

ZMĚNY OBSAHU VOLNÝCH FENOLICKÝCH LÁTEK V LISTECH JEČMENE JARNÍHO AKLIMOVANÉHO NA ROZDÍLNÉ UVB RADIČNÍ PODMÍNKY PŘI NÍZKÉ OZÁŘENOSTI FAR

Benešová Hana¹

¹Ostravská univerzita v Ostravě, Dvořáková 7, 701 03 Ostrava, r11164@student.osu.cz

Abstrakt

Fenolické látky (FL) jsou sekundární metabolity produkované všemi rostlinami. Jejich hlavní funkcí je ochrana před reaktivními formami kyslíku, které mimo jiné nadměrně vznikají v důsledku stresu rostlin vyvolaného UV radiací (UVR).

Cílem této práce bylo charakterizovat změny v obsahu FL v extraktech z listů ječmene jarního. Sledovali jsme indukci ochranných mechanismů při vystavení rostlin UVB radiaci (UVBR). Dále jsme charakterizovali změny v obsahu FL po odeznění stresového působení UVBR. To vše při nízké fotosynteticky aktivní radiaci (FAR). V metanolových extraktech z primárních listů bylo stanoveno celkové množství volných FL pomocí spektrofotometrické analýzy a zastoupení jednotlivých FL metodou HPLC.

Z výsledků vyplynulo, že UVBR by mohla stimulovat syntézu FL i při nízké ozáření FAR. Ve všech vzorcích byl dominantně zastoupen saponarin. Ostatní látky byly přítomny ve výrazně menším množství. Tomu odpovídal tvar absorpčních spekter extraktů volných FL. Malé množství celkově identifikovaných FL bylo v důsledku kultivace rostlin při nízké FAR.

Klíčová slova: Fenolické látky; ultrafialové záření B; HPLC; absorpční spektra; UV-stínění.

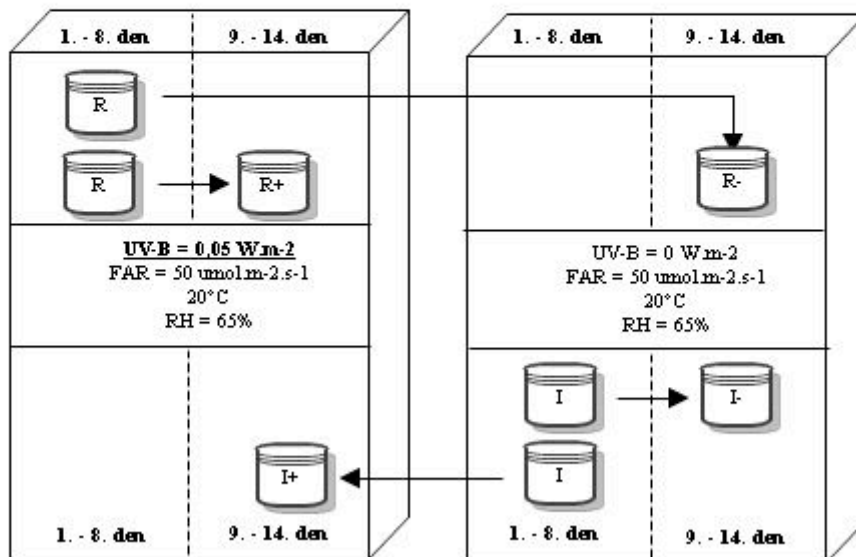
Úvod

UVR tvoří asi 5-9% z celkového slunečního záření dopadajícího na zemský povrch. Jedná se především o UVA a UVB radiaci. V tomto experimentu se věnujeme UVBR, která je schopna svou vysokou energií kvant rostlinnou buňku přímo poškodit. Rostliny reagují na ozáření syntézou FL, které rostlinu před UVBR chrání [1.]. Ochrana je uskutečňována dvěma mechanismy. Prvním je UV-stínění, které je založeno na schopnosti vybraných FL absorbovat v rozmezí vlnových délek oblasti UVR. Druhým mechanismem je antioxidační funkce [2.].

Materiál a metody

V tomto experimentu byly použity rostliny ječmene jarního (*Hordeum vulgare* L. cv. Bonus). Ječmen byl pěstován ve dvou skupinách. První skupina byla určena pro sledování změn obsahu volných FL v důsledku odeznění stresového působení UVBR. Tato skupina byla označena „R“ (relaxace). Druhou skupinu ječmene jsme pěstovali za účelem sledování indukce ochranných mechanismů při působení UVBR. Tato skupina byla označena „I“ (indukce). Ječmen byl kultivován v růstových komorách dle obrázku 1. při relativní vlhkosti 65%, teplotě 20°C a nízké FAR 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ v režimu 16 hod. světlo 8 hod. tma. Expozici UVBR byly rostliny vystavovány v 16-ti hodinových intervalech (shodně s FAR) o intenzitě záření 0,05 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$. Pro analýzy obsahu volných fenolických látek byly odebírány střední segmenty primárních listů u rostlin starých 8, 9, 11 a 14 dní (tzn. těsně před změnou úrovně UVBR a následně 1., 3. a 6. den po uvedené změně UVBR). Segmenty měly hmotnosti cca 100 mg. U všech listů byla stanovena jejich čerstvá hmotnost a plocha listů.

Byla zvolena extrakční technika z práce Nezvala [3]. Listy byly homogenizovány ve 40% metanolu. Homogenáty byly 5 min ultrasonifikovány a následně centrifugovány. V supernatantu jsme proměřili absorpční spektrum na spektrofotometru (UV 550, Unicam, Velká Británie) v rozmezí vlnových délek 200-750 nm. Zbytek supernatantu bylo použito pro analýzu na HPLC (TSP Analytical, USA). Chromatogramy byly zaznamenány při 314 nm.

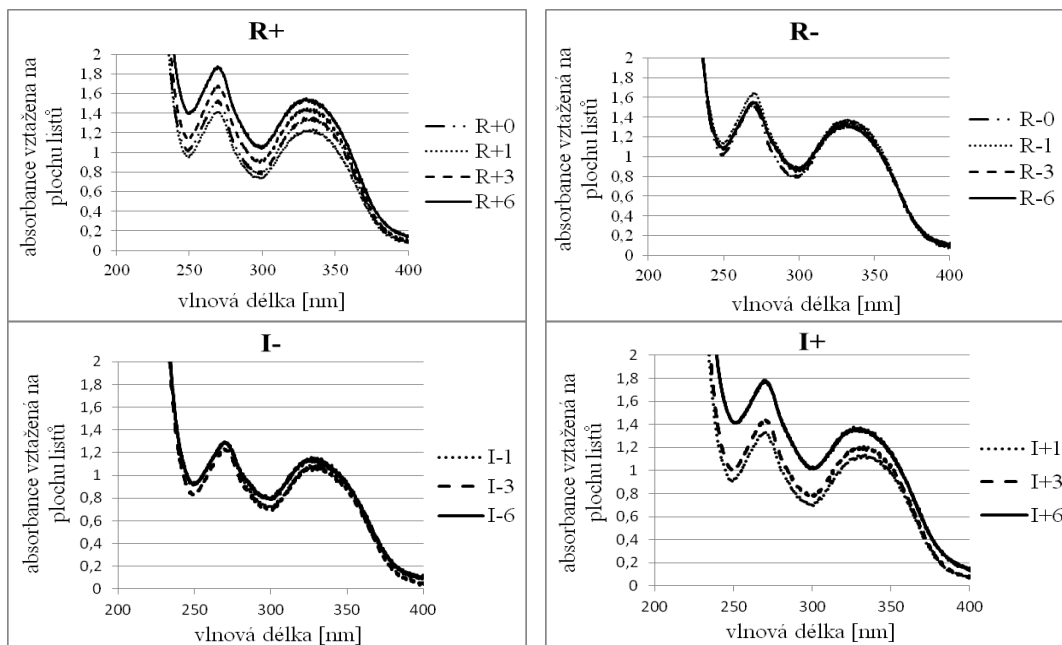


Obrázek 1. Průběh růstu ječmene jarního v růstových komorách. R+ je skupina ječmene, která byla po celou dobu růstu v komoře s UVBR. Skupina ječmene R- byla nejdříve 8 dní kultivována v komoře s UVBR a následně byla na 6 dní přemístěna do komory bez UVBR. Skupina ječmene I+ byla prvních 8 dní kultivována v komoře bez UVBR a následně byla na 6 dní přemístěna do komory s UVBR. Skupina ječmene I- byla po celou dobu růstu umístěna v komoře bez UVBR.

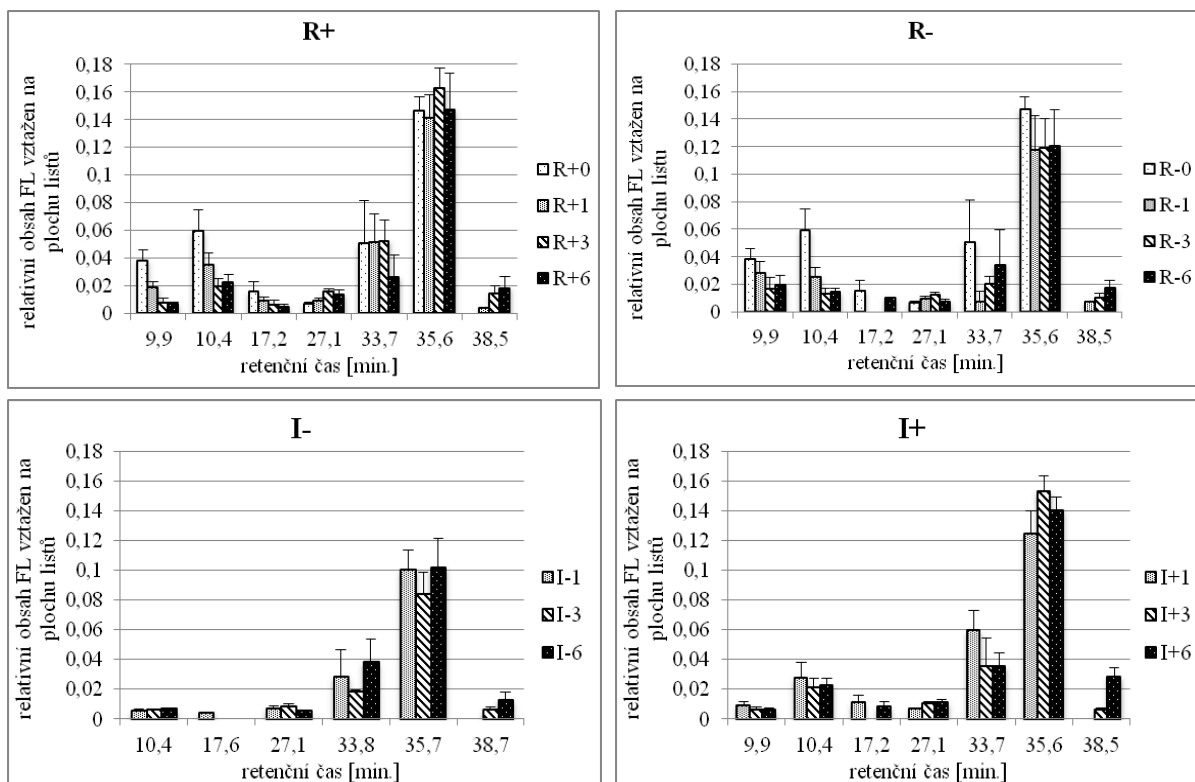
Výsledky a diskuse

Ve výsledcích spektrofotometrické analýzy extraktů FL byla zaznamenána absorpční spektra tvarem nejbližší saponarinu. Tvar spektra se mezi jednotlivými skupinami nelišil. Ječmen R+ zvyšoval obsah volných FL v listech v průběhu růstu. S výjimkou skupiny R+1, kde můžeme vidět pokles koncentrace FL oproti skupině R+0. Spektra měla docela výraznou směrodatnou odchylku, takže toto snížení nepovažuji za významné. Ve skupině R- zůstal obsah FL během růstu stejný jako při nultém dni. Je tedy zřejmé, že po odeznění stresu z UVBR nedošlo k průkaznému poklesu celkového obsahu volných FL. V ječmeni I- zůstala koncentrace FL v průběhu růstu rostliny stejná (průkazně nižší ve srovnání s ostatními skupinami), ale u ječmene I+ můžeme vidět, že UVBR indukovala syntézu volných FL v listech. (obrázek 2)

Při HPLC analýze bylo detekováno 8 výraznějších píků, kterým dominoval saponarin. Ostatní látky byly zastoupeny v mnohem menším množství. Koncentrace saponarinu se při porovnání mezi skupinami R+ a R- signifikantně nelišila, taktéž tomu bylo při srovnání skupin I+ a I- (data nejsou znázorněna). Dynamiku změn koncentrací ostatních detekovaných FL můžeme vidět na obrázku 3. Ve výsledcích spektrofotometrické analýzy jsme během růstu rostlin pozorovali u skupin R+ a I+ zvyšování koncentrace volných FL. Z výsledků HPLC, ale vidíme u většiny látek spíše pokles koncentrace. To by mohlo být zapříčiněno zvýšením koncentrace minoritně zastoupených FL – ve skupině R+0 bylo detekováno pouze 14 píků, ale ve skupině R+6 24 píků. Stejně tomu bylo ve skupině I+. Naopak ve skupinách I- a R- zůstal počet FL během růstu stejný.



Obrázek 2. Průměrný obsah fenolických látek v listech ječmene jarního pěstovaného v odlišných podmínkách UVB radiace (viz Obrázek 1.). 0, 1, 3, 6 v názvech skupin ječmene značí dny odběru vzorků po rozdělení do odlišných UVB radiačních podmínek. (n=6)



Obrázek 3. Shrnutí změn obsahu jednotlivých FL v průběhu růstu tzn. 0. 1. 3. a 6. den růstu po rozdělení rostlin do odlišných UVB radiačních podmínek. Změny jsou sledovány ve 4 skupinách lišících se kultivací v různých UVB radiačních podmínkách (viz Obrázek 1.). Jednotlivé FL jsou uvedeny retenčním časem, při kterém byly detekovány. (n=6, +SD)

Kolem 10 min se vyskytovaly látky, které jsou pravděpodobně dle výsledků [2.] derivátem fenolických kyselin (DFK). V průběhu růstu klesala jejich koncentrace, to bylo pravděpodobně zapříčiněno postupnou přeměnou DFK během zrání listu z volné formy na vázanou [4.], kterou jsme nebyli schopni extrahovat. Látka s nejvyšší koncentrací mimo saponarin byla detekována v retenčním čase 35,6 min. Dle absorpčního spektra by se mohlo jednat o derivát apigeninu [3.]. Látkou v 17 min. je pravděpodobně lutanarin [3.]. Můžeme vidět, že ve všech skupinách je tato látka zastoupena minimálně, což je dáno tím, že jeho syntéza je podmíněna vyšší intenzitou FAR a také se více akumuluje v mladších listech [5.]. Většina látek se vyskytovala ve vyšší koncentraci ve skupině R+ oproti R- během všech dní měření. Změny jednotlivých FL byly v průběhu dní mezi těmito skupinami podobné. Ve skupině I+ byla zřetelná indukce syntézy většího množství FL v porovnání se skupinou I-.

Závěr

Tvar spekter zaznamenaných absorpční spektrofotometrií odpovídal saponarinu a mezi jednotlivými skupinami se tvar spektra nelišil. To souhlasí s výsledky HPLC analýzy, kde ve všech vzorcích byl absolutně dominantní saponarin, ostatní FL byly zastoupeny minimálně. Celkově nízká koncentrace FL byla důsledkem kultivace rostlin při nízké FAR. Nicméně z výsledků obou analýz vyplývá, že rostliny jsou schopny syntetizovat FL v reakci na ozáření UVBR i při nízké úrovni FAR. Naproti tomu během 6-ti dní po odstranění UVBR nedošlo k průkaznému poklesu celkového obsahu FL. Akumulace FL má tedy zřejmě trvalejší charakter.

Poděkování

Práce vznikla s finanční podporou grantu SGS OU (SGS17/PřF/2012) a CZ.1.05/2.1.00/03.0100.

Literatura

- [1.] SOLOVCHENKO, A. Photoprotection in plants. *Screening*, 14, 9-31. 2010.
- [2.] TATTINI, M., GALARDI, C., PINELLI, P., MASSAI, R., REMORINI, D., AGATI, G. Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. *New Phytologist* 163: 547-561. 2004.
- [3.] NEZVAL, J. Detekce a kvantifikace UV-absorbujících látek a fotosyntetických pigmentů u vyšších rostlin. Diplomová práce. Ostravská univerzita. 2009.
- [4.] LIU, L., GITZ, D. C., McCLURE, L. W., Effects of UV-B on flavonoids, ferulic acid, growth and photosynthesis in barley primary leaves. *Physiologia Plantarum*, 93: 725-733. 1995.
- [5.] BENEŠOVÁ, H. Zastoupení volných fenolických látek v extrakte z listů ječmene jarního aklimovaného na různé radiační podmínky. Bakalářská práce. 2011.

Abstract

Phenolic compounds (FL) are secondary metabolites produced by all plants. Their main function is to protect against reactive oxygen species, which excessively rise due to plant stress caused by UV radiation (UVR).

The main objective of this study was to characterize changes in concentrations of FL in the extracts of spring barley. We observed the induction of protective mechanisms under UVBR exposure and characterized the changes in the content of FL after withdrawal of UVBR stress in plants cultivated at low photosynthetically active radiation (PAR). The absorption spectra of leaf methanol extracts were used as an estimate of total amount of free FL and representation of individual FL was determined by HPLC.

The results showed that UVBR could stimulate the synthesis of FL at low irradiance PAR. In all samples was dominantly represented saponarin. Other substances were represented at considerably lower amount. This corresponded to the shape of the spectra obtained spectrophotometrically. Most FL has a low concentration, because the plants were grown at low PAR.