

THE EFFECT OF CADMIUM IONS ON MAIZE (*ZEAMAYS* L.) REVEALED BY ELECTROCHEMICAL TECHNIQUES

VLIV KADEMNATÝCH IONTŮ NA KUKUŘICI (*ZEAMAYS* L.) STUDOVANÝ POMOCÍ ELEKTROCHEMICKÝCH TECHNIK

Zítka O.^{1,2)}, Stejskal K.^{1,3)}, Kleckerová A.¹⁾, Adam V.^{1,3)}, Mikelová R.^{1,4)},
Havel L.²⁾, Kizek R.¹⁾

¹Department of Chemistry and Biochemistry and ²Department Plant Biology, Mendel University of Agriculture and Forestry, Zemedelska 1, 613 00 Brno, Czech Republic

³Department of Biochemistry, ⁴Department of Analytical Chemistry and ⁵Department of Theoretical and Physical Chemistry, Masaryk University Faculty of Science, Kotlarska 2, 611 37 Brno, Czech Republic,

E-mail: zitkao@seznam.cz, kizek@sci.muni.cz

ABSTRACT

The study of plant response to heavy metals stress is especially important for the understanding of many biological processes. That is why we studied the influence of seven different cadmium concentrations (0, 50, 100, 150, 200, 400 and 500 μM CdCl_2) on growth of maize plants (*Zea mays* L.) during six days long experiment. The growth curves of maize plants were determined by increase in its fresh according to treatment time. Besides that, we applied a highly sensitive differential pulse anodic stripping voltammetry for the determination of changes in cadmium concentrations in leaves and roots after 24, 48, 72, 96, 120 and 144 hours of treatment. A detection limit close to 0.5 fM Cd was obtained for S/N = 3 criteria. In addition, plants respond to the presence of heavy metals by the production of cysteine-rich peptides such as glutathione and phytochelatins. Therefore a high performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection was used for determination of cysteine (Cys), oxidized (GSSG) and reduced (GSH) glutathione, and phytochelatin (PC_2) in treated maize plants. Detection limits were 112 fmol (Cys), 63.5 fmol (GSH), 112.2 fmol (GSSG) and 2.53 pmol (PC_2) per injection (5 μl).

Keywords: Maize; Cadmium; Cysteine; Phytochelatin; Oxidized and Reduced Glutathione.

ABSTRAKT

Studium rostlinné odpovědi na stres vyvolaný těžkým kovem je velmi důležitý pro pochopení mnoha základních biologických procesů. A proto jsme v této práci studovali vliv sedmi různých koncentrací kadmia (0, 50, 100, 150, 200, 400 a 500 μM CdCl_2) na růst kukuřice (*Zea mays* L.) během šestidenního experimentu. Růstové křivky kukuřičných rostlin byly stanoveny pomocí přírůstku svěží hmotnosti v závislosti na době expozice. Vysoce citlivní metoda diferenční pulsní anodické rozpouštěcí voltametrie byla aplikována pro stanovení změn koncentrace kadmia v listech a kořenech kukuřice po 24, 48, 72, 96, 120 a 144 hodinách expozice. Detekční limit pro kadmium byl stanoven na 0,5 fM (S/N = 3). A navíc rostliny se brání přítomnosti těžkých kovů produkcí na cystein bohatých peptidů jako jsou glutathion a

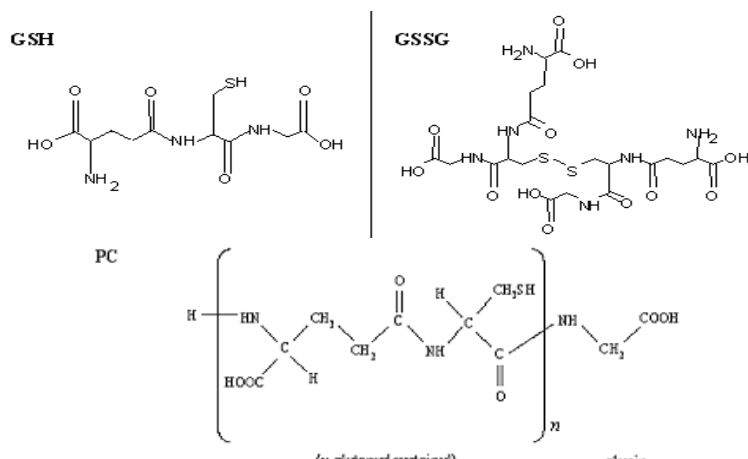
fytochelatinu. Proto byla metoda vysoko účinné kapalinové chromatografie spojená s elektrochemickou detekcí použita pro stanovení cysteinu (Cys), oxidovaného (GSSG) a redukovaného (GSH) glutathionu, a fytochelatinu (PC₂) v kukuřičných rostlinách, které byly vystaveny působení kadmia. Získané detekční limity byly 112 fmol pro Cys, 63,5 fmol pro GSH, 112,2 fmol pro GSSG a 2,53 pmol pro PC₂ na nástřik (5 µl).

Klíčová slova: Kukuřice; Kadmium; Cystein; Fytochelatin; Oxidovaný a redukovaný glutathion.

ÚVOD

Je-li rostlina vystavena účinkům esenciálních, a nebo toxických kovů začne syntetizovat ochranné sloučeniny mezi, které patří především různé trioly [1-9]. Mezi významné rostlinné thiole patří cystein, glutathion, a fytochelatinu [10-13], viz. (Obr. 1).

Obr. 1 Strukturní vzorce fytochelatinu (PC), oxidovaného (GSSG) a redukovaného glutathionu (GSH).



Glutathion je tripeptid skládající se z glutaminu, cysteinu a glycinu (γ-Glu-Cys-Gly) a je nejrozšířenějším neproteinovým thiolem, vyskytujícím se prakticky ve všech buňkách. Vyskytuje se ve dvou formách a to jako redukovaný glutathion (GSH) a oxidovaný glutathion (GSSG). Tyto dvě formy jsou v určitém poměru a jeho narušení může signalizovat oxidativní poškození buňky volnými radikály. Fytochelatinu (PC) mají základní strukturu (γ-Glu-Cys)_n-Gly [14-17] kde se dipeptidická repetice glutamové kyseliny a cysteinu (γ-Glu-Cys) může opakovat 2 až 11krát (nejčastěji 2–5krát) [3]. V této práci jsme studovali vliv sedmi různých koncentrací kadmia (0, 50, 100, 150, 200, 400 a 500 µM CdCl₂) na růst kukuřice (*Zea mays* L.) během šestidenního experimentu.

MATERIÁL A METODY

Chemikálie

Methanol (HPLC-čistota) byl od firmy Merck (Darmstadt, Germany). Standard PC₂ byl získán od firmy Clonestar Brno. Všechny další chemikálie byly zakoupeny u firmy

Sigma-Aldrich (USA). Zásobní roztoky standardů (koncentrace $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) byly připraveny v ACS vodě (Aldrich, USA) a uchovány ve tmě při 4°C . Pracovní roztoky byly ze zásobního připravovány každý den nové. Všechny roztoky byly před HPLC analýzou filtrovány přes teflonový filtr $0,45 \mu\text{m}$ (MetaChem, Torrance, CA, USA). Hodnoty pH byly měřeny pomocí WTW inoLab Level 3 (Weilheim, Německo), řízeným počítačovým programem (MultiLab Pilot; Weilheim, Německo). Voda použitá pro kultivační medium byla demineralizována pomocí reverzní osmózy na přístrojích Aqua Osmotic 02 (Aqua Osmotic, Tišnov, Česká republika) a dále čištěná pomocí Millipore RG (Millipore Corp., USA, $18 \text{ M}\Omega$).

Kultivace rostlin

Pokusnou rostlinou byla kukuřice setá (*Zea mays* L.) F1 hybrid Gila. Sedmidenní klíčící rostliny byly vysazeny do opěrných novodurových nádobek a umístěny do novodurových kultivačních van naplněných vodou. Vany byly umístěny v kultivačním boxu (Sanyo), kde byla udržována teplota $23,5 - 25^\circ\text{C}$, relativní vlhkost vzduchu $71 - 78\%$ a délka světelné periody 14 hodin, při intenzitě světelného toku $200 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$. Po osmi dnech kultivace byla voda ve vanách nahrazena roztoky o různé koncentraci kadmia (0, 50, 100, 150, 200, 400 a $500 \mu\text{M}$) ve formě CdCl_2 . Expozice rostlin Cd trvala 6 dnů, přičemž po 24 h intervalech byly odebírány čtyři rostliny od každé pokusné varianty. Odebrané rostliny byly omyty třikrát v destilované vodě a jednou v roztoku $0,5 \text{ M}$ EDTA, a následně rozděleny na listy a kořeny.

Příprava vzorku pro stanovení thiolových sloučenin

Listy a kořeny kukuřice (průměrně $0,2 \text{ g}$ svěží hmotnosti) byly zmrazeny kapalným dusíkem z důvodu destrukce buněk. Zmražené části rostlin byly rozetřeny v třecí misce a poté byly do misky přidány 2 ml fosfátového pufru o pH 7,0. Vzniklý roztok byl homogenizován třepáním na Vortex–2 Genie po dobu 30 min při 4°C (Scientific Industries, USA). Homogenát byl centrifugován ($15\,000 \text{ ot./min}$) 30 min při 4°C pomocí Universal 32 R centrifugy (Hettich-Zentrifugen GmbH, Německo) [18,19]. Supernatant byl před injekcí filtrován přes membránový filtr ($0,45 \mu\text{m}$, Millipore).

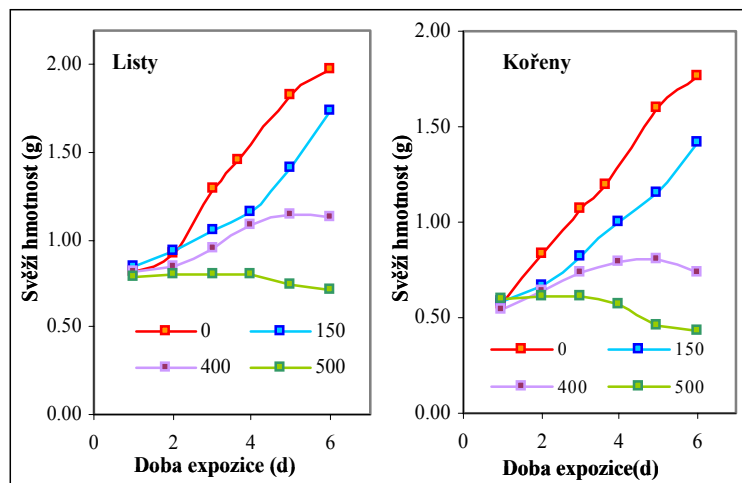
Vysoko účinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí (HPLC-ED)

HPLC-ED systém byl složen ze dvou chromatografických pump Model 582 ESA (ESA Inc., Chelmsford, MA) (pracovní rozsah $0,001 - 9,999 \text{ ml/min}$), a chromatografické kolony s reverzní fází Polaris C18A ($150 \times 4,6$; $3 \mu\text{m}$ velikost částic, Varian Inc., CA, USA) a osmi-kanálového CoulArray elektrochemického detektoru (Model 5600A, ESA, USA). Detektor je složen z průtočné analytické komůrky (Model 6210, ESA, USA) obsahující čtyři cely. Každá cela obsahuje jednu pracovní uhlíkovou membránovou elektrodu, dvě referentní a dvě pomocné elektrody. Chromatografická kolona a elektrochemický detektor jsou termostatovány. Vzorek ($5 \mu\text{l}$) byl injektován manuálně přes dávkovací ventil.

VÝSLEDKY A DISKUSE

V našich experimentech byly rostliny kukuřice (*Zea mays*) vystaveny působení 0, 50, 100, 150, 200, 400 a 500 μM CdCl_2 po dobu šesti dnů. Každý den byly odebírány rostliny ($n = 4$), které byly rozděleny na jednotlivé části (listy, kořen), které byly zváženy. Získané růstové křivky ukazují toxický vliv kadmia na rostliny v závislosti na aplikované koncentraci kadmia (Obr. 2).

Obr. 2 Růstové křivky rostlin kukuřice, které byly po dobu šesti dnů vystaveny působení čtyřech různých koncentrací kadmia (0, 150, 400 a 500 μM).

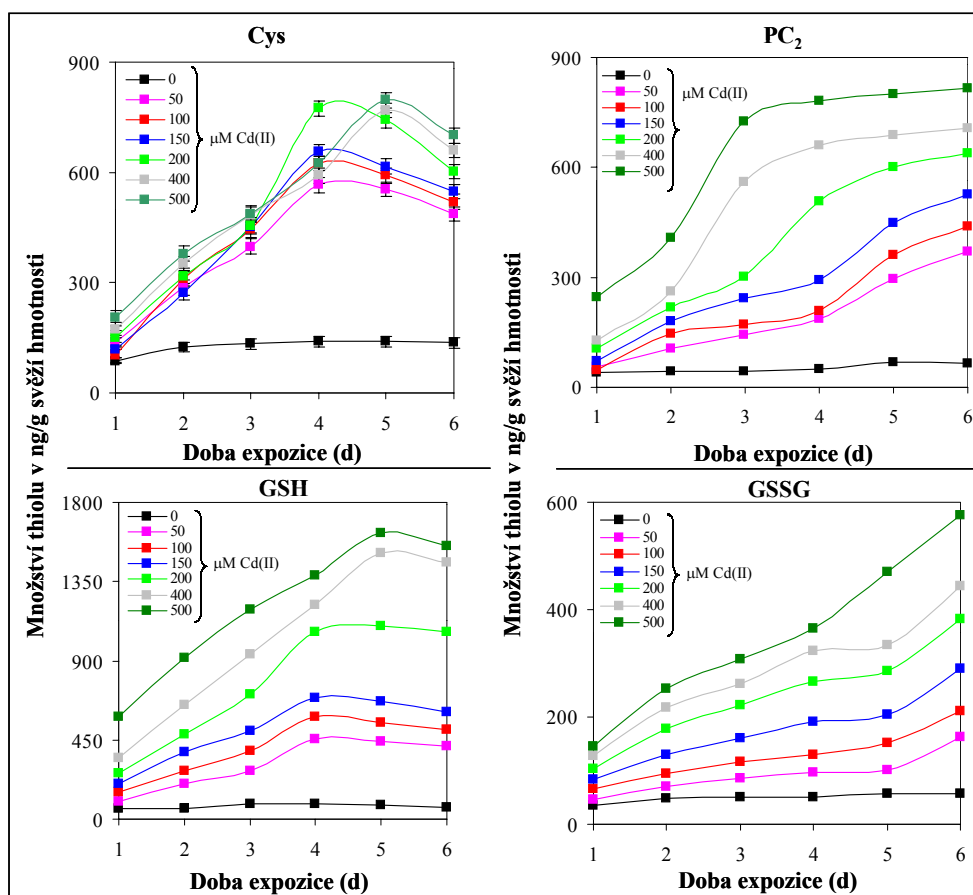


Rostliny syntetizují celou skupinu thiolových sloučenin jako ochranu před toxickým působením těžkých kovů (podmiňují vznik kyslíkových radikálů). Jednou ze skupin těchto thiolových látek jsou fytochelatiny. V získaných extraktech byl stanoven obsah thiolových sloučenin pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí (HPLC-ED), přičemž získané detekční limity byly 112 fmol pro Cys, 63,5 fmol pro GSH, 112,2 fmol pro GSSG a 2,53 pmol pro PC_2 na nástřik (5 μl). V kukuřičných extraktech byla sledována změna cysteinu, GSH, GSSG a PC_2 . Obsah cysteinu u všech rostlin exponovaných kadmii se vzrůstající koncentrací aplikovaného kadmia a dobou expozice vzrůstá asi o 500 – 800 % (v porovnání s kontrolou) ve čtvrtém a pátém dni experimentu. Šestý den experimentu byl pozorován mírný pokles obsahu cysteinu, což může souviset s intenzivním zapojením této látky do metabolismu rostliny právě v detoxikačním procesu (Obr. 3).

Obsah GSH a PC_2 po celou dobu experimentu velmi rychle vzrůstal. Již v první den experimentu byl při nejvyšší aplikované koncentraci pozorovaný nárůst obsahu thiolů o více jako 200 % (v porovnání s kontrolou). Po následující dva dny kultivace se obsah GSH a PC_2 zvyšoval přibližně o 30 – 60 % v závislosti na aplikované dávce kadmia kromě kontroly (Obr. 3). Od třetího dne experimentu, byly tyto změny pozvolnější (10 – 30 %). Tento jev již souvisí s výraznou toxicitou kadmia, která ve třetím dni experimentu byla velmi dobře patrná jak na růstové křivce, tak na morfologii rostlin.

Obsah GSSG v rostlinách s rostoucí aplikovanou dávkou kadmia a dobou kultivace rostl, a šestý den byl jeho obsah o 100 až 600 % vyšší v porovnání s kontrolou (Obr. 3). U aplikované dávky 500 μM byl obsah GSSG výrazně vyšší než u nižších aplikovaných dávek kadmia. Tento výrazný nárůst obsahu GSSG pravděpodobně souvisí se vznikem kyslíkových radikálů.

Obr. 3 Množství sledovaných thiolových sloučenin (cystein - Cys, redukovaný glutathion - GSH, oxidovaný glutathion - GSSG a fytochelatin - PC₂) obsažených v rostlinách kukuřice v závislosti na době kultivace a aplikované dávce kadmia.



ZÁVĚR

Zjistili jsme tedy, že vstup těžkého kovu (kadmia) do rostlin je velmi přísně regulován. A dále, že se rostlina velmi intenzivně brání toxickému působení těžkých kovů prostřednictvím syntézy thiolových látek (glutathion a fytochelatin). Selhání těchto regulačních a ochranných mechanismů velmi rychle vede k nárůstu koncentrace toxického prvku a následně ke smrti organismu (rostliny).

Poděkování

Práce na tomto projektu byla podporována granty: GAČR 525/04/P132, INCHEMBIOL 0021622412 a FRVŠ 2348/F4a.

LITERATURA

- [1] A.-C. Cazale and S. Clemens *Arabidopsis thaliana* expresses a second functional phytochelatase, FEBS Lett. 507 (2001) 215–219.
- [2] C.S. Cobbett A family of phytochelatase genes from plant, fungal and animal species, Trends Plant Sci. 4 (1999) 335–337.
- [3] C.S. Cobbett Phytochelatin synthase and their roles in heavy metal detoxification, Plant Physiol. 123 (2000) 825–832.
- [4] C.S. Cobbett Phytochelatase biosynthesis and function in heavy-metal detoxification, Curr. Opin. Plant Biol. 3 (2000) 211–216.
- [5] M. Dabrio, A.R. Rodríguez, G. Bordin, M.J. Bebianno, M. De Ley, I. Šestáková, M. Vašák and M. Nordberg Recent developments in quantification methods for metallothionein, J. Inorg. Biochem. 88 (2002) 123–134.
- [6] I. Šestáková, H. Vodičková and P. Mader Voltammetric methods for speciation of plant metallothioneins, Electroanalysis 10 (1998) 764–770.
- [7] B. Klejdus, R. Kizek, J. Vacek, J. Zehnálek, L. Trnková and V. Kubáň Determination of isoflavones in soybean food and human urine using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, J. Chromatogr. B 806 (2004) 101–111.
- [8] M.H. Zenk Heavy metal detoxification in higher plants – a review, Gene 179 (1996) 21–30.
- [9] L.S. di Toppi and R. Gabbriellini Response to cadmium in higher plants, Environ. Exp. Botany 41 (1999) 105–130.
- [10] J. Vacek, J. Petrek, R. Kizek, L. Havel, B. Klejdus, L. Trnkova and F. Jelen Electrochemical determination of lead and glutathione in a plant cell culture, Bioelectrochemistry 63 (2004) 347–351.
- [11] J. Vacek, R. Kizek, B. Klejdus and L. Havel Fytochelatiny a jejich role pro detoxifikaci těžkých kovů: biosyntéza, regulace a transport, Biol. Listy 68 (2003) 133–153.
- [12] J. Vacek, J. Petřek, L. Havel, D. Koutná, V. Adam, L. Trnková and R. Kizek Stanovení olova a rostlinných metallothioneinů v explantátových kulturách smrku ztepilého (*Picea abies* L.), In: VI. Pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů Brno (2002).
- [13] B. Klejdus, J. Zehnalek, V. Adam, J. Petrek, R. Kizek, J. Vacek, L. Trnkova, R. Rozik, L. Havel and V. Kuban Sub-picomole high-performance liquid chromatographic/mass spectrometric determination of glutathione in the maize (*Zea mays* L.) kernels exposed by cadmium, Anal. Chim. Acta 520 (2004) 57–67.
- [14] E. Grill, E.-L. Winnacker and M.H. Zenk Phytochelatin synthase, a class of heavy-metal-binding peptides from plants are functionally analogous to metallothioneins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987) 439–443.
- [15] E. Grill, S. Löffler, E.-L. Winnacker and M.H. Zenk Phytochelatin synthase, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatase), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 6838–6842.
- [16] E. Grill, E.-L. Winnacker and M.H. Zenk Phytochelatin synthase, Methods Enzymol. 205 (1991) 333–341.
- [17] D. Grill, M. Tausz and L.J.D. Kok Plant Ecophysiology, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 2001.
- [18] M. Inouhe, R. Ito, S. Ito, N. Sasada, H. Tohoyama and M. Joho Azuki bean cells are hypersensitive to cadmium and do not synthesize phytochelatin synthase, Plant Physiol. 123 (2000) 1029–1036.
- [19] M. Inouhe, S. Ninomiya, H. Tohoyama, M. Joho and T. Murayama Different characteristics of roots in the cadmium-tolerance and Cd-binding complex formation between mono- and dicotyledonous plants, J. Plant. Res. 107 (1994) 201–207.