

Studium obsahu fytochelatinů v rostlinách lnu setého (*Linum usitatissimum* L.)

DETECTION OF PHYTOCHELATINS IN FLAX (*LINUM USITATISSIMUM* L.)

Ondřej Zítka^{1,2}, Jitka Najmanová³, Natalia Cernei¹, Vojtěch Adam¹, Martina Macková³, Tomáš Macek^{3,4}

Josef Zehnálek¹, Ladislav Havel¹, Aleš Horna², René Kizek¹

¹Mendelova univerzita v Brně; ²Radanal s. r. o.; ³Vysoká škola chemicko-technologická v Praze,

⁴Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky

Toxické těžké kovy jsou zástupci xenobiotik se schopností nejen napomáhat tvorbě reaktivních kyslíkatých částic (ROS) oxidujících buněčné kompartmenty a důležité intracelulární proteiny a DNA, ale také narušovat homeostázu esenciálních kovů a nahrazovat je v aktivních místech enzymů, který tím ztrácí svoji funkci. Rostlinné i živočišné buňky mají řadu mechanismů, které je ochraňují před negativním vlivem těžkých kovů. Společným mechanismem pro obě skupiny je syntéza redukováného glutathionu (γ -Glu-Cys-Gly, GSH) a činnost glutathion-askorbátového cyklu. V této práci byl studován obsah některých fytochelatinů (PC) v rostlinách lnu setého (*Linum usitatissimum* L.).

Materiál a metody

Rostlinný materiál: Len kultivaru AGT952 od firmy Agritek byl pěstován 12 dní s 16hodinovou fotoperiodou na mediu Murashige and Skoog od firmy Sigma-Aldrich s přidáním kadmia ve formě CdCl₂. Rostliny byly vystaveny účinkům kadmia o různých koncentracích (50, 250, a 500 μ M) a byly dále homogenizovány mechanicky a ultrazvukem v prostředí 0,2 M fosfátovém pufru o pH 7,2.

Chromatografická analýza: HPLC-ED systém byl složen ze dvou chromatografických pump a chromatografické kolony s reverzní fází Zorbax eclipse AAA C18 (150 \times 4,6; velikost částic 3,5 μ m, Agilent Technologies, USA). Vzorek (20 μ l) byl injektován automaticky pomocí autosampleru, který měl v sobě zabudován i termostatovaný prostor pro kolonu. Kolona byla termostatována na 30 $^{\circ}$ C. Průtok mobilní fáze byl 1 ml.min⁻¹. Mobilní fáze se skládala z A: kyseliny trifluorooctové (80 mM) a B: 100% Met-OH.

Výsledky a diskuze

Pomocí naší vyvinuté chromatografické metody s elektrochemickou detekcí se nám podařilo studovat obsah thiolových látek v rostlinách lnu. Svou pozornost jsme zaměřili na skupinu fytochelatinů, konkrétně pak na PC₂, PC₃, PC₄ a PC₅ a na redukovanou a oxidovanou formu glutathionu. Vliv narůstající koncentrace kadmia byl dobře pozorovatelný na poměru GSH a GSSG. Z chromatografického záznamu tří vzorků lnu,

ze kterých každý byl kultivován při jiné koncentraci kadmia, je patrné, že se koncentrace GSSG na úkor GSH zvyšuje. Současně jsme zaznamenali i zvýšení koncentrace všech studovaných fytochelatinů se zvyšující se koncentrací aplikovaného kadmia. Zajímavým byl nárůst koncentrace PC₅, jehož syntéza je pro buňky nejvíce energeticky náročná, a tudíž ve stresové reakci méně preferovaná. Nejvyšší nárůst koncentrace PC₄ a PC₅ byl pozorován při nejvyšší aplikované koncentraci kadmia oproti PC₂. Vzhledem k předpokladu, že PC₄ a vyšší fytochelatinů mohou vznikat dimerizací nižších fytochelatinů, především PC₂, můžeme tento trend spojit s tvorbou vyšších fytochelatinů na úkor PC₂. Tato práce ukazuje, že metoda HPLC-ED, kterou jsme vyvinuli, je velmi vhodná pro účely analýzy obsahu thiolových látek jak v geneticky modifikovaných rostlinách lnu, tak i v jiných typech matrice.

Poděkování: Tato práce byla podpořena grantem REMEDTECH GA ČR 522/07/0692, 1M06030 a NANIMEL GA ČR 102/08/1546.

Zítka O., Najmanová J., Cernei N., Adam V., Macková M., Macek T., Zehnálek J., Havel L., Horna A., Kizek R.: Detection of phytochelatin in flax (*Linum usitatissimum* L.)

In this study, we employed our optimized method of high performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ED) to study the content of thiols. These are glutathions (reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione), which ratio is used as a marker of oxidative stress, and phytochelatin PC₂, PC₃, PC₄ and PC₅, which are very important for the protection of plant cells against adverse effects of heavy metals. Thiols content was studied in flax plants treated with various concentrations of cadmium(II) ions. Using our method, we were able to identify and quantify the levels of thiols, which varied depending on the applied dose of cadmium.

Key words: flax, phytochelatin, high performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ED).

Kontaktní adresa – Contact address:

doc. Ing. René Kizek, Ph.D., Mendelova univerzita, Ústav chemie a biochemie, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika; e-mail: kizek@sci.muni.cz

Příloha časopisu Listy cukrovarnické a řepařské – vydal VUC Praha, a. s., 142 00 Praha 4, U Jednoty 7, IČO: 26470080. Listopad 2010. Redaktor: Ing. Blahoslav Marek – tel.: 775 115 161, 261 090 645, fax: 261 090 649, e-mail: b.marek@centrum.cz, www.cukr-listy.cz. Otsik povolen se svolením redakce, s údajem pramene a se zachováním autorských práv. Za obsahovou náplň příspěvků ručí autoři.

ISSN 1210-3306

MK ČR E 493