

# VLIV SVĚTLA NA AKTIVITU PIGMENTŮ XANTOFYLOVÉHO CYKLU

**Zuzana Materová<sup>1</sup>, Iva Holubová<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Katedra fyziky, Přírodovědecká fakulta, Ostravská univerzita v Ostravě, Chittussiho 10, 710 00, Slezská Ostrava, 724 543 392, p12183@student.osu.cz*

<sup>2</sup>*Katedra biologie, Přírodovědecká fakulta, Ostravská univerzita v Ostravě, Chittussiho 10, 710 00, Slezská Ostrava, 724 543 392, p13045@student.osu.cz*

## **Abstrakt**

Pro posouzení vlivu aktinického světla o různých délkách trvání (intenzita  $1400\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) a teploty (20 a 40°C) na aktivaci xantofylového cyklu, charakterizovanou parametrem DEPS (deepoxidační stav pigmentů xantofylového cyklu;  $(A+Z)/(V+A+Z)$ , kde V=violaxantin, A=anteraxantin, Z=zeaxantin; %), bylo použito 14-16 dní starých semenáčků smrku ztepilého (*Picea Abies* (L.) Karsten), pěstovaných v růstových komorách při ozáření z oblasti FAR (fotosynteticky aktivní radiace) o intenzitě  $50\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  a teplotě 20°C.

Zjistili jsme, že u jehlic smrku adaptovaných na tmu bylo přítomno velké množství anteraxantinu, které při relativním vyjádření  $A/(V+A+Z)$  (%) dosahovalo 12 %. Vysoká teplota měla výrazný efekt na aktivaci xantofylového cyklu (hlavně u variant rostlin vystavených světelným pulzům delším než 60s). Vystavení jehlic 1s dlouhému světelnému pulzu následovanému 59s tmy (10x) vedlo při teplotě 40°C ke zdvojnásobení hodnoty parametru DEPS, ve srovnání s 10s dlouhým světelným pulzem. Důvody, proč dochází pouze při zvýšené teplotě ke stimulaci deepoxidace krátkými světelnými pulzy, budou ještě prodiskutovány.

***Klíčová slova:*** smrk ztepilý; deepoxidace; xantofylový cyklus; světelné pulzy; teplota

## **Úvod**

V přirozeném prostředí jsou všechny fotosyntetické organismy vystavovány měnícím se světelným podmínkám. Tyto změny se pohybují od těch krátkodobých, mezi které můžeme zařadit délku trvání v sekundách či minutách, až po dlouhodobé, zahrnující hodiny až měsíce [1]. Rostliny jsou schopny na tyto změny okamžitě reagovat a dle svých možností aktivovat ochranné procesy proti nadměrné ozáření a zvýšené teplotě a tím předejít či snížit míru poškození fotosyntetického aparátu. Jedním z hlavních ochranných procesů, na kterých se podílí karotenoidy, je disipace nadbytečné energie, zhášení reaktivních forem kyslíku (ROS) [2] a také zhášení tripletních forem chlorofylu *a*.

Množství disipované energie může být jednak monitorováno jako nefotochemické zhášení fluorescence chlorofylu *a* (NPQ)[3], ale také pomocí deepoxidačního stavu pigmentů xantofylového cyklu (DEPS). Mezi pigmenty, účastníci se xantofylového cyklu, patří violaxantin (V), anteraxantin (A) a zeaxantin (Z). V rámci tohoto cyklu je deepoxidován violaxantin, přes anteraxantin, až na zeaxantin. V tomto směru je reakce katalyzována proteinem violaxantin-deepoxidázou, který pro svou aktivaci vyžaduje nízké pH (<5,8), askorbát a světlo, v opačném směru pak pracuje zeaxantin-epoxidáza (ZE) [4].

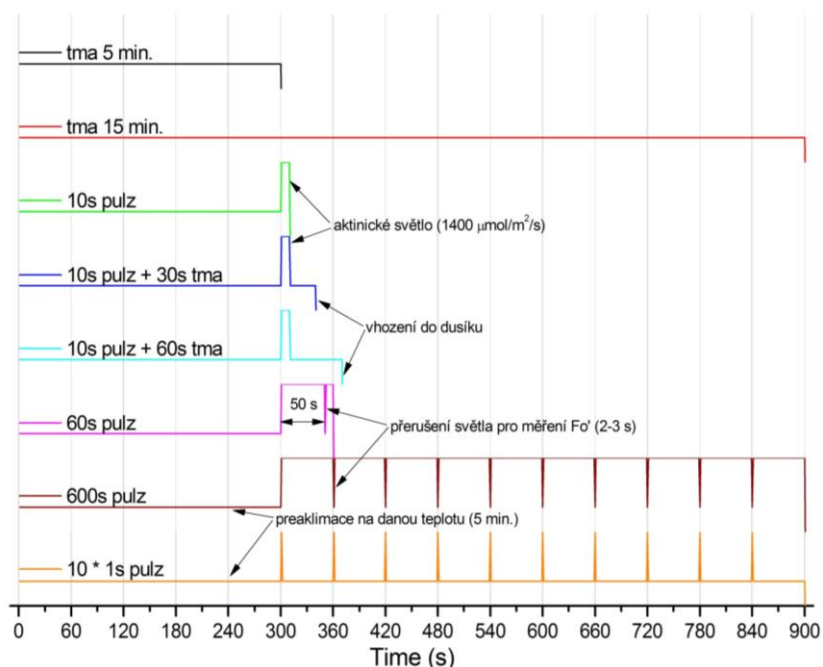
Cílem této práce bylo posoudit vliv sekundových až minutových světelných pulzů, v kombinaci s kultivační a zvýšenou teplotou, na míru disipačních procesů u semenáčků smrku ztepilého.

## Materiál a metody

Pro experiment byly vybrány 14-16ti denní semenáčky smrku ztepilého (*Picea Abies* (L.) Karsten), pěstované v perlitu, v růstových komorách BioLine (HB 1014, Vötsch, Německo), při ozáření z oblasti FAR o intenzitě  $50\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , světelném režimu 16/8 hodin světla/tmy a teplotě  $20^{\circ}\text{C}$ . Každý vzorek představoval jeden semenáček smrku, který měl v průměru 6-8 jehlic o hmotnosti 10-20mg. Vždy bylo provedeno 6 opakování u rostlin adaptovaných minimálně 2.hod.na tmu.

Měření probíhalo jednak při kultivační teplotě ( $20^{\circ}\text{C}$ ), ale také při teplotě  $40^{\circ}\text{C}$ . Aklimace jednotlivých semenáčků na zvýšenou teplotu bylo dosaženo termostatem připojeným k měřící komůrce fluorimetru PAM 101-103(Heinz Walz, Effeltrich, Německo). Samotné měření pak probíhalo tak, že byly rostliny vystaveny různým světelným režimům (obr.1). Intenzita aktinického světla byla (pro dostatečnou aktivaci xantofylového cyklu) nastavena na  $1400\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Bezprostředně po ozáření byly vzorky vloženy do označených eppendorfek a vhozeny do termosky s kapalným dusíkem (pro zastavení probíhajícího procesu deepoxidace, a také možné zpětné epoxidace pigmentů xantofylového cyklu).

Následně byly vzorky podrobeny HPLC analýze pigmentů, se zaměřením na pigmenty xantofylového cyklu (V, A, Z). Extrakty byly připraveny ve 100% acetonu (příměs  $\text{MgCO}_3$ , mořský písek), následně 3 min.centrifugovány při 6000ot./min (EBA 20, Hettich Zentrifugen, Německo), doředěny destilovanou vodou na 80% aceton, přefiltrovány přes  $0,20\mu\text{m}$  filtr do vialek a vloženy do HPLC systému Agilent (Agilent 1200, USA). Analýza pigmentů probíhala na koloně 25/4 RP 18 (Lichrocart, Germany), s použitím mobilních fází A (241ml acetonitril, 30 ml metanol, 9 ml tris) a B (240 ml metanol, 60 ml n-hexan), s průtokem 2ml/min. Měření probíhalo v rozsahu 190-750nm, s detekcí při 440nm. Jednotlivé plochy píků byly vyděleny příslušnými konverzními faktory [5]. Míra deepoxidace pigmentů xantofylového cyklu byla vyjádřena parametrem DEPS ( $A+Z/(V+A+Z)$ ; %).

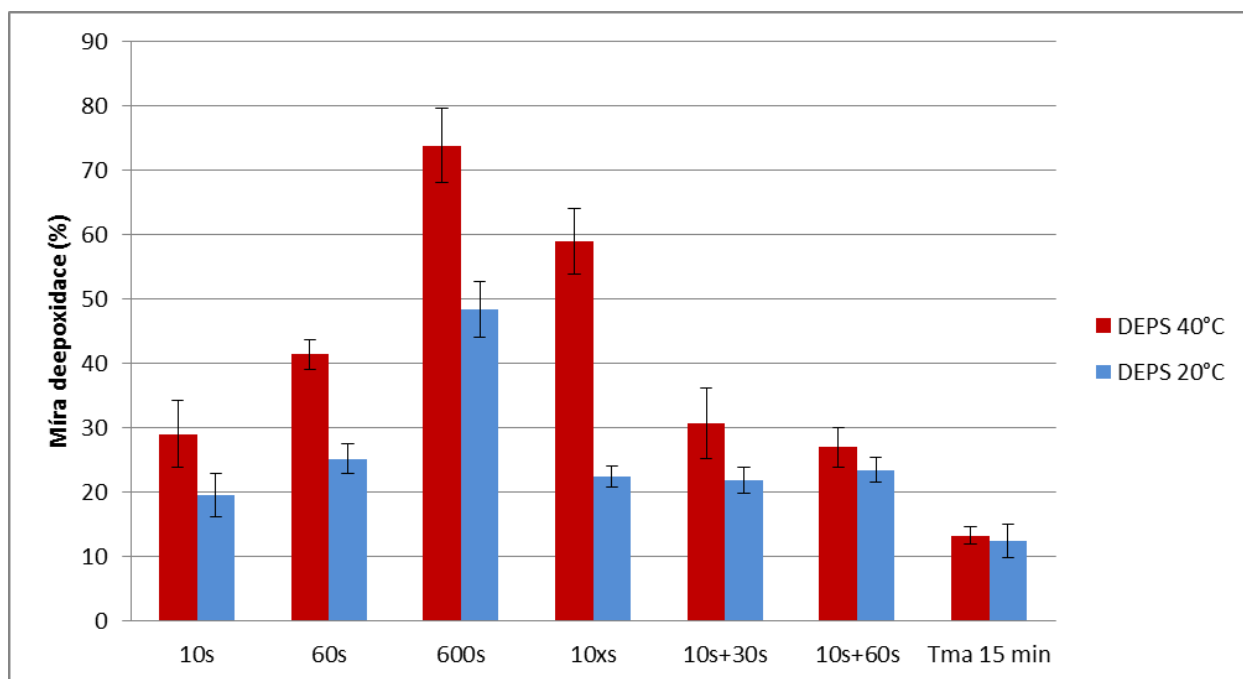


**Obrázek 1.** Grafické zpracování světelných režimů použitých pro stanovení vlivu aktinického světla ( $1400\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) na aktivaci (deepoxidaci) pigmentů xantofylového cyklu.

## Výsledky a diskuse

V porovnání s ječmenem jarním, se kterým obvykle pracujeme, je zajímavé, že přestože byly semenáčky smrku aklimované na tmě, HPLC analýzou u nich byla prokázána přítomnost anteraxantinů. Jejich množství se pohybovalo kolem 12% (vůči sumě xantofylů) (obr.2 – TMA).

Nabízí se několik možností srovnání parametru DEPS v závislosti na délce použitého aktinického světla. Můžeme říci, že pro aktivaci xantofylového cyklu stačí vystavit rostlinu 10s dlouhému pulzu (a to nezávisle na teplotě jehlic). Při srovnání s variantami 10s+30s a 10s+60s (+30 a +60s představuje časovou prodlevu před vložením osvětleného vzorku do dusíku, viz obr.1) je zřejmé, že je to příliš krátká doba pro výraznou zpětnou epoxidaci zeaxantinu na violaxantin (nezávisle na teplotě jehlic). Vlivem zvýšené teploty jehlic (40°C) můžeme u variant 60s, 600s a 10xs pozorovat urychlenou deepoxidaci (ve srovnání s teplotou 20°C), což je v korelaci s výsledky Ilík et al. 2010 [6]. To potvrzuje i srovnatelná míra deepoxidace u variant 10s a 10xs při teplotě 20°C, v kontrastu s 40°C. Výrazný nárůst DEPS u var. 10xs 40°C může být způsoben pokračováním deepoxidace i mezi jednosekundovými světelnými pulzy (obr.2). U této varianty pak došlo (v porovnání s var. 600s) ke kvantitativní změně v zastoupení anteraxantinu a zeaxantinu (data nejsou uvedena). Experimentálně bylo ověřeno, že samotné zvýšení teploty nestačí, u smrku, k aktivaci xantofylového cyklu (viz obr.2; tma 15 min).



**Obrázek 2.** Vliv odlišných světelných režimů (obr.1) a teplot jehlic (20 a 40°C) na míru deepoxidace pigmentů xantofylového cyklu  $((A+Z)/(V+A+Z); \%)$  u semenáčků smrku kultivovaných při teplotě 20°C. Sloupec *TMA 15 min* představuje procento A přítomného u semenáčků smrku aklimovaných na tmě (min.2 hod.) a příslušnou teplotu (15 min.)(A/VAZ).  $n=5-6 \pm SD$ .

## Závěr

Design experimentu byl navržen tak, aby co nejdetailněji postihl změny v nárocích na deepoxidaci/epoxidaci pigmentů xantofylového cyklu v závislosti na délce trvání světla o vysoké intenzitě, v kombinaci s kultivační a zvýšenou teplotou. Schéma může být aplikováno na další rostlinné druhy kultivované např. při různé kvalitě světla z oblasti FAR, pro posouzení a srovnání jejich reakcí.

## Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat svému vedoucímu práce, panu Mgr. Michalu Štrochovi Ph.D, za vstřícné a motivační vedení. Dále pak studentce, Bc. Ivě Holubové, za svědomitou a samostatnou práci v laboratoři.

Experiment byl podpořen Ostravskou univerzitou v Ostravě prostřednictvím grantu SGS21/PřF/2014.

## Literatura

- [1.] JAHNS, P., HOLZWARTH, A. R. *The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II*. Biochimica et Biophysica Acta 1817 (2012) 182–193
- [2.] BALLOTTARI, M., GIRARDON, J., DALL'OSTO, L., BASSI, R. *Evolution and functional properties of Photosystem II light harvesting complexes in eukaryotes*. Biochimica et Biophysica Acta 1817 (2012) 143–157
- [3.] JOHNSON, M.P., RUBAN, A.V. *Restoration of Rapidly Reversible Photoprotective Energy Dissipation in the Absence of PsbS Protein by Enhanced  $\Delta pH$* . The Journal of Biological Chemistry 286 (2011) 19973–19981
- [4.] JAHNS, P., LATOWSKI, D., STRZALKA K. *Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: The role of antenna proteins and membrane lipids*. Biochimica et Biophysica Acta 1787 (2009) 3–14
- [5.] FÄRBER, A., JAHNS, P. *The xanthophyll cycle of higher plants: influence of antenna size and membrane organization*. Biochimica et Biophysica Acta 1363 (1998) 47-58
- [6.] ILÍK, P., KOTABOVÁ, E., ŠPUNDOVÁ, M., NOVÁK, O., KAŇA, R., STRZALKA, K. *Low-light-induced Violaxanthin De-epoxidation in Shortly Preheated Leaves: Uncoupling from  $\Delta pH$ -dependent Nonphotochemical Quenching*. Photochemistry and Photobiology 86 (2010) 722-726

## Abstract

For assessment of the effect of different actinic light duration (intensity of  $1400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) and different temperature of needles (20 and  $40^\circ\text{C}$ ) on xanthophyll cycle activation, estimated by DEPS parameter (deepoxidation state of xanthophyll cycle pigments;  $(A+Z)/(V+A+Z)$ , where V=violaxanthin, A=antheraxanthin, Z=zeaxanthin;%), we used 14-16 days old spruce seedlings (*Picea Abies* (L.) Karsten), cultivated in a growth chamber at PAR (photosynthetic active radiation) irradiance  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  and temperature of  $20^\circ\text{C}$ .

In dark adapted spruce needles we detected a high amount of antheraxanthin around 12%  $A/(V+A+Z)$ . High temperature had a significant effect on xanthophyll cycle activation (especially for plants exposed to longer actinic light periods then 60s). Exposure of needles to periods of 1s light pulse followed by 59s of darkness (10 times) at  $40^\circ\text{C}$  led to doubled DEPS as compared to illumination with 10s light pulse. The reasons why stimulation of deepoxidation by short light pulses occurs only at elevated temperature will be discussed.