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

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

Ondřej Zítka[1,2], Jitka Najmanová[3], Natalia Cernei[1], Vojtěch Adam[1], Martina Macková[3], Tomáš Macek[3,4]
Josef Zehnálek[1], Ladislav Havel[1], Aleš Horna[2], Rene Kizek[1]
[1]Mendelova univerzita v Brně; [2]Radanal s. r. o.; [3]Vysoká škola chemicko-technologická v Praze,
[4]Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky

Toxické těžké kovy jsou zástupci xenobiotik se schopností nejen napomáhat tvorbě reaktivních kyslíkatých částic (ROS) oxidující 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 redukovaného 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 přidaným kadmiem ve formě $CdCl_2$. Rostliny byly vystaveny účinkům kadmia o různých koncentracích (50, 250, a 500 μM) 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 × 4,6; velikost částic 3,5 μm, Agilent Technologies, USA). Vzorek (20 μl) byl injektován automaticky pomocí autosampleru, který měl v sobě zabudován i termostatovaný prostor pro kolonu. Kolona byla termostatována na 30 °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

Pomoci námi 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 PC_2, PC_3, PC_4 a PC_5 a na redukovanou a oxidovanou formu glutathionu. Vliv narůstající koncentrace kadmia byl dobře pozorovatelný na poměru GSH a GSSG. Z chromatografického záznamu tří vzorků lnů, 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 PC_5, jehož syntéza je pro buňky nejvíce energeticky náročná, a tudíž ve stresové reakci méně preferovaná. Nejvyšší nárůst koncentrace PC_4 a PC_5 byl pozorován při nejvyšší aplikované koncentraci kadmia oproti PC_2. Vzhledem k předpokladu, že PC_4 a vyšší fytochelatiny mohou vznikat dimerizací nižších fytochelatinů, především PC_2, můžeme tento trend spojit s tvorbou vyšších fytochelatinů na úkor PC_2. 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.

Zitka O., Najmanová J., Cernei N., Adam V., Macková M., Macek T., Zehnálek J., Havel L., Horna A., Kizek R.: Detection of phytochelatins 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 phytochelatins PC_2, PC_3, PC_4 and PC_5, 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, phytochelatins, 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