

SLEDOVÁNÍ VZTAHU MEZI OBSAHEM ENZYMU RUBISCO A KONCENTRACÍ CO₂ V CHLOROPLASTU

Nikola Burianová

*Katedra fyziky, Přírodovědecká fakulta, Ostravská univerzita v Ostravě, Chittussiho
10, 710 00 Ostrava, n.burianova@centrum.cz*

Abstrakt

Rubisco (ribulosa-1,5-bisfosfát karboxyláza/oxygenáza) je hlavní enzym, který asimiluje CO₂ do biosféry. Na druhou stranu je Rubisco velmi neefektivní katalyzátor a jeho karboxylázová aktivita je nahrazena aktivitou oxygenázovou, při které je využíván atmosférický O₂. Difúzní cesta CO₂ až do míst karboxylace zahrnuje řadu vodivostí, které přispívají ke snižování koncentrace CO₂ uvnitř listu. K největšímu poklesu dochází přes průduchy a mezofyl listu. Hlavní myšlenkou je hypotéza, že obsah a aktivita enzymu Rubisco musí být v optimálním poměru ke koncentraci CO₂ v chloroplastech, z důvodu maximálního využití energie, která je generována v rámci primárních fotochemických reakcí. Pro stanovení obsahu Rubisco byla využita denaturující elektroforéza (SDS-PAGE) a koncentrace CO₂ v chloroplastu byla stanovena pomocí gazometrie.

Klíčová slova: *Rubisco; koncentrace CO₂; fotorespirace; fotosyntéza*

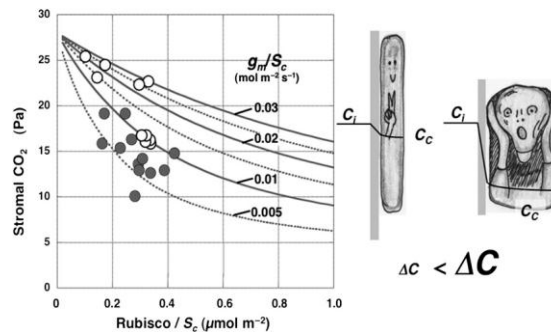
Úvod

Rubisco (ribulosa-1,5-bisfosfát karboxyláza/oxygenáza) je enzym, který tvoří více jak 50% všech rostlinných proteinů. Podílí se na fixaci molekul CO₂ do metabolismu fotosyntézy. Tento proces se nazývá Calvinův cyklus, který probíhá v temnostní fázi fotosyntézy. Rubisco je extrémně pomalý katalyzátor a jeho karboxylační aktivita je navíc ovlivňována vedlejší konkurenční reakcí, ve které se uplatňuje kyslík (oxygenace) a spouští proces fotorespirace [1]. Poměr těchto dvou reakcí (karboxylace a oxygenace) je závislý na poměru výskytu CO₂ a O₂ v okolní atmosféře listu [2].

Při difúzi CO₂ až do míst karboxylace dochází ke snižování jeho koncentrace díky odporům vytvořeným na jednotlivých úrovních difúzní cesty. CO₂ přechází z okolní atmosféry listu (C_a) skrz povrch listu, kde se nachází hraniční vrstva vzduchu, a prostřednictvím průduchů do podprůduchové dutiny (C_s). Odtud přechází skrz intracelulární prostory (C_i) přes mezofyl až do stromatu chloroplastů (C_c). Významnými místy, kde dochází k největšímu poklesu množství CO₂ jsou průduchy a mezofyl listu (průduchová g_s a mezofylová g_m vodivost) [3].

Listy potřebují značné množství Rubisco na jednotku plochy pro fotosyntézu, protože tento enzym se vyznačuje nízkou katalytickou aktivitou. Z toho důvodu je mezofylová vodivost konečná a není velká. Koncentrace CO₂ ve stromatu chloroplastu se snižuje s rostoucím množstvím Rubisco na jednotku plochy chloroplastu (S_c). Z důvodu nízké afinity Rubisco k CO₂, s klesající C_c karboxylační rychlost klesá a fotorespirace roste. Jestliže se v rostlině nachází velké množství Rubisco/S_c, dochází k velké spotřebě CO₂ a jeho koncentrace v chloroplastu se snižuje. Tím dochází k tomu, že Rubisco začne odebírat kyslík a spustí se proces fotorespirace. V opačném případě, kdy má rostlina malé množství Rubisco, je koncentrace CO₂ ve stromatu chloroplastu velká. Potom nedochází ke spotřebě energie a hrozí tak oxidační poškození tylakoidních membrán a fotooxidační poškození [4]. Slunné listy mají větší množství Rubisco na jednotku plochy než listy stinné. Jestliže listy mají větší množství Rubisco, tak také mají větší plochu mezofylu (S_{mes}) a tudíž i větší plochu chloroplastů (S_c). Vzhledem k tomu, že u stejných

druhů rostlin se průměr ani hustota buněk slunných a stinných listů neliší, vysvětluje se, že větší plochy mezofylu je dosaženo protažením buněk do výšky. To vysvětluje, proč jsou slunné listy tlustší než ty stinné [5]



Obrázek 1. Závislost koncentrace oxidu uhličitého ve stromatu chloroplastu (C_c) na množství Rubisco na jednotku plochy chloroplastu (Rub/S_c). Prázdné a plné symboly znázorňují roční byliny a listnaté stromy. Převzato z [4].

Materiál a metody

Pro obě metody byly použity rostliny: řepaš durkoman (*Xanthium strumarium*), slunečnice roční (*Helianthus annuus*) a tabák selský (*Nicotiana rustica*). Všechny rostliny byly pěstovány v růstových komorách (HB 1014, Bioline-Heraeus, Německo) při vysokém ($850\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a nízkém ($150\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) ozáření. Rostliny byly ozařovány 16 hodin denně při 23°C a 8 hodin byly ve tmě při 8°C . Pro stanovení obsahu byly odebrány 4 vzorky od každého druhu při nízké i vysoké ozáření. Rostliny pěstované na nízkém světle byly označeny jako LI (low intensity) a na vysokém světle HI (high intensity).

Obsah enzymu Rubisco byl stanovován pomocí denaturující elektroforézy (SDS-PAGE) dle Matulkové (2010) [6] za použití aparatury Mini-PROTEAN 3 (BIO-RAD, USA). Polyakrylamidový gel se připravuje polymerací akrylamidu, kdy vzniklé molekuly polyakrylamidu se spojují příčnými můstky, které se tvoří kopolymerací s N,N'-metylenbisakrylamidem. Polymerace se zahajuje přidáním katalyzátorů peroxydisíranu amonného a tetrametylendiaminu (TEMED). Pro elektroforézu byl použit 10% separační gel (10ml) a 5% zaostřovací gel (3ml). Jednotlivé vzorky byly připraveny homogenizací s mořským pískem a 4ml extrakčního pufru, pH 7,8 [62mM tris(hydroxymethyl)aminomethanu (TRIS), 2% (w/v) dodecylsulfátu sodného (SDS), 65mM DTT a 10% (v/v) glycerolu]. Poté následovala centrifugace a ředění vzorků. K 0,5ml extraktu bylo přidáno 0,5ml vzorkového pufru [3% (w/v) TRIS, 5% (v/v) 2-merkapt ethanol, 10% (w/v) SDS, 20% (v/v) glycerol, 0,2% (w/v) bromfenolová modř]. Tato směs byla provařena 5 minut v termobloku. Na každý gel byl také nanesen standard Rubisco o koncentraci ($1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Elektroforéza probíhala přibližně 2 hodiny při 80V. Gely byly barveny pomocí barviva Coomassie brilliant blue a vyhodnocovány pomocí programu Image Lab 4.0.1. (Bio-Rad).

Koncentrace CO_2 v chloroplastu byla stanovena pomocí gazometrie. Pro měření byl použit Li 6400 (LiCor) s integrovanou fluorescenční komorou. Měření probíhalo při PPFD $1000\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a teplotě listu 22°C . Současně se stanovením parametrů A_n (rychlost asimilace oxidu uhličitého), C_i , C_a byl stanoven parametr ETR (rychlost elektronového transportu přes PSII).

Z takto získaných hodnot bylo možno vypočítat mezofylovou vodivost dle vzorce:

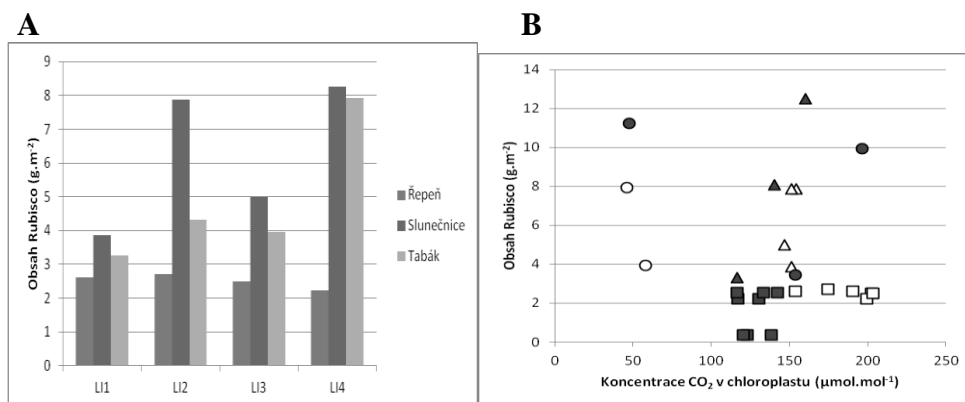
$$g_m = \frac{A_n}{C_i - \frac{\Gamma^* [ETR + 8(A + R_d)]}{ETR - 4(A + R_d)}}$$

kde Γ^* je kompenzační bod CO_2 bez přítomnosti R_d , R_d je respirace ve dne.

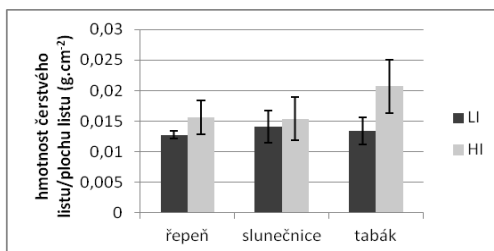
Prostřednictvím I. Fickova zákona a g_m lze pak dále získat hodnoty koncentrace CO_2 v chloroplastu:

$$C_c = C_i - \left(\frac{A_n}{g_m} \right)$$

Výsledky a diskuse



Obrázek 2. A) Obsah Rubisco ($\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$) u jednotlivých druhů rostlin (řepeň durkoman-*Xanthium strumarium*, slunečnice roční-*Helianthus annuus*, tabák selský-*Nicotiana rustica*), které byly pěstovány při nízké ozáření ($150\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$); B) Závislost obsahu Rubisco ($\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$) na koncentraci CO_2 v chloroplastu C_c ($\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$). Obrázce bez výplně představují rostliny pěstované při nízké ozáření ($150\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a obrázce s výplní představují rostliny pěstované při vysoké ozáření ($850\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Čtverce (*Xanthium strumarium*), kolečka (*Nicotiana rustica*) a trojúhelníky (*Helianthus annuus*).



Obrázek 2A představuje obsah Rubisco vzatžený na plochu listu u rostlin rostoucích při nízké ozáření. Nejméně Rubisca má podle výpočtů řepeň durkoman a naopak nejvíce má slunečnice roční. U rostlin pěstovaných při vysoké ozáření byly výsledky podobné, nejvyšší hodnoty zde měl ale tabák. Na obrázku 2B je znázorněna závislost obsahu Rubisco na

koncentraci CO_2 v chloroplastu. Z obrázku vyplývá, že řepěň durkoman nevykazuje žádnou závislost a vzáta mezi těmito veličinami je náhodný. U slunečnice pěstované při vysoké ozáření lze pozorovat nárůst C_c s vzrůstajícím obsahem enzymu Rubisco, což je v rozporu s hypotézou, kterou ve své práci uvádí Terashima et al. (2011) [4]. Pravděpodobně je to dáno variabilitou g_m , která se může náhle změnit ve velmi krátkém časovém úseku, což ve své práci popisuje Flexas et al. (2007) [7]. Na posledním obrázku 3 jsou znázorněny průměrné hodnoty hmotnosti čerstvého listu vztažené na plochu listu. Jsou zde evidentní anatomické rozdíly mezi rostlinami LI a HI. Rostliny HI mají větší nárůst biomasy z důvodu větší fotosyntézy. LI Rostliny mají nižší fotosyntézu a proto také menší nárůst biomasy než rostliny HI.

Závěr

Z výsledků tedy vyplývá, že hypotéza, kterou uvádí Terashima et al. (2011) [4], se v našem případě nepotvrdila. Rostliny s vyšším obsahem Rubisco neobsahovaly menší C_c a naopak.

Poděkování

Tato práce byla finančně podpořena Ostravskou univerzitou (SGS20/PřF/2013) a z projektu EU „Institut environmentálních technologií“ (CZ.1.05./2.1.00/03.0100).

Literatura

- [1.] ANDERSSON, I., BACKLUND, A. *Structure and function of Rubisco*. Plant Physiology and Biochemistry 46 (2008) 275-291
- [2.] MAKINO, A., MAE, T. *Photosynthesis and Plant Growth at Elevated Levels of CO_2* . Plant Cell Physiology 40(10) (1999) 999-1006
- [3.] TERASHIMA, I., HANBA, Y., TAZOE, Y., VYAS, P., YANO, S. *Irradiance and phenotype: komparative eco-development of sun and shade leaves in relation to photosynthetic CO_2 diffusion*. Journal of Experimental Botany 57 (2006) 343-354
- [4.] TERASHIMA, I., HANBA, Y., THOLEN, D., NIINEMETS, U. *Leaf Functional Anatomy in Relation to Photosynthesis*. Plant Physiology 155 (2011) 108-116
- [5.] TERASHIMA, I., MIYAZAWA, S., HANBA, Y. *Why are Sun Leaves Thicker than Shade Leaves? – Consideration based on Analyses of CO_2 Diffusion in the Leaf*. J. of Plant Research 114 (2001) 93-105
- [6.] MATULKOVÁ, Z. *Denní chod obsahu a aktivity enzymu Rubisco v podmínkách normální a zvýšené koncentrace oxidu uhličitého*. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně 2010
- [7.] FLEXAS, J., DIAZ-ESPEJO, A., GALMÉS, J., KALDENHOFF, R., MEDRANO, H., RIBAS-CARBO, M. *Rapid variations of mesophyll conductance in response to changes in CO_2 concentration around leaves*. Plant, Cell and Environment 30 (2007) 1284-1298.

Abstract

Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) is the major enzyme assimilating CO_2 into the biosphere. At the same time Rubisco is extremely inefficient catalyst and its carboxylase activity is compensated by an opposing oxygenase activity involving atmospheric O_2 . Diffusion pathway of CO_2 into the sites of carboxylation includes a number of conductivity, which contributes to reducing CO_2 concentration. The largest decline occurs through stomata and leaf mesophyll. The main idea is the hypothesis that the content and activity of Rubisco must be in optimal proportion to the concentration of CO_2 in chloroplast, for reason of maximum usage of energy, which is generated within the primary photochemical reaction. SDS-PAGE electrophoresis was used for the determination of Rubisco content and gas exchange measurement was used for the determination of CO_2 concentration in chloroplast.