

FOTOSYNTETYCZNY TRANSPORT ELEKTRONÓW W CHLOROPLASTACH LIŚCI  
POMIDORÓW PODDANYCH DZIAŁANIU KADMU

Tadeusz Baszyński, Lucyna Wajda\*, Maria Król, Danuta Wolińska  
Zbigniew Krupa, Anna Tukendorf

Instytut Biologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej,  
20-033 Lublin, ul. Akademicka 19

Większe stężenia kadmu występujące w środowisku naturalnym mogą być dla roślin toksyczne [3]. Kadm jest inhibitorem metabolizmu roślin, a szczególnie procesu fotosyntezy u roślin wyższych [8]. Stwierdzona przez Bazzaza i in. [3, 4] oraz Huanga i in. [9] zależność między fotosyntezą netto a transpiracją sugeruje, iż działanie kadmu w procesie fotosyntezy mogłoby się sprowadzać do zamykania szparek. Podobne sugestie wysuwają Lamoreaux i in. [10]. W ostatnich latach ukazały się także doniesienia, iż kadm w izolowanych chloroplastach roślin wyższych hamuje fotosyntetyczny transport elektronów w obrębie II układu fotosyntezy [5]. W roku 1975 Van Duijvendijk-Matteoli i Desmet [6] wykazali, że kadm uszkadza układ rozszczepiający wodę w miejscu działania manganoproteidu. Z drugiej strony Li i Miles [11] uważają, że kadm działa bezpośrednio na chlorofil w centrum reakcji II układu fotosyntezy. Według Lucero i in. [12] kadm użyty w niskich stężeniach hamuje również fotofosforylację liści szpinaku.

Większość pomiarów fotosyntezy netto przeprowadzano na liściach odciętych roślin zanurzonych na krótki okres w roztworze o różnym stężeniu kadmu. Aktywności fotochemiczne mierzono natomiast w izolowanych chloroplastach inkubowanych w roztworze kadmu. W pracy niniejszej badano aktywności fotosyntetyczne chloroplastów roślin uprawianych na pożywcze zawierającej jony kadmu. Zwrócono także uwagę na ochronne działanie jonów manganu przed inhibującym wpływem kadmu na świetlną fazę fotosyntezy.

\*Zakład Fizjologii Roślin, PAN, Kraków.

## MATERIAŁ I METODY

Nasiona pomidora (*Lycopersicum esculentum* Mill. odm. Money-maker) sterylizowano w 70% alkoholu przez 5 min. następnie moczo no przez 2-3 godz. w wodzie destylowanej, wreszcie kiełkowano przez 5 dni w ciemności w temperaturze 27°C na bibule filtracyjnej. Siewki umieszczano w wazonach zawierających pożywkę Steinecka rozcieńczoną wodą destylowaną w stosunku 1:1 i przenoszono do szklarni. Po 10 dniach rośliny przeniesiono na pełną pożywkę, którą przewietrzano codziennie i zmieniano co 2-3 dni. Do pożywki dodawano mikroelementy w następujących ilościach, w  $\mu\text{molach/litr}$ : 100  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 100  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 30  $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 5 KJ, 1  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 0,1  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,1  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .

Po 4 tygodniach wzrostu część roślin przenoszono do pożywki (jak wyżej) zawierającej 20  $\mu\text{moli/litr}$  kadmu w postaci 3  $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ . Po 9 dniach część roślin traktowanych roztworem kadmu nawożono dodatkowo siarczanem manganu w ilości 500 i 1000  $\mu\text{moli/litr}$  pożywki. Sześciotygodniowe rośliny zbierano do oznaczeń aktywności fotochemicznych. Doświadczenia przeprowadzano trzykrotnie w trzech niezależnych powtórzeniach w 7-dniowych odstępach w czerwcu i lipcu 1978 r. Zawartość chlorofilu oraz stosunek chl a/b oznaczono metodą Arnona 1. Chloroplasty z liści pomidorów izolowano i zawieszano w buforze fosforanowym (0,05 M, pH 7,6) zawierającym 0,15 M KCl i 0,4 N sacharozy według metody Sane i in. [13].

Aktywność II układu fotosyntezy mierzono spektrofotometrycznie przy 600 nm na podstawie fotoredukcji sztucznego akceptora elektronów, dwuchlorofenoloindofenolu (DCIP). Pomiar przeprowadzano w kuwetach szklanych w 20°C stosując światło czerwone o intensywności  $1,5 \times 10^4 \mu\text{W} \cdot \text{cm}^{-2}$ . Mieszanina reakcyjna zawierała, w  $\mu\text{molach}$ : bufor Tricine-NaOH (pH 7,0), 150; DCIP, 0,125; chloroplasty w ilości odpowiadającej 30  $\mu\text{g}$  chlorofilu w końcowej objętości 3 ml. W miejscach zaznaczonych w tabeli stosowano jako alternatywny donor elektronów dwufenylokarbazyd (DPC).

Aktywność I układu fotosyntezy mierzono określając pobór  $\text{O}_2$  elektrodą tlenową Clarka w temperaturze 24°C. Donorem elektronów był askarbinian sodu i N,N,N',N'-czterometylo-p-fenyleneodwuamina, (TMPD), zaś akceptorem metylowiologen (MV). Naczynko reakcyjne oświetlano światłem czerwonym o intensywności  $2,5 \times 10^4 \mu\text{W} \cdot \text{cm}^{-2}$ . Mieszanina reakcyjna dla pomiaru poboru tlenu zawierała, w  $\mu\text{mo}$ -

lach: bufor Tricine-NaOH (pH 8,0), 150; DCMU, 0,03; askorbinian sodu, 50; TMPD, 0,2; metylowiologen, 0,4; chloroplasty w ilości odpowiadającej 15  $\mu\text{g}$  chlorofilu w końcowej objętości 3 ml. Transport elektronów od wody do metylowiologenu (PS II + I), będący miarą aktywności obydwu układów fotosyntezy mierzono również polarograficznie przy użyciu elektrody tlenowej Clarka.

Fosforylację cykliczną mierzono w obecności metosiarczanu fenazyny zmodyfikowaną metodą Avrona [2]. Mieszanina reakcyjna zawierała następujące składniki, w  $\mu\text{molach}$ : bufor Tricine-NaOH (pH 8,0), 50; KCl, 50;  $\text{MgCl}_2$ , 10;  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , 10; ADP, 4; metosiarczan fenazyny, 0,15; askorbinian sodu, 20; chloroplasty w ilości równoważnej 50  $\mu\text{g}$  chlorofilu w końcowej objętości 3 ml. Mieszaninę reakcyjną oświetlano przez 5 min światłem o intensywności  $1,2 \times 10^3 \mu\text{W cm}^{-2}$ . Fotofosforylację niecykliczną oznaczono w ten sam sposób z tym, że metosiarczan fenazyny zastąpiono żelazicjanem potasu w ilości 5  $\mu\text{moli}$  [7]. Zawartość fosforu nieorganicznego oznaczono metodą Fiske-Subbarowa.

Skrawki liści utrwalono w 4% aldehydzie glutarowym w 0,07 M buforze fosforanowym (pH 7,2) w temperaturze 4°C w ciągu 12 godz. a następnie przez 1 godz w 1% roztworze buforowym  $\text{OsO}_4$ . Materiał odwadniano alkoholem etylowym i poprzez tlenek propylenu zatapiało w Vestopalu W. Spolimeryzowany materiał krojono na ultracienkie skrawki i kontrastowano octanem uranylu w 30% etanolu w ciągu nocy a następnie 0,03% cytrynianem ołowiu przez 10 min. Skrawki analizowano w mikroskopie elektronowym Tesla BS-500.

## OMÓWIENIE WYNIKÓW

Dotychczasowe badania nad wpływem kadmu na fotosyntezę dotyczyły głównie krótkotrwałego działania tego pierwiastka. W środowisku naturalnym działanie to trwa z reguły długo, przez cały okres ontogenezy rośliny. Kadm zawarty w środowisku odżywczym badanych roślin powodował znaczny spadek zawartości chlorofilu w liściach pomidorów (ok. 50% w stosunku do roślin kontrolnych) oraz około 15% obniżenie stosunku chl a/b (tab. 1). Rysunek 1 przedstawia zdjęcia spod mikroskopu elektronowego wykazujące zmiany w wewnętrznej strukturze chloroplastów pod wpływem tego pierwiastka. Zmiany te sprowadzają się do zmniejszenia ilości gran, lub ich całkowitego zaniku oraz akumulacji dużych plastoglobul

Zawartość chlorofilu w liściach pomidorów rosnących  
na podłożu mineralnym zawierającym kadm

Wyszczególnienie	Dodatkowe nawożenie manganem w mM	Liście pomidora	
		kontrolne	traktowane kadmem
Zawartość chlorofilu w mg/dcm <sup>2</sup>	-	2,82 ± 0,20	1,47 ± 0,04
	0,5		2,11 ± 0,16
	1,0		1,89 ± 0,10
Stosunek chl <u>a/b</u>	-	2,7	2,3
	0,5		2,6
	1,0		2,6

wskazujących na deorganizację błon chloroplastowych. Przeniesienie roślin traktowanych kadmem na pożywkę zawierającą nadmiar jonów manganu powoduje częściową odbudowę struktury chloroplastów, głównie gran. Dotychczas wpływ kadmu na strukturę chloroplastów badany był sporadycznie. Ostatnio Simola [14] nie zaobserwował większych zmian struktury chloroplastów mchu (*Sphagnum nemoreum*) pod wpływem kadmu.

Stwierdzone przez nas zaburzenia w strukturze wewnętrznej chloroplastów sugerują zróżnicowanie aktywności fotosyntetycznego transportu elektronów. Tabela 2 pokazuje, że przez nawożenie pomidorów kadmem aktywność II układu fotosyntezy jest silnie hamowana. Po dwóch tygodniach wzrostu na podłożu zawierającym kadm aktywność ta w izolowanych chloroplastach jest obniżona do około 57% aktywności roślin kontrolnych. Kadm nie powodował znaczniejszych zmian aktywności II układu fotosyntezy, jeżeli jako sztucznego donora elektronów użyto DPC. Fakt ten wykazuje, iż kadm blokuje transport elektronów przed miejscem, w którym DPC oddaje elektrony do centrum II układu fotosyntezy.

T a b e l a 2

Aktywności fotochemiczne w chloroplastach pomidorów rosnących na pożywce mineralnej zawierającej kadm

Rośliny	Dodatkowe nawożenie manganem w mM	H <sub>2</sub> O → DCIP μmole zred. akceptora/mg chl · h %	DPC → DCIP %	H <sub>2</sub> O → MV μmole pobranego O <sub>2</sub> /mg chl · h %	TMPD → MV
Kontrolne	-	37 ± 5 100	40 ± 5 100	39 ± 3 100	933 ± 152 100
Traktowane kadmem	-	21 ± 2 57	34 ± 4 85	23 ± 6 59	864 ± 112 93
"	0.5	36 ± 6 97	39 ± 6 98	35 ± 5 90	842 ± 123 90
"	1.0	33 ± 7 89	41 ± 9 103	39 ± 8 100	830 ± 120 89

Również fotoredukcja metyłowiologenu w reakcji włączającej obydwie fotoukłady jest hamowana w chloroplastach roślin traktowanych kadmem. Inhibicja ta wynosi około 60%, jest pod względem wielkości podobna do fotoredukcji DCIP. Obecność kadmu w roślinie zakłóca więc te reakcje fotochemiczne chloroplastów, dla których woda stanowi źródło elektronów. Mangan, uczestniczący, jak wiadomo, w procesie fotoredukcji wody, dodany do podłoża, na którym rosły rośliny traktowane kadmem, zmniejsza stopień inhibicji reakcji fotochemicznych w chloroplastach związanych z II układem fotosyntezy.

Pojawianie się ponownie w chloroplastach gran pod wpływem nadmiaru manganu i równoczesna reaktywacja II układu fotosyntezy stanowić mogą dowód na zależność między strukturą chloroplastu a jego funkcją. W doświadczeniach *in vitro* inhibujący wpływ kadmu na aktywność II układu fotosyntezy był po dodaniu manganu jedynie częściowo odwracany [6, 11].

Kadm pobrany przez rośliny z podłoża (*in vivo*) wpływa na łańcuch transportu elektronów podobnie jak w doświadczeniach *in vitro*, w których chloroplasty inkubowano z jonami kadmu. Nie jest to prawdopodobnie bezpośredni wpływ na fotoredukcję II układu fotosyntezy, jak to na podstawie badań *in vitro* przyjmowali Li i Miles [11]. Bardziej uzasadnione wydaje się przypuszczenie, iż pobrany przez roślinę kadm wpływa na funkcje manganu w fotosyntetycznym wydzielaniu tlenu. Takie miejsce działania kadmu na izolowane chloroplasty sugerował Bazzaz i Govindjee [5].

W tabeli 3 przedstawiono wyniki wykazujące, że chloroplasty wyizolowane z roślin nawożonych kadmem charakteryzują się fosforylacją niecykliczną (przynależną do II układu fotosyntezy) niższą o około 50% aniżeli chloroplasty roślin kontrolnych. Fosforylacja cykliczna natomiast jest podobna w obu rodzajach chloroplastów (tj. kontrolnych roślin i traktowanych kadmem), a wpływ kadmu nie zaznacza się. Jest to sprzeczne z obserwacjami Lucero i in. [12], którzy po dodaniu kadmu do zawiesiny chloroplastów stwierdzili inhibicję obu fotofosforylacji. W naszych doświadczeniach wykazano, że nadmiar manganu reaktywuje fosforylację niecykliczną. Ten efekt manganu nie był dotychczas znany.

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki sugerują, iż mangan może być w przyrodzie czynnikiem ochronnym przeciw inhibującemu działaniu kadmu na aparat fotosyntetyczny roślin wyższych. Stoso-

wanie wyższych stężeń manganu ograniczone jest niestety toksycznym działaniem wysokich jego dawek na rośliny.

T a b e l a 3

Fotofosforylacja w chloroplastach liści pomidorów rosnących na pożywce mineralnej zawierającej kadm

Rośliny	Dodatkowe nawożenie manganem w mM	Nie cykliczna		Cykliczna	
		$\mu$ mole pobranego P	%	/mg chl · h	%
Kontrolne	-	78 - 4	100	96 - 8	100
Traktowane kadmem	-	37 - 16	47	93 - 11	97
"	0.5	62 - 4	30	81 - 19	84
"	1.0	80 - 11	103	91 - 16	95

#### PODSUMOWANIE

Siewki pomidorów rosnące na pożywce mineralnej zawierającej jony kadmu charakteryzują się niższą zawartością chlorofilu oraz niższym stosunkiem chlorofilu a/b aniżeli rośliny kontrolne. Aktywność II układu fotosyntezy ( $H_2O \rightarrow DCIP$ ) oraz obu układów łącznie ( $H_2O \rightarrow MV$ ) w chloroplastach wyizolowanych z roślin rosnących na pożywce zawierającej jony kadmu, jest o około 60% niższa w porównaniu z roślinami kontrolnymi. Kadm nie wywiera istotnego wpływu na aktywność I udziału fotosyntezy.

Objawem działania kadmu na strukturę chloroplastów jest występowanie dużych plastoglobul i deorganizacja struktury lamellarnej, głównie stosów gran. Przeniesienie roślin poddanych działaniu kadmu do pożywki zawierającej wysokie dawki manganu powoduje ponowne tworzenie się gran i reaktywację II układu fotosyntezy.

Praca była finansowana przez Instytut Ekologii PAN (problem MR II/15). Autorzy dziękują p. mgr K. Kudlickiej za wykonanie zdjęć mikroskopowych.

## LITERATURA

1. Arnon D.J.: *Plant Physiol.*, 24, 1-15, 1949
2. Avron M.: *Biochim. Biophys. Acta*, 40, 257-272, 1960
3. Bazzaz F.A., Carlson R.W., Rolfe G.L.: *Environ Pollut.*, 7, 241-246, 1974
4. Bazzaz F.A., Rolfe G.L., Carlson R.W.: *Physiol. Plant.*, 32, 373-376, 1974
5. Bazzaz M.B., Givindjee: *Environ. Lett.*, 6, 1-12, 1974
6. van Duijvendijk-Matteoli M.A., Desmet G.M.: *Biochim. Biophys. Acta*, 408, 164-169, 1975
7. Gyldenholm A.O., Whatley F.R.: *New Phytol.* 67, 461-468, 1968
8. Hampp R., Beulich K., Ziegler H.: *Z. Pflanzenphysiol.*, 77, 336-344, 1976
9. Huang C., Bazzaz F.A., Vanderhoef L.N.: *Plant Physiol.*, 54, 122-124, 1974
10. Lamoreaux R.J., Chaney W.R.: *Physiol. Plant.*, 43, 231-236, 1978
11. Li E.H., Miles C.D.: *Plant Sci. Lett.*, 5, 33-40, 1975
12. Lucero H.A., Andreo C.S., Vallejos R.H.: *Plant Sci. Lett.*, 6, 309-313, 1976
13. Sane P.V., Goodchild D.J., Park R.B.: *Biochim. Biophys. Acta*, 216, 162-178, 1970
14. Simola L.K.: *Can. J. Bot.* 24, 27-63, 1977

Т. Башиньски, Л. Вайда, М. Круль, Д. Волинська  
З. Крупа, А. Тукендорф

ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЙ ТРАНСПОРТ ЭЛЕКТРОНОВ В ХЛОРОПЛАСТАХ  
ЛИСТЬЕВ ПОМИДОРОВ, ПОДВЕРГНУТЫХ ВОЗДЕЙСТВИЮ КАДМИЯ

Р е з ю м е

Сеянцы помидоров, растущие в минеральной питательной среде, содержащей ионы кадмия, характеризуются низким содержанием хлорофилла и низким соотношением хлорофилла  $a/b$ , чем контрольные растения. Активность фотосистемы II ( $H_2O \rightarrow DCIP$ ) и обеих систем вместе ( $H_2O \rightarrow MV$ ) в хлоропластах, изолированных из растений, растущих на питательной среде, которая содержит ионы кадмия, почти на 60% ниже, чем у контрольных растений. Кадмий не оказывает существенного влияния на активность фотосистемы I.

Признаком влияния на структуру хлоропластов является присутствие больших пластоглобул и деорганизация ламеллярной структуры, главным образом гранума. Перемещение растений, подвергнутых действию кадмия, в питательную среду, содержащую высокие дозы марганца, вызывает вторичное образование гранумов и реактивацию фотосистемы II.



T. Baszyński, L. Wajda, M. Król, D. Wolińska,  
Z. Krupa, A. Tukendorf

PHOTOSYNTHETIC ELECTRON TRANSPORT IN CHLOROPLASTS OF CADMIUM  
TREATED TOMATO PLANTS

S u m m a r y

Tomato plants grown on nutritional cadmium containing medium exhibit reduced chlorophyll content. In isolated chloroplasts of cadmium treated plants photosystem II activity ( $H_2O \rightarrow DCIP$ ) and both photosystems activity ( $H_2O \rightarrow MV$ ) are inhibited in about 60%. Photosystem I activity is not cadmium affected.

The fine structure of chloroplasts is desintegrated similarly to senescence response. The principal symptoms of cadmium action is the occurrence of large plastoglobules and disorganization of lamellar structure, mainly grana stacks. Transfer of cadmium treated plants into a medium with increased manganese level causes grana stacking and restoration of photosystem II activity. The effects of cadmium and manganese are discussed in relation to photosystem II activity.