

# THE INFLUENCE OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF CADMIUM AND LEAD ON EARLY SOMATIC EMBRYOS OF SPRUCE (*PICEA* SPP.)

## VLIV RŮZNÝCH KONCENTRACÍ KADMIA A OLOVA NA RANÁ SOMATICKÁ EMBRYA SMRKU (*PICEA* SPP.)

Petřek J.<sup>1)</sup>, Víteček J.<sup>1)</sup>, Petrlová J.<sup>2)</sup>, Havel L.<sup>1)</sup>, Mikelová R.<sup>2,3)</sup>, Baloun J.<sup>1)</sup>, Adam V.<sup>2,4)</sup>, Kizek R.<sup>2)</sup>

<sup>1</sup>Department of Plant Biology and <sup>2</sup>Department of Chemistry and Biochemistry, Mendel University of Agriculture and Forestry, Zemedelska 1, 611 37 Brno, Czech Republic

<sup>3</sup>Department of Theoretical and Physical Chemistry, and <sup>4</sup>Department of Analytical Chemistry, Masaryk University Faculty of Science, Kotlarska 2, 611 37 Brno, Czech Republic

E-mail: j.petrek@email.cz, kizek@sci.muni.cz

---

### ABSTRACT

In our work we aimed on study of growth and viability of early somatic embryos of spruces (ESEs) treated by heavy metals (cadmium and lead) for twelve days. Particularly, we studied the influence of three concentrations (50, 250 and 500  $\mu\text{M}$ ) of cadmium ( $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ ) and lead ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ) on growth and viability of early somatic embryos (ESEs) cultures of Norway spruce (*Picea abies*) and blue spruce (*Picea pungens*). We used a charge-coupled device (CCD) camera and computer programs GRAB-IT and Image-Pro for observation of growth of spruce ESEs culture. The images of ESEs clusters were recorded at the beginning of the cultivation and in certain intervals according to the end of the cultivation. The viability of ESEs was determined using fluorescence microscopy by double staining with fluorescein diacetate (FDA) and propidium iodide (PI). We found out that increase in ESEs clusters area decreased with increasing cadmium concentration and lead concentration. Investigations of plant cell viability indicated that the higher the concentration of cadmium/lead in the culture medium, the higher the number of dead cells. The attendance of heavy metals in plant cell activates defending mechanisms. They start synthesis of cysteine-containing compounds (e.g. glutathione and phytochelatins) used in detoxification processes. At the end we studied the effect of cadmium and lead on content of these thiol compounds of ESEs of spruce (*Picea* spp.).

**Keywords:** Norway spruce, blue spruce, *Picea abies*, *Picea pungens*, early somatic embryo, cadmium, lead, image analysis, plant cell viability, thiols.

### ABSTRAKT

V naší práci jsme se zaměřili na růst a životnost raných somatických embryí (RSE) smrku, která byla vystavena působení těžkého kovu (kadmium a olovo) po dobu dvanácti dnů. Konkrétně jsme studovali vliv tří různých koncentrací (50, 250 a 500  $\mu\text{M}$ ) kadmia ( $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ ) a olova ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ) na růst a životnost kultury raných somatických embryí smrku ztepilého

(*Picea abies*) a smrku pichlavého (*Picea pungens*). Ke zjištění růstu kultury RSE smrku jsme využili CCD-kameru a programy GRAB-IT a Image-Pro. Snímky shluků raných somatických embryí (SRSE) byly pořizovány na začátku kultivace a dále v jednotlivých intervalech měření. Životnost RSE byla stanovena pomocí fluorescenčního mikroskopu testem „dvojitého barvení“ fluoresceindiacetátem (FDA) a propidium jodidem (PI). Zjistili jsme, že se stoupající koncentrací iontů kadmia a olova v médiu klesá průměrný přírůstek plochy raných somatických embryí. Při stanovení životnosti roste počet mrtvých buněk s rostoucí koncentrací iontů kadmia/olova v médiu. Přítomnost těžkých kovů v rostlinné buňce aktivuje obranné mechanismy a ty startují syntézu obranných látek bohatých na cystein (glutathion a fytochelatin), které jsou využity v detoxikačních procesech. Dále jsme tedy studovali vliv kadmia a olova na obsah výše zmíněných thiolových sloučenin v RSE smrku (*Picea* spp.).

**Klíčová slova:** smrk ztepilý, smrk pichlavý, *Picea abies*, *Picea pungens*, rané somatické embryo kadmium, olovo, analýza obrazu, životnost rostlinných buněk, thioly.

## ÚVOD

Studium vlivu těžkých kovů na smrk je v přirozených podmínkách velmi náročné, proto se hledají možnosti, jak tento výzkum co nejvíce zjednodušit. Jednou z možností je studium explantátových kultur. V našem případě byly využity kultury raných somatických embryí (RSE) smrku ztepilého a smrku pichlavého. Byla prokázána značná podobnost mezi vývojem a strukturou RSE a raných zygotických embryí /1/, proto je možné použít kulturu RSE jako odvozenou modelovou kulturu, u které se dají předpokládat podobné fyziologické odpovědi jako u zygotické embryogeneze.

Při somatické embryogenezi vznikají embrya ze somatických (tělních) buněk. Charakteristické rysy vzniku raných somatických embryí u jehličnanů byly popsány mnoha autory /2-10/. Raná somatická embrya smrku (RSE) se skládají z embryonální skupiny, embryonálních tubulárních buněk a embryonálního suspenzoru. Buňky embryonální skupiny se stále dělí a jejich prodlužováním na distálním konci vznikají tubulární buňky, z nichž vzniká embryonální suspenzor, jehož buňky jsou uvolňovány do média /2, 11/. Dochází tak k neustálému oddělování nových tubulárních a suspenzorových buněk směrem od embryonální skupiny a tvoří se shluk raných somatických embryí (SRSE). Shluky raných somatických embryí jsou kultivovány v Petriho misce na kultivačním médiu.

Jako vhodný nástroj pro sledování růstu kultur RSE smrku se ukázala být analýza obrazu (IA). Vzhledem ke své jednoduchosti a dobré reprodukovatelnosti je použitelná pro studium somatické embryogeneze také u řady jiných rostlinných druhů. Své uplatnění našla také v případě automatického sledování produkce somatických embryí /12/ případně tvaru, velikosti nebo barvy kultury. Metoda nachází uplatnění při studiu suspenzních kultur i kultur rostoucích na tuhých a polotuhých médiích /13/. Před použitím IA při experimentu je nutné nejdříve optimalizovat nastavení CCD kamery a podmínky, za kterých experiment probíhá /14, 15/.

Pro stanovení viability bylo využito tzv. „testu dvojitého barvení“, který je založen na selektivní permeabilitě cytoplazmatické membrány, například pro propidium jodid - PI. Jiné metody využívání enzymové aktivity v živých buňkách (fluoresceindiacetát /FDA/ je štěpen esterázami na detekovatelný fluorescein a zbytky kyseliny octové). Dále je možné sledovat funkční metabolismus buněk. Jednu z možností představují intracelulární esterázy. Esterázy katalyzují hydrolytické štěpení molekul jednoduchých esterů obsahujících krátké uhlíkaté řetězce /16/. V rostlinných buňkách a pletivech se účastní mnoha biochemických dějů, např. výstavby buněčné stěny /17/, degradace některých xenobiotik /18, 19/ a signálních procesů /20/. Z výše uvedeného vyplývá, že esterázy představují značný potenciál pro rostlinné biotechnologie. Díky své souvislosti s buněčným metabolismem slouží esterázy jako ukazatel životaschopnosti (viability). Kromě toho některé práce upozornily na fakt, že je aktivita intracelulárních esteráz buněčné suspenze přímo úměrná počtu živých buněk /21/.

Cílem práce bylo sledování vlivu těžkých kovů na kulturu raných somatických embryí smrku. Zaměřili jsme se především na vliv těžkých kovů na růst a životnost kultury. Dále jsme se snažili stanovit kadmium a olovo v biologickém vzorku. A proto je potřebné vyvíjet přesné analytické metody s nízkými limity detekce pro stanovení těžkých kovů v biologických, environmentálních i potravinářských vzorcích /22-26/. Nejběžněji využívané techniky pro stanovení těžkých kovů jsou atomová absorpční spektrometrie s atomizací v plameni a nebo v grafitové kyvetě. Pro velmi přesné stanovení se používá atomová absorpční spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem /27-31/. Mezi vysoce senzitivní techniky také patří elektroanalytické postupy s detekčními limity v nM a pM koncentracích. Diferenční pulzní voltametrie v kombinaci s anodickým rozpouštěním patří mezi nejcitlivější elektroanalytické metody využívané pro detekci těžkých kovů /26, 32/. Stanovení těžkých kovů bylo provedeno právě pomocí diferenční pulzní anodické rozpouštěcí voltametrie (DPASV). Kromě těžkých kovů lze u rostlin stanovit také thiolové sloučeniny, jako jsou glutathion a fytochelatiny /32-35/, jejichž syntézou se rostliny intenzivně brání proti působení těžkých kovů. Mechanismy detoxikace a metabolismu toxických těžkých kovů jsou intenzivně studovány u různých organismů již po mnoho let /36-40/. Výsledky těchto studií přispívají nejen k lepšímu pochopení základních biologických mechanismů probíhajících v živých organismech, ale také při tvorbě nových biotechnologických postupů a zařízení.

## MATERIÁL A METODIKA

### Rostlinný materiál

Byly využity kultury raných somatických embryí smrku ztepilého (*Picea abies* /L./ Karst.), klony 2/32 a 3/5 H, a smrku pichlavého (*Picea pungens* Engelm.), klon PE 14. Klony 2/32 a 3/5 H pochází ze smrku ztepilého horského klimaxového typu z pokusné plochy v Beskydách. Klon PE 14 byl odvozen ze smrku pichlavého, byla použita zralá semena ze vzrostlého stromu *Picea pungens* Engelm. 'Argentea' v areálu Mendlovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně. Kultury jsou udržovány za striktně sterilních podmínek (flow box Galaire HF 36) tím způsobem, že se vždy po 14 dnech kultivace pasážují. Při pasáži jsou z horních partií shluků raných somatických embryí (SRSE) odebírány části s vyvinutými

skupinami embryonálních buněk o hmotnosti přibližně 2,5 – 5,0 mg a přenášeny na novou Petriho misku s LP/2 médiem. SRSE jsou kultivovány ve tmě při teplotě  $23 \pm 2$  °C. Při experimentech byly SRSE kultivovány ve sterilních plastových Petriho miskách (průměr 90 mm, 30 ml LP/2 média). Na jednu misku připadlo vždy 10 SRSE.

### **Kultivační médium**

Všechny výše uvedené kultury jsou dlouhodobě kultivovány na kultivačním médiu LP/2 /11/, které je modifikováno 9  $\mu\text{M}$  2,4-dichlorfenoxycetovou kyselinou a 4,4  $\mu\text{M}$  benzylaminopurinem /7/. Při přípravě kultivačního média byly anorganické i organické složky rozpuštěny v deionizované destilované vodě, pH bylo upraveno na hodnotu 5,7 – 5,8 pomocí KOH/HCl (pH metr Schott CG 842). Následně byla anorganická část média sterilizována při teplotě 121°C a tlaku 100 kPa po dobu 30 minut (Tuttnauer 3870 EA); organická část byla sterilizována membránovou filtrací (Whatman Puradisc 25 AS 0,2  $\mu\text{m}$ ).

Při pokusech byly využity modifikace média. Do základního média byl přidán chelát olova (Pb-EDTA) a chelát kadmia (Cd-EDTA) v koncentracích 50  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  a 500  $\mu\text{M}$ . Roztok Pb-EDTA byl připraven podle /41/. Zásobní roztok  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  ( $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ ) byl smíchán s kyselinou etylendiamintetraoctovou (EDTA) v poměru 1:1 při teplotě 50°C po dobu 1 h. Komplex Pb-EDTA (Cd-EDTA) byl přidán k anorganické části kultivačního média.

### **Analýza obrazu SRSE**

Pro zjištění plochy jednotlivých SRSE byla nutná digitalizace obrazu každé Petriho misky. Digitalizace byla prováděna pomocí kamery CCD Sony (UPV-GDS 8 000) a programu GRAB-IT. Pro vyhodnocení jednotlivých ploch byl využit program IMAGE – PRO. Plochy byly zjišťovány na začátku a poté v průběhu experimentu. Údaje byly dále zpracovány v programu Microsoft Excel; výsledkem byl průměrný přírůstek SRSE.

### **Stanovení životnosti pomocí fluorescenčních barviv**

Současně s růstem SRSE byla sledována životnost embryí. Pro vlastní sledování životnosti buněk bylo využito barvení fluorescenčními barvivy – propidium jodidem (PI) a fluoresceindiacetátem (FDA) podle metody /42/. PI není propouštěn přes cytoplazmatickou membránu dovnitř živé buňky. V případě mrtvé buňky, která má nefunkční cytoplazmatickou membránu, se dostává dovnitř a způsobuje červené fluorescenční zbarvení. FDA je v živých buňkách štěpen na octan a fluorescein, který vydává zelené fluorescenční zbarvení. Při vlastním barvení byla odebrána horní část SRSE, která byla umístěna na podložní sklíčko a následně byla zakápnuta suspenzí (37  $\mu\text{l}$  destilované, 10  $\mu\text{l}$  PI a 3  $\mu\text{l}$  FDA) /43/. Po pěti minutách inkubace se připravený preparát pozoroval pomocí inverzního fluorescenčního mikroskopu Olympus AX 70 při zvětšení 4 x 10 a 10 x 10. Pro pozorování bylo využito filtru WU, excitace při vlnové délce 330 – 385 nm. Při sledování preparátů byla pořízena jejich fotodokumentace digitálním fotoaparátem Olympus Camedia C-4040 ZOOM. Životnost byla

vypočítána pomocí analýzy obrazu; program IMAGE – PRO vypočítal zastoupení červeně a zeleně zbarvených buněk, tedy buněk mrtvých a živých.

### **Stanovení životnosti pomocí aktivity intracelulárních esteráz**

SRSE byly odebrány z pevného média, následně byly promyty 50 mM fosfátovým pufrům (pH 8,7) a byly uchovávány při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po rozmrazení byly vzorky doplněny na celkový objem 1 ml extrakčním pufrům (250 mM fosfátový pufr, pH 8,7) a dithiothreitem (DTT, cílová koncentrace 1 mM) a desintegrovány ve skleněném pístovém homogenizátoru (Kavalier, Česká republika), uloženém v ledové lázni po dobu 10 min. Získané rostlinné homogenáty byly umístěny v ledu do ultrazvukové lázně po dobu 1 min. a poté byly centrifugovány (10 000 g, 15 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Alikvot supernatantu byl přidán do reakční směsi obsahující fosfátový pufr (1 M, pH 8,7) a 5 mM FDA, jehož zásobní roztok v bezvodém acetonu byl uchováván v uzavřených nádobkách při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Množství acetonu v reakční směsi nepřekročilo 1 % (v/v). Po 15 minutové inkubaci v termostatu při  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  byla změřena fluorescence (RF-551, Shimadzu Scientific Instruments Inc., USA) – excitace 490 nm / emise 514 nm. Aktivita esteráz v IU (jedna mezinárodní jednotka uvolní při výše uvedených podmínkách 1  $\mu\text{mol}$  fluoresceinu za minutu).

### **Elektrochemická analýza**

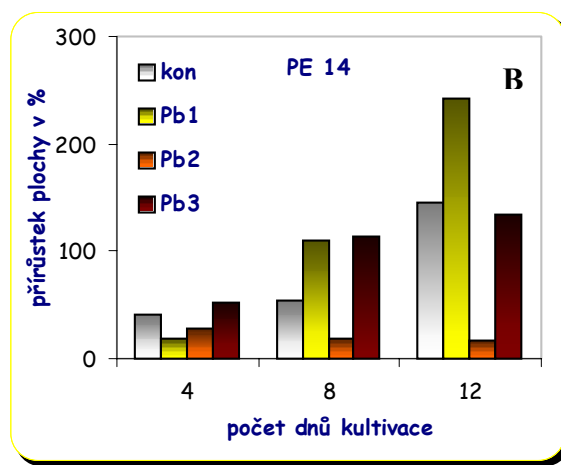
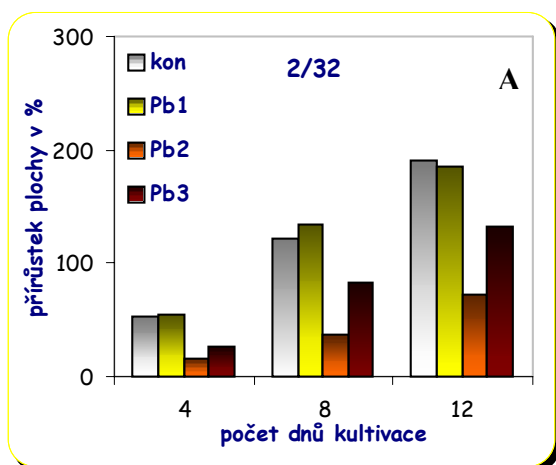
DPASV analýza byla prováděna pomocí elektrochemického analyzátoru AUTOLAB (EcoChemie, Netherlands) v zapojení s tříelektrodovou celou VA-Stand 663 (Metrohm, Switzerland). Byla použita pracovní elektroda – HMDE (plocha rtuťové kapky:  $0.4\text{ mm}^2$ ), referentní elektroda (Ag/AgCl, 3 M KCl) a uhlíková tyčinka jako pomocná elektroda. Získaná data byla upravena matematickou korekcí podle algoritmů navržených Savitzkym a Golayem implementovaných do GPES softwaru (EcoChemie). Experimenty byly prováděny při laboratorní teplotě, v potenciálovém rozsahu od  $-1,2\text{ V}$  do  $+0,1\text{ V}$ , potenciálový krok  $1,05\text{ mV}$ , pulzní amplituda  $25,05\text{ mV}$ , časový interval  $0,2\text{ s}$ , doba akumulace  $240\text{ s}$ , potenciál akumulace  $-1,1\text{ V}$ . Jako základní elektrolyty byl použit acetátový pufr ( $0,2\text{ M CH}_3\text{COOH} + 0,2\text{ M CH}_3\text{COONa}$ ) a  $0,1\text{ M KCl}$ . Stanovení thiolových sloučenin bylo provedeno pomocí techniky adsorptivní přenosové rozpouštěcí diferenční pulzní voltametrie (AdTS DPV) - Brdičkova reakce. Při této metodě je na povrch pracovní elektrody (rtuťové kapková elektroda) adsorbován fytochelatin (PC) z velmi malého množství vzorku ( $3\text{--}5\text{ }\mu\text{l}$ ). Přebytké množství fytochelatinu bylo z povrchu pracovní elektrody odmyto přenesením elektrody do vody a následně do roztoku základního elektrolytu.

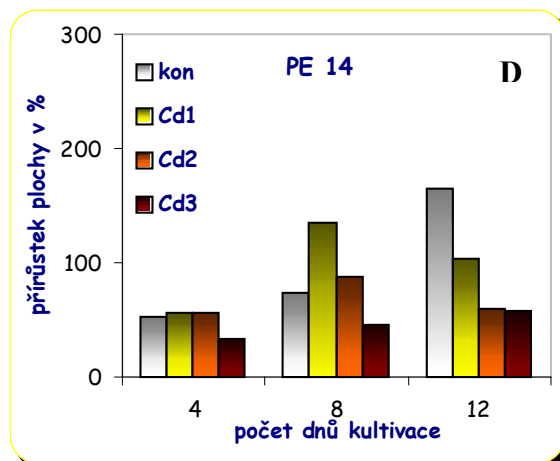
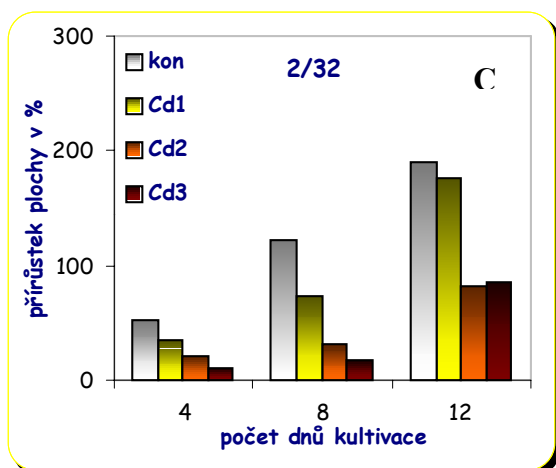
## **VÝSLEDKY A DISKUZE**

Byl sledován vliv iontů těžkých kovů na kultury raných somatických embryí (RSE) smrku ztepilého (*Picea abies* /L./ Karst.), klony 2/32 a 3/5 H, a smrku pichlavého (*Picea pungens* Engelm.), klon PE 14. Růst kultur a odumírání RSE bylo studováno při třech koncentracích  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  a  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  v kultivačním médiu. Základními parametry pro

sledování vlivu abiotických a biotických stresů na kulturu RSE smrku je růstová křivka a životnost. Abychom mohli sledovat růst kultur a srovnat jednotlivé varianty s těžkými kovy, musíme využít objektivní metody, které toto umožní. Jednou z vhodných metod, která charakterizuje růst kultur RSE smrku, je metoda analýzy obrazu (image analysis, IA). Pomocí této metody byly zjištěny plochy jednotlivých shluků raných somatických embryí, které dávají základní informaci o průběhu jejich růstu. IA je analytický nástroj při studiu růstu buněčných kultur. Vzhledem ke své jednoduchosti a dobré reprodukovatelnosti je použitelná pro studium somatické embryogeneze u řady rostlinných druhů. IA se ukázala být vhodnou alternativní metodou pro stanovení růstu k metodě gravimetrické, která je při stanovení nejčastěji využívána. Pomocí IA lze stanovit plochu (přírůstek plochy za čas) RSE bez zasahování do kultivovaného biologického materiálu, a tím nedochází k destrukci nebo kontaminaci kultury (u gravimetrické metody nelze zajistit). Nevýhodou IA zůstává nesprávné vyjádření růstu kultur, neboť SRSE smrku jsou prostorové útvary, a proto vyjádření jejich růstu pomocí plochy je nepřesné. Z tohoto důvodu byla IA porovnána s klasickou metodou sledující růst biologického materiálu – vážením (gravimetrická metoda) /14/. Z výsledků byl patrný podstatný rozdíl mezi přírůstky plochy a hmotnosti. Po dobu 14 dnů (běžná doba kultivace) ovšem mají růstové křivky získané oběma metodami stejný charakter, proto lze vážení nahradit analýzou obrazu, která je pro stanovení růstu kultury RSE smrku vhodnější.

Po vybrání vhodné metody pro stanovení růstu jsme již mohli přistoupit ke sledování vlastního vlivu těžkých kovů (Pb-EDTA, Cd-EDTA) na kulturu RSE. Na Obr. 1A,B je ukázán vliv Pb-EDTA a na Obr. 1C,D vliv Cd-EDTA na jednotlivé SRSE smrku ztepilého 2/32 a smrku pichlavého PE 14. Sledovali jsme růst jednotlivých SRSE v přítomnosti těžkých kovů. Nejnižší aplikovaná koncentrace kopírovala průběh růstu kontrolních SRSE, při koncentraci 250  $\mu\text{M}$  došlo k výrazné růstové depresi. U koncentrace 500  $\mu\text{M}$  jsme opakovaně pozorovali výrazný efekt zvětšení plochy SRSE, což je pravděpodobně způsobeno zvýšeným příjmem vody do SRSE, který se tak patrně snaží snížit koncentraci těžkého kovu uvnitř shluku.





Obr. 1: Vliv těžkých kovů na růst SRSE smrku;  
koncentrace těžkých kovů (Pb-EDTA, Cd-EDTA) v kultivačním médiu 0, 50, 250 a 500  $\mu$ M.  
(A) Vliv Pb-EDTA na růst SRSE klonu 2/32;  
(B) Vliv Pb-EDTA na růst SRSE klonu PE 14;  
(C) Vliv Cd-EDTA na růst SRSE klonu 2/32;  
(D) Vliv Cd-EDTA na růst SRSE klonu PE 14.

Další možností, jak sledovat vliv těžkých kovů na kulturu RSE smrku, je stanovení životnosti kultury. Životnost RSE smrku byla stanovena pomocí a) tzv. dvojitého barvení fluorescenčními barviv – fluoresceindiacetátem (FDA) a propidium jodidem (PI) a b) sledováním funkčního metabolismu buněk pomocí intracelulárních esteráz. Při sledování životnosti RSE byl zjištěn očekávaný průběh, tedy maximální toxicita u nejvyšší aplikované koncentrace (u stanovení životnosti pomocí fluorescenčních barviv) a snižující se aktivita intracelulárních esteráz se stoupající koncentrací těžkého kovu v kultivačním médiu.

Zdrojem těžkého kovu v médiu byl chelát (Cd-EDTA, Pb-EDTA), neboť při využití solí těžkých kovů (dusičnany, sírany, acetáty) docházelo k reakcím s ostatními složkami média a výsledná koncentrace těžkého kovu v médiu tak byla nejistá [32]. Vhodnost chelátu byla prokázána v některých pracích [14, 41, 44, 45]. Ke zjištění stanovení množství kadmia a olova v biologickém vzorku byla využita diferenční pulzní anodická rozpouštěcí voltametrie (DPASV). Tato metoda patří mezi nejcitlivější elektroanalytické metody využívané pro detekci těžkých kovů [26, 32]. Množství Pb detekované v SRSE je velmi nízké (v desítkách až stovkách pg Pb na 100 mg), ale jeho množství postupně se zvyšující se koncentrací narůstá. Při aplikované externí koncentraci 50 a 250  $\mu$ M jsme pozorovali postupnou zvyšující hladinu olova v SRSE, tato hladina se však v čase od 96 h měnila velmi zvolna. U koncentrace 500  $\mu$ M byl pozorován lineární vzestup množství Pb v SRSE. Tyto pozorované efekty pravděpodobně souvisí s aktivitou detoxikačních mechanismů buněk a jejich schopností přežít v prostředí v přítomnosti Pb.

Kromě těžkých kovů lze u rostlin stanovit také thiolové sloučeniny, jako jsou glutathion a fytochelatiny [32-35], jejichž syntézou se rostliny intenzivně brání proti působení

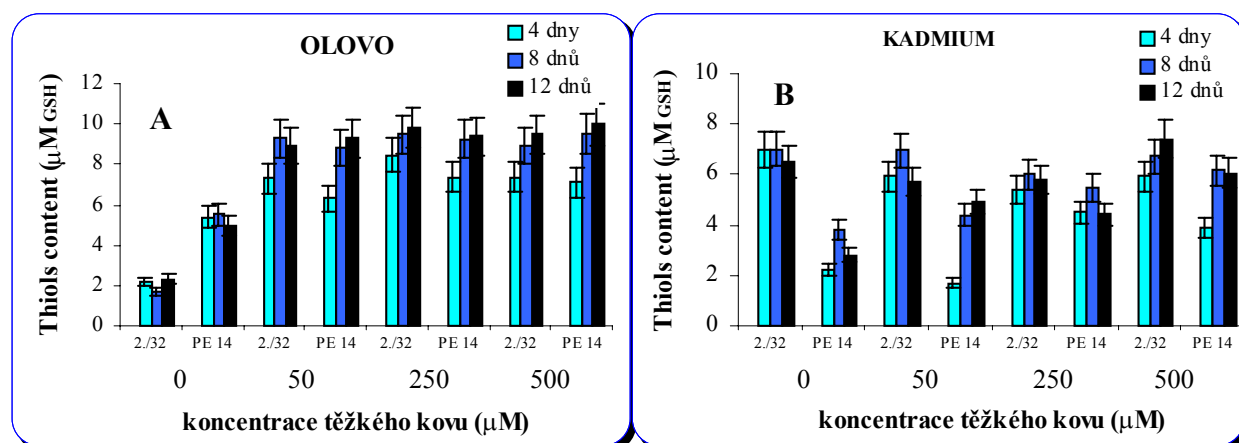
těžkých kovů. Mechanismy detoxikace a metabolismu toxických těžkých kovů jsou intenzivně studovány u různých organismů již po mnoho let. Dále jsme tedy studovali vliv kadmia a olova na obsah výše zmíněných thiolových sloučenin v RSE smrku (*Picea* spp.). Stanovení thiolových sloučenin bylo provedeno pomocí techniky adsorptivní přenosové rozpouštěcí diferenční pulzní voltametrie (AdTS DPV) - Brdičkova reakce. Na získaných voltamogramech byly pozorovány elektrochemické odezvy v podobě pěti thiolových signálů – Co<sub>1</sub>, RS<sub>2</sub>Co, Cat<sub>1</sub>, Cat<sub>2</sub> a Cat<sub>3</sub>. Signál Co<sub>1</sub> odpovídal redukci Co<sup>2+</sup> na Co<sup>0</sup> (~ -1,0 V), signál komplexu kobaltu s fytochelatinem označený jako RS<sub>2</sub>Co (~ -1,2 V) a další tři katalytické píky Cat<sub>1</sub> (-1,2 V); Cat<sub>2</sub> (-1,3 V) a Cat<sub>3</sub> (-1,4 V) [23]. Redukční signál kobaltu(II), který je pozorován v základním elektrolytu při potenciálu -1,2 V, se posouvá v přítomnosti fytochelatinu směrem do pozitivních potenciálů. Pozorované změny signálu souvisí s vazbou kobaltových komplexů do struktury PC za vzniku specifického komplexu RS<sub>2</sub>Co. Navíc jsme sledovali rozdíly v potenciálech a výškách katalytických signálů mezi glutathionem a fytochelatinem. Změny pravděpodobně souvisí s rozdílnou chemickou strukturou studovaných peptidů. Obsah studovaných thiolových sloučenin ve SRSE roste se zvyšující se koncentrací těžkého kovu v kultivačním médiu a s dobou kultivace (od 30 μM do 95 μM) (Obr. 2 A,B).

Obr. 2: Vliv těžkých kovů na obsah thiolových látek ve SRSE;

koncentrace těžkých kovů (Pb-EDTA, Cd-EDTA) v kultivačním médiu 0, 50, 250 a 500 μM.

(A) Vliv Pb-EDTA na obsah thiolových látek ve SRSE;

(B) Vliv Cd-EDTA na obsah thiolových látek ve SRSE.



## ZÁVĚR

Cílem práce bylo sledování vlivu iontů těžkých kovů na kultury raných somatických embryí smrku. Byl sledován růst a odumírání raných somatických embryí při třech koncentracích olova a kadmia (50 μM, 250 μM a 500 μM) v médiu. U sledovaných klonů byly pozorovány podobné reakce na přítomnost iontů těžkého kovu v médiu. Se zvyšující se

koncentrací iontů těžkého kovu a s dobou kultivace klesal průměrný přírůstek plochy SRSE. Pozorování životnosti buněk ukázalo, že s rostoucí koncentrací iontů těžkého kovu v médiu roste množství mrtvých buněk. Dále bylo stanoveno Pb detekované v SRSE. Jeho množství je velmi nízké (v desítkách až stovkách pg Pb na 100 mg), ale postupně narůstá se zvyšující se koncentrací. Spolu s množstvím těžkého kovu jsme se zajímali o obsah thiolových sloučenin ve SRSE, jejichž syntézou se rostliny intenzivně brání proti působení těžkých kovů. Zjistili jsme, že obsah studovaných thiolových sloučenin ve SRSE roste se zvyšující se koncentrací těžkého kovu v kultivačním médiu a s dobou kultivace (od 30  $\mu$ M do 95  $\mu$ M). Získané výsledky mohou být využity k dalšímu studiu vlivu těžkých kovů na somatickou embryogenezi smrku ztepilého a smrku pichlavého a při studiu jejich obranných reakcí.

### Poděkování

*Práce na tomto projektu byla podporována granty: GAČR 525/04/P132 a IGA MZLU 250061/2005.*

### LITERATURA

- /1/ NAGMANI, R. a kol.: Anatomical comparison of somatic and zygotic embryogeny in conifers, in Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Jain, S. M. a kol., Editors. 1995, Kluwer Academic Publ.: Dordrecht, Boston, London. s. 23-48.
- /2/ DURZAN, D. J. a kol., Latent diploid parthenogenesis and parthenote cleavage in egg-equivalents of norway spruce. Int. J. Plant Sci., 1994, 155, s. 677-688.
- /3/ DURZAN, D. J., Protein ubiquitination in diploid parthenogenesis and early embryos of Norway spruce. Int. J. Plant Sci., 1996, 157, s. 17-26.
- /4/ GUPTA, P. K. and DURZAN, D. J., Somatic polyembryogenesis from callus of mature sugar pine embryos. Bio-Technol., 1986, 4, s. 643-645.
- /5/ GUPTA, P. K. a kol., Somatic proembryo formation and transient expression of a luciferase gene in douglas-fir and loblolly-pine protoplasts. Plant Sci., 1988, 58, s. 85-92.
- /6/ HAVEL, L. and DURZAN, D. J., Apoptosis in plants. Bot. Acta, 1996, 109, s. 268-277.
- /7/ HAVEL, L. and DURZAN, D. J., Apoptosis during diploid parthenogenesis and early somatic embryogenesis of Norway spruce. Int. J. Plant Sci., 1996, 157, s. 8-16.
- /8/ HAVEL, L. and DURZAN, D. J.: Apoptosis during early somatic embryogenesis in Picea spp., in Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Jain, S. M. a kol., Editors. 1999, Kluwer Acad. Publ.: Dordrecht, Boston, London. s. 125-147.
- /9/ JOKINEN, K. J. and DURZAN, D. J., Properties of rescued embryonal suspensor mass of Norway spruce (Picea abies L. Karst.) determined by the genotype and environment in vitro. Silva Fenn., 1994, 28, s. 95-106.
- /10/ STASOLLA, C. and YEUNG, E. C., Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. Plant. Cell. Tiss. Org. Cultur., 2003, 74, s. 15-35.
- /11/ VON ARNOLD, S. J., Improved efficiency of somatic embryogenesis in mature embryos of Picea abies (L.). Plant Physiol., 1987, 127, s. 233-244.
- /12/ IBARAKI, Y. and KURATA, K., Automation of somatic embryo production. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 2001, 65, s. 179-199.

- /13/ IBARAKI, Y. and KENJI, K., Application of image analysis to plant cell suspension cultures. *Comput. Electron. Agric.*, 2001, 30, s. 193–203.
- /14/ PETŘEK, J. a kol., Computer processing for image analysis of early somatic embryos growth of Norway spruce (*Picea abies* /L./ Karst.). MendelNET Brno, 2003.
- /15/ PETŘEK, J. a kol., nepublikované výsledky (2005).
- /16/ BORNSCHEUER, U. T., Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 2002, 26, s. 73-81.
- /17/ WILLATS, W. G. T. a kol., Modulation of the degree and pattern of methyl-esterification of pectic homogalacturonan in plant cell walls. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, s. 19404-19413.
- /18/ CUMMINS, I. a kol., Biochemical characterisation of esterases active in hydrolysing xenobiotics in wheat and competing weeds. *Physiol. Plant.*, 2001, 113, s. 477-485.
- /19/ SANDERMANN, H., Plant metabolism of xenobiotics. *Trends Biochem Sci*, 1992, 17, s. 82-84.
- /20/ STUHLFELDER, C. a kol., Purification and partial amino acid sequences of an esterase from tomato. *Phytochemistry*, 2002, 60, s. 233–240.
- /21/ VÍTEČEK, J. a kol., Esterases as a marker for growth of BY-2 tobacco cells and early somatic embryos of the Norway spruce. *Plant Cell Organ and Tissue Culture*, 2004, 79, s. 195-201.
- /22/ KIZEK, R. a kol., Silver electrode as a sensor for determination of zinc in cell cultivation medium. *Anal. Biochem.*, 2002, 301, s. 8-13.
- /23/ KIZEK, R. a kol., Application of catalytic reactions on a mercury electrode for metallothionein electrochemical detection. *Chem. Listy*, 2004, 98, s. 160-167.
- /24/ LOCATELLI, C. a kol., Determination of heavy metals in environmental bio-indicators by voltammetric and spectroscopic techniques. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1999, 363, s. 662-666.
- /25/ LOCATELLI, C. and TORSI, G., Voltammetric trace metal determinations by cathodic and anodic stripping voltammetry in environmental matrices in the presence of mutual interference. *J. Electroanal. Chem.*, 2001, 509, s. 80–89.
- /26/ LOCATELLI, C. and TORSI, G., Simultaneous square wave anodic stripping voltammetric determination of Cr, Pb, Sn, Sb, Cu, Zn in presence of reciprocal interference: application to metal matrices. *Microchemical Journal*, 2004, 78, s. 175-180.
- /27/ XU, F. a kol., Review of chemical and biological speciation analyses for Se. *Spectroscopy and spectral analysis*, 2002, 22, s. 331-340.
- /28/ TAKEUCHI, M. a kol., Determination of organotin compounds in environmental samples. *Anal. Sci.*, 2000, 16, s. 349-359.
- /29/ SZPUNAR, J., Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques. *Analyst*, 2000, 125, s. 963–988.
- /30/ BI, S. P. a kol., Analytical methodologies for aluminium speciation in environmental and biological samples - a review. *Fres. J. Anal. Chem.*, 2001, 8, s. 984-996.
- /31/ FERNANDES, A. P. a kol., Potentialities and applications of ammonium diethyl dithiophosphate in chemical analyses. *Ecletica Quimica*, 2001, 26, s. 211-222.
- /32/ VACEK, J. a kol., Electrochemical determination of lead and thiols in a culture of Norway spruce. *Bioelectrochemistry*, 2004, 62, s. 1-5.
- /33/ ZAHRADNICEK, J. a kol., The weed beet, its metabolism and technological quality. *Listy Cukrov*, 2003, 119, s. 243-245.
- /34/ ZAHRADNICEK, J. a kol., Metabolism of sugar beet. *Listy Cukrov*, 2004, 120, s. 55-58.

- /35/ KLEJDUS, B. a kol., Sub-picomolar HPLC/MS determination of glutathione in the maize (*Zea mays* L.) kernels exposed by cadmium. *Anal. Chim. Acta*, 2004, in press, s.
- /36/ COBBETT, C. S., A family of phytochelatin synthase genes from plant, fungal and animal species. *Trends Plant Sci.*, 1999, 4, s. 335–337.
- /37/ COBBETT, C. S., Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol.*, 2000, 123, s. 825–832.
- /38/ DABRIO, M. and RODRÍGUEZ, A. R., Electrochemical study of human foetal liver metallothionein: influence of the additions of cadmium and zinc. *Anal. Chim. Acta.*, 2000, 406, s. 171–181.
- /39/ GARCÍA-HERNÁNDEZ, M. a kol., Metallothioneins 1 and 2 have distinct but overlapping expression patterns in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 1998, 118, s. 387–397.
- /40/ GRILL, E. a kol., Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science*, 1985, 320, s. 674–676.
- /41/ VASSIL, A. D. a kol., The Role of EDTA in Lead Transport and Accumulation by Indian Mustard. *Plant Physiol.*, 1998, 117, s. 447–453.
- /42/ JONES, K. H. and SENFT, J. A., An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate propidium iodide. *J. Histochem. Cytochem.*, 1985, 33, s. 77–79.
- /43/ MLEJNEK, P. and PROCHAZKA, S., Activation of caspase-like proteases and induction of apoptosis by isopentenyladenosine in tobacco BY-2 cells. *Planta*, 2002, 215, s. 158–166.
- /44/ MEAGHER, R. B., Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Curr. Opin. Plant. Biol.*, 2000, 3, s. 153–162.
- /45/ PETŘEK, J. a kol., Application of computer imaging, stripping voltammetry and mass spectrometry to study the effect of lead (Pb-EDTA) on the growth and viability of early somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies* /L./ Karst.). *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, 383, s. 575–586.