

EFFECT OF FLUORANTHENE ON HILL REACTION AND CHLOROPHYLL FLUORESCENCE IN PEA PLANTS

VLIV FLUORANTHENU NA HILLOVU REAKCI A FLUORESCENCI CHLOROFYLU U ROSTLIN HRACHU

Krulová J., Kummerová M.

Katedra Fyziologie a anatomie rostlin, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita v Brně, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Česká republika.

E-mail: kopytnik@sci.muni.cz, kumerova@sci.muni.cz

ABSTRACT

The effect of increasing concentration (0.01 and 1 mg.l⁻¹) of fluoranthene (FLT) and the duration of exposure (18 and 25 days) on the growth and photosynthetic processes in pea plants (*Pisum sativum* L., cv. Garde) were investigated. FLT concentration in roots and shoot of pea plants was also determined. The obtained results demonstrated that the higher concentration of FLT (1 mg.l⁻¹) significantly inhibited the growth, the content of photosynthetic pigments (chlorophyll *a*, *b* and carotenoids) and the primary photochemical processes of photosynthesis of the pea plants after 25 days of cultivation. In chlorophyll fluorescence parameters, the significant increase of F_0 values and the decrease of F_V/F_M and Φ_{II} values was recorded. Already after 18 days of cultivation of pea plants in nutrient solution with FLT (0.01 and 1 mg.l⁻¹) an affection of Hill reaction activity was recorded. Its significant inhibition was recorded after 25 days. The fluoranthene content in roots and shoot of pea plants increased with increasing FLT concentration in the environment and the substantial accumulation of FLT was observed in the roots.

Keywords: PAH, *Pisum sativum*, primary photosynthetic processes, photosynthetic pigments

ABSTRAKT

Byl sledován vliv zvyšující se koncentrace (0.01 and 1 mg.l⁻¹) fluoranthenu (FLT) a doby působení (18 a 25 dnů) na růst a fotosyntetické procesy hrachu (*Pisum sativum* L., cv. Garde). V kořenech a nadzemních částech rostlin byl detekován obsah FLT. Po 25 dnech kultivace koncentrace 1 mg.l⁻¹ FLT významně inhibovala růst, ovlivnila obsah fotosyntetických pigmentů (chlorofyl *a*, *b* a karotenoidy) a primární procesy fotosyntézy. Fluoranthen ovlivnil parametry fluorescence chlorofylu: významně zvýšil hodnoty F_0 a významně snížil hodnoty F_V/F_M a Φ_{II} . Aktivita Hillovy reakce suspenze chloroplastů byla ovlivněna již po 18 dnech kultivace rostlin v živném roztoku s FLT. Významná inhibice aktivity Hillovy reakce byla zjištěna po 25 dnech. Obsah FLT se v nadzemních částech a zejména v kořenech zvyšoval se zvyšující se koncentrací v prostředí.

Klíčové slova: PAH, *Pisum sativum*, primární procesy fotosyntézy, fotosyntetické pigmenty

ÚVOD

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs) jsou skupinou všudypřítomných organických polutantů v prostředí s potenciálními karcinogeními, mutageními a teratogeními účinky.

Rostliny, jako dominantní složka terestrických ekosystémů, jsou ovlivňovány celou řadou látek typu PAHs (McCarthy et Tschaplinski, 1991). V závislosti na délce a intenzitě působení mohou PAHs vyvolávat akutní, chronické i latentní poškození rostlin, zejména v interakci s dalšími environmentálními faktory. Dlouhodobé působení toxikantů může mít vliv na strukturu a funkci ekosystémů, diverzitu rostlinných druhů, snížení produkce biomasy, snížení produkce O₂, popř. degradaci přírodního prostředí (Wang et Freemark 1995).

PAHs a jejich metabolity mohou ovlivňovat struktury a funkce na celulární i subcelulární úrovni (Kolb et Harms, 2000). Prvním místem působení těchto lipofilních sloučenin na buněčné úrovni je plazmatická membrána, kde jsou oxidovány membránové lipidy (Chiang et al. 1996). Narušení plazmatické membrány a ostatních subcelulárních membrán, změny v aktivitě enzymů a zejména strukturní změny nukleových kyselin a proteinů vede k inhibici fotosyntetických a respiračních procesů (Huang et al. 1996; Kummerová et al. 1996; Duxbury et al. 1997).

Fotosyntéza představuje významný anabolický metabolismus rostlin, jehož výsledkem je produkce energeticky bohatých sloučenin nezbytných pro růst a vývoj rostlin. Elektronový transport fotosystému II (PSII) a aktivita Hillovy reakce mohou být citlivými indikátory poškození fotosyntetického aparátu (Krause et Weis, 1991). Parametry fluorescence chlorofylu: základní fluorescence chlorofylu – F₀, potenciální výtěžek fotochemických reakcí fotosystému II – F_v/F_M a efektivní kvantový výtěžek fotosystému II - Φ_{II} jsou využívány jako indikátory stresem ovlivněných fotochemických reakcí spojených s absorbcí světelné energie (Krause et Weis, 1991; Branquinho et al. 1997). Fotosystém II katalyzuje oxidaci vody na kyslík (kyslík-vyvíjející komplex, Hillova reakce) a umožňuje elektronový transport (Geiken et al. 1998).

Ze skupiny fytotoxických organických sloučenin je relativně dobře znám fyziologický vliv herbicidů na fotosyntetické procesy. Bylo prokázáno, že Hillova reakce (produkce kyslíku) je inhibována simazinem a několika dalšími herbicidy (Hernández-Terrones et al. 2003). Chemická struktura PAHs (př. fluoranthen) je podobná struktuře herbicidů a proto může být jejich vliv na rostliny srovnáván s účinky herbicidů (Kummerová 2001).

Cílem práce bylo posoudit vliv koncentrace a doby působení fluoranthenu (FLT) na růst a fotosyntetické procesy rostlin hrachu. Fluoranthen, vybraný ze skupiny PAHs, je nejčastěji se vyskytujícím polycyklickým aromatickým uhlovodíkem v prostředí České republiky (Holoubek 2000). Neméně významným cílem práce bylo posoudit citlivost metody indukované fluorescence chlorofylu a aktivity Hillovy reakce pro včasnou detekci vlivu FLT na primární procesy fotosyntézy.

MATERIÁL A METODIKA

Rostlinným materiálem byly 18 a 25 denní rostliny hrachu setého (*Pisum sativum* L., cv. Garde). Fluoranthén (FLT) (*Supelco*, USA) byl aplikován v koncentracích 0.01 a 1 mg.l⁻¹ do živného roztoku. Obsah fotosyntetických pigmentů (chlorofyl *a* a *b*, karotenoidy) byl stanoven spektrofotometricky (UV-VIS Spektrofotometr, Shimadzu, Japonsko). Pigmenty byly extrahovány z listů hrachu 100% acetonem a výpočet byl proveden dle Holma (Holm 1954). Parametry fluorescence chlorofylu (F_0 , F_v/F_m , Φ_{II} ; pro upřesnění viz Roháček et Barták 1999) byly určeny z pomalé (Kautsky) indukční křivky fluorescence chlorofylu pomocí fluorometru PAM-2000 (*Walz*, Německo). Aktivita Hillovy reakce byla stanovena spektrofotometricky při 630 nm jako množství redukce DCIP (2,6-dichlorofenol-indofenol) suspenzí chloroplastů při ozáření 400 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ PAR. Výsledky byly statisticky zpracovány programem STATISTICA 6 (StatSoft, Inc.[®]). Získané výsledky představují průměr nejméně 6 opakování. Významnost rozdílů průměrných hodnot jednotlivých variant byla hodnocena jednocestnou analýzou rozptylu (ANOVA, $P = 0.05$) po ověření normality dat a homogenity jejich rozptylů, nebo neparametrickým Kruskal-Wallis testem. Pro porovnání průměrů byl využit Scheffé test.

VÝSLEDKY A DISKUZE

- Fluoranthén (0.01 mg.l⁻¹) inhiboval růst kořenů a nadzemní části rostlin hrachu již po 18 dnech kultivace v živném roztoku (Tabulka 1)

Vliv obou koncentrací FLT (0.01 a 1 mg.l⁻¹) se prohluboval s délkou kultivace (25 dnů)

Tab. 1 Sušina rostlin hrachu kultivovaných v živném roztoku se zvyšující se koncentrací fluoranthenu

Doba kultivace (dny)	Koncentrace FLT (mg.l ⁻¹)	Sušina (g)	
		Kořen	Nadzemní část
18	0	0.054 ± 0.006 ^a	0.166 ± 0.023 ^a
	0.01	0.049 ± 0.003 ^a	0.112 ± 0.007 ^b
	1	0.036 ± 0.003 ^b	0.079 ± 0.006 ^c
25	0	0.062 ± 0.006 ^a	0.259 ± 0.025 ^a
	0.01	0.061 ± 0.006 ^a	0.211 ± 0.024 ^b
	1	0.043 ± 0.006 ^b	0.141 ± 0.016 ^c

Hodnoty označené různými písmeny jsou statisticky významně rozdílné ($P=0.05$).

- Obsah fotosyntetických pigmentů (chlorofyl *a*, *b* a karotenoidů) byl snížen oběma aplikovanými koncentracemi FLT (0.01 a 1 mg.l⁻¹) (Tabulka 2)

Tab. 2 Obsah fotosyntetických pigmentů v listech rostlin hrachu kultivovaných v živném roztoku se zvyšující se koncentrací fluoranthenu

Doba kultivace (dny)	Koncentrace FLT (mg.l ⁻¹)	Fotosyntetické pigmenty (mg.g ⁻¹ sušiny)		
		Chlorofyl <i>a</i>	Chlorofyl <i>b</i>	Karotenoidy
18	0	12.94 ± 0.19 ^a	5.06 ± 0.11 ^a	4.49 ± 0.09 ^a
	0.01	12.42 ± 0.31 ^a	4.78 ± 0.13 ^a	4.34 ± 0.09 ^a
	1	9.43 ± 0.57 ^b	3.92 ± 0.17 ^b	3.59 ± 0.14 ^b
25	0	13.00 ± 0.57 ^a	5.41 ± 0.35 ^a	4.49 ± 0.17 ^a
	0.01	14.26 ± 0.36 ^a	5.63 ± 0.17 ^a	4.78 ± 0.08 ^a
	1	8.02 ± 0.39 ^b	3.88 ± 0.17 ^b	2.90 ± 0.13 ^b

Hodnoty označené různými písmeny jsou statisticky významně rozdílné (P=0.05).

- Obsah FLT v rostlinných orgánech se zvyšoval s jeho zvyšující se koncentrací v prostředí. Vyšší obsah FLT byl detekován v kořenech (Tabulka 3)

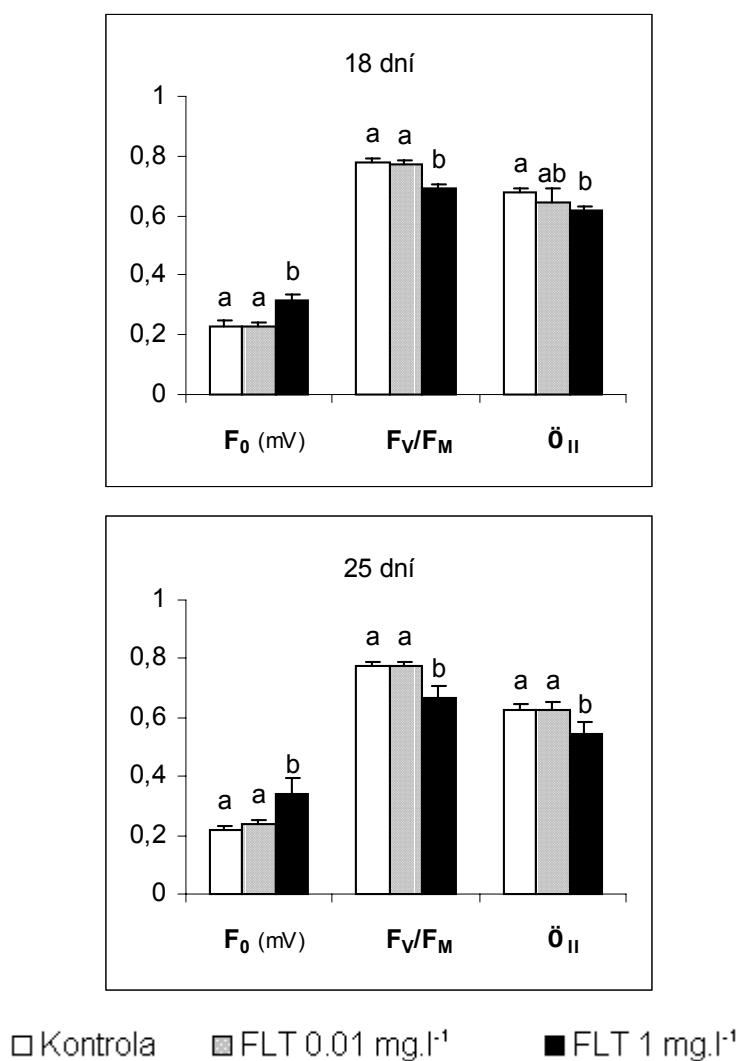
Tab. 3 Obsah fluoranthenu (mg.kg⁻¹) v sušině rostlin hrachu kultivovaných 25 dní v živném roztoku se zvyšující se koncentrací FLT a biokoncentrační faktor (BCF) pro FLT přepočítaný na čerstvou hmotnost

Koncentrace FLT (mg.l ⁻¹)	Obsah FLT (mg.kg ⁻¹ sušiny)		Biokoncentrační faktor (BCF)	
	Kořen	Nadzemní část	Kořen	Nadzemní část
0	n.d.	n.d.	--	--
0.01	2.25	0.06	9.00	0.43
1	137.69	0.76	5.50	0.05

Hodnoty jsou průměry dvou opakování.

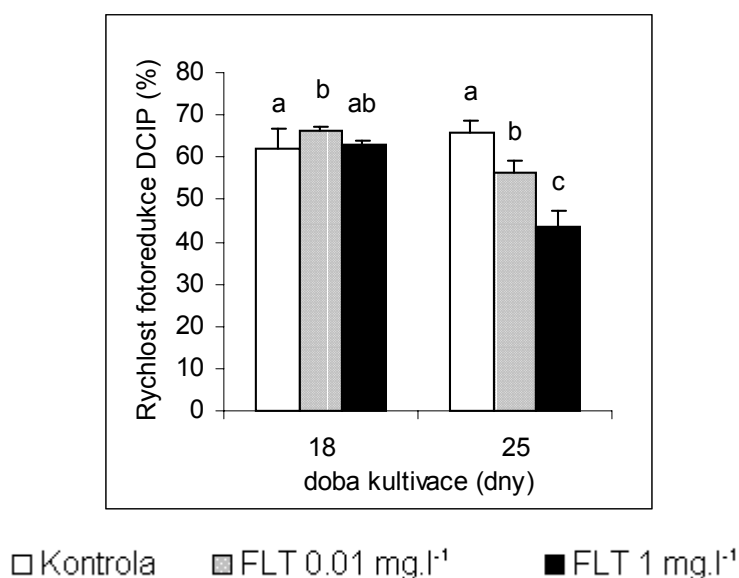
- Fluoranthen (1 mg.l^{-1}) způsobil významné zvýšení F_0 a snížení F_v/F_M a Φ_{II} již po 18 dnech kultivace rostlin v živném roztoku (Obrázek 1)

Obr. 1 Vliv zvyšující se koncentrace fluoranthenu na parametry fluorescence chlorofylu rostlin hrachu po 18 a 25 dnech; F_0 – bazální fluorescence chlorofylu; F_v/F_M – potenciální výtěžek fotochemických reakcí fotosystému II a Φ_{II} – efektivní kvantový výtěžek fotosystému II. Směrodatná odchylka je indikována chybovými úsečkami. Hodnoty označené různými písmeny jsou statisticky významně rozdílné ($P=0.05$).

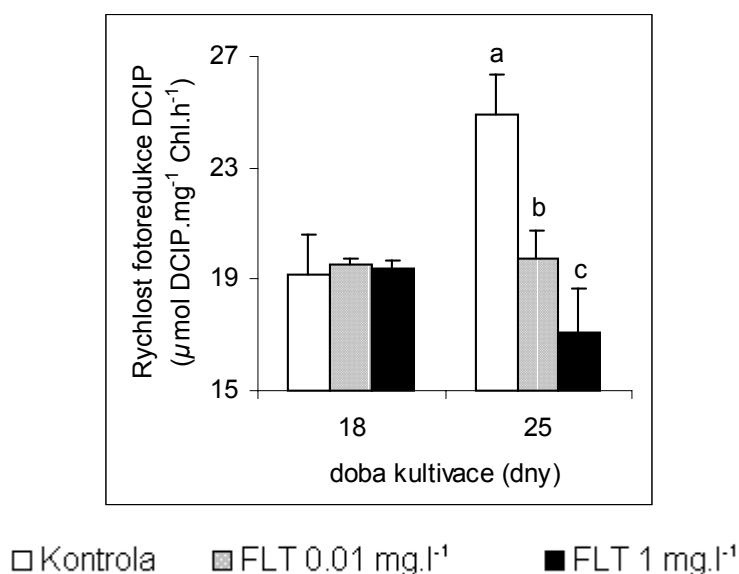


- Výsledky, prezentované v obrázku 2 a 3 ukazují, že aktivita Hillové reakce izolovaných chloroplastů rostlin hrachu byla významně ovlivněna přítomností FLT (0.01 a 1 mg.l⁻¹)

Obr. 2 Rychlost fotoredukce DCIP (v % během 4-6 minut inkubace se suspenzí chloroplastů) v závislosti na době kultivace rostlin hrachu v živném roztoku se zvyšující se koncentrací fluoranthenu. Směrodatná odchylka je indikována chybovými úsečkami. Hodnoty označené různými písmeny jsou statisticky významně rozdílné (P=0.05).



Obr. 3 Rychlost fotoredukce DCIP (μmol DCIP.mg⁻¹ Chl.h⁻¹) suspenzí chloroplastů rostlin hrachu kultivovaných v živném roztoku se zvyšující se koncentrací fluoranthenu. Směrodatná odchylka je indikována chybovými úsečkami. Hodnoty označené různými písmeny jsou statisticky významně rozdílné (P=0.05).



Příjem organických polutantů rostlinami může ovlivnit řadu biochemických a fyziologických procesů spojených s celkovou rychlostí růstu. Doba expozice a zvyšující se koncentrace FLT v prostředí, a následně v rostlinných orgánech, způsobila pokles biomasy kořenů a nadzemních částí (Tabulka 1). Z obsahu FLT i hodnot biokoncentračního faktoru (BCF) je zřejmé, že chronická expozice nízkými dávkami fluoranthenu může vést k významné akumulaci v rostlinách.

Je známo, že chloroplasty jsou prvním místem působení mnoha abiotických stresorů (Alsher et al. 1998). Změny v obsahu fotosyntetických pigmentů mohou souviset nejen s ovlivněním příjmu, distribuce a využití živin v důsledku poškození kořenů zatížených FLT (Kummerová 2001). Ale také přímým vlivem FLT, který byl detekovaný v nadzemních částech rostlin hrachu. Snížení obsahu fotosyntetických pigmentů může být buď výsledkem vlivu FLT na jejich biosyntézu, nebo FLT indukovanou destrukcí molekul pigmentů.

Významná inhibice fotosyntetického aparátu rostlin hrachu zatížených fluoranthenem byla detekována *in vivo* metodou indukované fluorescence chlorofylu (Obrázek 1). Inhibice pravděpodobně spočívá v poklesu efektivity přenosu světelné energie ze světlosběrných komplexů do reakčního centra PSII a také ve zvýšení hodnoty základní fluorescence chlorofylu (F_0) (Krause et Weis, 1991). Rozpad molekul fotosyntetických pigmentů může být dalším mechanismem zodpovědným za zvýšení F_0 u rostlin exponovaných PAHs (Gensemer et al. 1996, Huang et al. 1996).

ZÁVĚR

Výsledky našich experimentů prokázaly, že FLT (0.01 a 1 mg.l^{-1}) ovlivnil obsah fotosyntetických pigmentů, parametry fluorescence chlorofylu a aktivitu Hillové reakce. Nejvýznamněji byla ovlivněna aktivita Hillové reakce. Po 25 dnech kultivace byla zaznamenána až 25% inhibice.

Zaznamenané změny v biochemických a fyziologických procesech se nesporně podílejí i na snížení biomasy rostlin, které byly vystaveny účinku FLT.

LITERATURA

Alscher R.G., Donahue J.L., Cramer C.L. (1998): Molecular responses to reactive oxygen species: multifaceted changes in gene expression. In: De Kok, L.J., Stulen, I. (Eds). Responses of plant metabolism to air pollution and global change. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, pp. 233-240

Branquinho C., Brown D.H., Catarino F. (1997): The cellular location of Cu in lichens and its effects on membrane integrity and chlorophyll fluorescence. Environmental and Experimental Botany 38: 165-179.

Duxbury C.L., Dixon D.G., Greenberg B.M. (1997): Effects of simulated solar radiation on the bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the duckweed *Lemna gibba*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16(8): 1739-1748.

Geiken B., Masojídek J., Rizutto M., Pompili M.L., Giardi M.T. (1998): Incorporation of [35S]methionine in higher plants reveals that stimulation of the D1 reaction centre II protein turnover accompanies tolerance to heavy metal stress. *Plant, Cell and Environment* 21: 1265-1273.

Gensemer R.W., Ren L., Day K.E., Solomon K.R., Greenberg B.M. (1996): Fluorescence induction as a biomarker of creosote phototoxicity to the aquatic macrophyte *Lemna gibba*. In: Bengston, D., Henshel, D.S. (Eds) *Environmental toxicology and risk assessment*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 163-176.

Hernández-Terrones M.G., Aguilar M.I., King-Diaz B., Lotina-Hennsen B. (2003): Inhibition of photosystem II in spinach chloroplasts by trachyloban-19-oic acid. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 77: 12-17.

Holm G. (1954): Chlorophyll mutations in barley. *Acta Agriculturae Scandinavica* 4: 457-471.

Holoubek I. (2000): Advances and trends in environmental chemistry - The case of persistent, bioaccumulative and toxic compounds (PBTs) in the environment. *Chemické listy* 94(9): 771-775.

Huang X.-D., Zeiler L.F., Dixon D.G., Greenberg B.M. (1996): Photoinduced toxicity of PAHs to the foliar regions of *Brassica napus* (canola) and *Cucumis sativus* (cucumber) in simulated solar radiation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 35: 190-197.

Huang X.-D., Zeiler L.F., Dixon D.G., Greenberg B.M. (1996): Photoinduced toxicity of PAHs to the foliar regions of *Brassica napus* (canola) and *Cucumis sativus* (cucumber) in simulated solar radiation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 35: 190-197.

Chiang P., Li K.-P., Hseu T.-M. (1996): Spectrochemical behavior of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in biological systems. Part II: A theoretical rate model for BaP metabolism in living cells. *Applied Spectroscopy Reviews* 50(11): 1352-1359.

Kolb M., Harms H. (2000): Metabolism of fluoranthene in different plant cell cultures and intact plants. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19(5): 1304-1310.

Krause G.H., Weis E. (1991): Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The Basics. *Annual Review of Plant Physiology* 42: 313-349.

Kummerová M., Gloser J., Slovák L., Holoubek I. (1996): Project TOCOEN. The fate of selected organic compounds in the environment. The growth response of maize to increasing concentration of fluoranthene. *Toxicology Environmental and Chemistry* 54: 99-106.

Kummerová M., Kmentová E., Koptíková J. (2001): Effect of fluoranthene on growth and primary processes of photosynthesis in faba bean and sunflower. *Plant Production (Rostlinná Výroba)* 47(8): 344-351.

McCarthy J.F., Tschaplinski T.J. (1991): Biological markers in environmental sentinels to establish exposure to and effects of atmospheric toxicants: An overview. In: Moser, T.J., Baker, J.R., Tingey, D.T. (Eds). *Ecological exposure and effects of airborne toxic chemicals: An overview*. U.S. EPA Report: 600/3-91/001. U.S. EPA, Corvallis, Oregon, USA, pp. 107-127.

Roháček K., Barták M. (1999): Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications. *Photosynthetica* 37(3): 339-363.

Wang W., Freemark K. (1995): The use of plants for environmental monitoring and assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 30: 289-301.