

# Vliv aklimační ozáření na organizaci pigment-proteinových komplexů thylakoidní membrány smrku ztepilého

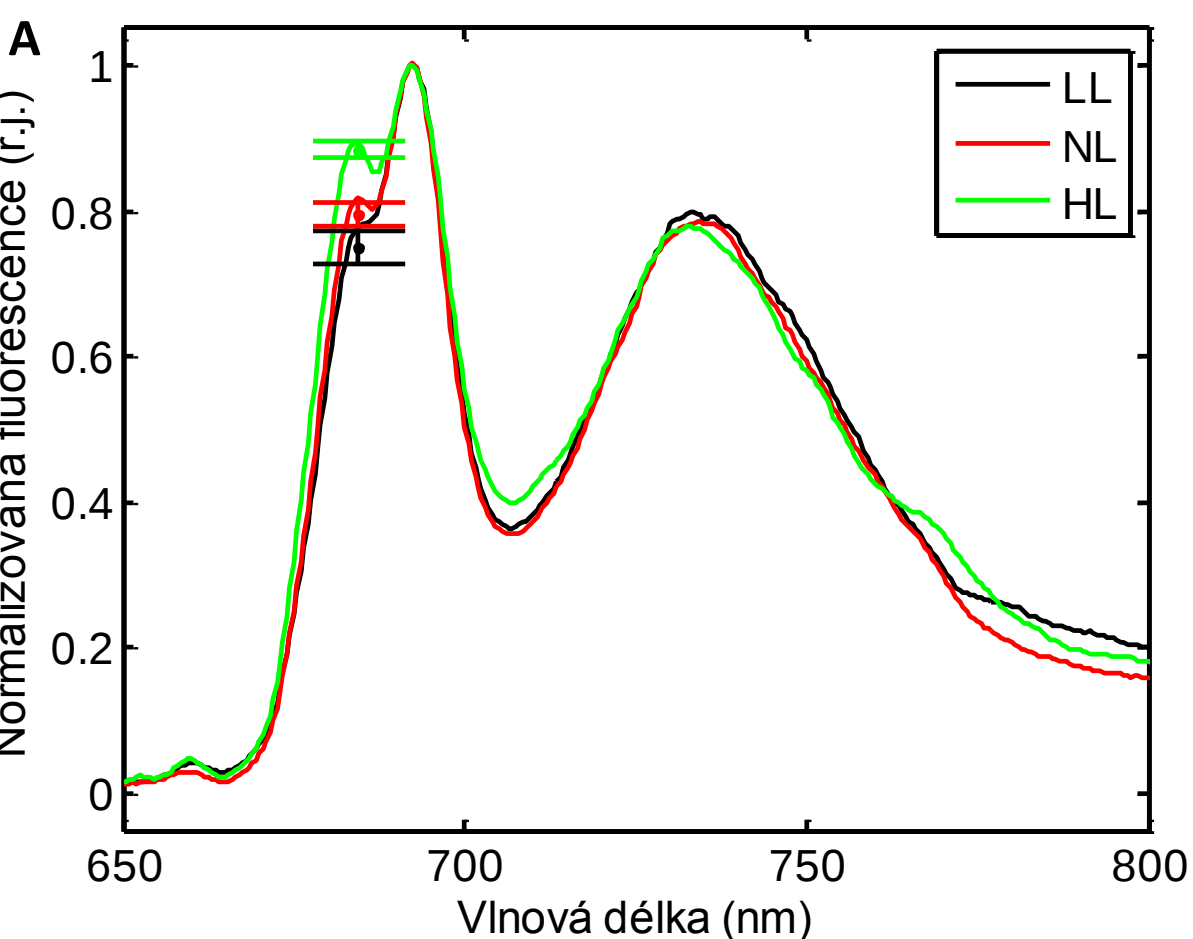


Kateřina Pečínková

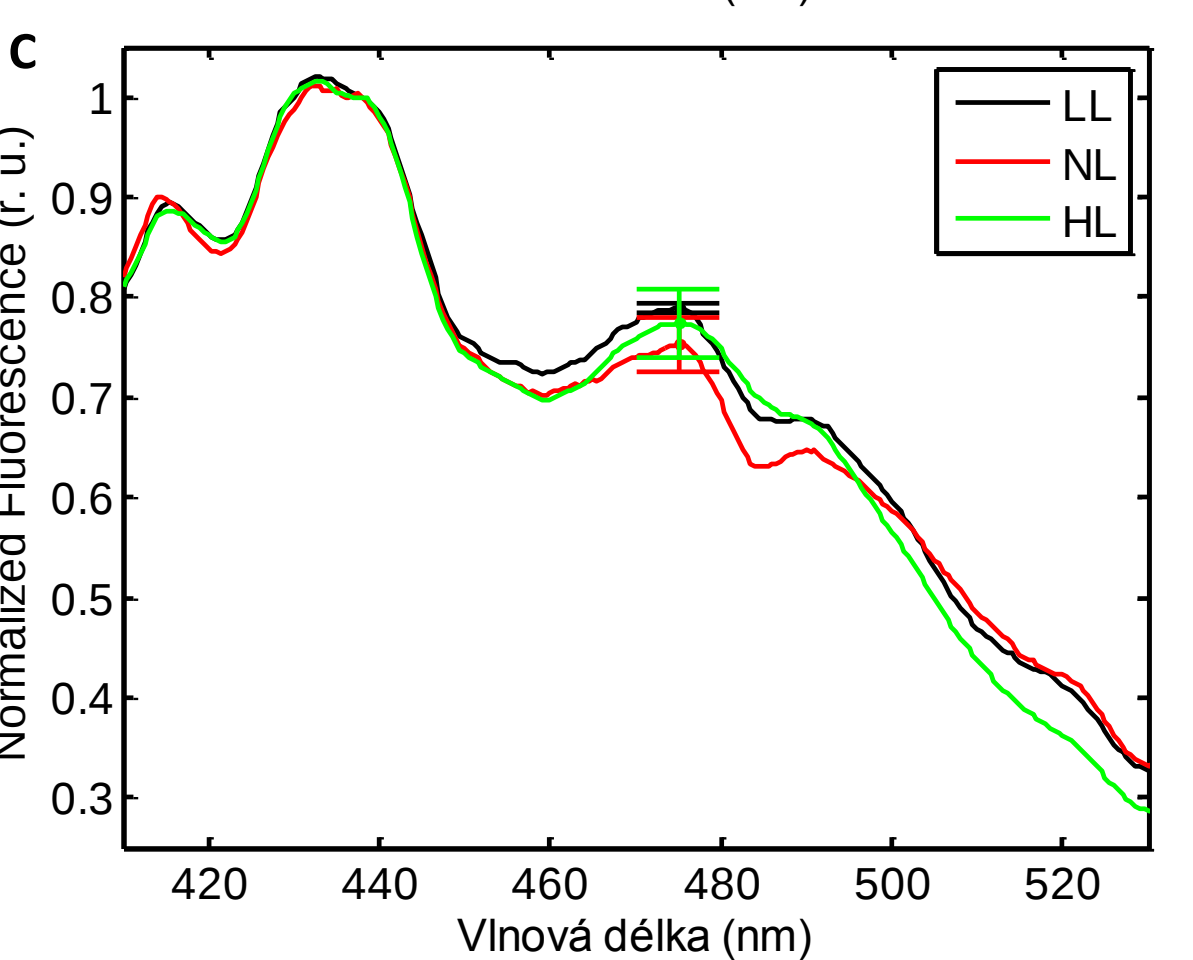
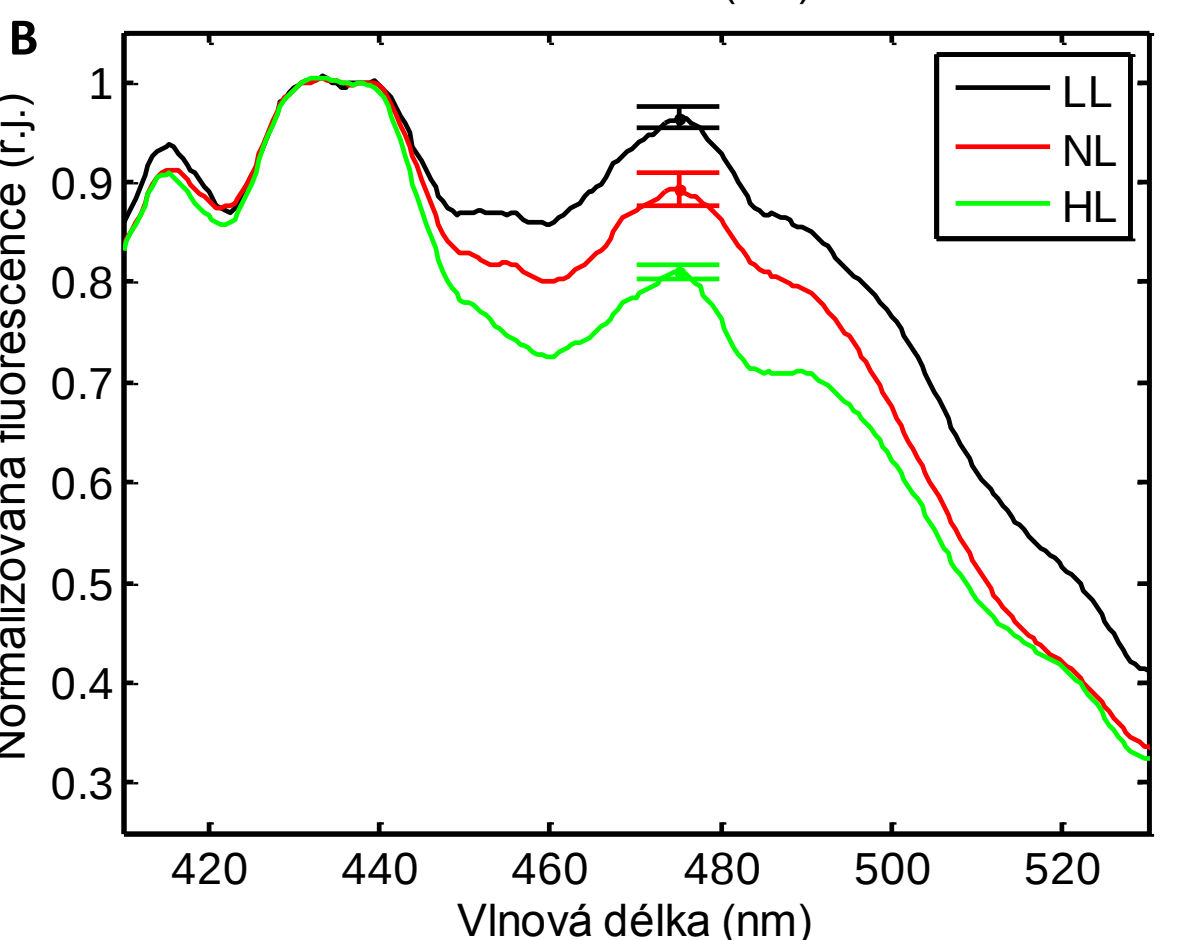
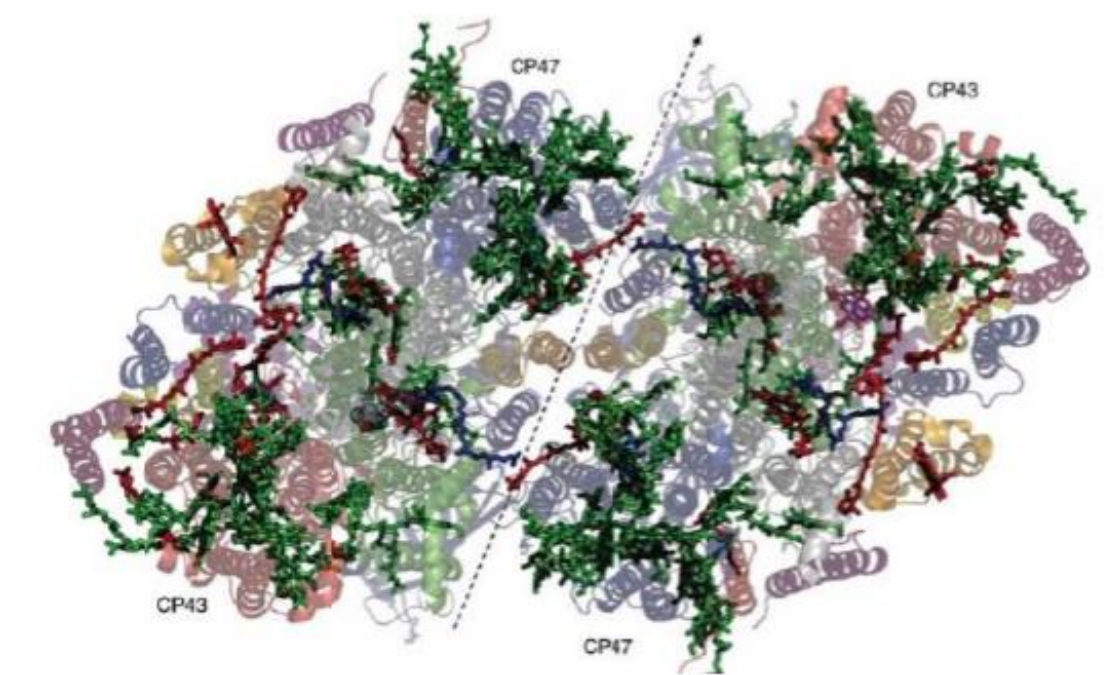
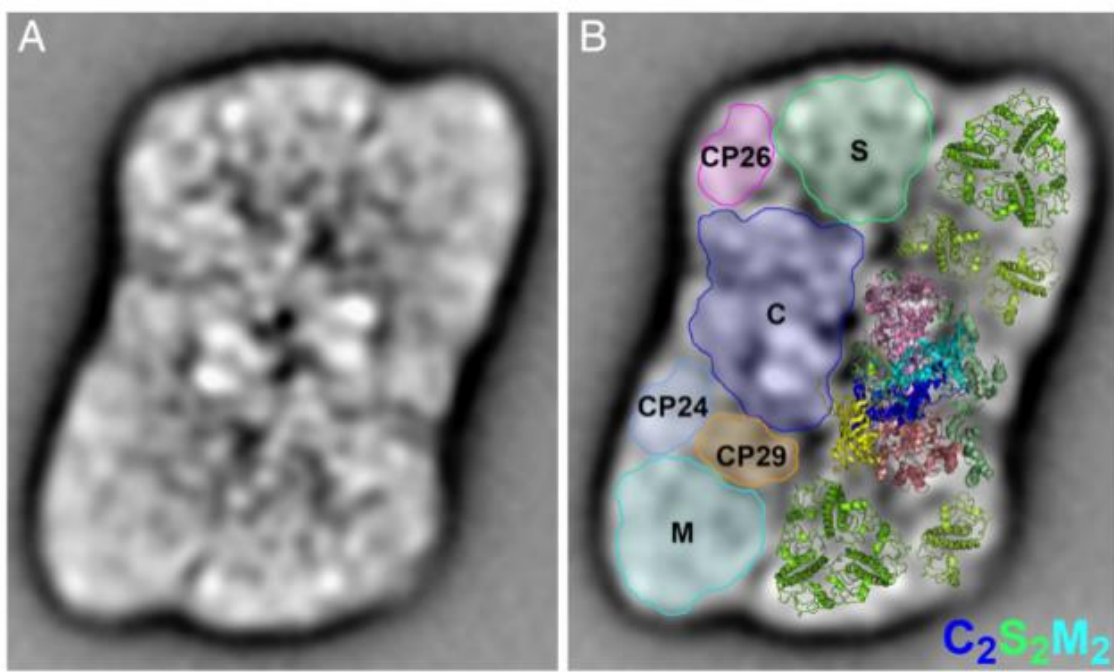
Gymnázium Frýdlant nad Ostravicí, náměstí T. G. Masaryka 1260, 739 11 Frýdlant nad Ostravicí

## Úvod a cíle

Smrk ztepilý (*Picea abies*) vykazuje oproti jiným rostlinám několik odlišností. Ty naznačují, že rozdílná by mohla být i reakce smrku na aklimační ozáření a tedy i aklimační strategie. Chybějící Lhcb3 a Lhcb6 proteiny, které byly považovány za typické pro suchozemské rostliny, způsobují odlišnou strukturu superkomplexu fotosystému II (Kouřil *et al.*, 2016). U smrku navíc není zcela znám mechanismus nefotochemického zhášení, ochranného mechanismu s krátkou dobou působení vůči stresovým podmínkám. Tato práce sleduje aklimaci, dlouhodobé ochranné mechanismy, semenáčků smrku na vysokou a nízkou aklimační ozáření. Cílem je popsat změny na úrovni thylakoidní membrány. Výsledky jsou zajímavé i v porovnání s předchozími výzkumy na zralých jehlicích smrku – ty schopnost měnit složení a množství světlosběrných antén postrádají. (Kurasová *et al.*, 2003)



Obr. 1: Strukturní model PSII  $C_2S_2M_2$  superkomplexu. (a) Obraz superkomplexu z *Arabidopsis thaliana* získaný transmisíí elektronovou mikroskopií individuálních makromolekul. (b) Strukturní model superkomplexu, kde je znázorněna struktura jádra PSII – podjednotka D1 je zvýrazněna tmavě modrou, D2 tyrkysovou, CP43 lososovou, CP47 růžovou a vnější PsbO žlutou a struktura Lhcb – trimerní LHClI tmavě zelenou, monomerní Lhcb3 světle zelenou. Schematicky je tedy monomer jádra PSII „C“ vyobrazen tmavě modrou barvou, trimery LHClI typu „S“ a „M“ světle zelenou a tyrkysovou, v tomto pořadí, a minoritní antény CP24, CP26 a CP29 světle modrou, růžovou a oranžovou, v tomto pořadí. (Převzato z Kouřil *et al.*, 2012). Obr. 2: Pohled ze stromální strany na strukturu jádra fotosystému II v dimérním stavu. Převzato z Nelson a Yocum, 2006.



Obr. 3: Normovaná fluorescenční emisní spektra (A) - excitace proběhla při vlnové délce 476 nm (preferenční excitace chlorofylu b) a excitační spektra (B) nerozvolněných a rozvolněných (C) - emise byla detekována při vlnové délce 685 nm (emise PSII) (B,C) thylakoidních membrán izolovaných ze smrku ztepilého (*Picea abies*) a měřených při 77 K. Semenáčky smrku byly aklimovány na různou ozáření – LL (nízká), NL (kontrolní) a HL (vysoká). Zobrazena jsou průměrná spektra ze tří nezávislých experimentů a standardní odchylky při vlnové délce 685 nm (A) a při 476 nm (B, C).

## Nízkoteplotní fluorescenční spektroskopie chlorofylu a

- emisní spektra nerozvolněných thylakoidních membrán se vyznačují pásy při 685, 695 a 735 nm (Obr. 3A)
- pro smrk je typická výraznější emise při 695 nm, s rostoucí aklimační ozáření roste poměr F685/F695 → větší množství LHClI trimerů nezapojených do přenosu excitační energie do reakčního centra fotosystému II u HL vzorků oproti LL vzorkům (Obr. 3A)
- excitační spektra pro fotosystém II nerozvolněných i rozvolněných thylakoidních membrán mají excitační maxima při 436 a 476 nm (3B,C)
- pás při 460-490 nm typický pro Chl b a karotenoidy, u spekter nerozvolněných membrán s rostoucí aklimační ozáření klesá, méně světlosběrných antén (Obr. 3B)
- u spekter rozvolněných membrán je intenzita pásu 460-690 nm přibližně stejná u všech vzorků (Obr. 3C)
- stejný efekt je viditelný i u excitačních spekter fotosystému I
- mění se i poměr obsahu pigmentů Chl a/Chl b (Tab. 1)
- redukci LHClI u vzorků aklimovaných na vyšší ozáření naznačují klesající pásy CD nerozvolněných thylakoidních membrán typu psi při (+) 505, (+) 685, (-) 673 nm (Obr. 4A)

Tab. 1: Analýza obsahu pigmentu rostlin aklimovaných na různou ozáření. Hodnoty byly zjištěny spektroskopicky z extraktu z jehlic v 80% roztoku acetonu. Data značená stejným písmenem v řádku se signifikantně neliší. ( $P > 0,05$ )

|                | LL                       | NL                       | HL                        |
|----------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Chl a/Chl b    | 2,59 ± 0,04 <sup>a</sup> | 2,76 ± 0,05 <sup>b</sup> | 3,03 ± 0,10 <sup>c</sup>  |
| Car/1000 Chl a | 261,6 ± 4,7 <sup>a</sup> | 265,3 ± 3,2 <sup>a</sup> | 365,4 ± 15,4 <sup>c</sup> |

## Závěr

Získané výsledky ukazují, že primární jehlice semenáčků smrku mají oproti zralým jehlicím schopnost měnit množství a složení světlosběrných antén v souvislosti s vyšší a nižší aklimační ozáření oproti té růstové. To naznačuje měnění se poměr obsahu Chl a/Chl b, pokles pásu 460-690 nm u spekter excitačních a pásu cirkulárního dichroismu typu psi při (+) 685 a (-) 673 nm. Zajímavým poznatkem je, že s rostoucí aklimační ozáření klesá teplotní stabilita makro-organizace pigment-proteinových komplexů, zatímco stabilita LHClI trimerů roste. Vyskytly se i značné rozdíly ve vlastnostech nerozvolněných a rozvolněných thylakoidních membrán. Vzhledem k těmto faktům se nabízí celá řada pokračování práce a dalších výzkumů. Tyto poznatky by v budoucnu mohly přispět k objasnění otázek týkajících se evoluce aklimačních mechanismů.

## Materiál a metody

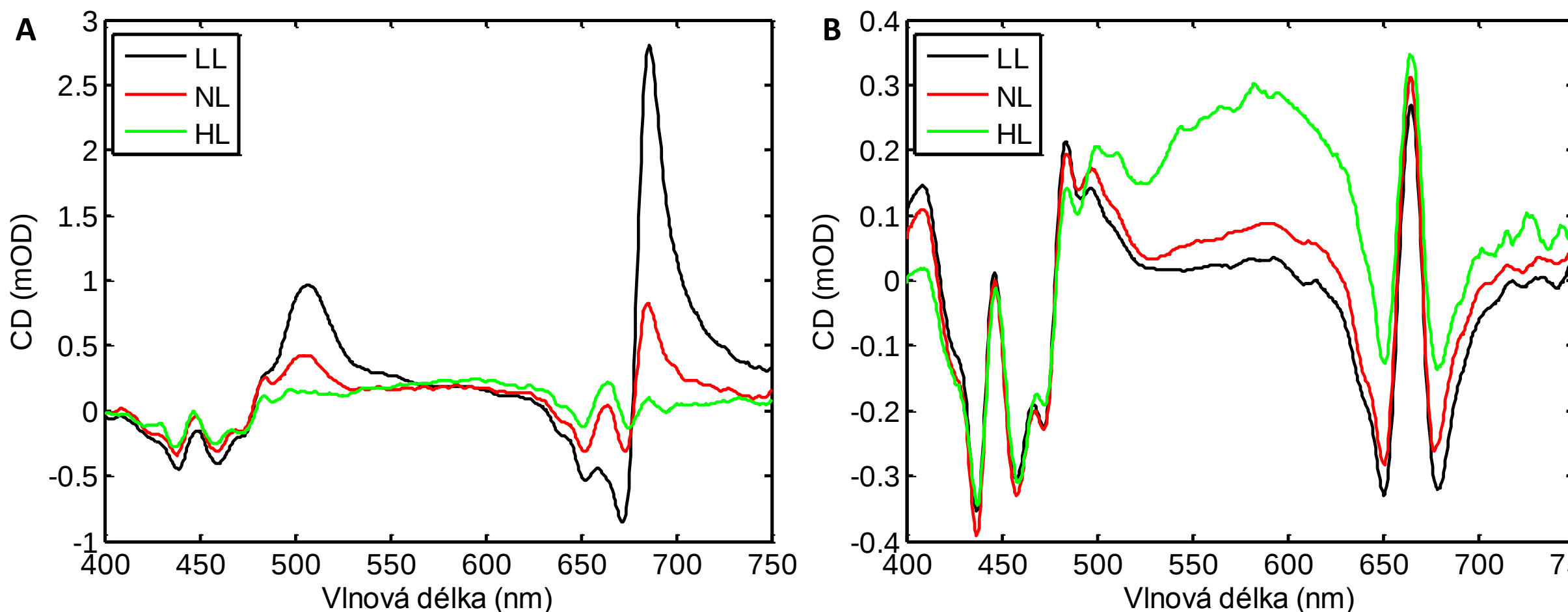
Semenáčky smrku ztepilého (*Picea abies*) byly vypěstovány ze semen v růstové komoře HB 1014 (Bioline-Heraeus, Německo) při ozáření 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , relativní vlhkosti 65 % a světelném režimu 16/8 hodin světlo/tma (17 dnů). Poté byla část rostlin aklimována na nízkou ozáření (LL, 20  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a část na vysokou ozáření (HL, 800  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) po dobu 10 dnů. U třetí části rostlin zůstala ozáření nezměněna (NL, kontrolní). Izolace thylakoidních membrán byla provedena sérií homogenizací a centrifugací rostlinného pletiva podle Noska, 2012. Spektra cirkulárního dichroismu byla měřena v rozsahu 400-750 nm spektropolarimetrem J-815 (Jasco, Tokio, Japonsko). Nerozvolněné thylakoidní membrány byly připraveny resuspenzací izolovaných membrán se stanoveným obsahem Chls v médiu I, rozvolněné thylakoidní membrány byly resuspendovány v médiu II a pomocí jehlového ultrazvuku (GM 3100, Bandelin Electronic, Berlín, Německo) sonifikovány. Vzorky při měření teplotních závislostí byly postupně ohřívány v Petrierově držáku (20 °C – 70 nebo 80 °C). Díky proložení sigmoidální křivkou bylo možno určit  $T_m$  (teplotu, kdy se intenzita CD pásu sníží na 50% hodnoty při 20 °C). Nízkoteplotní fluorescenční spektra chlorofylu a byla měřena při 77 K za použití luminescenčního spektrofluorometru LS50B (Perkin-Elmer, Velká Británie) a na zakázku vyrobeného optického kryostatů Dewarova typu. Všechna měření byla provedena na půdě Katedry fyziky, Přírodovědecké fakulty Ostravské univerzity.

## Reference

KOUŘIL, R. *et al.*, New Phytol. 2016, 210: 808-814. KOUŘIL, R. *et al.*, Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg. 2012, 1817:2-12.  
KURASOVÁ, I. *et al.*, Photosynthetica 2003, 41:513-523. NOSEK, L., Diplomová práce, 2012, Univerzita Palackého v Olomouci.  
NELSON N., YOCUM C. F., Annu. Rev. Plant Biol. 2006, 57:521–65.

## Spektroskopie cirkulárního dichroismu

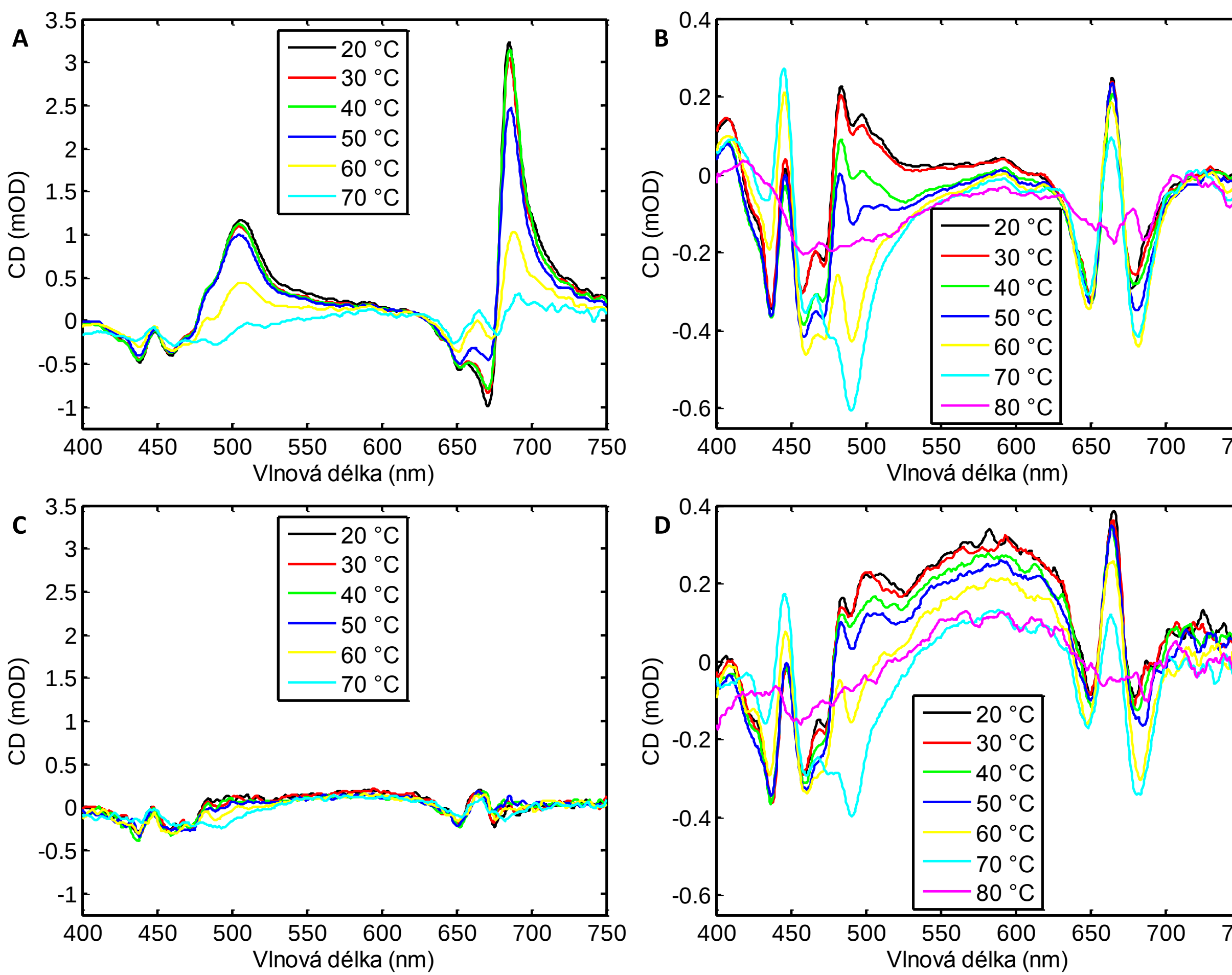
pásky psi typu: (+) 685, (-) 673, (+) 505 nm (Obr. 4A) pásky excitonické: (-) 650, (-) 458, (-) 448, (-) 438 nm (Obr. 4A); (-) 650, (-) 458, (+) 448, (+) 493 nm (Obr. 4B)  
• s rostoucí aklimační ozáření klesá stabilita makro-organizace pigment-proteinových komplexů v thylakoidní membráně → pokles psi typu pásů (Obr. 4A)  
• u excitonických pásů se neprojevují výrazné změny (Obr. 4B) (rozdíly v oblasti 500-600 nm na Obr. 4B způsobené pravděpodobně rozptylem)



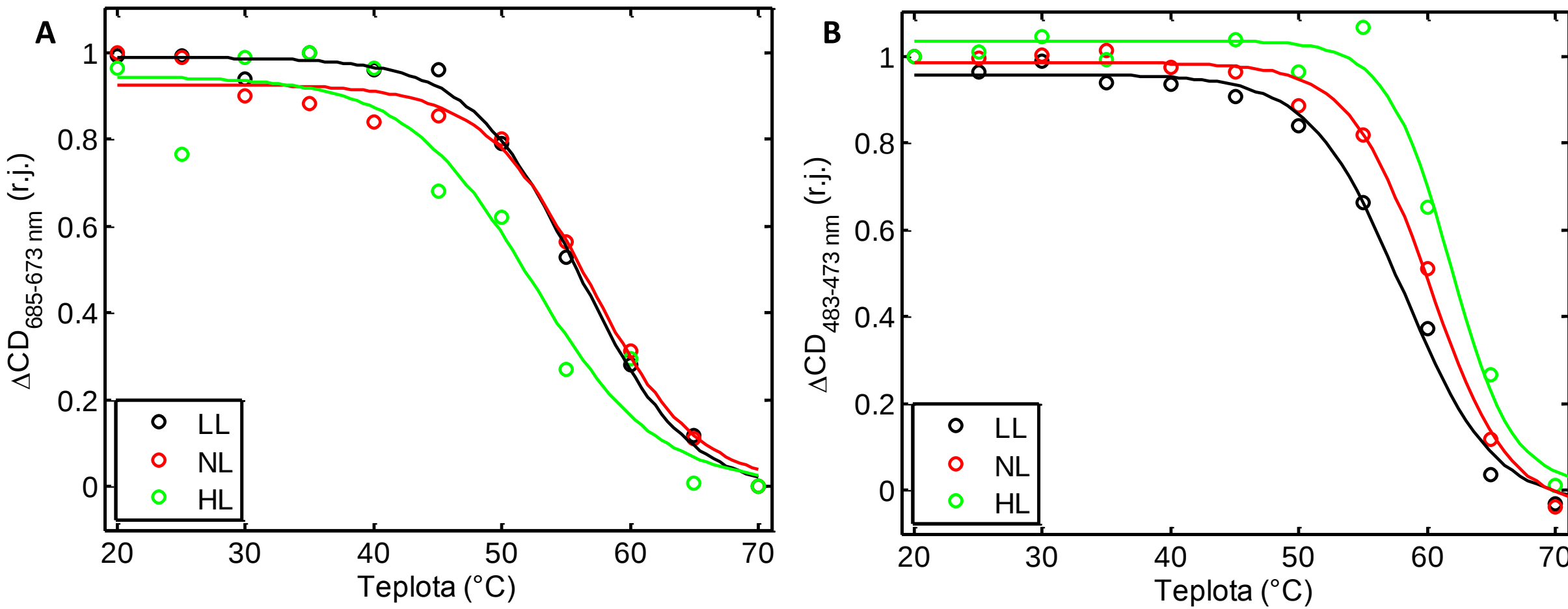
Obr. 4: Spektra cirkulárního dichroismu nerozvolněných (A) a rozvolněných (B) thylakoidních membrán měřených při 20 °C izolovaných ze smrku ztepilého (*Picea abies*). Semenáčky smrku byly aklimovány na různou ozáření – LL (nízká), NL (kontrolní) a HL (vysoká). Zobrazena jsou průměrná spektra ze tří nezávislých experimentů normovaná na maximum absorpce chlorofylu a v červené oblasti spektra.

## Teplotní závislosti

- nejvyšší teplotní stabilitu makro-organizace pigment-proteinových komplexů mají LL vzorky nerozvolněných thylakoidních membrán → s rostoucí teplotou klesá intenzita psi typu pásů (Obr. 5A,C; Obr. 6A; Tab. 2)
- teplotní stabilita LHClI trimerů roste → pás při (-) 473 nm je typický právě pro LHClI trimery (Obr. 6B)



Obr. 5: Typické teplotní závislosti spekter cirkulárního dichroismu nerozvolněných (A, B) a rozvolněných (B, D) thylakoidních membrán izolovaných ze smrku ztepilého (*Picea abies*). Semenáčky smrku byly aklimovány na různou ozáření – LL (nízká) (A, B), NL (kontrolní) a HL (vysoká) (C, D). Spektra byla normovaná na maximum absorpce chlorofylu a v červené oblasti spektra.



Obr. 6: Typické teplotní závislosti CD pásů při (+) 685 nm a (-) 673 nm (A) a (-) 473 nm a (+) 483 nm (B) získané z nerozvolněných a rozvolněných thylakoidních membrán smrku ztepilého (*Picea abies*). Semenáčky smrku byly aklimovány na různou ozáření – LL (nízká), NL (kontrolní) a HL (vysoká). Jednotlivé body byly proloženy sigmoidální křivkou a hodnoty jsou průměrem tří na sobě nezávislých experimentů.

Tab. 2: Přechodové teploty ( $T_m$ ) vybraných párů pásů typu psi a excitonických pásů rozvolněných a nerozvolněných thylakoidních membrán izolovaných ze smrku ztepilého (*Picea abies*) aklimovaného na různou aklimační ozáření – LL (nízká), NL (kontrolní) a HL (vysoká). Data značená stejným písmenem v řádku se výrazně neliší. ( $P > 0,05$ )

| CD signál (nm) | Původ       | $T_m$ (LL, °C)          | $T_m$ (NL, °C)          | $T_m$ (HL, °C)          |
|----------------|-------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 685-730        | psi-typ     | 55,1 ± 0,9 <sup>a</sup> | 54,2 ± 1,0 <sup>a</sup> | 51,3 ± 1,2 <sup>b</sup> |
| 685-673        | psi-typ     | 55,1 ± 0,9 <sup>a</sup> | 54,5 ± 2,1 <sup>a</sup> | 51,6 ± 0,6 <sup>b</sup> |
| 505-550        | psi-typ     | 57,7 ± 0,7 <sup>a</sup> | 58,2 ± 0,2 <sup>a</sup> | 56,8 ± 1,6 <sup>a</sup> |
| 483-473        | excitonický | 58,6 ± 0,7 <sup>a</sup> | 60,0 ± 0,6 <sup>b</sup> | 61,1 ± 1,5 <sup>b</sup> |