

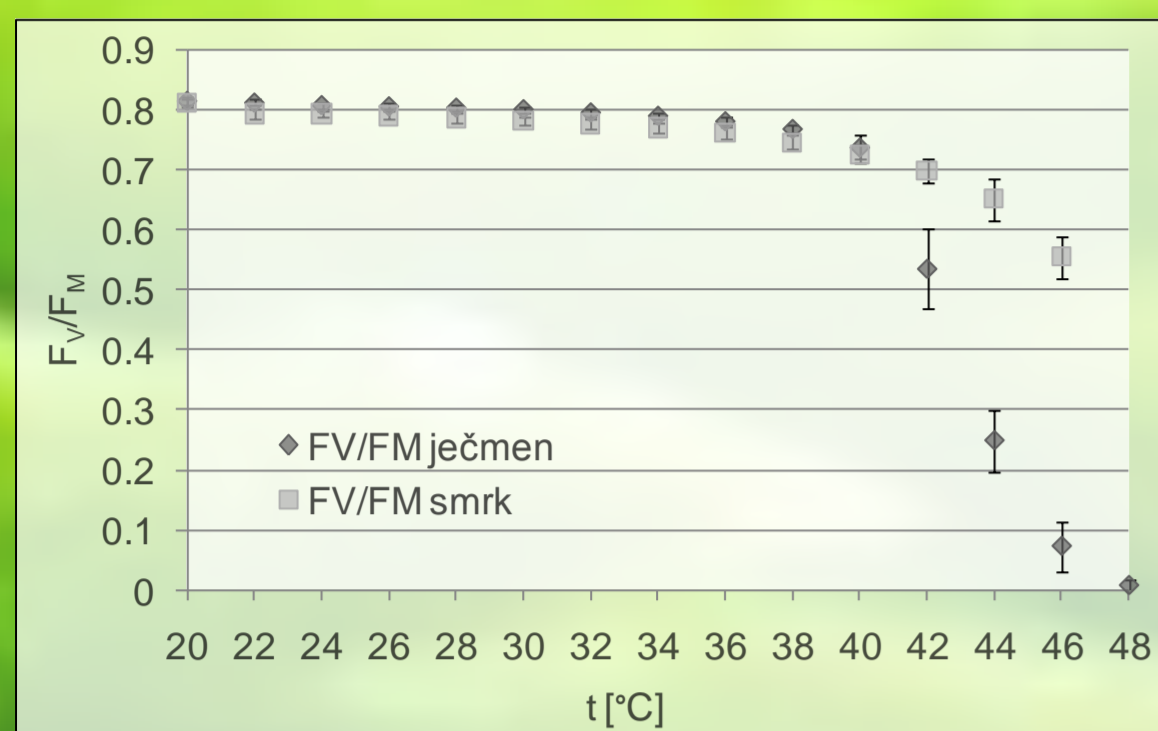
VLIV TEPLoty NA DYNAMIKU VYUŽITÍ FOTOSYNTETICKY AKTIVNÍ RADIACE VE FOTOSYSTÉMU II

Z. NOSEK, V. ŠPUNDA, E. ŠILHAVÍKOVÁ

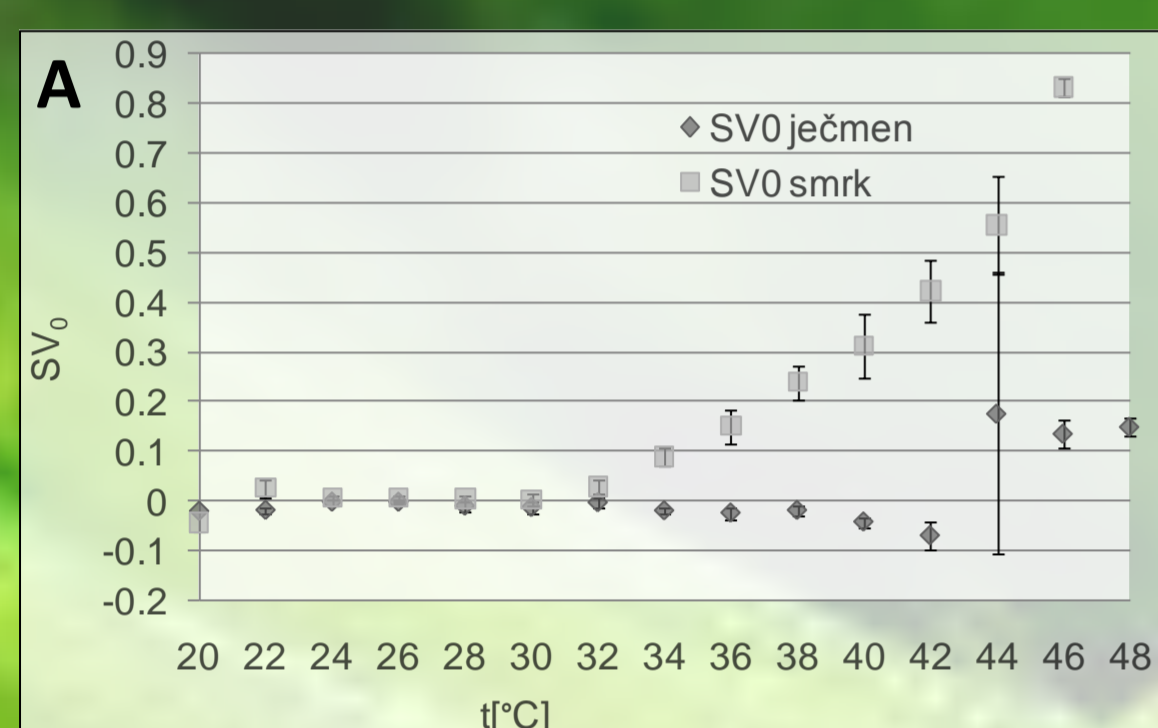
Katedra fyziky, Přírodovědecká fakulta, Ostravská univerzita v Ostravě, 30. dubna 22, 701 03 Ostrava, ČR; e-mail: r09448@student.osu.cz

Úvod

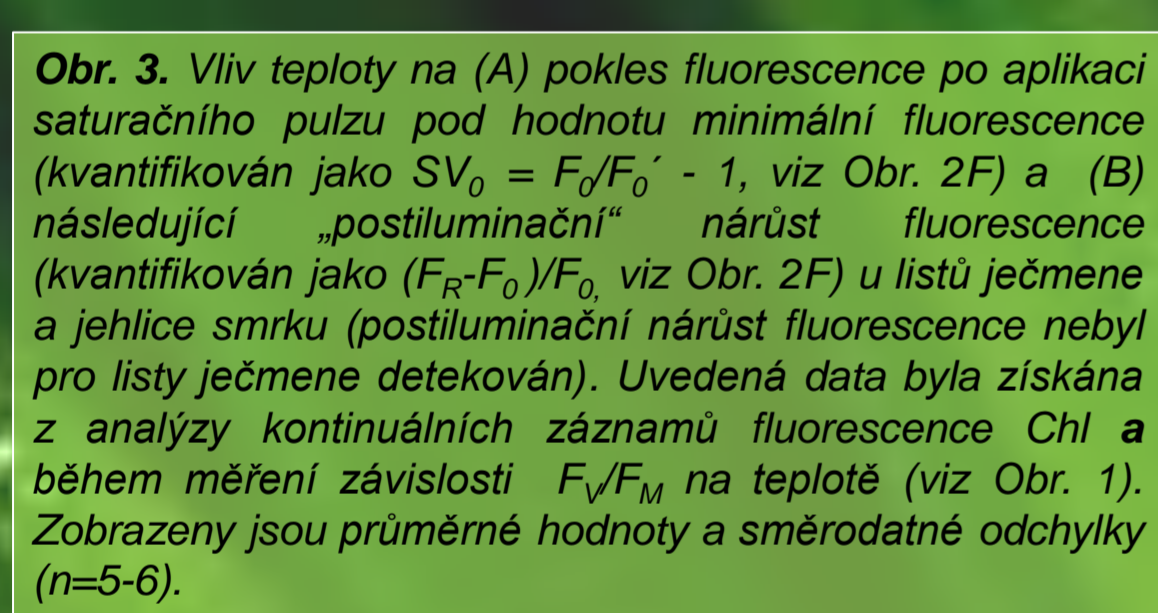
Problematika odolnosti fotosyntetického aparátu vůči vysokoteplotnímu stresu je aktuálním tématem současné ekologické fyziologie rostlin. Nejrychlejší metodou stanovení termostability funkčního stavu asimilačního aparátu je měření závislosti parametrů fluorescence Chl *a* na listech rostlin vystavených lineárnímu režimu ohřevu. V předkládaném příspěvku jsme se zaměřili na analýzu kontinuálního záznamu fluorescence Chl *a* během měření závislosti kvantového výtěžku fotochemie PS II na teplotě. Naším cílem bylo zjistit, zda lze tato měření využít nejen k rychlému stanovení termostability funkčního stavu fotosyntetického aparátu, ale rovněž k vysvětlení rozdílné míry inaktivace PS II při vyšších teplotách u různých druhů rostlin. Výše uvedená měření byla provedena na listech ječmene a jehlicích smrku ztepilého aklimovaných na nízkou úroveň fotosynteticky aktivní radiace a optimální teploty.



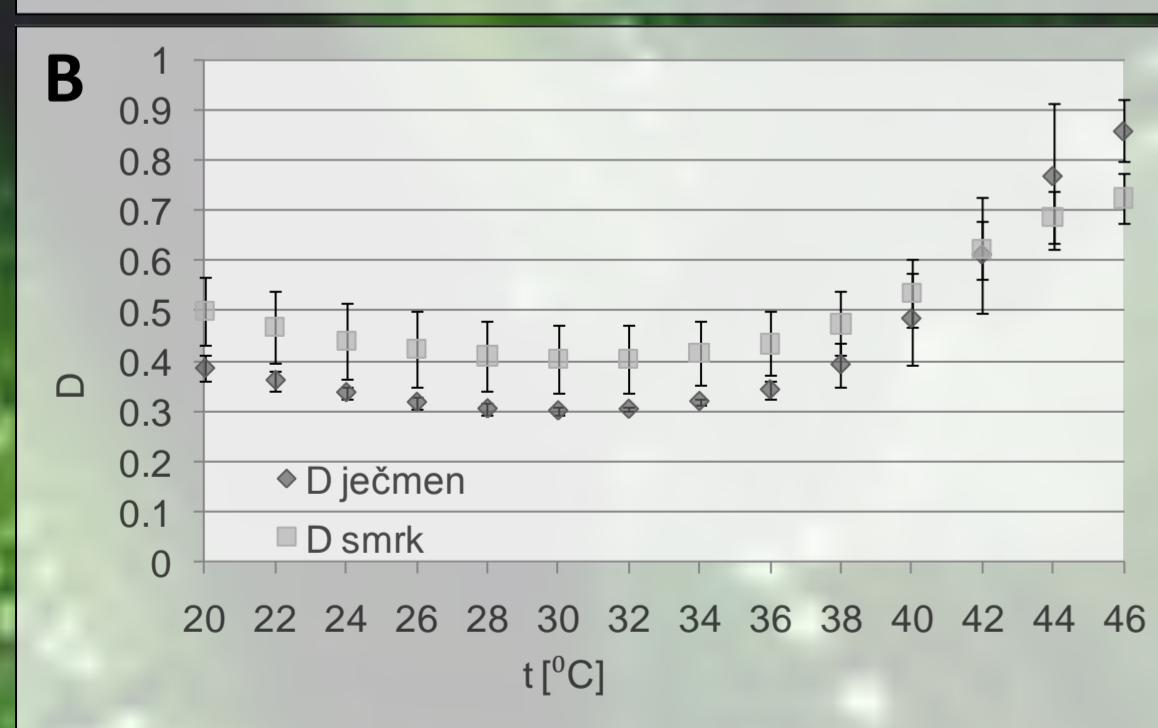
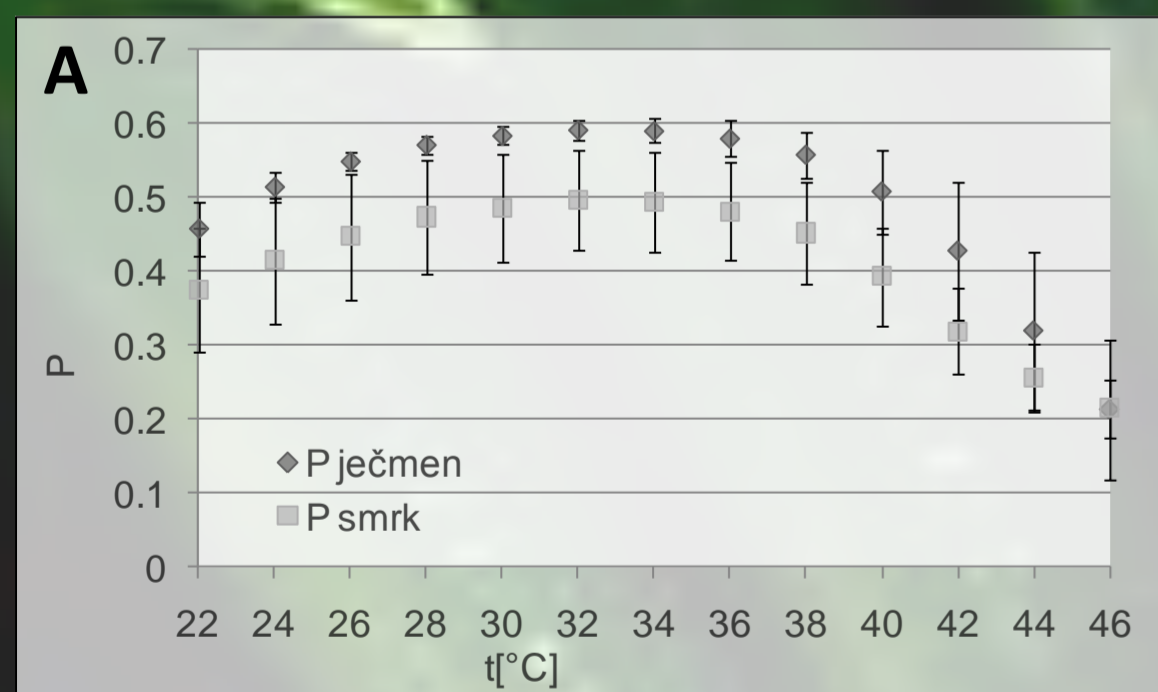
Obr. 1: Závislost maximální fotochemické účinnosti PSII (F_v/F_m) na teplotě pro jehlice smrku ztepilého a listy ječmene jarního adaptované na tmou. Rostliny byly aklimovány po dobu cca 10 dnů na nízkou úroveň fotosynteticky aktivní radiace a optimální teploty. Zobrazeny jsou průměrné hodnoty a směrodatné odchylky ($n=5-6$).



Obr. 2: Kontinuální záznam fluorescence Chl *a* získaný během měření závislosti F_v/F_m na teplotě (viz Obr. 1) pro listy ječmene jarního (A) a jehlice smrku ztepilého (D) adaptované na tmou. Vzorky byly během měření vystaveny analytickému měřicímu světlu a ohřívány rychlostí cca 1°C/min. Saturací pulz byl aplikován vždy po ohřevu listu o 2°C. Detail odezvy fluorescence Chl *a* na saturací pulz při teplotách 20 (B,E) a 40 (C,F) °C pro listy ječmene (B,C) a jehlice smrku (E, F). Šípky na Obr. 2F znázorňují hodnoty fluorescence před aplikací saturací pulzu (F_0), pokles intenzity fluorescence na hodnotu F_0' (v čase několika s po aplikaci saturací pulzu) a následný „postiluminační“ nárůst fluorescence na hodnotu F_R (v čase několika desítek s).



Obr. 3: Vliv teploty na (A) pokles fluorescence po aplikaci saturací pulzu pod hodnotu minimální fluorescence (kvantifikován jako $SV_0 = F_v/F_0' - 1$, viz Obr. 2F) a (B) následující „postiluminační“ nárůst fluorescence (kvantifikován jako $(F_R - F_0)/F_0$, viz Obr. 2F) u listů ječmene a jehlice smrku (postiluminační nárůst fluorescence nebyl pro listy ječmene detekován). Uvedená data byla získána z analýzy kontinuálních záznamů fluorescence Chl *a* během měření závislosti F_v/F_m na teplotě (viz Obr. 1). Zobrazeny jsou průměrné hodnoty a směrodatné odchylky ($n=5-6$).



Obr. 4: Závislost účinnosti využití absorbovaného světla ve fotochemických reakcích PS II (P) a tepelné disipaci (D) na teplotě pro jehlice smrku ztepilého a listy ječmene jarního vystavené aktinické ozáření 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Rostliny byly aklimovány po dobu cca 10 dnů na nízkou úroveň fotosynteticky aktivní radiace a optimální teploty. Zobrazeny jsou průměrné hodnoty a směrodatné odchylky ($n=5-6$).

Materiál a metody

Měření probíhalo na jehlicích čtyřletých sazenic smrku ztepilého, které byly kultivovány v růstové komoře HB 1014 (BioLine, Heraeus, Německo). Maximální teplota v režimu aklimace byla 25°C a maximální intenzita FAR byla 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Dále byly použity osm dní staré rostliny ječmene jarního, pěstované při teplotě 20°C, maximální intenzitě FAR 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a relativní vlhkosti vzduchu 65%. Pro každé měření vzorku smrku bylo odebráno 7–8 jehlic z předem stanovených větviček. Pro měření na ječmeni se odebrali střední segment primárního listu. K měření teplotní závislosti fluorescence Chl *a* byl použit fluorimetr PAM 101–103 (Heinz – Walz, Německo). Termostátování měřící komůrky (Hansatech) bylo zajištěno termostatem (Julabo MC-4, Německo). Měření teplotní závislosti bylo realizováno v režimu lineárního ohřevu přibližně 1°C/min v rozmezí 20°C až 46°C (u ječmene až 48°C), jak na vzorcích adaptovaných na tmou, tak na vzorcích adaptovaných na mírné aktinické světlo (100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Během ohřevu listů byly vždy po 2 minutách aplikovány saturací pulsy ($t=0,8$ s, $I = \text{cca } 3000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) pro stanovení hodnot maximální fluorescence (F_m , respektive $F_{m'}$), těsně před aplikací saturací pulsu byly odečteny hodnoty minimální fluorescence F_0 , respektive fluorescence v ustáleném stavu F_T . Po odeznění saturací pulsu byla u vzorků adaptovaných na světlo vypnuta na 5s aktinická ozáření a během této doby byla stanovena minimální hodnota fluorescence F_0' . Na vzorcích adaptovaných na tmou jsme stanovovali maximální fotochemickou účinnost PS II [$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$]. U vzorků adaptovaných na světlo byla vyhodnocována účinnost nezářivé disipace excitace energie v PSII [$D = 1 - (F_m - F_0)/F_m$]. Dále byly z měření teplotní závislosti uvedených parametrů získány kontinuální záznamy intenzity fluorescence Chl *a* (v časových intervalech cca 10ms), na základě kterých byla provedena analýza odezvy fluorescence po saturací pulsu, popřípadě po vypnutí a zapnutí aktinické ozáření.

Použitá literatura:

1, Kurasová I, Kalina J, Urban O, Štroch M, Špunda V: *Photosynthetica* 41: 513–523, 2003. 2, Štroch M, Kuldová K, Kalina J, Špunda V: *J Plant Physiol* 165: 612–622, 2008. 3, Wang P, Duan W, Takabayashi A, Endo T, Shikanai T, Ye JY, Mi HL: *Plant Physiology*, 141(2):465–474, 2006. 4, Zhang R, Sharkey TD: *Photosynthesis Research* 100: 29–43, 2009.

Závěr

Naše měření ukázala, že ve stavu adaptovaném na tmou je termostabilita funkce fotosystému II výrazně nižší u listů ječmene ve srovnání s jehlicemi smrku, což se projevuje dramatickým poklesem potenciální fotochemické účinnosti PS II při teplotách nad 40°C a úplnou inaktivací PS II při teplotách 46–48°C. Z analýzy odezvy fluorescence na saturací pulz, respektive na krátkodobé vypnutí aktinické ozáření, jsme zjistili, že pouze u smrku dochází při teplotách nad 30°C k výraznému zrychlení indukce a relaxace nezářivé disipace absorbované excitace energie. Dále byl u jehlic smrku ztepilého adaptovaných na tmou pozorován po saturací pulsu při teplotách nad 30°C postiluminační nárůst fluorescence svědčící o aktivaci cyklického transportu elektronů přes fotosystém I. Předpokládáme tedy, že v thylakoidních membránách smrku ztepilého dochází s rostoucí teplotou k velmi rychlé indukci ochranných mechanismů, což souvisí s vyšší termostabilitou funkce PS II ve srovnání s ječmenem.

Výsledek a diskuze

1) Termostabilita PS II ječmene jarního a smrku ztepilého ve stavu adaptovaném na tmou

- U smrku je maximální fotochemická účinnost PS II vzorků adaptovaných na tmou poměrně stálá, u ječmene při 42°C dochází k strmému pádu.
- U smrku je překvapivě ještě při teplotě 46°C maximální fotochemická účinnost nad hodnotou 0,5, u ječmene dochází při této teplotě k téměř úplné inaktivaci PS II.

Myšlenka

Lze z podrobnější analýzy kontinuálních záznamů fluorescence Chl *a* získaných během měření závislosti F_v/F_m na teplotě získat dodatečné informace o vlivu teploty na funkční stav thylakoidních membrán?

Výsledek

- **Ječmen:** až do teploty 40°C je po saturací pulsu pozorována odezva fluorescence Chl *a* typická pro vzorky adaptované na tmou; dominantní rychlá fáze poklesu fluorescence (cca 1s) s následující pomalejší fází (cca desítky s), během které se intenzita fluorescence ustálí přibližně na původní hodnotě F_0 (postupná reoxidace akceptorů PS II) (Obr. 2A, B, C)
- **Smrk (rozdíl 1):** při teplotách nad 32°C docházelo po odeznění k rychlému snížení fluorescence pod hodnotu F_0 (označena F_0' , Obr. 2D, F).
- **Pravděpodobná příčina: velmi rychlá indukce (aktivace) procesů které vedou ke zvýšení nezářivé disipace absorbované excitace energie (NRD) ve světlosběrných komplexech PS II (LHC II) související se zrychlením tvorby gradientu pH v důsledku zvýšené fluidity thylakoidní membrány.**
- **Smrk (rozdíl 2):** při dalším zvyšování teploty (cca nad 36°C) docházelo po prudkém poklesu fluorescence na hodnotu F_0' k jejímu nárůstu nad hodnotu F_0 (označeno F_R , Obr. 2D, F).
- **Pravděpodobná příčina: tzv. „post iluminační nárůst fluorescence“ v důsledku redukce PQ poolu NADPH či dalšími stromálními reduktanty indukující cyklický transport elektronů přes PS I (CTE, Wang et al. 2006).**

Co se ví:

- Jak NRD tak CTE patří mezi základní ochranné (regulační) mechanismy, které jsou indukovány v případě, že produkce NADPH a ATP ve světelných reakcích fotosyntézy převyšuje jejich spotřebu (v enzymatických reakcích CC a fotorespirace).
- Nicméně podle doposud publikovaných prací je výrazná indukce NRD i CET spojována s podstatně delším působením aktinické ozáření než odpovídá době trvání saturací pulzu (0,8).

Co nového plyne z analýzy odezvy fluorescence na saturací pulz:

- Analýza závislosti SV_0 na teplotě (Obr.3A) ukazuje, že pouze u jehlic smrku ztepilého při teplotách nad 32°C indukuje saturací pulz rostoucí úroveň NRD a při 42°C jsou hodnoty SV_0 srovnatelné s hodnotami SV_0 indukovanými kontinuální saturací ozáření (Kurasová et al. 2003, Štroch et al. 2008).
- Analýza závislosti $(F_R - F_0)/F_0$ na teplotě (Obr. 3B) ukazuje, že pouze u jehlic smrku ztepilého dochází s rostoucí teplotou nad 34°C k postupné aktivaci CTE po saturací pulsu.

2) Závislosti účinnosti využití absorbovaného světla ve fotochemických reakcích PS II (P) a tepelné disipaci (D) na teplotě

Charakteristika rozdílů teplotní závislosti P a D mezi ječmenem a smrkem

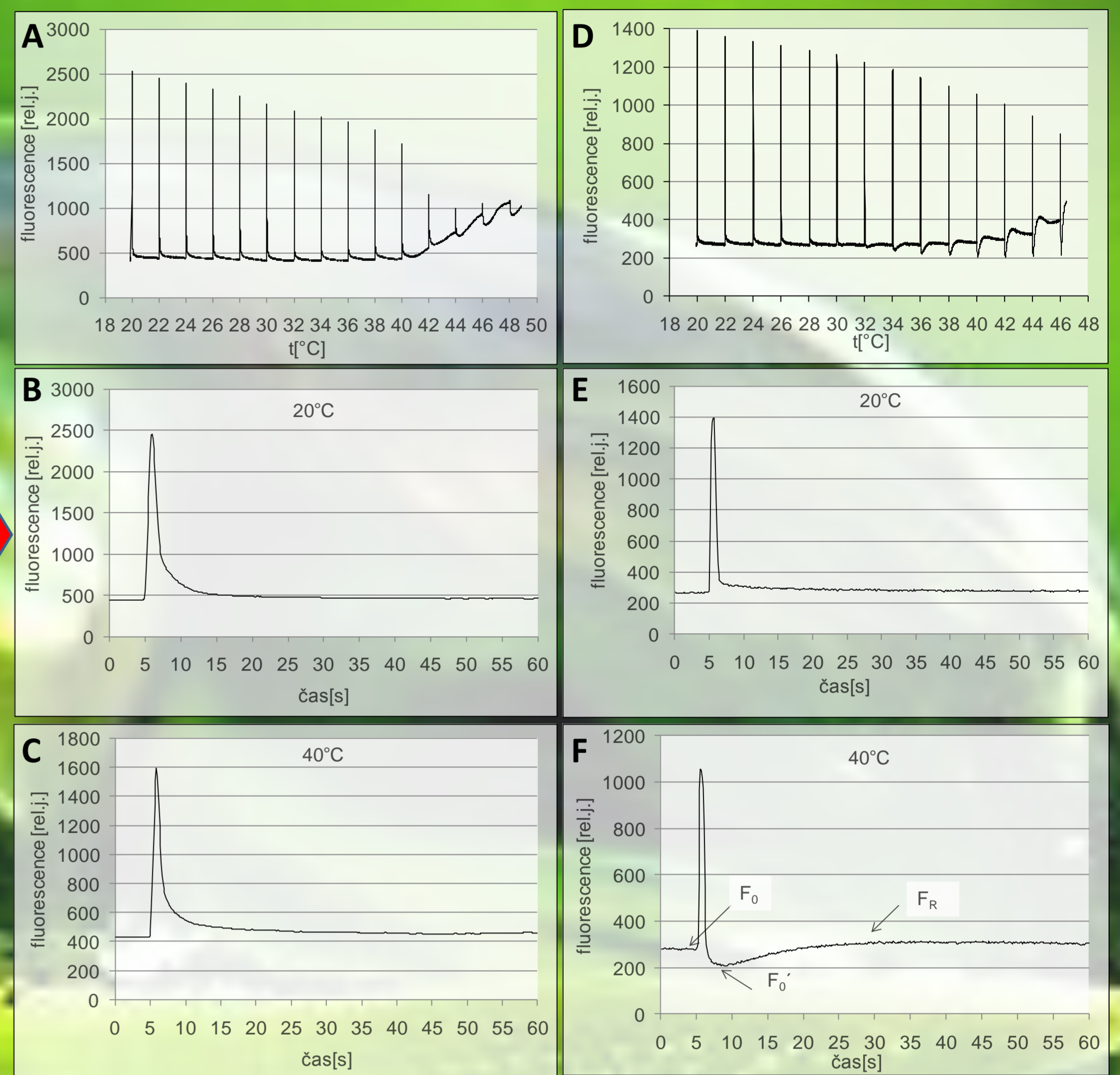
- Při teplotách do 36°C je P vyšší u listů ječmene (nároky na D jsou adekvátně menší) než u jehlic smrku => listy ječmene mají při nižších teplotách a mírné ozáření větší fotosyntetickou aktivitu.
- Při teplotách nad 36°C roste D u ječmene rychleji než u smrku => u ječmene dochází s rostoucí teplotou k výraznějšímu poklesu účinnosti využití absorbované radiace ve fotochemických reakcích PS II
- Nicméně u listů ječmene vystavených mírné ozáření je PS II aktivní i při teplotě 46°C (na rozdíl od listů adaptovaných na tmou, Obr. 1) => u ječmene zvyšuje mírná ozáření odolnost PS II vůči vysokoteplotnímu stresu.

Myšlenka

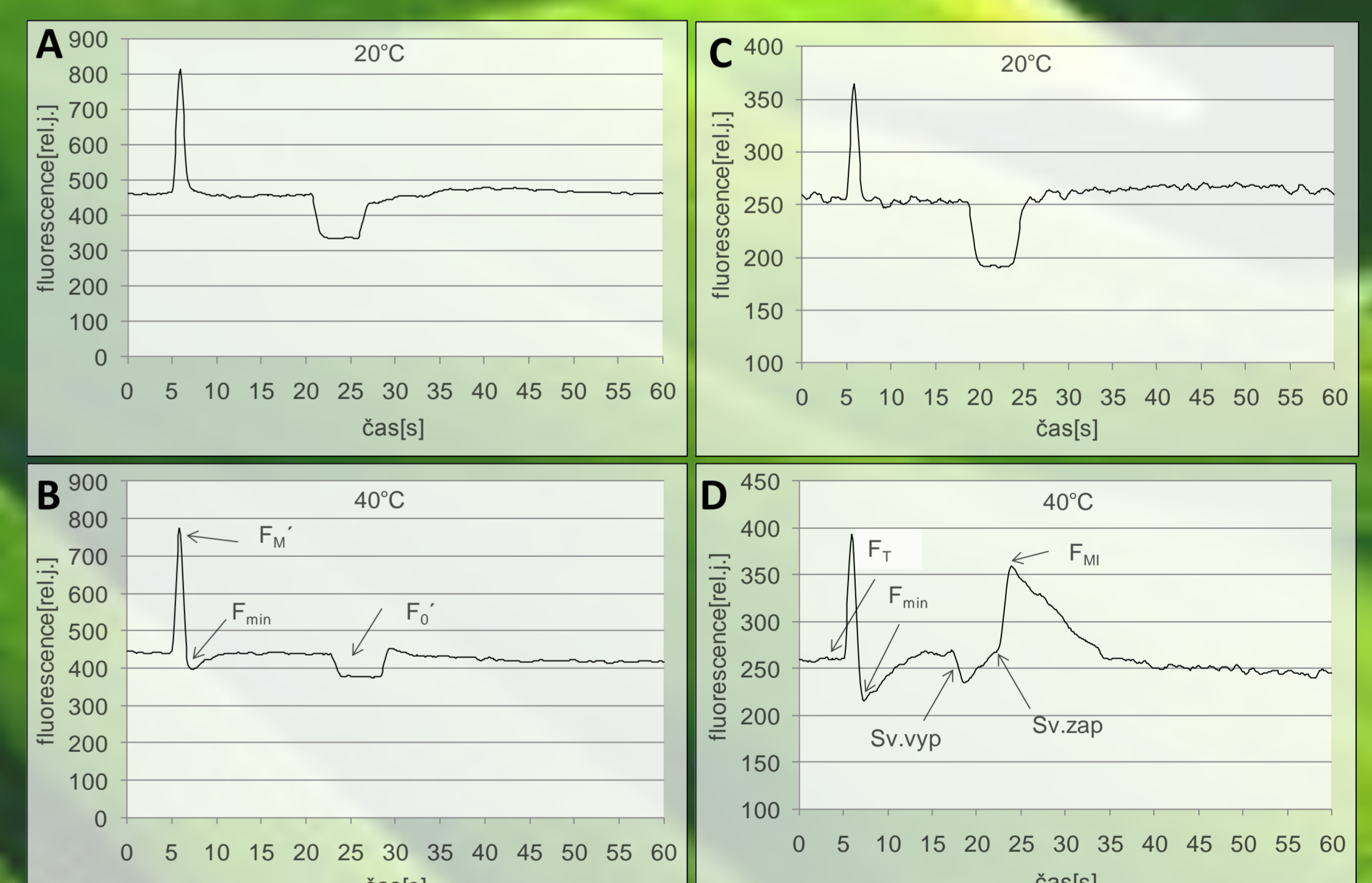
Potvrdí analýza kontinuálního záznamu fluorescence Chl *a* během měření teplotní závislosti P a D hypotézu, že u smrku dochází při vyšších teplotách k výraznému zrychlení odezvy thylakoidních membrán na krátkodobé změny ozáření

Výsledek

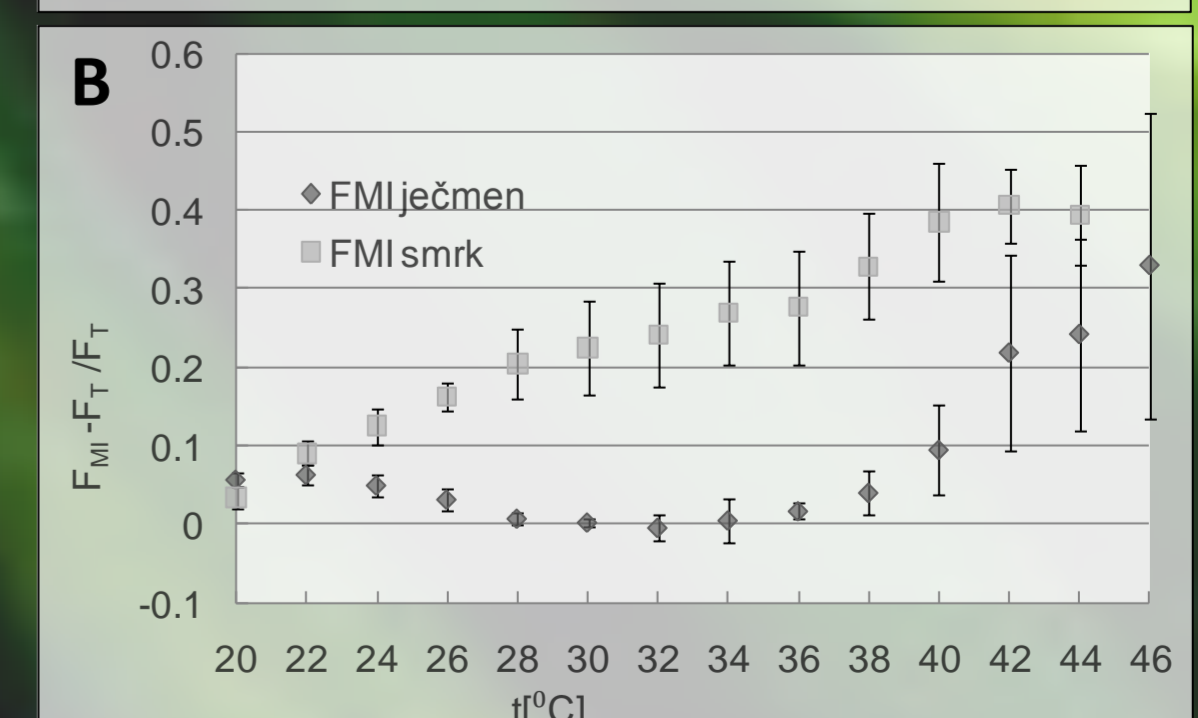
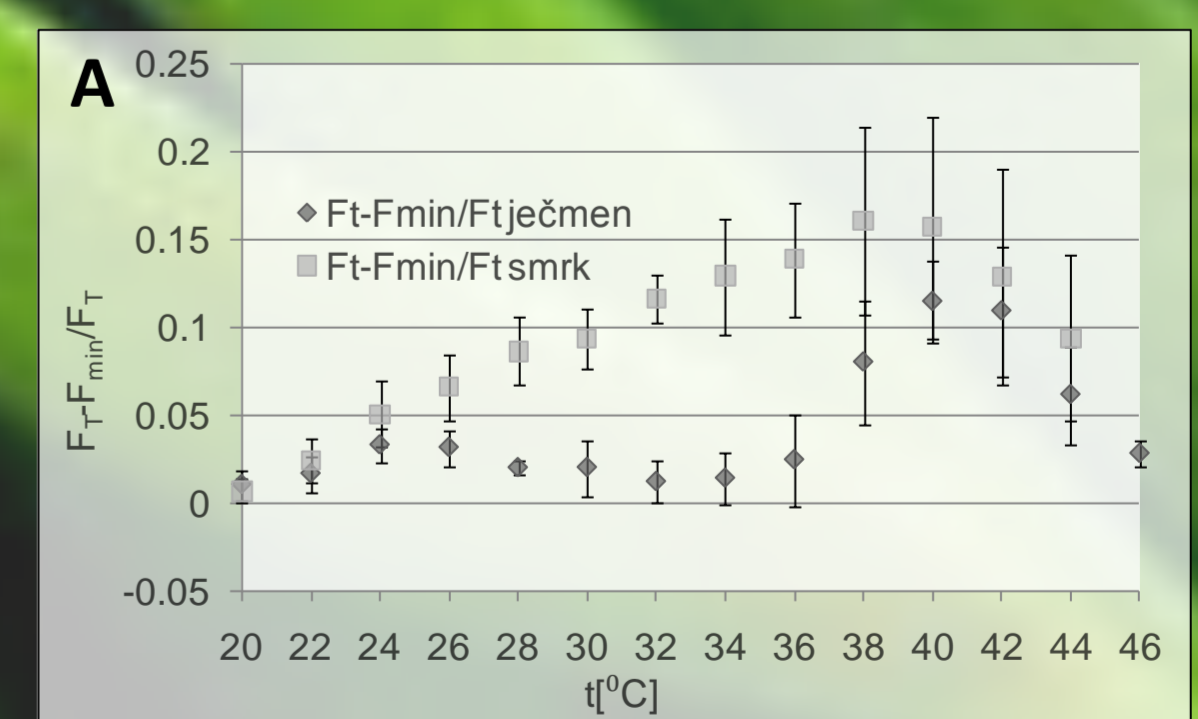
- **ad1, Odezva na krátkodobé zvýšení intenzity aktinické ozáření (aplikace 0,8 s saturací pulsu):** Pouze u smrku ztepilého byl při vyšších teplotách (nad 32°C) pozorován pokles fluorescence pod hodnotu fluorescence v ustáleném stavu (F_T) na hodnotu F_{min} (Obr. 5, kvantifikováno jako $(F_T - F_{min})/F_T$; Obr. 6A)
- **Interpretace ad1:** Podobně jako u jehlic smrku ztepilého rostlin adaptovaných na tmou (Obr. 2 a Obr. 3A) došlo při vyšších teplotách u jehlic vystavených mírné ozáření k zvýšení NRD již po aplikaci saturací pulsu (obvykle aplikace saturací pulsu NRD nezmění).
- **ad2, Odezva na krátkodobé přerušení aktinické ozáření (pro stanovení hodnoty fluorescence F_0' byla aktinická ozáření vypnuta po dobu 5s):** Zatímco u listů ječmene nedošlo po následném zapnutí aktinického světla k průkazné indukci fluorescence (F_{M1}), která by svědčila o rychlé relaxaci NRD, u jehlic smrku ztepilého jsme s rostoucí teplotou pozorovali postupné zvyšování F_{M1} (Obr. 5, kvantifikováno jako $(F_{M1} - F_T)/F_T$; Obr. 6B).
- **Interpretace ad2, Hlavním procesem určujícím dynamiku relaxace NRD po vypnutí mírného aktinického světla je disipace $\Delta p H$, která může být u jehlic smrku při vyšších teplotách urychlena v důsledku zvýšené fluidity thylakoidní membrány a s ní související zvýšené propustnosti pro protony (Zhang R, et al. 2009.)**



Obr. 5: Detail odezvy fluorescence Chl *a* na saturací pulz, vypnutí aktinické ozáření na dobu 5 s a následné zapnutí aktinické ozáření pro listy ječmene (A,B) a smrku ztepilého (C, D) při různých teplotách: 20 (A,C) a 40 (B,D) °C. Šípky na Obr. 5B,D znázorňují fluorescence v ustáleném stavu (F_T), maximální fluorescence během aplikace saturací pulsu (F_M), pokles intenzity fluorescence na hodnotu F_{min} po aplikaci saturací pulsu, pokles intenzity fluorescence na hodnotu F_0' po vypnutí aktinického světla na dobu 5s a relaxaci zhašení fluorescence na hodnotu F_{M1} po opětovném zapnutí aktinického světla.



Obr. 6: Vliv teploty na (A) pokles fluorescence po aplikaci saturací pulsu pod hodnotu v ustáleném stavu [kvantifikován jako $(F_T - F_{min})/F_T$, viz Obr. 5C,F] a (B) relaxaci zhašení fluorescence po 5 s přerušení aktinické ozáření [kvantifikována jako $(F_{M1} - F_T)/F_T$, viz Obr. 5C,F] u listů ječmene a jehlice smrku. Uvedená data byla získána z analýzy kontinuálních záznamů fluorescence Chl *a* během měření závislosti P a D na teplotě (viz Obr. 4). (viz Obr. 1). Zobrazeny jsou průměrné hodnoty a směrodatné odchylky ($n=5-6$).



Obr. 6: Vliv teploty na (A) pokles fluorescence po aplikaci saturací pulsu pod hodnotu v ustáleném stavu [kvantifikován jako $(F_T - F_{min})/F_T$, viz Obr. 5C,F] a (B) relaxaci zhašení fluorescence po 5 s přerušení aktinické ozáření [kvantifikována jako $(F_{M1} - F_T)/F_T$, viz Obr. 5C,F] u listů ječmene a jehlice smrku. Uvedená data byla získána z analýzy kontinuálních záznamů fluorescence Chl *a* během měření závislosti P a D na teplotě (viz Obr. 4). (viz Obr. 1). Zobrazeny jsou průměrné hodnoty a směrodatné odchylky ($n=5-6$).

Poděkování: Práce byla podpořena grantem Ostravské univerzity v Ostravě (SGSG/PfF/2010).