

DYNAMIKA OBSAHU VYBRANÝCH SKUPIN FENOLICKÝCH LÁTEK V LISTECH JEČMENE JARNÍHO PŘI PŘECHODU Z VYSOKÉ NA NÍZKOU OZÁŘENOST V NEPŘÍTOMNOSTI UV-RADIACE

Jakub Nezval*, Zuzana Materová, Martina Volfová, Ladislav Šigut, Vladimír Špunda

*Email: nezval.jakub@gmail.com

Oddělení biofyziky, Katedra fyziky, Přírodovědecká fakulta, Ostravská univerzita v Ostravě, 30. dubna 22, 701 03 Ostrava, ČR

Vysoká úroveň fotosynteticky aktivní radiace (FAR), v nepřítomnosti UV-záření indukuje akumulaci fenolických látek

➤ bude po odstranění tohoto stresového faktoru obsah těchto látek v listech klesat nebo zůstane zachován?

➤ lze identifikovat změny v obsahu volných fenolických látek pouze za pomoci absorpční a fluorescenční spektroskopie?

Materiál a metody

Rostlinný materiál

- Sledovaná rostlina: Ječmen jarní (*Hordeum vulgare* L. cv. Bonus) a jeho mutant *Chlorina f2 (Clo f2)*
- Kontrolované růstové podmínky (kultivační komory) T=20°C, vlhkost vzduchu 65 %
- světelné režimy (16/8 světlo/tma):
- Pěstováno v nepřítomnosti UV-radiace (UV-filtr LEE 226, Lee Filters, GB)
- Po 8 dnech růstu na vysoké ozáření 1000 μmol m⁻² s⁻¹ (HI), byly rostliny přemístěny na nízkou ozáření 50 μmol m⁻² s⁻¹ (LI) - ve vybraných dnech (viz. Tab. 1) byly odebrány střední segmenty primárních listů, které byly zkoumány pomocí níže zmíněných instrumentálních metod

Instrumentální metody a příprava vzorku

a) in-vivo absorpční spektra listů

- absorpční spektrofotometr (UV-550, Unicam GB)
- skenovány střední segmenty primárních listů
- parametry měření: spektrální rozsah 200-800 nm, spektrální šířka štěrbin 1 nm, rychlost skenu 240 nm/min., sběr dat po 0,2 nm
- listy byly dále použity pro metody b) a c)

b) absorpční spektra extraktů fenolických látek

- 100 mg (čerstvé hmotnosti - F.W.) listů bylo homogenizováno v třetí misce ve 3 ml 40% metanolu po dobu přibližně 1 minuty, homogenát byl na 5 minut umístěn v ultrazvukové lázni a následně centrifugován 5 min. při 6000 ot./min., supernatant byl oddělen od peletu - 1 ml byl přefiltrován přes 0,2 μm teflonový filtr, přelit do vialky -> vzorek pro HPLC analýzu (c). 1 ml supernatantu byl zředěn 40% metanolem na celkový objem 5 ml, přelit do kvety a změřen na absorpčním spektrofotometru UV-550 (Unicam, GB): spektrální rozsah 200-750 nm, spektrální šířka štěrbin 0,5 nm, rychlost skenu 240 nm/min., sběr dat po 0,2 nm
- byla provedena korekce na rozptyl při 750 nm a výsledná spektra byla vztažena na plochu listu

c) HPLC analýza extraktů volných fenolických látek

- použita upravená gradientová metodika dle Kolb 2005, modifikace uvedeny v (Nezval 2009), mobilní fáze:

A - H₂O, H₃PO₄ (0,01% (w/v)),

B - metanol: H₂O, H₃PO₄ (metanol: 0,1% (w/v) H₃PO₄ (9:1; v/v))

- HPLC-DAD systém (TSP Analytical, USA), kolona: RP-18, 5 μm (Licosphere, GER)
- chromatogramy zaznamenávané při 240, 314, 440 nm
- spektra pořízena v rozsahu 180-500 nm (zobrazena od 200 nm)
- pro relativní srovnání obsahu látek mezi jednotlivými skupinami, byly plochy piků normovány na čerstvou hmotnost listu

d) In-vivo fluorescenční analýza UV-A stínění

- Míra epidermálního UV-A stínění listů byla stanovena pomocí fluorimetru DUALEX Scientific (FORCE-A, Orsay, FR) na základě metodiky dle Bilger et al. (2001).
- Detekována byla fluorescence chl a ve stavu adaptovaném na tmu excitovaná v červené a UV-A oblasti spektra. Pro excitaci fluorescence v červené oblasti byla použita LED dioda s λ_{max} = 655 nm a pro excitaci v UV-A oblasti LED dioda s λ_{max} = 375 nm. Fluorescence chl a byla detekována nad 700 nm.

d) In-vivo fluorescenční analýza UV-A stínění

➤ v průběhu aklimace na nízkou ozáření, nebyla pozorována žádná změna v míře UV-A stínění a to jak u divokého typu ječmene tak u jeho mutantu Clo f2

➤ za pomoci in-vivo metod nebyly v průběhu aklimace na LI pozorovány žádné výrazné změny, které by měly souvislet se zastoupením fenolických látek v rostlinách ječmene (viz. Výsledky a) a d))

➤ ze spekter extraktů lze často predikovat typ (podskupinu) fenolických látek ve větší míře v rostlině zastoupených, výrazné změny v obsahu minoritních fenolických látek jsou v absorpčních spektrech často zcela potlačeny malými změnami hlavních složek

➤ odezva jednotlivých fenolických látek na přechod HI -> LI je odlišná: obsah majoritně zastoupené fenolické látky - saponarinu zůstává konstantní, obsah fenolických kyselin jeví klesající trend (často exponenciální), stejně tak obsah lutanarinu (spíše lineární pokles)

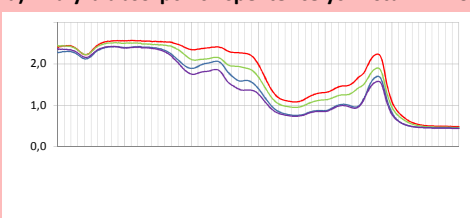
➤ pokles obsahu lutanarinu může být důsledkem menší potřeby látek s antioxidantní aktivitou v podmínkách, kdy není rostlina vystavena stresovému FAR (není vyloučeno, že i deriváty kyseliny ferulové mají antioxidantní vlastnosti, jejich úbytek však může souviset i s jejich zabudováním do buněčných stěn v průběhu růstu listu)

Úvod

Fenolické látky (FL) zastávají v rostlinách řadu funkcí, mimo jiné hrají důležitou úlohu i ve fotoprotektivních mechanismech (UV-stínění, antioxidantní aktivita). Indukce těchto sekundárních metabolitů vlivem různých biotických a abiotických stresů je poměrně dobře popsána, avšak méně často je sledován další osud těchto látek v rostlinách po odstranění stresového faktoru. Tato práce se zabývá jak indukcí FL vyvolanou pouze vysokou úrovní fotosynteticky aktivní radiace (FAR) v nepřítomnosti UV-radiace (UV-R), tak následnou odezvou po výrazné redukci kultivační ozáření.

Výsledky

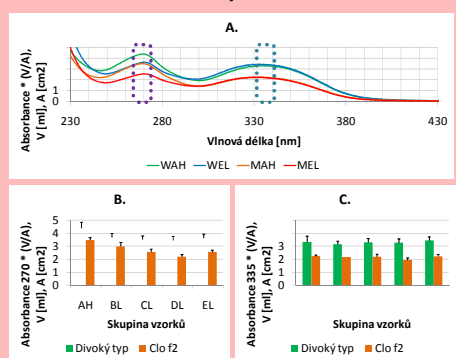
a) Analýza absorpčních spekter celých listů in-vivo



Obr.1.: Absorpční spektrum středních segmentů listů ječmene jarního (divokého typu a mutantu Clo f2, značení viz. Tab. 1)

➤ v průběhu aklimace na nízkou ozáření nebyly pozorovány statisticky významné změny absorpce v UV oblasti, ovšem byl zaznamenán její pokles ve VIS oblasti spektra, jenž souvisí s snížením obsahu fotosyntetických pigmentů. Toto snížení je zřejmě důsledkem senescence primárních listů viz. Tab.2.

b) Analýza absorpčních spekter extraktů volných fenolických látek



Obr.2.: A. Absorpční spektra metanolových extraktů (40% metanol) primárních listů ječmene jarního a jeho mutantu Clo f2 (značení skupin viz. Tab.1.). Průměrná absorpce extraktů při 270 nm (B.) a 335 nm (C.) vynásobená faktorem zohledňujícím různý objem extrakčního činidla a různou plochu listů, n = 6 + SD

Charakteristika změn absorpce extraktů volných fenolických látek v průběhu aklimace rostlin na nízkou ozáření:

- Jak u divokého typu tak u mutantu ječmene nedochází k významným změnám absorpce při 335 nm
- U divokého typu i mutantu dochází k poklesu absorpce při 270 nm
- U divokého typu a mutantu lze pozorovat odlišnou dynamiku poklesu absorpce při 270 nm, u divokého typu pozorujeme rychlejší pokles, avšak ustálení na vyšší hodnotě A_{270nm}

➤ na základě tvaru spekter lze soudit, že hlavními složkami extraktů jsou flavonoidy, resp. saponarin (max. absorpce 270 nm, 335 nm), což je v souladu s Liu et al. (1995), Kolb et al. (2005), viz. Obr. 2.: A.

➤ poměr absorpcí saponarinu v jeho dvou absorpčních maximech (270, 335 nm) je přibližně roven 1 - z Obr. 2.: B., C. je tedy zřejmé, že spektrální změny sledované v průběhu aklimace ječmene na nízkou ozáření nemohou být způsobeny změnou obsahu saponarinu

Tab.2.: Srovnání průměrné absorpce jednotlivých skupin rostlin při zvolených vlnových délkách + vybrané výsledky statistických testů - jednosměrná ANOVA s Tukeyho post-testem

Vlnová délka na níž byla měřena absorpce	Srovnání průměrných hodnot absorpce vybraných skupin vzorků *			
	WAH X WEL		MAH X MEL	
A 270 nm	0,0412	↓ ns	0,0123	↑ ns
A 335 nm	0,0745	↓ ns	0,0190	↓ ns
A 430 nm	0,2571	↓ ***	0,1960	↓ ***
A 475 nm	0,3410	↓ ***	0,2320	↓ ***
A 673 nm	0,3408	↓ ***	0,1148	↓ **

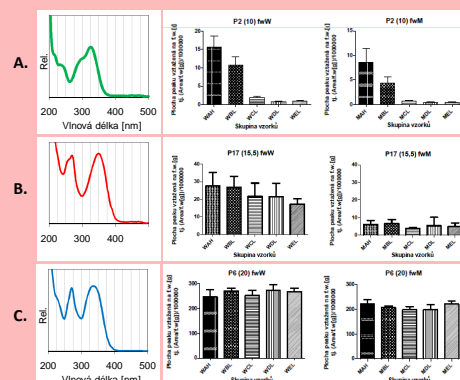
*: rozdíl průměrů / nárůst (↑), pokles (↓) / signifikantní * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; ns nesignifikantní

➤ v UV oblasti je patrná mírně nižší absorpce u mutantu Clo f2 ve srovnání s divokým typem

c) HPLC analýza extraktů volných fenolických látek

➤ bylo detekováno více než 19 UV-absorbujících látek. Většinu z nich lze na základě jejich spektrálních vlastností zařadit mezi fenolické kyseliny, flavonoidy a deriváty obou těchto skupin

➤ byla provedena semikvantitativní analýza změn obsahu těchto látek v průběhu aklimace na LI



Obr.3.: Odlišná odezva vybraných fenolických látek na přechod z vysoké na nízkou ozáření, v levé části zobrazena spektra těchto látek, v pravé části relativní změna obsahu v průběhu aklimace (v závorce uvedena průměrná hodnota retenčního času), n = 6 + SD:

A. - derivát kyseliny ferulové, B. - lutanarin, C. - saponarin

Charakteristika změn absorpce extraktů volných fenolických látek v průběhu aklimace rostlin na nízkou ozáření:

- Obsah fenolických kyselin (rt 9-12 min.) v průběhu aklimace na LI klesá (v případě hlavních dvou složek exponenciálně). Na základě spektra a ret. času, lze usuzovat, že hlavními složkami této skupiny jsou **deriváty kyseliny ferulové** (případně samotná kyselina ferulová)
- Obsah látky rt = 15,5 min. (s největší pravděpodobností **lutanarinu**), je výrazně vyšší u divokého typu a v průběhu aklimace na LI u něj lze pozorovat klesající trend (u mutantu se jeho stav významně nemění)
- Majoritně zastoupený flavonoid - **saponarin** (rt = 21 min.) je zastoupen ve vysokém množství jak u divokého typu tak u mutantu a jeho obsah se v průběhu aklimace nemění

Literatura

- Bilger, W., Johnsen, T., Schreiber, U., 2001, J. Exp. Bot. 52: 2007-2014
- LIU, L., GITZ III, D.C., MCCLURE, J.W. Effects of UV-B on flavonoids, ferulic acid, growth and photosynthesis in barley primary leaves. *Physiologia Plantarum*. 1995, 93, no. -, p. 725-733.
- KOLB, C.A., PFÜNDEL, E.E. Origins of non-linear and dissimilar relationship between epidermal UV absorbance and UV absorbance of extracted phenolics in leaves of grapevine and barley. *Plant, Cell and Environment*. 2005, 25, no. -, p. 580-590.
- Nezval, J., Detekce a kvantifikace UV-absorbujících látek a fotosyntetických pigmentů u vyšších rostlin, 2009

Tab.1.: Značení skupin vzorků, rozdělení - divoký typ/mutant Clo f2 (W/M), den měření (A-E), ozáření 1000 μmol m⁻² s⁻¹ / 50 μmol m⁻² s⁻¹ (HI/LI)

WAH - divoký typ ječmene, 8 dní HI	MAH - mutant Clo f2, 8 dní HI
WBL - divoký typ ječmene, 8 dní HI, 1 den LI	MBL - mutant Clo f2, 8 dní HI, 1 den LI
WCL - divoký typ ječmene, 8 dní HI, 3 dny LI	MBL - mutant Clo f2, 8 dní HI, 3 dny LI
WDL - divoký typ ječmene, 8 dní HI, 6 dní LI	MDL - mutant Clo f2, 8 dní HI, 6 dní LI
WEL - divoký typ ječmene, 8 dní HI, 9 dní LI	MEL - mutant Clo f2, 8 dní HI, 9 dní LI