

SIMULTÁNNÍ STANOVENÍ OBSAHU NESTRUKTURNÍCH SACHARIDŮ A ŠKROBU V LISTECH VYŠŠÍCH ROSTLIN METODOU VYUŽÍVAJÍCÍ ANTHRONOVÉHO ČINIDLA

PETRA TESLOVÁ^a, JIŘÍ KALINA^a a OTMAR
URBAN^b

^a Katedra fyziky, Fakulta Přírodovědecká, Ostravská Univerzita, 30. dubna 22, 701 03 Ostrava, ^b CzechGlobe – Centrum pro studium dopadu globální změny klimatu, Laboratoř ekologické fyziologie rostlin, ÚSBE AV ČR, Poříčí 3b, 603 00 Brno
jiri.kalina@osu.cz

Došlo 6.2.09, přepracováno 16.9.09, přijato 29.10.09.

Klíčová slova: anthronové činidlo, spektrofotometrie, kalibrační faktor, nestrukturní sacharidy, škrob, smrk ztepilý, *Picea abies*, buk, *Fagus sylvatica*, oxid uhličitý.

Úvod

Metoda využívající anthronového činidla je založena na reakci vyšších sacharidů a škrobu s anthronem v kyselém prostředí, při které jsou tyto makromolekulární látky převedeny na šesti-uhlíkaté sacharidy. Vzniká zelený kondenzační produkt, který lze následně spektrofotometricky stanovit¹.

Této skutečnosti poprvé využil Dreywood ke stanovení sacharidů². Na práci Dreywooda navázala řada autorů, z nichž nejznámější a nejvíce citovaní jsou asi Yemm a Willis, kteří se ve své práci věnovali jak důkazu, tak stanovení standardů sacharidů běžně se vyskytujících v rostlinném materiálu¹. Od té doby je anthron hojně využíván jako účinné činidlo jak pro kolorimetrická stanovení sacharidů a škrobu v rostlinách, tak např. pro stanovení sacharidů v krvi, moči nebo míšním moku^{3,4}. Na základě našich znalostí však nikdo neuvádí možnost simultánního stanovení jak sacharidů, tak i škrobu z jednoho vzorku rostlinného materiálu.

Cílem této práce bylo: 1) použití metodik využívajících anthronového činidla pro účel vytvoření metodiky simultánního stanovení nestrukturních sacharidů a škrobu v listech vyšších rostlin, a 2) zhodnotit vliv zvýšené koncentrace CO₂ na akumulaci nestrukturních sacharidů a škrobu v asimilačním aparátu dvou druhů dřevin – smrku ztepilého (*Picea abies*) a buku lesního (*Fagus sylvatica*).

Materiál a metody

Rostlinný materiál

Rostliny smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) Karst.) a buku lesního (*Fagus sylvatica* L.) (stáří 8 let) byly v průběhu vegetační sezóny 2008 aklimovány v lamelových kultivačních sférách v lokalitě Bílý Kříž (Moravskoslezské Beskydy; 49° 30' S, 18° 32' V, 908 m.n.m., Česká republika), v atmosféře s přirozenou koncentrací CO₂ (385 μmol(CO₂) mol⁻¹) a zvýšenou (dvojnásobnou) koncentrací CO₂ (700 μmol(CO₂) mol⁻¹). Podrobný popis experimentu je uveden v publikaci⁵.

Odběr a stanovení obsahu nestrukturních sacharidů a škrobu bylo provedeno v září 2008 na plně vyvinutých slunných listech buku a jehlicích smrku (C-1, jehlice roku 2007). Vzorky listů a jehlic (cca 0,1 g) byly odebrány během poledních hodin (11:00–15:00 LEČ). Po určení čerstvé hmotnosti vzorků byla stanovena i jejich projekční plocha⁶. Vzorky byly vystaveny na 10 min ozáření 1000 μmol m⁻² s⁻¹, zmraženy kapalným dusíkem, vloženy do Dewarovy nádoby (Voyageur 12, Air Liquide, Francie) a při teplotě blízké 77 K převezeny do laboratoře a uchovávány až do doby vlastního zpracování.

Kalibrační přímka

Obsah nestrukturních sacharidů byl stanovován metodou kalibrační přímky sestavené z naměřených hodnot absorpance roztoků směsi standardů D-fruktosy (Roth, Karlsruhe, Německo) a D-glukosy (Penta, Chrudim, ČR) v poměru 9:1 o hmotnostních koncentracích 0; 0,012; 0,024; 0,048; 0,075 a 0,15 mg ml⁻¹ destilované vody. Směrnice kalibrační přímky odpovídá kalibračnímu faktoru v ml mg⁻¹ cm⁻¹ směsi fruktosy a glukosy⁷.

Množství škrobu bylo stanoveno pomocí kalibrační přímky sestavené z naměřených hodnot absorpance roztoků D-glukosy o hmotnostních koncentracích 0; 0,012; 0,024; 0,048; 0,075 a 0,15 mg ml⁻¹ destilované vody. Směrnice kalibrační přímky odpovídá kalibračnímu faktoru v ml mg⁻¹ cm⁻¹ glukosy.

Anthronové činidlo

Anthronové činidlo bylo připraveno rozpuštěním 0,2 g anthronu (Sigma-Aldrich, Praha, ČR) v 8,3 ml 95% ethanolu (Tanda, Olomouc, ČR) a ve 20 ml destilované vody. Poté bylo k roztoku postupně přidáno 100 ml 96% kyseliny sírové (Lachema, Brno, ČR). Roztok je nutné chladit ledem, jelikož se při reakci uvolňuje velké množství tepla. Anthronové činidlo se nedoporučuje používat úplně čerstvé, je lepší ho nechat 3 hodiny stát⁷⁻⁹.

Metodika

Vzorky rostlinného materiálu (cca 0,1 g, viz výše) byly v třecí misce homogenizovány s malým množstvím

MgCO₃ a 2 ml 95% ethanolu. Obsah třecí misky byl převeden do centrifugační zkumavky, třecí miska byla ještě dvakrát promyta 1,5 ml 95% ethanolu a vše bylo převedeno do centrifugační zkumavky. Homogenát byl centrifugován 5 min při 3000 rpm. Takto připravený supernatant lze následně použít např. pro stanovení UV-absorbujících látek a fotosynteticky aktivních pigmentů.

K sedimentu byly přidány 2 ml destilované vody, obsah centrifugační zkumavky byl protřepán a znovu centrifugován 5 min při 3000 rpm. Do odměrné zkumavky byl odlit supernatant obsahující nestrukturní sacharidy. Z důvodu reextrakce nestrukturních sacharidů je třeba zopakovat alespoň ještě jednou předcházející krok.

K sedimentu byl přidán 1 ml 1M roztoku chloralhydrátu (Mach Chemikálie, Ostrava, ČR), obsah centrifugační zkumavky byl protřepán a převeden do teflonových centrifugačních zkumavek o objemu 10 ml (FEP, Nalgene, USA). Zkumavky byly umístěny na 15 min do vroucí vodní lázně, tím došlo k rozpuštění amyloplastů a uvolnění škrobu do roztoku. Po následné centrifugaci (5 min, 3000 rpm) bylo pipetou odebráno 0,5 ml supernatantu obsahujícího škrob, který byl zředěn destilovanou vodou v poměru 1:9.

Při vlastní reakci bylo k 0,5 ml roztoku nestrukturních sacharidů (resp. kalibračního roztoku) přidáno 5 ml anthronového činidla. Vzorky bylo nutné chladit ledem, aby se produkt reakce nerozkládal. Poté byly vzorky zahřívány ve vodní lázni přesně 7,5 min při teplotě 92 °C. Po vyjmutí z vodní lázně byly zchlazeny ledem, promíchány na třepače (IKA MS3 digital, USA) a ponechány při pokojové teplotě.

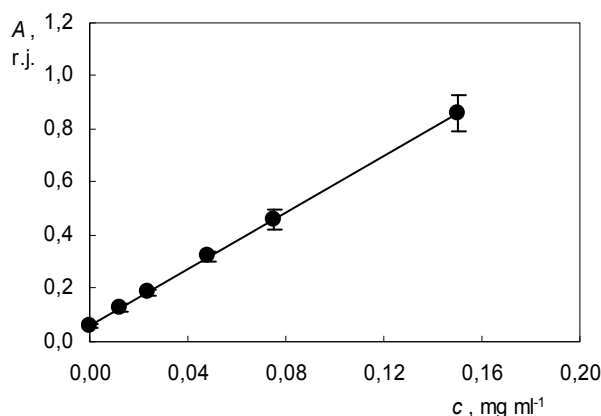
Podobně bylo postupováno při reakci škrobu s athronovým činidlem s tím rozdílem, že k 1 ml roztoku škrobu byly přidány 3 ml anthronového činidla a vzorky byly ponechány ve vroucí vodní lázni 5 min.

Jakmile vzorky dosáhly pokojové teploty, byla změřena jejich absorbance při vlnové délce 625 nm (cit.⁸). K měření absorbance byl použit dvoupraprskový spektrofotometr UV 550 (Unicam, Anglie) a skleněné kyvety (Helma, Německo) o tloušťce 10 mm. Spektrální šířka štěrbin činila 2 nm.

Z naměřených hodnot absorbancí bylo na základě kalibrační křivky směsi fruktosy a glukosy (9:1), resp. kalibrační křivky glukosy stanoveno množství nestrukturních sacharidů, resp. škrobu v použitém rostlinném materiálu. Vypočtené výsledky byly vztaženy na čerstvou hmotnost a projekční plochu vzorků.

Výsledky a diskuse

Pro stanovení nestrukturních sacharidů byla vytvořena závislost absorbance na koncentraci směsi standardů (obr. 1). Vypočítaný koeficient determinace ($R^2 = 0,999$) plně dovoluje uvedenou kalibrační přímku využít pro analytické účely stanovení nestrukturních sacharidů z listů vyšších rostlin. Vzhledem k možnosti používat jako referenční vzorek destilovanou vodu není absolutní člen

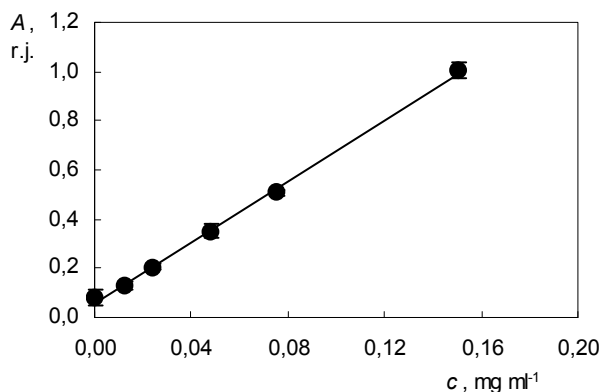


Obr. 1. Kalibrační přímka sestavená z naměřených hodnot absorbancí (A) koncentrační řady směsi standardů D-fruktosy a D-glukosy (v poměru 9:1) o hmotnostních koncentracích 0,150; 0,075; 0,048; 0,024; 0,012 a 0 mg ml⁻¹. Kalibrační faktor v ml mg⁻¹ cm⁻¹ je vyjádřen směrnicí lineární regresní přímky. Uvedeny jsou průměrné hodnoty a směrodatné odchylky ($n=3$), $y = 5,307x + 0,062$, $R^2 = 0,999$

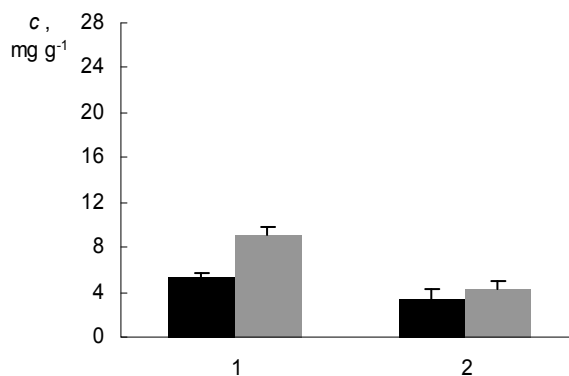
v kalibrační rovnici roven nule, ale nabývá hodnoty +0,052. Tuto hodnotu je nutno odečíst od stanovené absorbance pro neznámý vzorek. Zjištěný kalibrační faktor (5,306 ml mg⁻¹ cm⁻¹), resp. jeho převrácená hodnota (0,18846 mg cm ml⁻¹) dovoluje po vynásobení změřenou absorbancí pro neznámý vzorek určit množství nestrukturních sacharidů v 1 ml extraktu. Po vynásobení celkovým objemem extraktu a dělením hodnotou čerstvé hmotnosti, resp. projekční plochy listů získáme obsah nestrukturních sacharidů v těchto vztažných jednotkách mg g⁻¹, resp. g m⁻². Námí získaná hodnota kalibračního faktoru odpovídá hodnotám uvedeným v dřívějších pracích⁷. Kalibrační přímka byla sestavena i pomocí jednoduššího, jednopaprskového spektrofotometru Specol 220 (Carl Zeiss Jena, Německo) s větší spektrální šířkou štěrbin (3 nm) s obdobným výsledkem (data neuvedena). Pro stanovení nestrukturních sacharidů je tedy možné využít i levnější přístroje. Doporučujeme však možnost takového použití ověřit změřením kalibrační přímky tak, jak je uvedeno výše.

Podobně jako pro stanovení nestrukturních sacharidů byla i pro stanovení škrobu vytvořena závislost absorbance na koncentraci standardu (obr. 2). Vypočítaný koeficient determinace ($R^2 = 0,998$), absolutní člen (+0,059) a kalibrační faktor (6,213 ml mg⁻¹ cm⁻¹), resp. jeho převrácená hodnota (0,16095 mg cm ml⁻¹), dovoluje po vynásobení změřenou absorbancí pro neznámý vzorek určit množství škrobu v 1 ml extraktu a následně i obsah škrobu vztažený na čerstvou hmotnost, resp. projekční plochu listů. Námí získaná hodnota kalibračního faktoru odpovídá hodnotám uvedeným v dřívějších pracích¹⁰.

Tento článek si neklade za cíl vysvětlit příčiny výsledného působení zvýšené koncentrace oxidu uhličitého



Obr. 2. Kalibrační přímka sestavená z naměřených hodnot absorbance (A) koncentrační řady standardu D-glukosy o hmotnostních koncentracích 0,150; 0,075; 0,048; 0,024; 0,012 a 0 mg ml⁻¹. Kalibrační faktor v ml mg⁻¹ cm⁻¹ je vyjádřen směrnici lineární regresní přímky. Uvedeny jsou průměrné hodnoty a směrodatné odchylky ($n=4$); $y = 6,213x + 0,059$, $R^2 = 0,998$

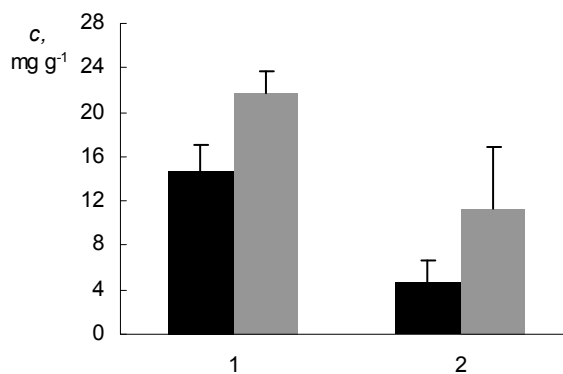


Obr. 3. Obsah nestrukturních sacharidů (1) a škrobu (2) ve slunných jehlicích smrku ztepilého (*Picea abies*), ročník 2007; tmavé sloupce znázorňují rostliny vystavené okolní koncentraci CO₂, světlé sloupce rostliny vystavené zvýšené koncentraci CO₂. Výška sloupců udává průměrné hodnoty, úsečkami jsou vyznačeny směrodatné odchylky ($n=8$)

na asimilační aparát. Má pouze dokumentovat použití našeho přístupu ke stanovení množství nestrukturních sacharidů a škrobu v asimilačním pletivu, jelikož ta významně ovlivňují výslednou fyziologickou odezvu rostlin k působení zvýšené koncentrace CO₂. Použití uvedené metodiky uvádíme na následujících dvou případech, kdy jsme z 0,1 g navážky čerstvé hmotnosti listů simultánně stanovili jak obsah nestrukturních sacharidů, tak i škrobu, a to pro stálezelený smrk a buk. Stanovené a uváděné hodnoty koncentrací řádově odpovídají koncentracím nestrukturních sacharidů a škrobu uváděných v dřívějších pracích pro jiné rostliny^{7,11,12}.

Jak bylo uvedeno výše, výsledky byly vztaženy na čerstvou hmotnost a projekční plochu listů. Vzhledem k tomu, že trend reakce obsahu/koncentrace na zvýšenou koncentraci CO₂ je stejný, uvádíme pouze výsledky koncentrací vztažené na čerstvou hmotnost. Obsah asimilátů byl stanovován v září 2008 u slunných jehlic smrků kultivovaných v přirozené a zvýšené koncentraci CO₂ (obr. 3). Smrky kultivované ve zvýšené koncentraci CO₂ vykazují nárůst jak obsahu nestrukturních sacharidů (o 70 %), tak i obsahu škrobu (o 26 %). Tento výsledek je v dobré shodě s dřívějšími studii zabývajícími se působením zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na asimilační aparát^{11,13}. Akumulace sacharidů a škrobu v rostlinném pletivu pak může být jednou z příčin zpětnovazebné limitace rychlosti fotosyntézy (např. přehledný článek¹⁴).

Ve stejném období bylo provedeno stanovení nestrukturních sacharidů a škrobu ve slunných listech buku, který byl rovněž kultivován v přirozené a zvýšené koncentraci CO₂ (obr. 4). I v tomto případě byl pozorován nárůst obsahu nestrukturních sacharidů (o 49 %) i škrobu (o 145 %). Podobný výsledek byl získán při kultivaci dvou druhů klonů topolů v přirozené a zvýšené koncentraci oxidu uhličitého¹².



Obr. 4. Obsah nestrukturních sacharidů (1) a škrobu (2) ve slunných listech buku lesního (*Fagus sylvatica*); tmavé sloupce znázorňují rostliny vystavené okolní koncentraci CO₂, světlé sloupce rostliny vystavené zvýšené koncentraci CO₂. Výška sloupců udává průměrné hodnoty, úsečkami jsou vyznačeny směrodatné odchylky ($n=8$)

Z výše uvedeného můžeme soudit, že námi použitý přístup, kdy jsme spojili dvě metodiky v jednu simultánní, je možné využít pro stanovení jak nestrukturních sacharidů, tak i škrobu, a to z minimálního množství vzorků (0,1 g čerstvé hmotnosti). Uvedenou metodiku lze navíc aplikovat za použití jednodušších a levnějších spektrofotometrů.

Závěr

Tato práce je zaměřena na vytvoření metodiky pro simultánní stanovení obsahu nestrukturních sacharidů a škrobu v rostlinném pletivu vyšších rostlin. Obě metody jsou založeny na spektrofotometrické analýze zeleného kondenzačního produktu (s maximem absorpance při vlnové délce 625 nm), který vzniká zahříváním sacharidů s anthronem v kyselém prostředí. Byly vytvořeny kalibrační přímky sestavené z průměrných hodnot absorpance čtyř nezávislých měření koncentrační řady roztoků směsi D-fruktózy a D-glukózy (v poměru 9:1) (pro stanovení nestrukturních sacharidů) a D-glukózy (pro stanovení škrobu) v rozmezí hmotnostních koncentrací 0–0,150 mg ml⁻¹. Směrnice kalibrační přímky odpovídá kalibračnímu faktoru. Hodnota kalibračního faktoru činila 5,306 ml mg⁻¹ cm⁻¹ (pro stanovení nestrukturních sacharidů) a 6,213 ml mg⁻¹ cm⁻¹ (pro stanovení škrobu). Vypočítaný koeficient determinace $R^2 = 0,999$, resp. $R^2 = 0,998$, plně dovoluje uvedenou kalibrační křivku využít pro analytické účely stanovení nestrukturních sacharidů, resp. škrobu, v listech vyšších rostlin.

Vytvořená metodika byla aplikována v experimentu studujícím vliv zvýšené koncentrace CO₂ na asimilační aparát buku a smrku. Množství sacharidů a škrobu ve vzorcích buku a smrku bylo vypočteno z příslušných regresních rovnic. Získané hodnoty byly vztaženy na čerstvou hmotnost v mg g⁻¹, resp. projekční plochu listů v g m⁻². Metodika využívající anthronového činidla poskytovala výsledky srovnatelné s literaturou a je tudíž aplikovatelná pro stanovení obsahu sacharidů a škrobu v listech vyšších rostlin.

Tato práce byla vypracována v rámci projektu GA ČR č. 522/06/0930 „Změny aktivity a obsahu enzymu Rubisco při působení zvýšené koncentrace CO₂“ a projektu MŠMT NPVII („INTERVIRON“, 2B06068).

LITERATURA

1. Yemm E. W., Willis A. J.: *Biochem J.* 57, 508 (1954).
2. Dreywood R.: *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.* 18, 499 (1946).
3. Roe J. H.: *J. Biol. Chem.* 208, 889 (1954).
4. Zweens J., Bouman P. R.: *Diabetologia* 4, 278 (1968).
5. Urban O., Janouš D., Pokorný R., Marková I., Pavelka

- M., Fotík Z., Šprtová M., Kalina J., Marek M. V.: *Photosynthetica* 39, 395 (2001).
6. Kalina J., Slovák V.: *Ecology (Bratislava)* 3, 163 (2004).
7. Gloser V., Košovcová M., Gloser J.: *Biologia* 59, 179 (2004).
8. Grospietsch M.: *Symposium o metodách používaných v Česku a na Slovensku při studiu rostlin, Vranovská Ves u Znojma, 3.-6. listopadu 1997*, Sborník příspěvků (Petrášek J. ed.), str. 39. Společnost experimentální biologie rostlin a Ústav experimentální botaniky AVČR, 1997.
9. Teslová P.: *Bakalářská práce*. Ostravská Univerzita, Ostrava 2008.
10. Ghosh A., Charalampous F., Sison Y., Borer R.: *J. Biol. Chem.* 253, 2522 (1960).
11. Zhao D., Reddy K. R., Kakani V. G., Read J. J., Sullivan J. H.: *Plant, Cell Environ.* 26, 771 (2003).
12. Kalina J., Ceulemans R.: *Photosynthetica* 33, 51 (1997).
13. Marek M. V., Kalina J., Matoušková M.: *Photosynthetica* 31, 209 (1995).
14. Urban, O.: *Photosynthetica* 41, 9 (2003).

P. Teslová^a, J. Kalina^a, and O. Urban^b
^a*Department of Physics, Faculty of Science, University of Ostrava, Ostrava,* ^b*CzechGlobe – Center for Global Climate Change Impacts Studies, Laboratory of Ecological Physiology of Plants, Institute of Systemic Biology and Ecology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno): Simultaneous Determination of Non-Structural Saccharides and Starch in Leaves of Higher Plants Using Anthrone Reagent*

This review is focused on development of simultaneous determination of non-structural saccharides and starch in leaves of higher plants. The method is based on spectrophotometric analysis of the condensation product obtained by heating saccharides or starch with anthrone in acid solution. The determination was calibrated using D-fructose and D-glucose ($R^2 = 0.999$ and 0.998). The method was used for the determinations in leaves of European beech and in needles of Norwegian spruce cultivated under ambient conditions at elevated CO₂ concentrations. The found contents were comparable with the literature values.