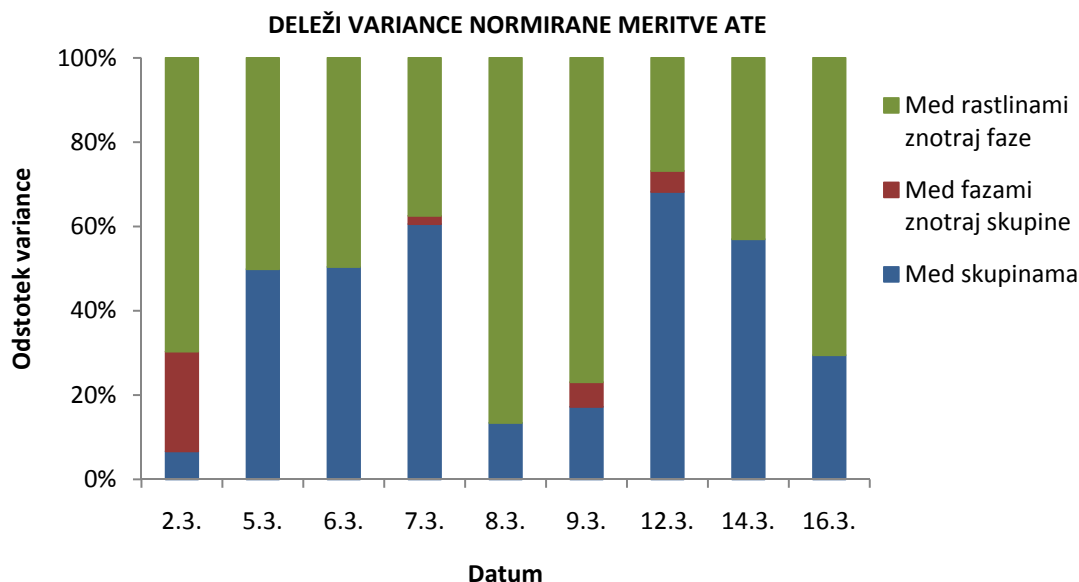
Slika 10: Deleži variance normirane meritve ATE po metodi vgnezdene ANOVE a.

Primerjali smo sedem rastlin znotraj posamezne faze, faze znotraj posamezne skupine (pred, po in 40 min po izpostavitvi temperaturnemu stresu) in skupino kontrole s skupino izpostavljeno temperaturnemu stresu. Dobljene vrednosti deležev varianc povedo, kolikšen delež celotne variance je posledica razlik med posameznimi rastlinami, kolikšen med fazami in kolikšen delež variance med skupinama je posledica razlik med njima. Za prikazane dni veljata predpostavki o normalo razporejenih podatkih in homogenosti variance podskupin.



Slika 11 Deleži variance normirane meritve ATE po metodi vgnezdene ANOVE b.

Primerjali smo sedem rastlin znotraj posamezne faze, faze znotraj posamezne skupine (pred, po in 40 min po izpostavitvi temperaturnemu stresu) in skupino kontrole s skupino izpostavljeno temperaturnemu stresu. Dobljene vrednosti deležev varianc povedo, kolikšen delež celotne variance je posledica razlik med posameznimi rastlinami, kolikšen med fazami in kolikšen delež variance med skupinama je posledica razlik med njima. Za prikazane dni veljata predpostavka o normalo razporejenih podatkih, NE velja pa predpostavka o homogenosti variance podskupin.



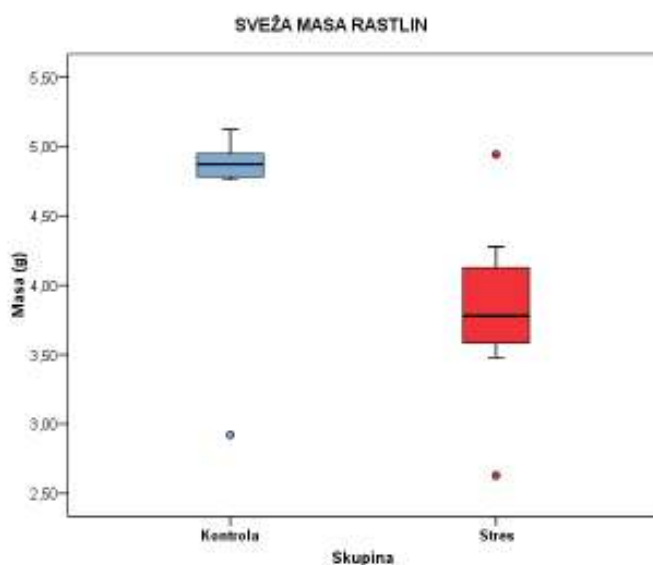
Slika 12: Deleži variance normirane meritve ATE po metodi vgnezdene ANOVE c.

Primerjali smo sedem rastlin znotraj posamezne faze, faze znotraj posamezne skupine (pred, po in 40 min po izpostavitvi temperaturnemu stresu) in skupino kontrole s skupino izpostavljeno temperaturnemu stresu. Dobljene vrednosti deležev varianc povedo, kolikšen delež celotne variance je posledica razlik med posameznimi rastlinami, kolikšen med fazami in kolikšen delež variance med skupinama je posledica razlik med njima. Za prikazane dni NE veljata predpostavki o normalo razporejenih podatkih in homogenosti variance podskupin.

4.2 SVEŽA IN SUHA MASA RASTLIN

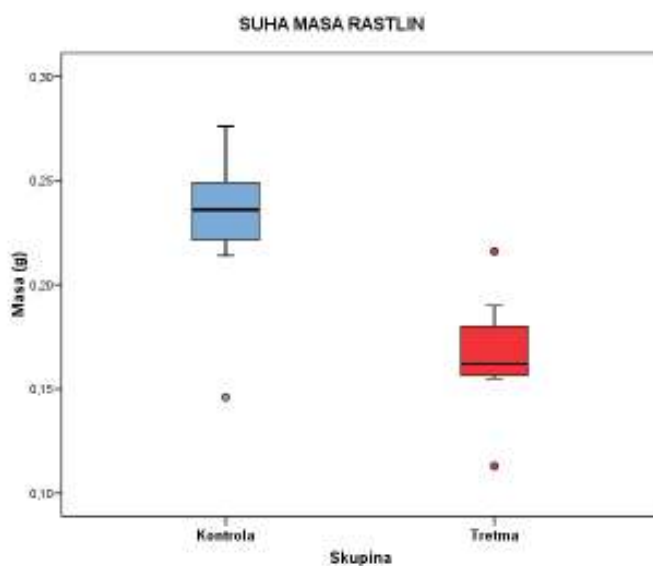
V prilogi C so zbrane izmerjene suhe in sveže mase rastlin v posamezni skupini, meritve sveže in suhe mase celih rastlin prikazujejo okvirji z ročaji (»box plots«) na slikah 13 in 14. Povprečna sveža in suha masa rastlin kontrole sta bili 4,62 g (SD=0,76) in 0,23 g (SD=0,04), sveža in suha masa rastlin tretmaja pa 3,82 g (SD=0,71) in 0,17 g (SD=0,71).

Analiza normalnosti (Shapiro-Wilk test) je pokazala, da podatki o sveži masi rastlin v kontrolni skupini niso normalno razporejeni ($p = 0,000$), zato smo za primerjavo vzorcev uporabili Mann-Whitney U test, ki je zaznal slabo značilno razliko med svežo maso rastlin kontrole in svežo maso rastlin izpostavljenih stresu ($p = 0,064$). Primerjava suhe mase rastlin kontrole in tretmaja z Mann-Whitney U testom je dala značilno razliko med vzorcema ($p = 0,025$). Za primerjavo suhih mas smo opravili tudi neodvisni parni t-test (podatki so normalno razporejeni, varianca je homogena), ki je tudi pokazal značilno razliko med vzorcema ($p = 0,008$).



Slika 13: Okvirji z ročaji po skupinah za svežo maso rastlin.

Vsaj okvir z ročaji zajema povprečne vrednosti mase posamezne rastline ($N=7$). S prečno črto je označena mediana, meji okvirja sta spodnji in zgornji kvartil (Q_1 in Q_3), ročaji pa prikazujejo zadnje vrednosti, ki so za manj kot 1,5 kvartilnega razmika (Q_3-Q_1) oddaljeni od spodnjega in zgornjega kvartila. Vrednosti zunaj tega obsega so označene s $\circ$ (krog), ekstremne vrednosti, ki so za več kot 3 kvartilne razmike oddaljene od spodnjega oz. zgornjega kvartila, so označene z $*$ (zvezdica). Rastline v skupini stresa so bile tekom poskusa večkrat izpostavljene temperaturnemu stresu (40 min na 42 °C). Izhodišče ordinate je premaknjeno in se ne začne v 0.



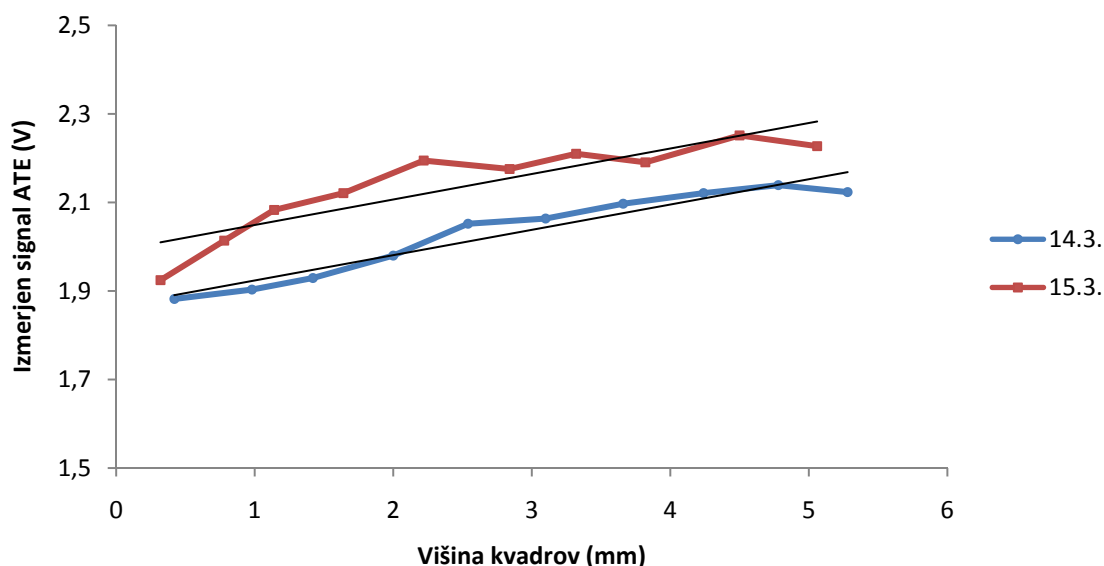
Slika 14: Okvirji z ročaji po skupinah za suho maso rastlin.

Vsaj okvir z ročaji zajema povprečne vrednosti mase posamezne rastline ($N=7$). S prečno črto je označena mediana, meji okvirja sta spodnji in zgornji kvartil (Q_1 in Q_3), ročaji pa prikazujejo zadnje vrednosti, ki so za manj kot 1,5 kvartilnega razmika (Q_3-Q_1) oddaljeni od spodnjega in zgornjega kvartila. Vrednosti zunaj tega obsega so označene s ○ (krog), ekstremne vrednosti, ki so za več kot 3 kvartilne razmike oddaljene od spodnjega oz. zgornjega kvartila, so označene z * (zvezdica). Rastline v skupini stresa so bile tekom poskusa večkrat izpostavljene temperaturnemu stresu (40 min na 42 °C). Izhodišče ordinate je premaknjeno in se ne začne v 0.

4.3 MERITVE ATE NEŽIVIH OBJEKTOV

Slika 15 prikazuje odvisnost vrednosti ATE kvadrov iz kartonskih plošč od njihove višine za dva ločena poskusa. 14.3. je višina kvadrov postopno naraščala, 15.3. pa je višina kvadrov postopno padala. Povprečni korelacijski koeficient med višino in vrednostjo ATE obeh poskusov je bil $k = 0,93$. Korelacijski koeficient med maso in vrednostjo ATE obeh poskusov je bil še višji – $k = 0,94$, korelacijski koeficient med maso in višino kvadrov pa je bil praktično 1. Izmerjene vrednosti ATE, višine in mase kvadrov so zbrane v prilogi D.

IZMERJENE VREDNOSTI ATE KARTONASTIH KVADROV



Slika 15: Povprečne izmerjene vrednosti ATE v odvisnosti od višine kartonastih kvadrov iz 1 do 10 kartonskih plošč. Prikazane točke so povprečja sedmih zaporednih meritev ATE na posameznem kvadru, ki smo mu izmerili višino. Rezultati prvega poskusa (14.3) in ponovitve (15.3) so prikazani ločeno. Izhodišče ordinate je premaknjeno in se ne začne v 0.

5. RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Razmere med poskusom

Razmere so tekom poskusa ostajale dokaj nespremenjene. Njihovega vpliva na izmerjene vrednosti ATE ne moremo izključiti, vendar pa je očitno, da le te niso sledile nihanju temperature in relativne zračne vlage. Razpon temperatur je bil znotraj optimalnega okvirja za razvoj fižola in sam po sebi ni predstavljal posebnega stresa za rastline.

5.1.2 Vrednosti ATE živih in neživih objektov

Primerjava korelacijskega koeficienta debeline poganjkov in vrednosti ATE rastlin (živ objekt) s korelacijskim koeficientom višine in vrednosti ATE kvadrov iz kartonskih plošč (neživ objekt) je pokazala očitno razliko. Veliko nižja korelacija pri rastlinah nakazuje, da so bile vrednosti ATE močno odvisne tudi od fiziološkega stanja rastline in ne le od fizikalnih parametrov. Podobno so ugotovili Škarja in sod. (2005), ki so pokazali, da se organizmi obnašajo drugače kot prevodna telesa z dano maso, volumnom in vsebnostjo vode. Koeficient korelacije med ATE bližnjega električnega polja in višino vodnega stolpca je bil 0,99, korelacijski koeficient med ATE bližnjega električnega polja in višino ljudi pa je bil zanemarljivo majhen (Škarja in sod. 2005).

5.1.3 Vpliv fiziološkega stanja na vrednost ATE rastlin

Primerjava normiranih vrednosti ATE med skupinama kontrole in tretmaja pred izvajanjem temperaturnega stresa je pokazala, da izbrani skupini pripadata isti populaciji. Podobno je pokazala primerjava premera poganjkov rastlin v obeh skupinah. Temperaturni stres je že v naslednji fazi eksperimenta povzročil značilno razliko med skupinama. 40min izpostavljenost rastlin 42°C je očitno povzročila pomembno spremembo v fiziološkem stanju rastline, kar je v skladu z opaženim hitrim odzivom rastlin na povečano temperaturo zraka (Taiz in Zeiger, 2006: 672). Verjetno je že v nekaj minutah prišlo do aktivacije HSP transkripcijskih faktorjev in sinteze HSP proteinov, za kar pa je rastlina namenila veliko energije (povečano celično dihanje). V času temperaturnega stresa so bile rastline tretmaja tudi v slabših svetlobnih razmerah, kar je še dodatno znižalo stopnjo fotosinteze, ki je padla že zaradi povečane aktivnosti Rubisco oksigenaze ob višjih temperaturah (Morison in Lawlor, 1999).

Nadaljnje dni poskusa so bile z izjemo 8.3. rastline obeh skupin različne že pred začetkom izvajanja stresa. Verjetno so bile rastline na različnih ontogenetskih stopnjah, saj je ontogenetski razvoj močno odvisen od rastnih razmer (Morison in Lawlor, 1999). Razlika se je ohranila tudi, ko smo prenehali z izvajanjem temperaturnega stresa (12., 14., 16.3.). Izpostavitve temperaturnemu stresu je tako pustila dolgotrajne posledice na rastlinah. Višje normirane vrednosti ATE kontrole 8.3. bi lahko bile posledica aktivacije določene faze ontogenetskega razvoja, ki bi povzročila dvig vrednosti ATE rastlin kontrole, rastline tretmaja pa bi morda šle skozi to fazo razvoja v kasnejših dneh, ko žal nismo izvajali meritev ATE. Seveda je to zgolj predvidevanje, ki bi ga veljalo preveriti v morebitnih nadaljnjih raziskavah.

Na sliki 8 lahko opazimo, da so se vrednosti ATE tekom dni pri obeh skupinah podobno spreminjale. Med samim razvojem so rastline prehajale v različne razvojne faze, ki jim odgovarjajo specifična fiziološka stanja, kar bi lahko razložilo opaženo časovno nihanje vrednosti ATE.

Opazimo, da je bila povprečna normirana vrednost ATE rastlin tretmaja višja od vrednosti rastlin kontrole. Podobno opazimo tudi, če primerjamo faze znotraj posameznega dne. Vrednosti tretje faze so bile običajno višje kot vrednosti prve faze, kar je razvidno tudi s slike 9. To nakazuje, da imajo rastline pod stresom višje vrednosti ATE. Višje vrednosti ATE kasnejših faz rastlin kontrole nakazujejo, da so tudi slednje tekom izvedbe poskusa prestajale stres. Ta sicer ni bil toplotni, smo pa med samim poskusom rastline večkrat premaknili, nanje pripeli merilni sistem in tako povzročili mehanski stres, ki se je morda odražal tudi na fiziološkem stanju rastlin.

Primerjava posameznih faz znotraj dneva (preglednica 5) je največkrat pokazala na statistično značilno razliko med ustreznimi pari faz obeh skupin, prisotne pa so bile tudi razlike med fazami iste skupine. Pričakovali smo tudi značilno razliko med S1 in S2 fazo, a je bila ta redko statistično značilna. Uporabljena Kruskal-Wallis neparametrična ANOVA je manj močna in zaradi velikega števila primerjanih skupin lahko pogosto privede do napak prvega tipa (falsse positive). Zanesljivejša Welch ANOVA je izpostavila veliko manj značilnih razlik med pari faz, tako da gotovih zaključkov o zanesljivosti metode kot kazalca fiziološkega stanja ne moremo narediti. Ena od težav pri analizi podatkov je bila gotovo majhnost vzorca, večje število podatkov bi nam vlilo več zaupanja v interpretacijo rezultatov.

Vgnezdena ANOVA je pokazala, da so zelo majhen delež variance prispevale razlike med fazami znotraj iste skupine. Večino variance je šlo na račun razlik med skupinama, velika variabilnost pa je bila tudi med rastlinami znotraj posamezne faze. Slednja je bila 9.3. še

posebej izrazita, kar dodatno govori v prid vključitvi nekega razvojno značilnega fiziološkega stanja, ki pa ga posamezne rastline niso dosegle sočasno.

5.1.4 Vpliv toplotnega stresa na rastline

Primerjava svežih mas rastlin ob koncu poskusa je pokazala, da sta se skupini rastlin delno razlikovali med seboj, analiza suhe mase pa je to razliko nedvomno potrdila. Zato lahko zaključimo, da je izpostavljanje rastlin 42 °C za 40 min povzročalo dejanski stres, ki se je odrazil v manjši biomasi rastlin tretmaja v primerjavi s kontrolo. Stres lahko dodatno potrdimo tudi z našimi opažanji, saj so bile rastline tretmaja že na pogled manjše in so imele slabše razvite liste in poganjke.

5.1.5 Komentar k uporabljeni metodi

Metoda EMADDEL se je izkazala za obetavno, meritve ATE bližnjega električnega polja rastlin so pokazale določene razlike med rastlinami izpostavljenimi stresu in rastlinami kontrole. Za bolj zanesljive zaključke je potrebno metodo še nekoliko spremeniti, izboljšati, predvsem je potrebno razmisliti o pravilnem protokolu, ki bi čim bolj eliminiral mehanski stres na rastline. Verjetno je potrebno prilagoditi tudi merilni sistem, morda tako, da bi bila oddajni in detekcijski sistem fiksna, vmes pa bi postavili rastlino. Druga možnost je merjenje ATE na več točkah iste rastline hkrati, vendar pa bi bilo potrebno izdelati prilagojene merilne sisteme za posamezne dele rastline.

Ena glavnih težav pilotskega poskusa so bili nenormalno razporejeni podatki, ki jih nismo mogli normalizirati z nobeno izmed običajnih transformacij. To bi verjetno lahko odpravili s povečanjem števila rastlin v poskusu, kar pa bi nam omogočilo uporabo parametričnih testov, s katerimi bi opravili močnejše statistične analize in imeli več zaupanja v naše zaključke.

Zanimivo bi bilo vpeljati tudi drugačne tretmaje. Rastline bi tako lahko izpostavili osmotskemu stresu, nizkim temperaturam, pomanjkanju hranil, različnim koncentracijam hormonov, težkim kovinam in drugim dejavnikom. Zanimivo bi bilo večkrat ponovljeno spremljanje razvoja rastlin in iskanje morebitnih vzorcev gibanja signala ATE v odvisnosti od faze razvoja. Tako bi se utegnili meritev ATE izkazati za primerno za določanje prehoda med heterotrofnim in avtotrofnim načinom življenja rastline.

5.2 SKLEPI

- V diplomskem delu smo prvič preskusili metodo EMADDEL kot kazalnik fiziološkega stanja rastline.
- Fizikalni parametri imajo pri rastlinah značilen, a veliko manjši vpliv na absorbcijo, transmisijo in emisijo bližnjega električnega polja v primerjavi z neživimi objekti.
- Pokazale so se razlike med absorbcijo, transmisijo in emisijo bližnjega polja rastlin v različnih fizioloških stanjih, vendar pa so rezultati zaradi šibkih statističnih testov nezanesljivi.
- Rastline izpostavljene temperaturnemu stresu imajo povečano ATE bližnjega električnega polja.
- Večkratna 40 min izpostavitve rastlin 42 °C povzroča stres, ki se odraža v manjši biomasi rastlin.
- Optimizirana metoda bi lahko služila kot kazalnik fiziološkega stanja rastline.

6. POVZETEK

V sodobnem svetu so organizmi vedno bolj izpostavljeni antropogenim elektromagnetnim sevanjem, ki poleg dobro poznanih termalnih učinkov povzročajo tudi atermalne. Slednji so vezani izključno na žive sisteme. Novejša odkritja predpostavljajo, da zunanja EM polja interagirajo z endogenim koherentnim EM poljem v organizmu, način interakcije pa bi naj bil odvisen tudi od fiziološkega stanja organizma. V diplomskem delu smo želeli preveriti vpliv fiziološkega stanja fižola (*Phaseolus vulgaris* L.) na absorpcijo, transmisijo in emisijo bližnjega električnega polja.

Interakcija snovi z električnim, magnetnim ali elektromagnetnim poljem je odvisna od lastnosti snovi (dielektričnost, magnetna permeabilnost) in lastnosti polja (amplituda, frekvenca, faza, gradient EM polja). Električno polje v organizmih povzroči nastanek tokov prostih nabojev, polarizacijo vezanih nabojev, nastanek dipolov in reorientacijo stalnih dipolov. Oscilirajoče magnetno polje povzroči nastanek internega električnega polja v organizmih.

Elektromagnetno valovanje s frekvenco nižjo do 100kHz in magnetno polje manjše od 20mT zaradi premajhne energije ne povzroči temperaturnih sprememb v tkivih, pride pa do številnih atermalnih učinkov. Ti se pojavijo šele po določenem času izpostavitve in samo, če je presežena prazna jakost dražljaja ter le znotraj ustreznega frekvenčnega okna, ki je lahko vrstno značilno.

Vplivi zunanjih EM polj na rastline so raznoliki in odvisni od amplitude, frekvence in komponente, ki deluje na rastlino. Največ poskusov je bilo narejenih na stimulaciji rasti pridelkov z izpostavitvijo elektromagnetnim poljem in izpostavitvijo semen magnetnim poljem, vendar pa so izsledki raziskav neenotni. Pogosto se je pokazalo, da zunanja EM polja povzročajo stres v rastlinah, ki spremeni metabolizem organizma, ta lahko vodi v asimetrijo listov, povečano proizvodnjo smole, kopičenje signalnih molekul za stres (alanin) in drugo.

Fröhlich je svojo teorijo o endogenih koherentnih elektromagnetnih oscilacijah v organizmih osnoval na treh lastnostih živih sistemov: (1) so relativno stabilni, daleč od termodinamskega ravnotežja, (2) kažejo kompleksen, dinamičen, nelinearen red in (3) imajo izredne dielektrične lastnosti, katerih osnova so električna polja čez membrano. Nastale koherentne oscilacije bi naj imele razpon od 10^9 in 10^{12} Hz. Danes obstajajo mnogi posredni eksperimentalni dokazi in novejša teorije endogenih koherentnih polj.

Temperaturni stres povzroči spremembe v celičnem ciklu, ekspresiji genov, sintezi proteinov, strukturi membran in celične stene, zmanjša učinkovitost prenosa elektronov v PSII in PSI sistemu ter negativno vpliva na stopnjo rasti. Na temperaturni stres so še posebej občutljive mlade rastline, ki imajo zaradi premajhne površine manj možnosti hlajenja z izhlapevanjem vode.

V diplomskem delu smo uporabili metodo EMADDEL, ki so jo razvili na Inštitutu Bion. Princip meritve temelji na absorpciji, transmisiji in emisiji (ATE) bližnjega zunanega električnega polja skozi rastlino, ki deluje kot posrednik med oddajnim in detekcijskim sistemom. Oddajni sistem deluje kot vir bližnjega električnega polja, detekcijski sistem pa oddano bližnje polje rastline prestreže oz. izmeri.

Primerjali smo meritve ATE rastlin kontrole z rastlinami tretmaja. Vsak dan merjenj smo v 40 min razmaku opravili tri faze meritev, pri čemer smo med prvo in drugo fazo rastline tretmaja za 40 min izpostavili 42 °C. Spremljali smo tudi anatomske značilnosti rastlin in rastlinam ob koncu poskusa določili biomaso. Za primerjavo smo z merilnim sistemom izvedli tudi meritve ATE različno visokih kvadrov iz kartonskih plošč nasičenih z vodo.

Rezultati so pokazali, da so bile rastline tretmaja nedvomno pod stresom, saj je njihova biomasa značilno manjša od biomase rastlin kontrole. Pred začetkom poskusa ni bilo razlik v vrednostih ATE med obema skupinama, statistično značilne razlike so se pojavile takoj po prvem izvajanju temperaturnega stresa. Rastline tretmaja so imele višje vrednosti ATE v primerjavi z rastlinami kontrole, razlika pa se je bolj ali manj ohranila tekom celotnega eksperimenta. Razlikovale so se tudi vrednosti ATE med fazami znotraj iste skupine, kar lahko verjetno razložimo s prisotnostjo mehanskega stresa tekom izvajanja meritev. Vgnezdena ANOVA je pokazala, da velik delež variance med skupinama izvira iz razlik med rastlinami znotraj iste faze in iz razlik med skupinama, zanemarljiv delež pa so prispevale razlike med fazami znotraj iste skupine. Korelacijski koeficient med vrednostmi ATE in premerom poganjkov je bil majhen ($r = -0,126$; $p = 0,012$), medtem, ko je bil korelacijski koeficient med višino kvadrov iz kartonskih plošč in vrednostmi ATE skoraj 1 ($k = 0,94$). To nakazuje specifično interakcijo bližnjega el. polja z rastlinami, ki bi lahko bila odvisna od fiziološkega stanja rastline.

Meritve ATE so potencialno primerno orodje za ugotavljanje fiziološkega stanja rastline, vendar pa je potrebno metodo še izpopolniti in predvsem zmanjšati motenje rastlin med samo meritvijo. V nadaljnjih poskusih bi bilo dobro uporabiti tudi večje število rastlin, kar bi omogočilo uporabo močnejših statističnih testov.

7. VIRI

7.1 CITIRANI VIRI

- Bischof M. 2003. *Introduction to Integrative Biophysics. V: Integrative biophysics*. Popp F. A., Belousov L. (eds.). Netherlands, Kluwer Academic Publishers: 1-115
- Bischof M. 1994. *The history of bioelectromagnetism. V: Bioelectrodynamics and biocommunication*. Ho M. W., Popp F. A., Wranke U. (eds.). Singapore, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd: 1 - 32
- Bistolfi F. 1991. *Biostructures and Radiation Order Disorder*. Torino, Edizioni Minerva Medica: 154-169
- Capps C. 2001. *Near field or far field ?*. *Electronics Design, Strategy, News* 8: 95-102 EDN 16. Avgust 2001.
<http://www.edn.com/article/CA150828.html?text=Near+field+Capps> (25. avg 2008)
- Cowling S. A., Sage R. F. 1998. *Interactive effects of low atmospheric CO₂ and elevated temperature on growth, photosynthesis and respiration in Phaseolus vulgaris*. *Plant cell and environment*, 21: 427 – 435
- Del Giudice E., De Ninno A., Fleischmann M., Mengoli G., Milani M., Talpo G., Vitello G. 2005. *Coherent Quantum Electrodynamics in Living Matter*. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 24: 199-210
- Del Giudice E., Preparata G. 1994. *Coherent dynamics in water as possible explanation of membrane formation*. *J. of Biol. Phys.*, 20, 105–116
- Electromagnetic radiation. 2008. Wikipedia (ed. 25.8.2008).
http://en.wikipedia.org/wiki/Electromagnetic_radiation (30.8.2008)
- Freeman D. C., Graham J. H., Tracy M., Emlen J. M., Alados C. L. 1999. *Developmental instability as a means of assessing stress in plants: A case study using electromagnetic fields and soybeans*. *International journal of plant sciences*, Vol. 160, No. 6, S157 – S166
- Fröhlich H. 1978. *Coherent electric vibrations in biological systems and the cancer problem*. *IEEE Transactions on Microwave theory and techniques*, 26, 8 : 613-617

- Fröhlich H. 1975. *The extraordinary dielectric properties of biological materials and the action of enzymes. Proc. Nat. Acad. Sci.*, 72, 11: 4211-4215
- Giancoli D. C. 2000. *Physics for scientist & engineers with modern physics. 3rd edition. Upper Saddle River, Prentice Hall: 1172 str.*
- Georgieva Katia. 1999. *Some mechanisms of damage and acclimation of the photosynthetic apparatus due to high temperature. Bulgarian journal of plant physiology*, 25 (3-4): 89-99
- Goldsworthy A. 2006. *Effects of electrical and electromagnetic fields on plants and related topics. V: Plant Electrophysiology. Theory and methods. 2006. Volkov A.G. (Ed.). Berlin, Springer: 247 - 267*
- Hyland G.J. 2003a. *Bio-Electromagnetism. V: Integrative biophysic: Biophotonics, Popp F.A., Belousov L. (eds.). Netherlands, Kluwer Academic Publishers: 117-148*
- Hyland G.J. 2003b. *Herbert Fröhlich, FRS (1905 – 1991) – A physicist ahead of his time. Electromagnetic biology and medicine*, 24: 161-182
- Hyland G.J. 1998. *Non-thermal bioeffects induced by low-intensity microwave irradiation of living systems. Engineering science and education journal*, 12: 261-268
- Ikeda T., Nonami H., Fukuyama T., Hashimoto Y. 1999. *Hydraulic contribution in cell elongation of tissue-cultured plants: growth retardation induced by osmotic and temperature stresses and addition of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and benzylaminopurine. Plant cell and environment*, 22: 899 – 912
- International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection. 1998. *Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic, and electromagnetic field(up to 300 GHz). Health Physics*, 74, 4: 494 - 522
- Jerman I., Štern A. 1999. *Evolucija s teoretično biologijo.*, Ljubljana, ŠOU, Študentska založba: 143 str.
- Jerman I., Štern A. 1996. *Empirične in teoretične osnove nove biologije. V: Gen v valovih: porajanje nove biologije. Jerman I., Štern A. (ur.). Ljubljana, Znanstveno in publicistično središče: 177 – 200*
- http://www.bion.si/gradiva-objave/geni_v_valovih.pdf (20.9.2008)

- Jogan N. 2001. Navodila za vaje iz sistematske botanike. 3. Izdaja delovne verzije. <http://botanika.biologija.org/sist/skripta/sistbot-navodila-za-vaje.pdf> (21.9.2008)
- Lambreva M., Stoyanova-Koleva D., Baldjiev G., Tsonev T. 2005. Early acclimation changes in the photosynthetic apparatus of bean plants during short-term exposure to elevated CO₂ concentration under high temperature and light intensity. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 106: 219–232
- Liboff A.R. 2004. Toward an electromagnetic paradigm for biology and medicine. *The journal of alternative and complementary Medicine*, 10: 41 – 47
- Marino A. A., Becker R. O. 1977. Biological effects of extremely low frequency electric and magnetic fields: A review. *Physiol. Chem. & Physics*, 9: 131 – 147
- McDonald J. H. 2008a. *Handbook of Biological Statistics*. (16. Sep. 2008). <http://udel.edu/~mcdonald/statintro.html> (10.9.2008)
- McDonald J. H. 2008b. *Handbook of Biological Statistics*. (16. Sep. 2008). <http://udel.edu/~mcdonald/statnested.xls> (10.9.2008)
- Mei W. P. 1994. On the biological nature of biophotons. V: *Bioelectrodynamics and biocommunication*. 1994. Ho M. W., Popp F. A., Wranke U. (eds.). Singapore, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd: 269-291.
- Monselise B.-I. E., Parola A. H., Kost D. 2003. Low-frequency electromagnetic fields induce stress effect upon higher plants, as evident by the universal stress signal, alanine. *Biochemical and biophysical research communications*, 302: 427 – 434
- Morison J. I. L., Lawlor D.W. 1999. Interactions between increasing CO₂ concentration and temperature on plant growth. *Plant cell and environment*, 22: 656 – 682
- Phaseolus vulgaris* (Etna Bush Bean). Backyard Gardener.com http://www.backyardgardener.com/plantname/pda_1be7.html (20.8.2008)
- Pittman U. J. 1997. Effects of magnetic seed treatment on yields of barley, wheat, and oats in southern Alberta. *Can. J. plant Sci.*, 57: 37-45
- Polk C. 1991. Biological effects of low-level low-frequency electric and magnetic fields. *IEEE transactions on education*, 34, 3: 243 - 249

Popp F.A. 1994. *Electromagnetism and living systems. V: Bioelectrodynamics and biocommunication.* 1994. Ho M. W., Popp F. A., Wranke U. (eds.). Singapore, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd: 33-80

Porch T.G. 2006. *Application of Stress Indices for Heat Tolerance Screening of Common Bean.* *Journal of agronomy and crop science*, 192: 390 – 394

Selga T., Selga M. 1996. *Response of Pinus Sylvestris L. needles to electromagnetic fields. Cytological and ultrastructural aspects. The science of the total environment* 180, 65 – 73

Smith C.W. 1994. *Biological effects of weak electromagnetic fields. V: Bioelectrodynamics and biocommunication.* 1994. Ho M. W., Popp F. A., Wranke U. (eds.). Singapore, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd: 81-108

Škarja M., Jerman I., Leskovar R.T. 2005. *Changes of electric potencial of sensors due to near field contact with organisms. V: Coherence and electromagnetic fields in biological sistems, Fröhlich Centenary International Symposium, Juli 1-4 2005, Institute of radio engineering and electronics, Prague*

Škarja M., Jerman I. Ružič R., Leskovar R.T., Jejčič L. 2008. *Electric Field absorbtion and emission as an indicator of active electromagnetic nature of organisms – preliminary report. (oddano za objavo)*

Teiz L., Zeiger E. 2006. *Plant Physiology. 4th. Edition. Sunderland, Sinauer Associates, Inc. 764 str.*

7.2 DRUGI VIRI

Electromagnetic radiation. 2008. *Wikipedia (ed. 25.8.2008).*
http://en.wikipedia.org/wiki/Electromagnetic_radiation (30.8.2008)

ZAHVALA

Zahvaliti se želim mentorju, prof. dr. Igorju Jermanu, ki me je navdušil za področje endogenih polj v organizmih in mi s številnimi diskusijami pomagal osvojiti osnovna spoznanja novih pogledov na organizme.

Zahvaljujem se dr. Metodu Škarji, ki je prilagodil merilne inštrumente in tako omogočil izvajanje meritev na rastlinah ter ob vsem tem mirno prenašal moje pomanjkljivo znanje fizike. Pri sami izvedbi meritev ne bi šlo brez dr. Romane Ružič, ki me je prijazno vpeljala v laboratorijsko delo in mi odstopila del prostorov v uporabo.

Somentorici prof. dr. Marjani Regvar hvala za vse koristne napotke in nežne brce v rit, ko sem jih najbolj potreboval.

Hvala dr. Roku Krašovcu, dr. Robertu Leskovarju in Matevžu Likarju za pomoč pri obdelavi podatkov in spopadanju s to prečudovito statistiko.

Iskrena hvala celotni komisiji za zagovor diplomskega dela: prof. dr. Marini Dersmastia, doc. dr. Barbari Vilhar, prof. dr. Igorju Jermanu in prof. dr. Marjani Regvar za izredno hiter in kritičen pregled rokopisa, brez česar bi se moja znanstvena kariera verjetno zaključila še preden bi se zares začela.

Posebna zahvala gre moji mami, ki me je vsa ta leta študija podpirala in spodbujala ter ni pustila, da bi dokončno skrenil s poti, bratu Mihi, ki je pridno učil računalnik vseh potrebnih trikov za izdelavo diplomskega dela in bratu Alešu za konstantno navijanje in podporo tekom študija.

Hvala tudi vsem kolegicam in kolegom, ki so mi tekom študija stali ob strani in poskrbeli, da mi bodo študentska leta ostala v lepem spominu.

PRILOGA A

Premeri stebel rastlin

Premeri stebel rastlin v predelu namestitve merilnega sistema. Posamezne rastline so označene s številkami od 1 do 14, vrednosti v preglednici so povprečja 7 zaporednih meritev premera na posamezni rastlini za vsak dan izvajanja poskusa.

		Premer stebela rastline (mm)								
Datum Rastlina		2.3.	5.3.	6.3.	7.3.	8.3.	9.3.	12.3.	14.3.	16.3.
KONTROLA	1	3,5	3,5	3,3	3,4	3,4	3,4	3,4	3,5	3,4
	2	2,9	3,1	3,0	3,2	3,3	3,4	3,4	3,3	3,3
	3	2,9	3,3	3,2	3,1	3,1	3,3	3,4	3,4	3,4
	4	3,5	3,4	2,8	2,9	2,8	3,0	3,4	3,4	3,4
	5	3,1	3,1	2,9	2,9	3,0	3,0	3,7	3,3	3,3
	6	3,4	3,4	3,5	3,5	3,5	3,7	3,1	3,7	3,6
	7	3,4	3,4	3,4	3,2	3,3	3,4	3,0	3,3	3,4
TRETA	8	3,1	3,4	3,1	3,2	2,9	3,1	3,2	3,1	3,2
	9	3,3	2,9	2,8	2,7	2,9	2,9	3,0	2,9	2,9
	10	3,6	3,4	3,1	3,2	3,1	3,3	3,2	3,0	2,9
	11	3,0	2,9	2,7	2,4	2,8	2,8	2,9	2,9	2,8
	12	3,9	4,2	4,1	4,1	4,3	3,9	4,0	4,1	3,9
	13	3,6	3,4	3,4	3,3	3,5	3,5	3,6	3,5	3,5
	14	3,4	3,5	3,4	3,4	3,6	3,5	3,6	3,6	3,2

PRILOGA B

Povprečja normiranih vrednosti ATE po fazah

Povprečja normiranih vrednosti ATE s standardno deviacijo (SD) in relativno standardno napako (SE) po posameznih fazah na dan meritev. Posamezna vrednost ATE v preglednici je povprečje 49 meritev znotraj posamezne faze (meritve 7 rastlin, vsaka 7 zaporednih meritev).

Datum:		2.3.			5.3.			6.3.		
Skupina	Faza	Povprečje ATE (V)	SD	SE(%)	Povprečje ATE (V)	SD	SE (%)	Povprečje ATE (V)	SD	SE (%)
KONTROLA	faza K1	1,61	0,02	0,69	1,42	0,04	1,60	1,38	0,03	0,97
	faza K2	1,55	0,05	1,81	1,42	0,06	2,31	1,40	0,02	0,74
	faza K3	1,52	0,08	2,87	1,42	0,03	1,17	1,40	0,02	0,60
TRETMA	faza S1	1,62	0,09	3,37	1,47	0,04	1,57	1,44	0,04	1,49
	faza S2	1,62	0,04	1,47	1,50	0,04	1,46	1,45	0,05	1,95
	faza S3	1,56	0,05	1,92	1,47	0,04	1,61	1,45	0,06	2,17

Datum:		7.3.			8.3.			9.3.		
Skupina	Faza	Povprečje ATE (V)	SD	SE (%)	Povprečje ATE (V)	SD	SE (%)	Povprečje ATE (V)	SD	SE (%)
KONTROLA	faza K1	1,37	0,02	0,84	1,38	0,03	1,14	1,38	0,03	0,98
	faza K2	1,36	0,02	0,85	1,39	0,02	0,63	1,40	0,02	0,72
	faza K3	1,40	0,02	0,84	1,40	0,02	0,62	1,42	0,03	1,26
TRETMA	faza S1	1,43	0,04	1,40	1,40	0,07	2,65	1,43	0,04	1,37
	faza S2	1,43	0,03	1,24	1,41	0,06	2,37	1,43	0,05	1,90
	faza S3	1,43	0,04	1,60	1,44	0,06	2,08	1,42	0,04	1,51

Datum:		12.3.			14.3.			16.3.		
Skupina	Faza	Povprečje ATE (V)	SD	SE (%)	Povprečje ATE (V)	SD	SE (%)	Povprečje ATE (V)	SD	SE (%)
KONTROLA	faza K1	1,32	0,02	0,64	1,32	0,02	0,90	1,38	0,04	1,34
	faza K2	1,35	0,02	0,66	1,33	0,02	0,78	1,39	0,03	1,31
	faza K3	1,37	0,02	0,76	1,33	0,02	0,80	1,40	0,06	2,28
TRETMA	faza S1	1,41	0,04	1,57	1,41	0,04	1,47	1,42	0,02	0,71
	faza S2	1,43	0,04	1,57	1,38	0,06	2,08	1,44	0,05	1,89
	faza S3	1,44	0,05	1,96	1,38	0,06	2,10	1,43	0,02	0,90

PRILOGA C

Sveža in suha masa rastlin ob koncu eksperimenta

Posamezne rastline so označene z zaporednimi števkami od 1 do 14. Vsako rastlino smo na stiku s prstjo prečno prerežali in določili svežo in suho maso nadzemnih in podzemnih delov. Vrednosti v preglednici so povprečne mase treh zaporednih meritev.

		SVEŽA MASA (g)			SUHA MASA (g)		
	Rastlina	Nadzemni del	Podzemni del	Cela rastlina	Nadzemni del	Podzemni del	Cela Rastlina
KONTROLA	1	4,212	0,548	4,760	0,186	0,028	0,214
	2	4,633	0,490	5,123	0,227	0,049	0,276
	3	2,473	0,449	2,922	0,112	0,034	0,146
	4	4,447	0,450	4,897	0,213	0,003	0,243
	5	4,590	0,409	4,999	0,225	0,003	0,255
	6	3,924	0,949	4,873	0,179	0,057	0,236
	7	4,275	0,528	4,803	0,204	0,025	0,229
TRETMA	8	2,486	0,143	2,629	0,104	0,009	0,113
	9	3,247	0,531	3,778	0,135	0,023	0,158
	10	3,389	0,300	3,689	0,144	0,018	0,162
	11	3,058	0,422	3,480	0,137	0,018	0,155
	12	4,113	0,830	4,943	0,179	0,037	0,216
	13	3,790	0,489	4,279	0,164	0,026	0,190
	14	3,376	0,598	3,974	0,141	0,029	0,170

PRILOGA D

Vrednosti mase, višine in ATE kartonskih kvadrov

V preglednici so izmerjene vrednosti mase, višine in ATE kvadrov iz 1 do 10 kartonskih plošč. Prikazane vrednosti mase so povprečja treh zaporednih meritev, vrednosti višine so povprečja petih zaporednih meritev (povprečna relativna standardna napaka meritev višine je bila 1,4%) in vrednosti ATE so povprečja sedmih zaporednih meritev (povprečna relativna standardna napaka meritev ATE je bila 0,30%) na posameznem kvadru. Rezultati prvega poskusa (14.3) in ponovitve (15.3) so prikazani ločeno.

Poskus	št. kart. plošč	Masa (g)	Višina (mm)	ATE (V)
14.3.	1	0,130	0,4	1,88
	2	0,268	1,0	1,90
	3	0,417	1,4	1,93
	4	0,591	2,0	1,98
	5	0,754	2,6	2,05
	6	0,924	3,1	2,06
	7	1,094	3,7	2,10
	8	1,229	4,3	2,12
	9	1,424	4,8	2,14
	10	1,546	5,3	2,12
15.3.	1	0,165	0,3	1,92
	2	0,330	0,8	2,01
	3	0,501	1,2	2,08
	4	0,650	1,7	2,12
	5	0,850	2,2	2,20
	6	1,022	2,9	2,18
	7	1,229	3,3	2,21
	8	1,356	3,8	2,19
	9	1,556	4,5	2,25
	10	1,699	5,1	2,23