

PHOTOINDUCED CHANGE OF TOXICITY OF FLUORANTHENE ON PEA PLANT (*PISUM SATIVUM* L.)

FOTOINDUKOVANÁ ZMĚNA TOXICITY FLUORANTHENU U HRACHU SETÉHO (*PISUM SATIVUM* L.)

Váňová L., Kummerová M.

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

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

ABSTRACT

The task was to observe the influence of increased concentration (0,1, 1, 10 mg.l⁻¹) of intact (FLT) and photomodified fluoranthene (phFLT) and a time of exposition (12, 24 and 48 h) to chosen parameters of chlorophyll fluorescence (F_0 , F_v/F_m , q_N , Φ_{II}) of a pea plant (*Pisum sativum* L.) on organ and subcellular levels was observed. The obtained results demonstrated significant influence on primary processes of photosynthesis: - the significant changes in the chlorophyll fluorescence parameters: the inhibition F_v/F_m and Φ_{II} and the stimulation F_0 and q_N - by the highest applied concentration (10 mg.l⁻¹) FLT and phFLT after 12 h of exposition. More sensitive response for a presence of FLT and phFLT in environment was demonstrated by their application on the separated leaves. By the short time exposition (48 h) was not demonstrated the higher phytotoxicity of phFLT.

Keywords: pea plant (*Pisum sativum* L.), PAH, fluoranthene, photosynthesis, chlorophyll fluorescence, photomodification

ABSTRAKT

Byl sledován vliv zvyšující se koncentrace (0,1, 1, 10 mg.l⁻¹) intaktního (FLT) a fotomodifikovaného fluoranthenu (fFLT) a doby expozice (12, 24 a 48 h) na vybrané parametry fluorescence chlorofylu (F_0 , F_v/F_m , q_N , Φ_{II}) u hrachu setého (*Pisum sativum* L.), a to na orgánové a subcelulární úrovni. Získané výsledky dokládají významné ovlivnění primárních procesů fotosyntézy: - signifikantní změny parametrů fluorescence chlorofylu: snížení F_v/F_m a Φ_{II} a zvýšení F_0 a q_N - nejvyšší aplikovanou koncentrací (10 mg.l⁻¹) FLT a fFLT a to již po 12 h expozice. Citlivější odezva na přítomnost FLT a fFLT v prostředí byla prokázána při jejich aplikaci na oddělené listy. Při krátkodobé expozici (48 h) nebyla prokázána vyšší fytotoxicita fFLT.

Klíčová slova: hrách setý (*Pisum sativum* L.), PAH, fluoranthen, fotosyntéza, fluorescence chlorofylu, fotomodifikace

ÚVOD

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs) jsou skupinou organických látek vyskytujících se ve všech složkách životního prostředí. Tyto perzistentní organické sloučeniny se dostávají do potravního řetězce a mohou působit jako látky toxické s potenciálními karcinogenními, mutagenními a teratogenními účinky (Wilson a Jones, 1993). Představují nebezpečí jak pro žijící organismy, tak i pro následné generace. PAHs vznikají zejména během přírodních a antropogenních spalovacích procesů. V atmosféře mohou být transportovány na značné vzdálenosti a byly detekovány i v tak vzdálených oblastech, jako je Arktida a Antarktida. Atmosférickým spadem se dostávají do vod, půd a sedimentů.

Významným zdrojem PAHs pro živočichy i člověka jsou kulturní plodiny, tvořící podstatnou složku suchozemských a vodních ekosystémů, a mají schopnost tyto sloučeniny přijímat, transformovat a akumulovat. Příjem, translokace, metabolizace a akumulace PAHs rostlinami jsou faktory určující fytotoxicitu těchto sloučenin. V závislosti na době a intenzitě působení mohou polycyklické aromatické uhlovodíky v interakci s dalšími environmentálními faktory vyvolávat akutní, chronické a latentní poškození rostlin. PAHs mohou ovlivňovat biochemické a fyziologické procesy rostlin, rozhodující kvantitativně i kvalitativně o tvorbě biomasy (Lewis, 1995). Dlouhodobé působení toxikantu může mít vliv na diverzitu rostlinných druhů, strukturu a funkci ekosystému.

Základním předpokladem pro hodnocení bioakumulace, transformace a fytotoxicity je studium příjmu xenobiotických sloučenin v laboratorních i přírodních podmínkách. Získané informace jsou využívány při sestavování testů fytotoxicity a matematických modelů využívaných k predikci vlivu PAHs na vegetaci. Umožňují porozumět vztahu mezi expozicí a potenciálním ekologickým rizikem.

Fotosyntetická aktivita rostlin je často používána jako bioindikátor kontaminace prostředí. Díky lipofilnímu charakteru mohou PAHs a jejich metabolity penetrovat do tylakoidní membrány a ovlivnit primární procesy fotosyntézy. Transport elektronů fotosystémem II (PSII) je jedním z nejcitlivějších indikátorů poškození (Huang et al., 1997). Tyto biochemické změny mohou být detekovány na základě změn indukce fluorescence chlorofylu dříve než změny morfologické. Metoda indukované fluorescence chlorofylu je vhodnou nedestruktivní metodou pro měření změn souvisejících s fotosystémem II u rostlin vystavených působení polutantů.

Dlouhou dobu se předpokládalo, že PAHs jsou v prostředí perzistentní. Bylo však zjištěno, že za určitých podmínek může dojít k modifikaci struktury sloučenin. Změna vlastností PAHs může probíhat abiotickými (např. fotochemicky) nebo biotickými (např. monooxygenací cytochromem P450) procesy (Huang et al., 1995). PAHs jsou schopny silně absorbovat sluneční záření v UV-A (320-400 nm) a v UV-B (290-320 nm) oblastech pomocí vysoce konjugovaného systému π -orbitalů. Po absorpci fotonů přecházejí PAHs s vysokým výtěžkem do excitovaného tripletového stavu. To může vést k tvorbě biologicky škodlivého singletového kyslíku ($^1\text{O}_2$) a reaktivních forem kyslíku, které jsou příčinou oxidativního stresu a následné toxicity. Absorpce fotonu polyaromáty vede k rychlé fotomodifikaci (např.

fotooxidaci nebo fotolýze). Fotomodifikací jakékoliv PAH vzniká směs více než 20 fotoproduktů, převážně se jedná o chinony, hydroxylované chinony a benzoové kyseliny, které vykazují toxičtější vlastnosti, pravděpodobně díky vyšší rozpustnosti ve vodě, biodostupnosti a reaktivitě (Ireland et al., 1996). V důsledku vyšší rozpustnosti ve vodě mohou produkty fotomodifikace PAHs snadněji migrovat do složek prostředí. Například v půdě mohou svými toxickými účinky ovlivnit klíčivost semen a růst kořene.

Cílem práce bylo rozšířit poznatky o účincích polycyklické aromatické sloučeniny fluoranthenu na rostliny. Rostlinným materiálem byla zvolena pro Českou republiku nejvýznamnější luskovina, hrách setý (*Pisum sativum* L.). Byl posuzován vliv intaktního (FLT) a fotomodifikovaného fluoranthenu (fFLT) na primární procesy fotosyntézy hrachu setého (*Pisum sativum* L.) využitím nedestruktivní metody měření fluorescence chlorofylu. Byly porovnány dvě odlišné expoziční cesty: kořenový a foliární příjem PAH. V obou případech byl sledován krátkodobý vliv zvyšující se koncentrace FLT a fFLT a prodlužující se doby jejího působení. Odezva primárních procesů fotosyntézy na přítomnost FLT a fFLT byla sledována na úrovni rostlinného orgánu, intaktního listu, a na úrovni subcelulární, izolovaných chloroplastů.

MATERIÁL A METODIKA

Rostlinným materiálem byl hrách setý (*Pisum sativum* L.), kultivar Lantra.

Fluoranthén (SUPELCO, USA) byl rozpuštěn v acetonu (LABSCAN, Ireland) na koncentraci 500 mg.l⁻¹. Aplikované koncentrace intaktního fluoranthenu (FLT) a fotomodifikovaného fluoranthenu (fFLT) 0,1, 1 a 10 mg.l⁻¹ byly připraveny ředěním destilovanou vodou. Použitá koncentrace acetonu v testovacích roztocích neovlivnila klíčivost semen a růst klíčících rostlin (Kummerová et al. 2001). Kontrolou byl Reid-



Obr. 1 Hrách setý (*Pisum sativum* L.)

Yorkův živný roztok s příslušným množstvím acetonu. Fotomodifikace fluoranthenu (fFLT) byla provedena UV-lampou (MPK Tesla 125 W) expozicí zářením o $\lambda \geq 280$ nm po dobu 120 minut. Po fotomodifikaci byl podíl intaktního FLT nižší než 5%. Koncentrace fluoranthenu v acetonu (500 mg.l⁻¹), aplikované koncentrace fluoranthenu 0,1, 1 a 10 mg.l⁻¹ a podíl intaktního fluoranthenu po fotomodifikaci byl stanoven chromatograficky (HPLC, Hewlett Packard). Produkty vzniklé fotomodifikací intaktního fluoranthenu fluorenón, hydroxy-fluorenón, fenantrendion a hydroxy-fenanthren byly stanoveny plynovou chromatografií (GC-FID, Hewlett Packard) s kapilární kolonou HP-5.

Klíční rostliny s dostatečně vyvinutým kořenem (cca 3 cm) byly zasazeny do kultivačních nádobek, zasypány granulovaným polyetylénem a umístěny do kultivačních van s 2,5 l Reid-Yorkova živného roztoku. Rostliny byly kultivovány při přirozeném osvětlení ve

skleníku Katedry fyziologie a anatomie rostlin. Živný roztok byl pravidelně provzdušňován a vyměňován po 48 -72 hodinách.

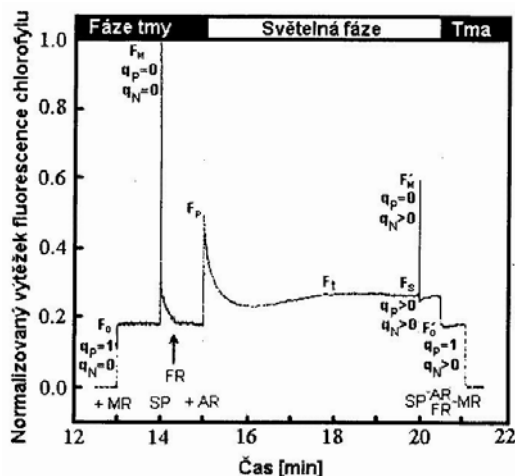
Po 18 dnech kultivace byly rostliny hrachu převedeny z kultivačních van do kádinek s Reid-Yorkovým živným roztokem s příslušným množstvím acetonu (kontrola), intaktního FLT (0,1 a 1 mg.l⁻¹) a fotomodifikovaného FLT (0,1 a 1 mg.l⁻¹). Vybrané parametry fluorescence chlorofylu (F_0 , F_V/F_M , q_N , Φ_{II}) byly měřeny po 12, 24 a 48 hodinách expozice FLT a fFLT.

Z 18 denních rostlin hrachu byly v těsné blízkosti stonku odděleny třetí a čtvrté listy (od báze stonku), které byly po 16 umístěny na filtrační papír do Petriho misek (průměr 120 mm). Disk filtračního papíru byl navlhčen 8 ml kontrolního roztoku, roztokem s intaktním FLT (0,1, 1 a 10 mg.l⁻¹) a roztokem s fotomodifikovaným FLT (0,1, 1 a 10 mg.l⁻¹). Vybrané parametry fluorescence chlorofylu (F_0 , F_V/F_M , q_N , Φ_{II}) byly měřeny po 12, 24 a 48 hodinách expozice FLT a fFLT.

Chloroplasty byly izolovány ze 4. listu upravenou metodou podle Makovce (1979, nepublikováno). Izolační médium bylo obohaceno o kyselinu askorbovou, resuspendační o K₃[Fe(CN)₆]. Obě média byla upravena na hodnotu pH 7. Do suspenze chloroplastů byla přidána příslušná koncentrace FLT a fFLT. Poté byly měřeny vybrané parametry fluorescence chlorofylu (F_0 , F_V/F_M , q_N , Φ_{II}).

Vliv intaktního fluoranthenu (FLT) a fotomodifikovaného fluoranthenu (fFLT) na primární procesy fotosyntézy byl sledován analýzou pomalé (Kautského) indukční kinetiky fluorescence chlorofylu doplněné o analýzu zhášecích mechanismů. Průběh kinetiky byl zaznamenáván modulovaným fluorometrem PAM 2000 (Walz, Německo). Údaje byly zpracovávány ovládacím programem na připojeném počítači. Analýzou indukční kinetiky byly získány hodnoty parametrů fluorescence chlorofylu: základní fluorescence chlorofylu (F_0), základní fluorescenční poměr (F_V/F_M), nefotochemické zhášení fluorescence chlorofylu (q_N) a kvantový výtěžek elektronového transportu PS II (Φ_{II}).

Obr. 2 Pomalá indukční kinetika fluorescence chlorofylu zaznamenaná in vivo fluorometrem PAM 2000 na semenáčcích smrku (*Picea abies*). Převzato od Roháčka (2002).



Uvedené výsledky jsou průměry 6 (intaktní list) a 4 (suspenze chloroplastů) hodnot v každé variantě. Při statistickém srovnání hodnot parametrů každé varianty byla nejprve testována normalita rozložení dat a homogenita rozptylů. Po prokázání normality rozložení a homogenity byla použita jednocestná analýza rozptylu (one-way ANOVA, Schéffe test). Při nesplnění vstupních předpokladů bylo srovnání provedeno neparametrickými testy (Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, Tukey test). Hodnota statistické významnosti byla ve všech případech $\alpha \leq 0,05$.

VÝSLEDKY A DISKUZE

V současné době jsou studována kritéria pro včasnou diagnostiku vlivu toxikantů na rostliny. Jsou studovány takové znaky a vlastnosti (biomarkery) rostlinného organismu, které by spolehlivě odrážely vztah expozice a potenciálního ekologického rizika. Výzkum je však velmi obtížný, protože v přirozených podmínkách jsou rostlinné organismy vystaveny spolupůsobení řady environmentálních faktorů, které mohou vyvolávat podstatné nespecifické reakce organismu. Proto se pozornost zaměřuje na změny v biochemických a fyziologických procesech, které mohou předcházet vizuálnímu poškození rostlin. Aplikovaný fluoranthen byl vybrán proto, že patří k nejčastěji se vyskytujícím PAHs v prostředí a je označován jako indikátor výskytu ostatních PAHs. Je látkou toxickou bez přímých mutagenních účinků. Použité koncentrace fluoranthenu 0,1 a 1 mg.l⁻¹ simulují mírně zvýšené zatížení prostředí. Nejvyšší aplikovaná koncentrace 10 mg.l⁻¹ představuje silně kontaminované prostředí. Jedná se např. o odpadní vody v průmyslu, srážky v průmyslových oblastech, které obsahují vysoké koncentrace PAHs vázané na pevné částice, a odtokové vody ze silnic (Edwards, 1983).

Jak již bylo zmíněno, k účinkům většiny environmentálních kontaminantů na rostliny patří inhibice fotosyntézy, a proto je fotosyntetická aktivita často využívána jako bioindikátor vlivu kontaminantů. Z tohoto důvodu byla metoda indukované fluorescence chlorofylu využita pro posouzení vlivu FLT a fFLT na rostliny hrachu.

Z množství získaných výsledků prezentujeme pouze některé. Byl vybrán vliv FLT a fFLT, o koncentraci 1 mg.l⁻¹, která byla aplikována do živného roztoku, na oddělené listy a do suspenze chloroplastů. U oddělených listů prezentujeme také námi nejvyšší použitou koncentraci (10 mg.l⁻¹).

Koncentrace fFLT (1 mg.l⁻¹) v prostředí (v živném roztoku) způsobila jak po 24, tak i po 48 (Tab.1) hodinách expozice změny hodnot parametrů fluorescence chlorofylu. Významné zvýšení hodnot F_0 i významné snížení F_v/F_m oproti hodnotám zjištěným u rostlin kontrolní varianty a rostlin vystavených účinku intaktní formy FLT je dokladem vyšší účinnosti, fytotoxicity, fotomodifikované formy FLT. Získané výsledky se shodují se závěry Jančárové (2003), která neprokázala ovlivnění primárních procesů fotosyntézy hrachu intaktním fluoranthenem o koncentraci 1 mg.l⁻¹.

Ovlivnění parametrů fluorescence chlorofylu FLT je dokladem, jak příjmu kořenovým systémem, tak i následným akropetálním transportem do nadzemních částí rostlin hrachu.

Tato skutečnost byla prokázána Kummerovou et al. (1997) u rostlin ječmene a Koptíkovou (2000) u rostlin bobu, slunečnice a kukuřice.

*Tab. 1 Hodnoty základní fluorescence chlorofylu (F_0), základního fluorescenčního poměru (F_V/F_M), koeficientu nefotochemického zhášení fluorescence chlorofylu (q_N) a kvantového výtěžku elektronového transportu PS II (Φ_{II}) hrachu setého (*Pisum sativum* L.) po 48 hodinové kultivaci v živném roztoku s fluoranthenem (FLT) a fotomodifikovaným fluoranthenem (fFLT).*

Parametr fluorescence chlorofylu	Varianta	Koncentrace FLT, fFLT (mg.l ⁻¹)	Intaktní list		
			průměr		S. D.
F_0 [mV]	kontrola	0	0,260	a	0,003
	FLT	1	0,263	a	0,007
	fFLT	1	0,269	b	0,006
F_V/F_M	kontrola	0	0,764	a	0,002
	FLT	1	0,762	a	0,003
	fFLT	1	0,760	b	0,002
q_N	kontrola	0	0,336	a	0,032
	FLT	1	0,342	a	0,016
	fFLT	1	0,357	a	0,039
Φ_{II}	kontrola	0	0,559	a	0,016
	FLT	1	0,554	a	0,018
	fFLT	1	0,546	a	0,037

Hodnoty označené stejným písmenem (horní index) se statisticky významně neliší.

Hlavní cestou příjmu PAHs rostlinami v přirozeném prostředí je penetrace do epikutikulární vrstvy listů nebo průnik do mezofylu přes průduchy. Není však doposud znám procentuální podíl obou těchto cest na příjmu PAHs listy. Přes uvedenou skutečnost jsme se dle možností snažili vyjádřit k otázce příjmu FLT a fFLT nadzemními částmi rostlin hrachu. Výsledky získané s oddělenými listy vystavenými krátkodobě (12, 24 a 48 hodin) účinku FLT a fFLT jsou dokladem významného ovlivnění fotosyntetického aparátu, a to již aplikací nejnižší koncentrace (0,1 mg.l⁻¹). Toxicita sloučenin je závislá na koncentraci dané látky, fyzikálně-chemických vlastnostech a na době jejího působení. Signifikantní snížení (F_0 , q_N) nebo zvýšení (Φ_{II}) hodnot parametrů fluorescence chlorofylu prokázané po 12 hodinách expozice nejvyšší aplikovanou koncentrací (10 mg.l⁻¹) fotomodifikovaného FLT je rovněž dokladem včasné účinnosti fotomodifikované formy FLT.

Tab. 2 Hodnoty základní fluorescence chlorofylu (F_0), základního fluorescenčního poměru (F_v/F_m), koeficientu nefotochemického zhášení fluorescence chlorofylu (q_N) a kvantového výtěžku elektronového transportu PS II (Φ_{II}) hrachu setého (*Pisum sativum* L.) po 48 hodinové expozici oddělených listů v prostředí s fluoranthenem (FLT) a fotomodifikovaným fluoranthenem (fFLT).

Parametr fluorescence chlorofylu	Varianta	Koncentrace FLT, fFLT (mg.l ⁻¹)	Intaktní list	
			průměr	S. D.
F_0 [mV]	kontrola	0	0,274 ^a	0,011
	FLT	1	0,279 ^a	0,011
	fFLT	1	0,280 ^a	0,022
F_v/F_m	kontrola	0	0,731 ^a	0,012
	FLT	1	0,732 ^a	0,015
	fFLT	1	0,730 ^a	0,024
q_N	kontrola	0	0,149 ^a	0,018
	FLT	1	0,160 ^a	0,029
	fFLT	1	0,171 ^a	0,017
Φ_{II}	kontrola	0	0,641 ^a	0,012
	FLT	1	0,636 ^a	0,019
	fFLT	1	0,641 ^a	0,007

Hodnoty označené stejným písmenem (horní index) se statisticky významně neliší.

Předpokládáme, v souladu s Duxburym (1997), že včasnější účinnost fotomodifikovaného FLT je dána vyšší polaritou, rozpustností ve vodě a vyšší toxicitou produktů fotomodifikace. Významné změny hodnot F_0 , F_v/F_m , q_N a Φ_{II} zjištěné již po 24 a 48 (Tab.3) hodinách expozice intaktním FLT a fotomodifikovaným FLT jsou dokladem účinnosti obou forem FLT. Významné zvýšení hodnot F_0 je v souladu s Ren et al. (1996) a vypovídá o možném ovlivnění antén PSII, ať již fluoranthenem nebo jeho metabolickými produkty, např. FLU-trans-2,3-dihydrodiol. Poměr F_v/F_m se často používá jako indikátor stresu. Se zvyšující se koncentrací FLT se tento poměr snižoval, tzn. že rostliny byly stresovány působením jednoho z environmentálních faktorů, organickým polutantem fluoranthenem.

Tab. 3 Hodnoty základní fluorescence chlorofylu (F_0), základního fluorescenčního poměru (F_V/F_M), koeficientu nefotochemického zhášení fluorescence chlorofylu (q_N) a kvantového výtěžku elektronového transportu PS II (Φ_{II}) hrachu setého (*Pisum sativum* L.) po 48 hodinové expozici oddělených listů v prostředí s fluoranthenem (FLT) a fotomodifikovaným fluoranthenem (fFLT).

Parametr fluorescence chlorofylu	Varianta	Koncentrace FLT, fFLT (mg.l ⁻¹)	Intaktní list	
			průměr	S. D.
F₀ [mV]	kontrola	0	0,299 ^a	0,010
	FLT	10	0,529 ^b	0,028
	fFLT	10	0,520 ^b	0,072
F_V/F_M	kontrola	0	0,724 ^a	0,008
	FLT	10	0,571 ^b	0,042
	fFLT	10	0,566 ^b	0,054
q_N	kontrola	0	0,229 ^a	0,028
	FLT	10	0,352 ^b	0,071
	fFLT	10	0,339 ^b	0,061
Φ_{II}	kontrola	0	0,552 ^a	0,005
	FLT	10	0,407 ^b	0,046
	fFLT	10	0,415 ^b	0,058

Hodnoty označené stejným písmenem (horní index) se statisticky významně neliší.

Statisticky významné změny hodnot parametrů fluorescence chlorofylu u suspenze chloroplastů vlivem FLT a fFLT nebyly zjištěny u žádné z aplikovaných koncentrací 0,1, 1 (Tab.4-7) a 10 mg.l⁻¹. Tato skutečnost je v souladu se závěry Jančárové (2003), která rovněž neprokázala jednoznačný a setrvalý inhibiční nebo stimulační vliv FLT na primární procesy fotosyntézy izolovaných chloroplastů.

Významné zvýšení hodnot F_0 (tab. 4) a snížení hodnot ostatních parametrů fluorescence chlorofylu F_V/F_M (Tab.5), q_N (Tab.6) a Φ_{II} (Tab.7), u kontroly a všech aplikovaných koncentrací FLT a fFLT (0,1, 1 a 10 mg.l⁻¹), ukazuje na rychlý pokles fotosyntetické aktivity suspenze chloroplastů, a to již po 15 minutách expozice. Zaznamenaný pokles mohl být zapříčiněn několika důvody. Domníváme se, že jedním z faktorů je chybějící návaznost na jiné buněčné kompartmenty, jejímž důsledkem může být hromadění asimilátů. Důvodem může být také omezený přísun CO₂, nebo déle trvající zatemnění. Vliv senescence

chloroplastů byl ve všech následujících pokusech eliminován měřením fluorescence chlorofylu ihned po izolaci chloroplastů.

Tab. 4 Vliv doby expozice a koncentrace fluoranthenu (FLT) a fotomodifikovaného fluoranthenu (fFLT) na základní fluorescenci chlorofylu (F_0) suspenze chloroplastů hrachu setého (*Pisum sativum* L.).

Doba expozice (min)	Varianta	Koncentrace FLT, fFLT (mg.l ⁻¹)	F_0 [mV]		
			průměr	S. D.	statistická významnost
15	kontrola	0	0,073 ^a	0,010	a
	FLT	1	0,093 ^b	0,008	a
	fFLT	1	0,089 ^b	0,007	a
60	kontrola	0	0,079 ^a	0,010	a
	FLT	1	0,099 ^a	0,017	a
	fFLT	1	0,093 ^a	0,009	a
105	kontrola	0	0,088 ^a	0,008	a
	FLT	1	0,100 ^a	0,016	a
	fFLT	1	0,101 ^a	0,009	a
150	kontrola	0	0,089 ^a	0,012	a
	FLT	1	0,106 ^a	0,012	a
	fFLT	1	0,103 ^a	0,009	a

Hodnoty parametru po stejné době expozice označené stejným písmenem (horní index) se statisticky významně neliší. Hodnoty parametru stejné varianty označené stejným písmenem (statistická významnost) se statisticky významně neliší.

Tab. 5 Vliv doby expozice a koncentrace fluoranthenu (FLT) a fotomodifikovaného fluoranthenu (fFLT) na základní fluorescenční poměr (F_V/F_M) suspenze chloroplastů hrachu setého (*Pisum sativum* L.).

Doba expozice (min)	Varianta	Koncentrace FLT, fFLT (mg.l ⁻¹)	F_V/F_M		
			průměr	S. D.	statistická významnost
15	kontrola	0	0,671 ^a	0,003	a
	FLT	1	0,589 ^a	0,106	a
	fFLT	1	0,609 ^a	0,083	a
60	kontrola	0	0,531 ^a	0,029	b
	FLT	1	0,457 ^a	0,116	ab
	fFLT	1	0,479 ^a	0,080	ab

105	kontrola	0	0,424 ^a	0,040	c	
	FLT	1	0,375 ^a	0,133		ab
	fFLT	1	0,416 ^a	0,069		b
150	kontrola	0	0,383 ^a	0,015	c	
	FLT	1	0,327 ^a	0,116		b
	fFLT	1	0,367 ^a	0,070		b

Hodnoty parametru po stejné době expozice označené stejným písmenem (horní index) se statisticky významně neliší. Hodnoty parametru stejné varianty označené stejným písmenem (statistická významnost) se statisticky významně neliší.

*Tab. 6 Vliv doby expozice a koncentrace fluoranthenu (FLT) a fotomodifikovaného fluoranthenu (fFLT) na koeficient nefotochemického zhášení fluorescence chlorofylu (q_N) suspenze chloroplastů hrachu setého (*Pisum sativum* L.).*

Doba expozice (min)	Varianta	Koncentrace FLT, fFLT (mg.l ⁻¹)	q_N		
			průměr	S. D.	statistická významnost
15	kontrola	0	0,149 ^a	0,016	a
	FLT	1	0,125 ^a	0,023	a
	fFLT	1	0,120 ^a	0,025	a
60	kontrola	0	0,126 ^a	0,052	a
	FLT	1	0,126 ^a	0,035	a
	fFLT	1	0,128 ^a	0,027	a
105	kontrola	0	0,098 ^a	0,030	a
	FLT	1	0,111 ^a	0,056	a
	fFLT	1	0,120 ^a	0,061	a
150	kontrola	0	0,091 ^a	0,007	a
	FLT	1	0,088 ^a	0,035	a
	fFLT	1	0,132 ^a	0,060	a

Hodnoty parametru po stejné době expozice označené stejným písmenem (horní index) se statisticky významně neliší. Hodnoty parametru stejné varianty označené stejným písmenem (statistická významnost) se statisticky významně neliší.

Tab. 7 Vliv doby expozice a koncentrace fluoranthenu (FLT) a fotomodifikovaného fluoranthenu (fFLT) na kvantový výtěžek elektronového transportu PS II (Φ_{II}) suspenze chloroplastů hrachu setého (*Pisum sativum* L.).

Doba expozice (min)	Varianta	Koncentrace FLT, fFLT (mg.l ⁻¹)	Φ_{II}		
			průměr	S. D.	statistická významnost
15	kontrola	0	0,418 ^a	0,026	a
	FLT	1	0,316 ^a	0,056	a
	fFLT	1	0,334 ^a	0,065	a
60	kontrola	0	0,326 ^a	0,017	b
	FLT	1	0,280 ^a	0,066	a
	fFLT	1	0,297 ^a	0,034	ac
105	kontrola	0	0,221 ^a	0,033	c
	FLT	1	0,237 ^a	0,021	ab
	fFLT	1	0,209 ^a	0,044	bc
150	kontrola	0	0,164 ^a	0,027	d
	FLT	1	0,156 ^a	0,052	b
	fFLT	1	0,182 ^a	0,025	b

Hodnoty parametru po stejné době expozice označené stejným písmenem (horní index) se statisticky významně neliší. Hodnoty parametru stejné varianty označené stejným písmenem (statistická významnost) se statisticky významně neliší.

Získané výsledky nám neumožňují dát jednoznačnou odpověď na to, zda je ovlivnění primárních procesů fotosyntézy hrachu důsledkem vlivu fluoranthenu nebo jeho metabolických produktů. Dle Foota (1991) mají PAHs schopnost významně podpořit v přítomnosti světla tvorbu singletového kyslíku, který poškozují biologické systémy, a mají tedy schopnost vyvolávat oxidativní stres. Toxické účinky FLT mohou způsobit poškození membrán následkem oxidace lipidů (Foote, 1991), změny fotosyntetických pigmentů a transportu elektronů mezi PSII a PSI (Huang et al., 1997). Lze tedy předpokládat, že námi prokázané změny fluorescence chlorofylu jsou dokladem včasného ovlivnění účinnosti fotosyntetického aparátu fotomodifikovaným FLT a reakcí probíhajících na úrovni thylakoidní membrány chloroplastu. McConkey et al. (1997) předpokládá, a naše výsledky tento předpoklad potvrzují, že změna hodnot parametrů fluorescence chlorofylu může být ovlivněna přítomností chinonů, tj. hlavních produktů metabolismu FLT. Tyto sloučeniny mohou mít funkci akceptorů nebo donorů elektronů a ovlivňovat tak elektronový transport mezi oběma fotosystémy v membráně chloroplastu. Jednotlivé rostlinné druhy se liší v citlivosti na přítomnost PAHs v prostředí. Dionisio-Sese a Tobita (1998) prokázali u rostlin hrachu, ve srovnání s jinými rostlinnými druhy, vyšší specifickou aktivitu antioxidantů

enzymů. Potvrzení tohoto poznatku by mohlo vysvětlit vyšší citlivost primárních procesů fotosyntézy rostlin bobu, slunečnice a kukuřice, ve srovnání s hrachem, na přítomnost FLT v prostředí (Koptíková, 2000), která rovněž používala metodu indukované fluorescence chlorofylu. Získané výsledky dokládají účinek vysokého zatížení prostředí, a to již po velmi krátké době expozice. A to zejména při působení těchto xenobiotických látek na nadzemní části rostlin, které byly vystaveny vlivu intaktních a fotomodifikovaných forem PAHs.

ZÁVĚR

Cílem práce bylo studium vlivu zvyšující se koncentrace (0,1, 1 a 10 mg.l⁻¹) intaktního (FLT) a fotomodifikovaného fluoranthenu (fFLT) a doby jejího působení (12, 24 a 48 hodin) na primární procesy fotosyntézy hrachu setého (*Pisum sativum* L.). Současně byly posuzovány dvě rozdílné cesty zatížení rostlin; působení intaktního a fotomodifikovaného fluoranthenu byl krátkodobě vystaven kořenový systém a oddělené listy. Parametry fluorescence chlorofylu (F_0 , F_V/F_M , q_N , Φ_{II}) byly měřeny na orgánové úrovni, tzn. na listu, který nebyl oddělen od stonku i na odděleném listu a na subcelulární úrovni, tzn. na suspenzi chloroplastů.

Získané výsledky dokládají nevýznamné ovlivnění parametrů fluorescence chlorofylu (F_0 , F_V/F_M , q_N , Φ_{II}) při krátkodobém (12, 24 a 48 hodin) působení intaktním fluoranthenem (0,1 a 1 mg.l⁻¹), který byl aplikován do živného roztoku a na oddělené listy. Byly prokázány významné změny hodnot fluorescence chlorofylu (F_0 , F_V/F_M , q_N , Φ_{II}) oddělených listů: zvýšení hodnot F_0 a q_N a snížení hodnot F_V/F_M a Φ_{II} , nejvyšší aplikovanou koncentrací intaktního a fotomodifikovaného fluoranthenu (10 mg.l⁻¹), a to již po 12 hodinách expozice.

LITERATURA

- Dionisio-Sese, M.L., Tobita, J. (1998): Antioxidant responses of rise seedlings to salinity stress. *Plant Science*, 135: 1-9.
- Duxbury, Ch.-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*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 8: 1739-1748.
- Edwards, N.T., Ross-Todd, R.M., Garver, E.G. (1982): Uptake and metabolism of ¹⁴C anthracene by soya-bean (*Glycine max*). *Environ. Exp. Bot.*, 22: 349-357.
- Foote, C.S. (1991): Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem. Photobiol.*, 54: 659 pp.
- Huang, X.-D., Dixon, D.G., Greenberg, B.M. (1995): Increased polycyclic aromatic hydrocarbon toxicity following their photomodification in natural sunlight: Impacts on the duckweed *Lemna gibba* L. G-3. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 32: 194-200.

- Huang, X.-D., McConkey, B.J., Babu, T.S., Greenberg, B.M. (1997): Mechanisms of photoinduced toxicity of photomodified anthracene to plants: Inhibition of photosynthesis in the aquatic higher plant *Lemna gibba* (duckweed). *Environ. Toxicol. Chem.*, 8: 1707-1715.
- Ireland, D.S., Burton, G.A., Hess, G.G. (1996): In situ toxicity evaluations of turbidity and photoinduction of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15: 574-581.
- Jančárová R. (2003): Vliv fluoranthenu na primární procesy fotosyntézy hrachu *Pisum sativum* L.. Diplomová práce. Brno: PřF MU.
- Koptíková, J. (2000): Vliv fluoranthenu na růst rostlin bobu, kukuřice a slunečnice. Disertační práce. Brno: PřF MU.
- Kummerová, M., Slovák, L., Holoubek, I. (1997): Growth response of spring barley to short- or long-period exposures to fluoranthene. *Rostlinná výroba*, 43 (5): 209-215.
- Lewis, M.A. (1995): Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: A review. *Environ. Pollut.*, 87: 319-336.
- McConkey, B.J., Duxbury, C.L., Dixon, D.G., Greenberg, B.M. (1997): Toxicity of a PAH Photooxidation Products to the Bacteria *Photobacterium phosphoreum* and the Duckweed *Lemna gibba*: Effects of Phenanthrene and its Primary Photoproducts, Phenantrenequinone. *Environ. Toxicol. and Chemistry*, 16(5): 892-899.
- Ren, L., Zeiler, L.F., Dixon, D.G., Greenberg, B.M. (1996): Photoinduced effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on *Brassica napus* (Canola) during germination and early seedling development. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 33, 73-80.
- Roháček, K., 2002: Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. *Photosynthetica*, 1: 13-29.
- Wilson, S.C., Jones, K.C. (1993): Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Environ. Pollut.*, 81: 229-249.