

WPŁYW OZONU NA KONDYCJĘ RÓŻNYCH GATUNKÓW ROŚLIN ZIELARSKICH

Renata Bączek-Kwinta

Katedra Fizjologii Roślin, Akademia Rolnicza im. H. Kołłątaja w Krakowie

Wstęp

Zawartość ozonu w troposferze zazwyczaj waha się w granicach od 20 do 60 nmol(O₃)-mol⁻¹(powietrza), przy okresach wzrostu nawet do 250 nmol-mol⁻¹ [STOCKWELL i in. 1997]. W obiegowej opinii podwyższone stężenie O₃ jest domeną obszarów zurbanizowanych jako składnik smogu fotochemicznego, jednak coraz więcej danych wskazuje na to, iż gaz ten może rozprzestrzeniać się na tereny wiejskie, a jak podają HEAGLE i in. [1998], wskutek tego produkcja roślinna może ulec obniżeniu nawet o 40% w ciągu sezonu wegetacyjnego. Dyfuzja O₃ następuje przez aparaty szparkowe, a zatem głównie w ciągu dnia, gdyż szparki otwierają się reagując na światło i obniżone stężenie CO₂. Uszkodzenia liści różnych gatunków często porównuje się z objawami występującymi na tytoniu odmiany Bel W3, klasyfikując je jako ostre i przewlekłe [PELL i in. 1997]. Wizualnym zmianom towarzyszą różnorodne reakcje fizjologiczne i biochemiczne, często związane z funkcjonowaniem systemu antyoksydacyjnego.

Melisa lekarska, szalwia lekarska i bazylija zwyczajna, rośliny z rodziny *Labiatae* o nieco odmiennej morfologii i cyklu życiowym stanowią cenny surowiec dla farmacji oraz przemysłu kosmetycznego i spożywczego. Jako że Polska jest jednym z czołowych producentów ziół w Europie, celowe wydaje się zbadanie wpływu podwyższonego stężenia ozonu na te gatunki.

Materiał i metody

Nasiona bazylii właściwej (*Ocimum basilicum* L.); melisy lekarskiej (*Melissa officinalis* L.) i szalwii lekarskiej (*Salvia officinalis* L.) wysiano do podłoża zawierającego glebę ogrodową (15 III). Siewki przepikowano do rozsadnika 21 IV. Wegetację roślin prowadzono w szklarni o natężeniu oświetlenia w zakresie promieniowania fotosyntetycznie czynnego (PAR) od 350 do 1500 μmol(quantum)-m⁻²-s⁻¹ (oświetlenie naturalne), przy fotoperiodzie 15/9 h (dzień/noc), temperaturze około 12°C w ciągu nocy i 15-25°C w dzień oraz wilgotności względnej 20-30%. Kilkucentymetrowe siewki melisy i około 10-cm siewki szalwii i bazylii przeniesiono do wentylowanej komory wegetacyjnej podzielonej na dwie części, o identycznych warunkach termicznych (17°C), świetlnych (300 μmol(quantum)-m⁻²-s⁻¹) i wilgotnościowych (wilgotność względna 50%), w jednej z nich fumigując rośliny ozonem o stężeniu 140 nmol-mol⁻¹(powietrza) aplikowanym w godz. 9-17 (zgodnie z dobową rytmiką syntezy O₃ w troposferze). Wszystkie pa-

rametry pracy komór były monitorowane i sterowane elektronicznie [SKOCZOWSKI i in. 2000]. Po 5-dniowym w przypadku melisy i 14-dniowym ozonowaniu pozostałych gatunków przeniesiono je do szklarni o warunkach powyżej opisanych. Ozonowane rośliny melisy poddano 6-dniowej remisji, a następnie podzielono je na serie: ponownie ozonowaną, kontrolną (w drugiej części komory) i trzecią pozostawioną w szklarni o warunkach uprzednio opisanych. Pomiary parametrów fluorescencji chlorofilu *a* wykonano przy użyciu przyrządu PSM (Plant Stress Meter) firmy BioMonitor AB (Umeå, Szwecja). Wykorzystano następujące parametry: F_v/F_m , który jest miarą sprawności PS II, a jego zmniejszenie świadczy o obniżeniu sprawności fotochemicznej fotosystemu; F_v/F_o , czyli efektywność kompleksu wydzielenia tlenu, uważanego za najbardziej wrażliwe na działanie stresów środowiskowych miejsce w łańcuchu fotosyntetycznego transportu elektronów w PS II [HAUVAUX, LANNYOYE 1984]; oraz $t_{1/2}$ – półokres narastania sygnału fluorescencyjnego od wartości minimalnej F_o do maksymalnej F_v . Skrócenie tego czasu świadczy między innymi o zaburzeniu procesów zbierania elektronów z chinonowego przenośnika elektronów Q_a , związanego z PS II. Oznaczenia przeprowadzono w temperaturze 20°C, w ilości powtórzeń biologicznych (roślin) $n = 8$. Czas wzbudzenia wynosił 5 s, poziom światła aktywnego 600 $\mu\text{mol}(\text{quantum})\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, czas zaciemnienia liści przed pomiarem 20 minut.

Wyniki

Wpływ bezpośredni

5-dniowa fumigacja ozonem wywołała uszkodzenia liści melisy lekarskiej w postaci nekrotycznych plam o średnicy około 2 mm, widocznych po obydwóch stronach liści, przypominających objawy nadwrażliwości roślin na stres biotyczny – ang. hypersensitive-like response (HR), (rys. 1). Starsze liście wykazywały objawy przyspieszonego starzenia (żółknięcie i zasychanie) w wyniku oddziaływania ozonu. W tym czasie zarówno bazylija właściwa, jak i szalwia lekarska nie ujawniały żadnych zewnętrznych objawów zatrucia O_3 . Przy pomocy pomiarów parametrów fluorescencji chlorofilu *a* wykonanych po 14 dniach zabiegu, wykazano brak uszkodzeń fotosystemu II liści tych dwóch gatunków (tab. 1).

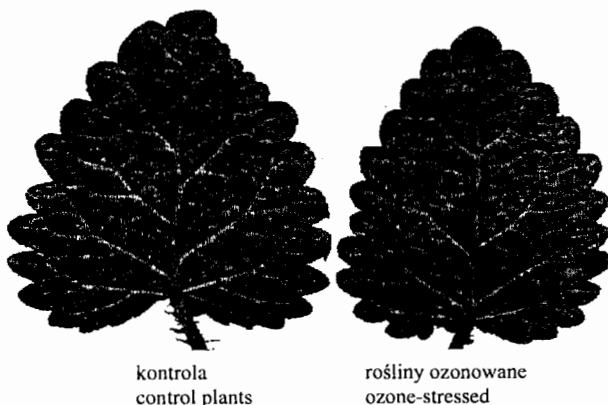
Tabela 1; Table 1

Parametry fluorescencji chlorofilu *a* liści bazylii właściwej (*O. basilicum*) i szalwii lekarskiej (*S. officinalis*) po 14 dniach ozonowania

Parameters of the chlorophyll *a* fluorescence of basil (*O. basilicum*) and sage (*S. officinalis*) leaves after 14 days of exposure to O_3

Parametr Parameter	<i>Ocimum basilicum</i>		<i>Salvia officinalis</i>	
	kontrola control plants	rośliny ozonowane ozone-stressed	kontrola control plants	rośliny ozonowane ozone-stressed
F_v/F_m	0,667 [^]	0,688 [^]	0,711 [^]	0,687 [^]
$t_{1/2}$	163 [^]	161 [^]	182 [^]	205 [^]
F_v/F_o	2,03 [^]	2,25 [^]	2,68 [^]	2,29 [^]

Jednakowe litery oznaczają brak statystycznie istotnego zróżnicowania średnich według testu t-Studenta przy $p=0,05$; Means signed with the same letters do not differ significantly (t-Student test, $p = 0.05$)



Rys. 1. Uszkodzenia liści melisy lekarskiej po 5 dniach ozonowania – 140 nmol(O₃)-mol⁻¹(powietrza)

Fig. 1. Leaf lesions of lemon balm after 5 days of exposure to O₃ – 140 nmol(O₃)-mol⁻¹(air)

Efekt następczy

Stężenie O₃ 140 nmol·mol⁻¹ wywarło wpływ następczy na melisę: uszkodzone w czasie ozonowania liście po 6 dniach fazy remisyjnej charakteryzowały się zmniejszonymi wartościami F_v/F_m i F_v/F_o w porównaniu z kontrolą (tab. 2). Po poddaniu tych roślin ponownemu ozonowaniu zaobserwowano pojawianie się nowych uszkodzeń na liściach uprzednio znekrotyzowanych. Tym razem było to zasychanie brzegów liści oraz obniżone wartości F_v/F_m i F_v/F_o zarówno w porównaniu z serią nieozonowaną, przetrzymywaną w takich samych warunkach świetlnych, jak i z roślinami, które przeniesiono do szklarni o bardziej intensywnym oświetleniu. Nie zaobserwowano natomiast uszkodzeń na młodszych liściach, a średnie wartości badanych parametrów były do siebie zbliżone niezależnie od warunków (rys. 2).

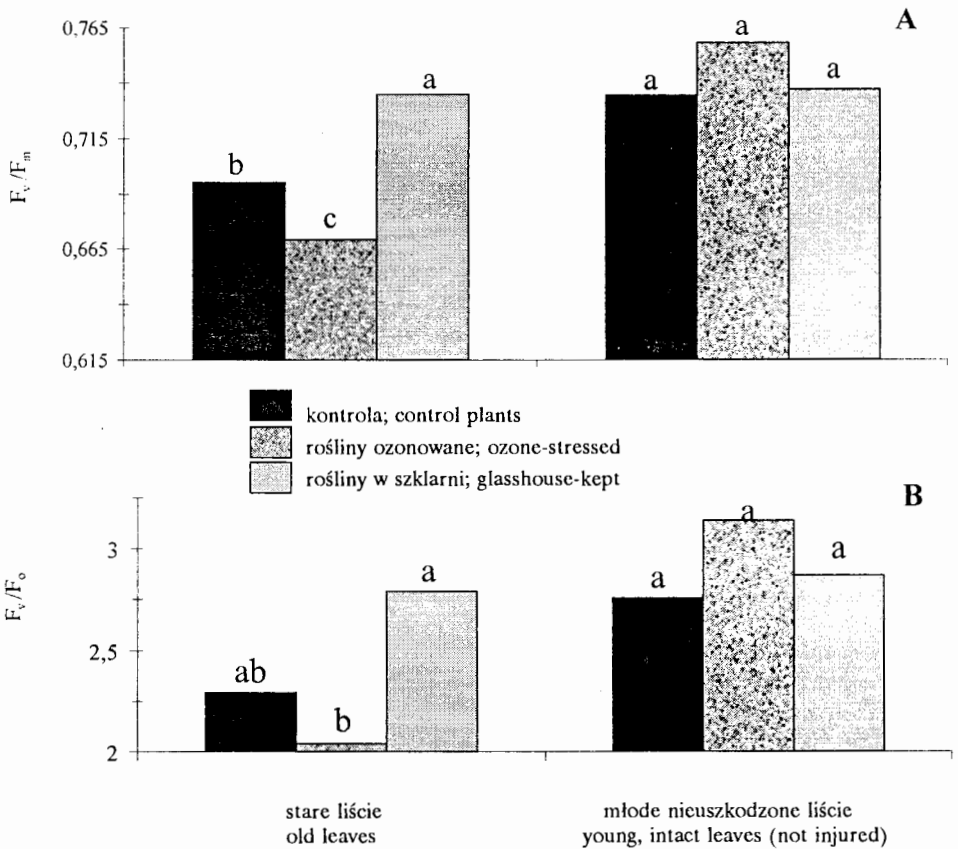
Tabela 2; Table 2

Parametry fluorescencji chlorofilu *a* liści melisy lekarskiej (*M. officinalis*) po 5 dniach ozonowania i 6 dniach remisji (efekt następczy)

Parameters of the chlorophyll *a* fluorescence of lemon balm (*M. officinalis*) leaves following 5 days of exposure to ozone and 6 days of recovery (the post-stress effect)

Parametr Parameter	<i>Melissa officinalis</i>	
	kontrola control plants	rośliny ozonowane ozone-stressed
F _v /F _m	0,678 ^A	0,635 ^B
t _{1/2}	154 ^A	129 ^A
F _v /F _o	2,14 ^A	1,72 ^B

Jednakowe litery oznaczają brak statystycznie istotnego zróżnicowania średnich według testu t-Studenta przy p=0,05; Means signed with the same letters do not differ significantly (t-Student test, p = 0.05)



Rys. 2. Maksymalna wydajność kwantowa PS II (A) i efektywność kompleksu wydzielania tlenu w PS II (B) liści melisy lekarskiej podczas powtórnego ozonowania (6 dni; $140 \text{ nmol}(\text{O}_3)\text{mol}^{-1}$ stosowanego codziennie w ciągu 12 h podczas oświetlenia). Rośliny uprzednio ozonowane i poddane remisji podzielono na grupy: kontrolną, powtórnje ozonowaną i przetrzymywaną w szklarni. Jednakowe litery oznaczają brak istotnego statystycznie zróżnicowania (test Duncana, $p = 0,05$)

Fig. 2. Maximal quantum efficiency of PS II (A) and efficiency of the oxygen-evolving complex (B) of lemon balm leaves during re-ozonation (6 days; $140 \text{ nmol}(\text{O}_3)\text{mol}^{-1}$ applied daily for 12 h during illumination). Previously ozone-stressed and recovered plants were divided into control, ozone-stressed and glasshouse-kept series. Means signed with the same letters do not differ significantly (Duncan test, $p = 0.05$)

Dyskusja

Ozon jest bardzo silnym utleniaczem (jego potencjał elektrochemiczny wynosi $+2,07 \text{ V}$). Po wnikięciu przez aparaty szparkowe, dyfundując w apoplazmę uszkadza jego podatne na oksydację elementy, a następnie szybko tworzy rodniki: $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$, nadtlenki lipidów i inne reaktywne formy tlenu, m. in. H_2O_2 [HEATH 1980, 1988], które przy obniżonej wydajności systemów detoksyfikacyjnych doko-

nią uszkodzeń plazmolemy oraz wnętrza komórki. Szczególnie składniki PS II podatne są na utlenianie [m.in. HELLGREN i in. 1995], a pogorszenie stanu fizjologicznego roślin znajduje zwykle odzwierciedlenie w obniżeniu wartości parametrów fluorescencji chlorofilu *a* [VIDAVER i in. 1991]. Tak więc zarówno brak wizualnych uszkodzeń, jak i zmian tych parametrów mogą pozwolić na zaklasyfikowanie szalwii i badanej odmiany bazylii jako roślin odpornych na toksyczne działanie ozonu, zwłaszcza że jego stężenie było dość wysokie, a stres trwał stosunkowo długo (14 dni). Według SCHRAUDNER i in. [1997], spośród roślin o użytkowaniu leczniczym odporne na ozon są również: babka lancetowata, mydlnica lekarska, mniszek lekarski i pokrzywa zwyczajna, aczkolwiek sposób klasyfikacji odporności danego gatunku polegał w tym przypadku na wizualnej ocenie uszkodzeń w porównaniu z wzorcową odmianą tytoniu Bel W3. Stwierdzona w niniejszym doświadczeniu odporność szalwii i bazylii na dwutygodniowe ozonowanie może znaleźć wyjaśnienie na przykład w szybkiej reakcji systemu antyoksydacyjnego, czyli enzymów i przeciwutleniaczy niskocząsteczkowych unieszkodliwiających wolne rodniki. Mechanizm polegający na zmniejszeniu stopnia rozwarcia aparatów szparkowych wydaje się w tym przypadku mniej prawdopodobny, gdyż nastąpiłoby wówczas także ograniczenie pobierania CO₂ przez liście, co zapewne obniżyłoby biomasę roślin ozonowanych w stosunku do kontroli, czego nie stwierdzono (dane nieprezentowane).

Melisa lekarska okazała się rośliną wrażliwą na podwyższone stężenie O₃, a objawy przypominające nadwrażliwość na stres biotyczny klasyfikowane są jako symptomy ostrego zatrucia. Według PELL i in. [1997] lokalne nekrozy mogą być wywołane: 1) programowaną śmiercią komórek (apoptozą), co ma miejsce w przypadku nadwrażliwości typu HR, kiedy to komórki sąsiadujące wysyłają sygnały chemiczne informujące o zagrożeniu, aktywujące systemy naprawcze i protekcyjne, lub 2) jedynie toksycznością ozonu i wtórnych utleniaczy. Zachowanie się roślin podczas powtórnego ozonowania przemawia na korzyść pierwszej możliwości, albowiem chociaż starsze, uszkodzone uprzednio liście wykazywały nowe nekrozy, to nie zaobserwowano ich na młodych organach, a wartości parametrów F_v/F_m i F_v/F_o tych organów nie wykazywały zróżnicowania niezależnie od warunków. Dla celów farmaceutycznych istotne jest ustalenie, czy tak silny oksydant jak ozon nie zmienia nie tylko plonu zióła melisy, lecz przede wszystkim jakości pozyskiwanego z tej rośliny oleju zawierającego terpenoidy.

Wnioski

1. Szalwia lekarska i badana odmiana bazylii są odporne na ozon działający w stężeniu 140 nmol(O₃)·mol⁻¹(powietrza).
2. Ostre uszkodzenia nekrotyczne melisy mogą być wywołane programowaną śmiercią komórek, prowadzącą do przesyłania informacji o stresie do innych organów, co prowadzi do aktywowania w nich systemów naprawczych i protekcyjnych.

Literatura

HAVAUX M., LANNOYE R. 1984. *Effects of chilling temperatures on prompt and delayed chlorophyll fluorescence in maize and barley leaves*. Photosynthetica 18: 117–127.

- HEAGLE A.S., MILLER J.E., BOOKER F.L. 1998. *Influence of ozone stress on soybean responses to carbon dioxide enrichment: I. Foliar properties*. Crop Sci. 38: 113–124.
- HEATH R.L. 1980. *Initial events in injury to plants by air pollutants*. Annu. Rev. Plant Physiol. 31: 395–431.
- HEATH R.L. 1988. *Biochemical mechanisms of pollutant stress, w: Assessment of crop loss from air pollutants*. Heck W.W., Taylor O.C., Tingey D.T. (red.). London, New York, Elsevier: 259–286.
- HELLGREN L.L., CARLSON A.S., SELLDEN G. 1995. *In situ leaf lipid metabolism in garden pea (Pisum sativum L.) exposed to moderately enhanced levels of ozone*. J. Exp. Bot. 283: 221–230.
- PELL E.J., SCHLAGNAUFER C.D., ARTECA R.N. 1997. *Ozone-induced oxidative stress. Mechanisms of action and reaction*. Physiol. Plantarum 100: 264–273.
- SCHRAUDNER M., LANGEBAEELS CH., SANDERMANN H. 1997. *Changes in the biochemical status of plant cells induced by the environmental pollutant ozone*. Physiol. Plantarum 100: 274–280.
- SKOCZOWSKI A., PIEŃKOWSKI S., NIEWIADOMSKA E., MISZAŁSKI Z. 2000. *Phytotron chambers for plant exposure to ozone*. Archiwum Ochrony Środowiska 26: 129–135.
- STOCKWELL W.R., KRAMM G., SCHEL H.E., MOHNEN V.A., SEILEV W. 1997. *Ozone formation, destruction and exposure in Europe and the United States, w: Forest decline and ozone: a comparison of controlled chamber and field experiments*. Sander mann H., Wellburn A.R., Heath R.L. (red.). Springer Verlag, Berlin/Heidelberg/New York 127: 1–37.
- VIDAVER W.E., LISTER G.R., BROOKE R. C., BINDER W.D. 1991. *A manual for the use of variable chlorophyll fluorescence in the assessment of the ecophysiology of conifer seedlings*. British Columbia Ministry of Forest. Forest Resource Development Agreement Report 163: 60.

Słowa kluczowe: ozon, fluorescencja chlorofilu, bazylia właściwa, melisa lekarska, szalwia lekarska

Streszczenie

Celem pracy było zbadanie podwyższonego stężenia O_3 do $140 \text{ nmol}(O_3) \cdot \text{mol}^{-1}$, stosowanego w ciągu dnia na stan fizjologiczny trzech gatunków roślin zielarskich z rodziny *Labiatae*: bazylii właściwej (*Ocimum basilicum* L.), melisy lekarskiej (*Melissa officinalis* L.) i szalwii lekarskiej (*Salvia officinalis* L.). Stwierdzono, że najbardziej wrażliwym na ozon spośród badanych gatunków okazała się melisa lekarska, której liście uległy uszkodzeniom nekrotycznym przypominającym nadwrażliwość na patogen po 5 dniach ekspozycji na stres. Bazylia i szalwia nie ujawniły takich uszkodzeń nawet po 14 dniach ozonowania. Analiza parametrów fluorescencji chlorofilu *a* również nie wykazała różnic pomiędzy seriami kontrolną i ozonowaną. Zanotowano natomiast niekorzystny wpływ następczy O_3 (utrzymujący się po 8 dniach od momentu zakończenia ozonowania) na fotosystem II u melisy lekarskiej – rośliny ozonowane wykazywały

wartości F_v/F_m w wysokości 94%, $t_{1/2}$ 84% i F_v/F_o 80% kontroli. Powtórne ozonowanie zwiększyło uszkodzenia starszych liści, nie wywołało natomiast nekroz ani spadku F_v/F_m w młodszych liściach. Jednym z możliwych wyjaśnień mechanizmu reakcji *M. officinalis* na ozon jest nadwrażliwość roślin, prowadząca do ochrony przed dalszym utlenianiem przy ponownej aplikacji O_3 .

DIFFERENTIAL RESPONSE TO ELEVATED OZONE OF VARIOUS HERBS

Renata Bączek-Kwinta

Plant Physiology Department, Agricultural University, Kraków

Key words: ozone, chlorophyll fluorescence, basil, lemon balm, sage

Summary

The aim of this work was to study the influence of elevated (up to 140 nmol·mol⁻¹) O_3 concentration, applied daily on physiological status of three herbs of *Labiatae* family: basil (*Ocimum basilicum* L.), lemon balm (*Melissa officinalis* L.) and sage (*Salvia officinalis* L.). Lemon balm plants were the most sensitive to ozone, and after 5 days of exposure to O_3 they exhibited necrotic lesions on leaves, resembling the hypersensitive response to pathogens. Neither sage nor basil was injured, even after 14 days of stress. Photosystem II was not affected, as shown with analysis of chlorophyll *a* fluorescence. The post-stress effect (following 8 days of recovery) of elevated O_3 on lemon balm was noticed – ozone-treated plants had their F_v/F_m of 94%, $t_{1/2}$ of 84% and F_v/F_o of 80% control, respectively. Re-ozonation enhanced the lesion formation in older leaves, but did not trigger necrotic spots nor the decline in F_v/F_m value in the younger ones. One of the possible mechanisms of *M. officinalis* response to ozone is hypersensitive-like one, resulting in protection against subsequent oxidation during repeated O_3 application.

Mgr inż. Renata **Bączek-Kwinta**
Katedra Fizjologii Roślin
Akademia Rolnicza im. H. Kołłątaja
ul. Podłużna 3
30-239 KRAKÓW
e-mail: rrbaczek@cyf-kr.edu.pl