

ANALÝZA OBRAZU A AKTIVITA INTRACELULÁRNÍCH ESTERAS JAKO NOVÝ ANALYTICKÝ NÁSTROJ PRO SLEDOVÁNÍ RŮSTU A ŽIVOTNOSTI EMBRYONÁLNÍCH KULTUR SMRKU (*Picea sp.*) OVLIVNĚNÝCH KADMIEM

JIRÍ PETŘEK^a, JIRÍ BALOUN^{a,b}, HELENA VLAŠÍNOVÁ^a, LADISLAV HAVEL^a, VOJTĚCH ADAM^{b,c}, JAN VÍTEČEK^a, PETR BABULA^d a RENÉ KIZEK^b

^a Ústav biologie rostlin a ^b Ústav chemie a biochemie, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, ^c Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, ^d Ústav přírodních léčiv, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno
kizek@sci.muni.cz

Došlo 3.5.06, přepracováno 11.9.06, přijato 6.10.06.

Klíčová slova: *Picea abies*, *Picea pungens*, rané somatické embryo, esterasy, Brdčková reakce, elektrochemie, spektrofotometrie, kadmium

Úvod

Analýza obrazu (Image analysis, IA) je nástrojem sloužícím k popisu tvaru, struktury ale také vzhledu zkoumaného objektu. Digitální analýza obrazu umožňuje rychlejší elektronické zpracování dat, je snadno opakovatelná a obvykle nevyžaduje velké zkušenosti s analytickým postupem¹. Nově se ukazuje, že analýza a digitalizace obrazu u rozdílných biologických objektů a struktur může přinést mnoho potřebných informací o jejich fyziologii^{2–6}. Navíc umožňuje kvantifikaci růstových a morfologických změn^{1,7–9}. Významnou výhodou a předností počítačové analýzy obrazu v *in vitro* kultivovaných kulturách je – na rozdíl od jiných experimentálních postupů – možnost sledovat výše uvedené parametry během kultivačního procesu bez externích zásahů (narušení sterility prostředí, mechanické poškození, stresová reakce apod.)¹.

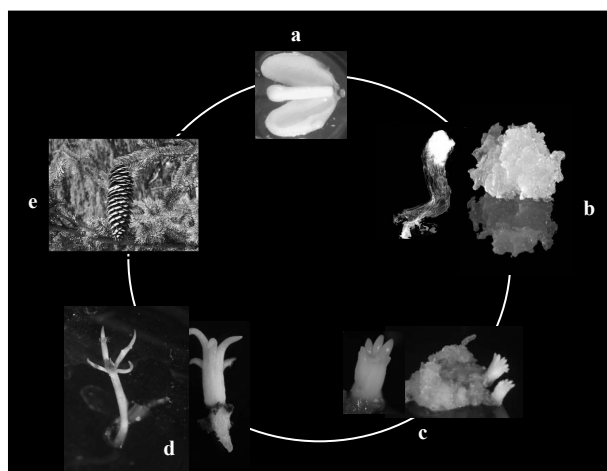
Kultivační postupy v podmínkách *in vitro* jsou v současnosti stále více využívány pro uchování genofondu vzácných genotypů dřevin, snadné a rychlé množení rostlin, a pro další biotechnologické aplikace^{10–15}. Pro odvození explantátové kultury rostlin je vhodné jakékoliv pletivo (část rostliny) obsahující buňky s funkčním jádrem.

Takové pletivo (explantát) je umístěno do sterilního prostředí, kde se dále kultivuje^{16–18}. Za přesně definovaných podmínek lze z takto odvozené kultury získat prakticky neomezené množství klonů původní rostliny, ze které explantát pocházel. Tento postup je schematicky ukázán na obr. 1. Významná je také kultivace dřevin metodou somatické embryogeneze, která vede k získání geneticky kvalitních a průmyslově využitelných rostlin^{17,19–24}. Při této metodě získáváme embryonální kultury, které lze odvodit z jakékoliv somatické (tělní) buňky. Je tak třeba hledat nové analytické metody sledování produkce a růstu takových kultur. Proto IA nachází uplatnění také v případě automatického sledování produkce somatických embryí¹⁰, tvaru, velikosti nebo barvy kultury^{1,25}. Cílem této práce byla aplikace metody analýzy obrazu pro sledování růstu různých embryonálních kultur smrku. Metoda byla porovnána s gravimetrickou metodou a aktivitou intracelulárních esterasy. Navíc byl studován obsah glutathionu pomocí Brdčkovy reakce v těchto kulturách.

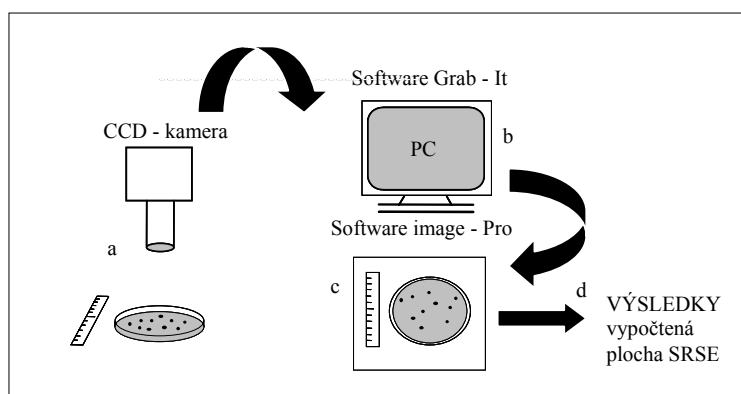
Experimentální část

Chemikálie

Pokud není uvedeno jinak, byly použity chemikálie dodané firmou Sigma Aldrich (USA) v čistotě ACS. Fosfátové pufrы byly připraveny z hydrogen- a dihydrogenfosforečnanu draselného. Jejich pH bylo upraveno pomocí KOH. Fluoresceindiacetát (FDA) byl zakoupen u firmy Sigma Aldrich Chemical Corp. (USA). Jeho roztok byl připraven rozpuštěním navážky v bezvodém acetonu. Na kultivační media byly použity chemikálie dodané firmou Duchefa Biochemie BV (Nizozemí). Media a roztoky byly



Obr. 1. Schéma množení smrku pomocí somatické embryogeneze v podmínkách *in vitro*; (a) zygotické embryo, (b) kultura raných somatických embryí, (c) kultura zralých somatických embryí, (d) růst kořene a děloh, (e) běžný růst v podmínkách *in vivo*



Obr. 2. Schéma analýzy obrazu; (a) digitalizace obrazu Petriho misky se shluky raných somatických embryí (SRSE) pomocí CCD kamery, (b) načtení obrazu do programu Grab-IT, (c) počítačový obraz, (d) výpočet plochy programem Image-Pro

připraveny rozpuštěním příslušných látek v deionizované vodě (18,2 M Ω , Iwa 20, Watek, Česká republika).

Rostlinný materiál

Byly využity kultury raných somatických embryí smrku ztepilého (*Picea abies* /L./ Karst.), klon 2/32, a smrku pichlavého (*Picea pungens* Engelm.), klon PE 14. Klon 2/32 pochází ze smrku ztepilého horského klimaxového typu z pokusné plochy v Beskydách. Klon PE 14 byl odvozen ze smrku pichlavého, přičemž pro jeho odvození byla použita zralá semena ze vzrostlého stromu *Picea pungens* Engelm. 'Argentea' v areálu Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně. Kultury jsou udržovány za striktně sterilních podmínek (flow box Gelaire HF 36) a vždy po 14 dnech kultivace se provádí pasáž. 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 (průměr 90 mm) s kultivačním médiem (30 ml). SRSE jsou kultivovány ve tmě při teplotě 23±2 °C. Na jednu misku připadlo vždy 10 SRSE.

Kultivační médium

Všechny výše uvedené kultury jsou dlouhodobě kultivovány na kultivačním médiu LP/2 (cit.²⁶), které je modifikováno 9 μ M 2,4-dichlorfenoxycetové kyseliny a 4,4 μ M benzylaminopurinu²⁷. 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 min (Tuttnauer 3870 EA); organická část byla sterilizována membránovou filtrací (Whatman Puradisc 25 AS 0,2 μ m).

Při našich pokusech bylo nezbytné modifikovat kultivační média. Přidavek kadmnatých iontů vedl okamžitě

ke vzniku sraženin. Z tohoto důvodu jsme přistoupili k jeho vyvázání pomocí EDTA. Navíc je známo, že cheláty těžkých kovů mnohem lépe prostupují přes různé buněčné bariéry^{28–30}. Do základního média byl přidán chelát kadmia (Cd-EDTA) ve výsledných koncentracích 50 μ M, 250 μ M a 500 μ M. Roztok Cd-EDTA byl připraven podle postupu uvedeného v práci Vassil a spol.³¹. Zásobní roztok Cd(NO₃)₂ byl smíchán s kyselinou ethylendiamintetraoctovou (EDTA) v poměru 1:1 při teplotě 50 °C po dobu 1 h. Komplex 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 provedena metodou analýzy obrazu pomocí kamery CCD Sony (UPV-GDS 8 000) a programu GRAB-IT (obr. 2). 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

Sledování životnosti buněk bylo provedeno pomocí barvení fluorescenčními barvivami – propidium jodidem (PI) a fluoresceindiacetátem (FDA) podle metody uvedené v práci Jones a spol.³². PI není propouštěn přes cytoplasmatickou membránu dovnitř živé buňky. V případě mrtvé buňky, která má nefunkční cytoplasmatickou membránu, se dostává dovnitř a způsobuje červené fluorescenční zbarvení. FDA je schopen projít přes funkční cytoplasmatickou membránu a 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 skličko a následně byla za-

kápnuta suspenzí (37 μl destilované, 10 μl PI a 3 μl FDA, koncentrace FDA 1 mg ml^{-1} a PI 20 mg ml^{-1})^{1,33}. Po pěti minutách inkubace se připravený preparát pozoroval pomocí inverzního fluorescenčního mikroskopu Olympus AX 70 při zvětšení 4×10 a 10×10 . 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 živých³⁴.

Stanovení životnosti pomocí aktivity intracelulárních esteraz

SRSE byly odebrány z pevného média, následně byly promyty 50 mM fosfátového pufru (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 připravený 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. Aktivity esteraz byla stanovena v IU (jedna mezinárodní jednotka uvolní při výše uvedených podmínkách 1 μmol fluoresceinu za minutu)^{34–36}.

Elektrochemická analýza

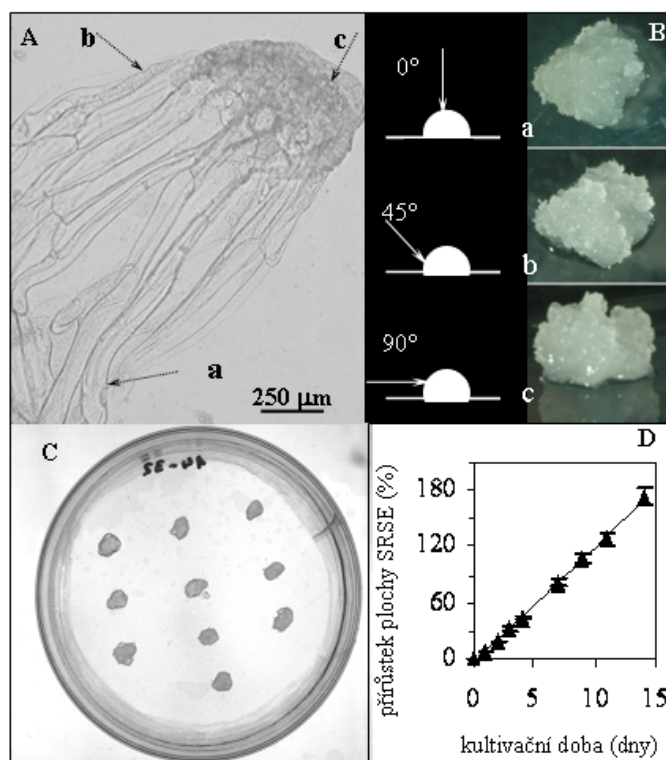
Elektrochemická analýza byla prováděna pomocí elektrochemického analyzátoru AUTOLAB (EcoChemie, Holandsko) v zapojení s tříelektrodovou celou VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko). Byla použita visící rtuťová kapková elektroda jako pracovní (HMDE, plocha rtuťové kapky: 0,4 mm^2), referentní elektroda (Ag/AgCl, 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). Stanovení thiolových sloučenin bylo provedeno technikou adsorptivní přenosové rozpouštěcí diferenční pulzní voltametrie (AdTS DPV) – Brdičkova reakce^{37,38}. Experimenty byly prováděny při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, v potenciálovém rozsahu od $-0,7\text{ V}$ do $-1,8\text{ V}$, potenciálový krok 1,05 mV, pulzní amplituda 25,05 mV, časový interval 0,2 s, doba akumulace 120 s, potenciál akumulace $-1,1\text{ V}$. Jako základní elektrolyt byl použit 1 mM roztok $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ v amonném pufru (1 M NH_4Cl + 1 M NH_4OH).

Výsledky a diskuse

Studium různých abiotických a biotických faktorů na rostliny je v přirozených podmínkách velmi náročné, proto se hledají možnosti, jak získat rychle dosažitelné a opakovatelné výsledky³⁹. Jednou z možností, které se stále častěji využívá, je studium explantátových kultur rostlin. Mezi takové kultury patří i kultura raných somatických embryí (RSE) smrku²⁷. Charakteristické rysy vzniku RSE u jehličnanů byly popsány mnoha autory^{27,40–43}. Každé RSE smrku se skládá z embryonální skupiny, embryonálních tubulárních buněk a embryonálního suspenzoru (obr. 3A). Zkráceně je pak možné popsat složitý proces růstu embryonální kultury: *i*) nejprve dochází k dělení buněk embryonální skupiny, *ii*) jejich prodlužováním na distálním konci vznikají tubulární buňky, z nichž vzniká embryonální suspenzor, *iii*) buňky suspenzoru jsou uvolňovány do kultivačního média²⁶. Jak stále dochází k oddělování nových tubulárních a suspenzorových buněk směrem od embryonální skupiny, tvoří se shluky raných somatických embryí (SRSE) (obr. 3B). V našich experimentálních podmínkách jsou SRSE kultivovány v Petriho misce na kultivačním médiu a každé dva týdny jsou přeneseny na nové kultivační médium (obr. 3C). Ke sledování kultury, popř. vlivu různých elicitorů na ni, je třeba sledovat základní charakteristiky, jako jsou růst a životnost kultury^{36,44}. Mezi nejčastěji využívané metody pro stanovení růstu rostlinných kultur patří vážení kultury nebo počítání buněk. V případě kultur SRSE smrku je velmi vhodné využít metody IA, neboť při experimentu probíhajícím v čase nemusíme zasahovat (odběr vzorků) do kultivovaného biologického materiálu.

Optimalizace obrazové počítačové analýzy

Nejdříve byly obrázky Petriho misek se shluky RSE digitalizovány pomocí CCD-kamery („charge-coupled device“, označení polovodičového zařízení, které je schopno jak fotodetekce, tak paměťových funkcí, a které převádí světlo na elektronické impulsy). Samotná digitalizace byla řízena PC prostřednictvím programu GRAB-IT. Pro získání kvalitního obrazu bylo nezbytné nastavit vhodnou expozici a rozlišení kritického detailu (místo nejostřejšího vidění předmětu)¹. Bylo zjištěno, že se stoupajícím rozlišením CCD-kamery klesá velikost plochy jednotlivých SRSE. Při rozlišení obrazu 2,8 až 3,6 pixelů na mm je digitalizovaná plocha nadhodnocena asi o 16 % (proti rozlišení 5 pixelů na mm) a hodnoty plochy jsou velice variabilní (kolem 20 %), protože není správně rozeznán okraj SRSE. Při vyšším rozlišení kritického detailu se variabilita výrazně snižuje a roste přesnost určení plochy SRSE. Při hodnotách snímání obrazu nad 5 pixelů na mm je proces snímání obtížnější a méně reprodukovatelný (v zorném poli kamery není celá plocha Petriho misky). Pro další experimenty bylo vybráno rozlišení kritického detailu 8 pixelů na mm, které zajišťuje dobré určení hodnoty plochy SRSE a zároveň je vhodné pro konstantní nastavení metody při jejím



Obr. 3. **Kultura raných somatických embryí smrku ztepilého, klon 2/32.** (A) Rané somatické embryo; (a) embryonální suspensor, (b) embryonální tubulární buňky, (c) embryonální skupina. (B) Shluky raných somatických embryí (SRSE); SRSE po dvoutýdenní kultivaci, fotografie z různého úhlu (Fotoaparát Olympus Digital Camera C-4040 ZOOM); 0° (a), 45° (b), 90° (c). (C) Petriho miska se SRSE na kultivačním médiu. (D) Typická růstová křivka zjištěná metodou analýzy obrazu ($y = 12,392x - 4,2157$; $R^2 = 0,998$)

rutinním využití, tedy aby byla v zorném poli kamery snímána vždy celá plocha (Petriho miska). Při správně nastavené expozici a při stejném nastavení kamery byla zjištěna chyba analýzy 0,31 % ($n=10$). Získané digitální údaje je možno, po zpracování integrálními algoritmy, využít ke kvantifikaci růstu, vitality a horizontálního uspořádání kultury. U embryonální kultury smrku lze pomocí počítačových programů sledovat obvod, plochu, délku, šířku, denzitu a další. Je potřebné zdůraznit, že dosud neexistovala v bioanalýze metoda umožňující sledovat tyto efekty u takto komplikovaných a značně heterogenních kultur (obr. 2).

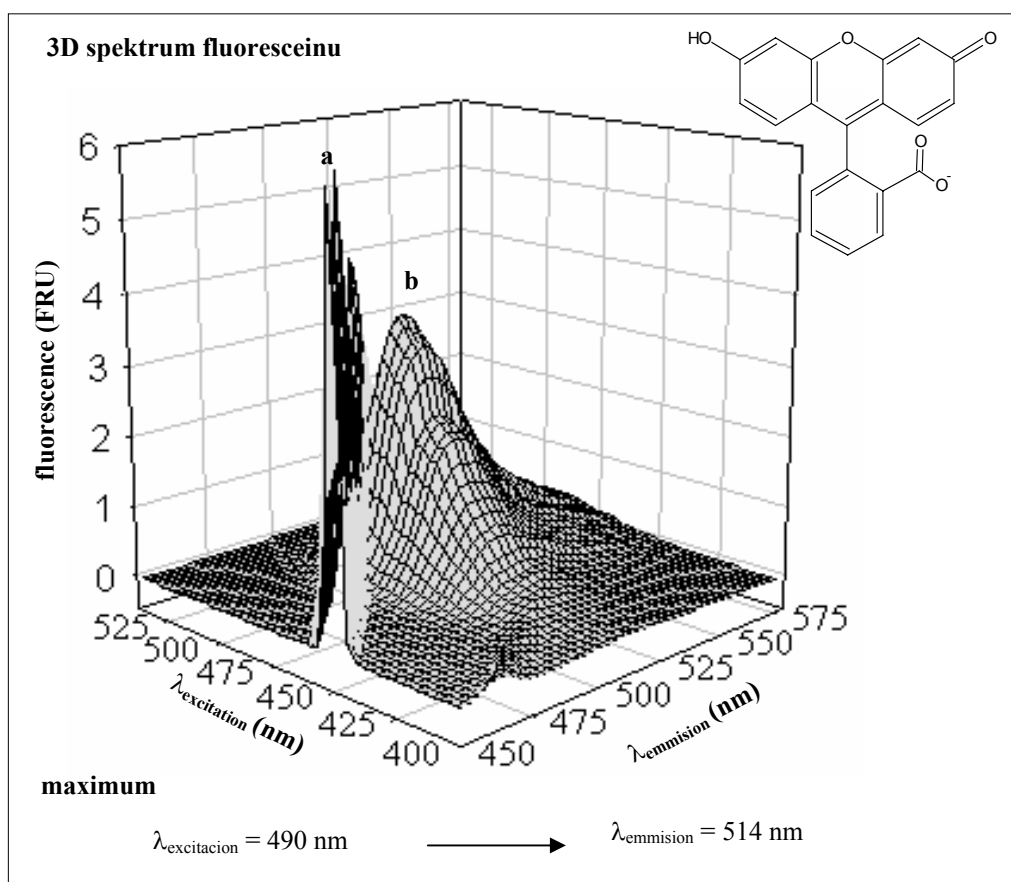
Růstové charakteristiky kultury RSE

Jednou z nejdůležitějších charakteristik každé kultury je růstová křivka. Na základě dříve zjištěných experimentálních dat jsme určili jako nejvhodnější počáteční velikost SRSE kolem 10 mm^2 (cit.¹). Za těchto podmínek byla sestrojena růstová křivka pomocí metody analýzy obrazu (obr. 3D). Při výpočtu přírůstku SRSE vycházíme z původní velikosti. Výsledný přírůstek představuje procento, o kolik se daný SRSE po dobu kultivace zvětšil. Pro výpočet byla využita následující rovnice:

$$P_p = ((I_n / I_0) - 1) \cdot 100 \quad [\%]$$

kde P_p je přírůstek SRSE vyjádřený v procentech, I_n je plocha SRSE po n dnech kultivace [mm^2] a I_0 plocha SRSE na začátku kultivace [mm^2].

Pro ověření analýzy obrazu (IA) bylo provedeno srovnání za využití gravimetrické metody a aktivity intracelulárních esterů. Nevýhodou gravimetrické metody bylo vysychání SRSE, což může při nedostatečně rychlém vážení ovlivnit získané hodnoty celkového přírůstku SRSE o 20 (po dobu 10 min), resp. o 46 % (po dobu 30 min). Metodu tak nelze využít pro kontinuální studium kultury v průběhu experimentu, neboť dochází ke vzniku silné stresové reakce. Zjistili jsme, že průměrné relativní přírůstky hmotnosti a plochy SRSE v průběhu čtrnáctidenní kultivace vykazovaly striktně lineární trend ($y = 12,392x - 4,2157$; $R^2 = 0,998$). Při kultivaci SRSE po dobu 35 dnů byla linearita zachována při parametrech rovnice přímky: $y = 9,0561x - 6,0197$, $R^2 = 0,9833$. Bylo zjištěno, že hmotnost SRSE v porovnání s jejich plochou roste rychleji, a to po celou dobu kultivace (směrnice jejich přímek se od sebe liší). Pozorované rozdíly jsou pravděpodobně způsobeny růstem SRSE do výšky, což analýzou obrazu nelze zachytit. Dále byla metoda analýzy obrazu porovnána s aktivitou intracelulárních esterů, kterou lze rovněž využít pro stanovení růstu³⁴. Pro detekci esterové aktivity byl jako substrát vybrán fluoresceindiacetát (FDA)³⁴, který se půso-



Obr. 4. **Spektrofluorimetrická detekce fluoresceinu;** fluoresceindiacetát je esterasami hydrolyzován na fluorescein, který při $\text{pH} > 7,0$ intenzivně fluoreskuje. Fluorescein poté lze spektrofluorimetricky detegovat ve viditelné oblasti světla (excitace 490 nm/emise 514 nm)

bením esteras hydrolyzuje na fluorescein. Fluorescein poté lze detegovat spektrofluorimetricky ve viditelné oblasti světla (excitace 490 nm/emise 514 nm), viz 3D spektrum fluoresceinu, které je ukázáno na obr. 4. Podobně jako u vážení byla růstová křivka získaná pomocí esterasové aktivity ekvivalentní růstové křivce získané analýzou obrazu.

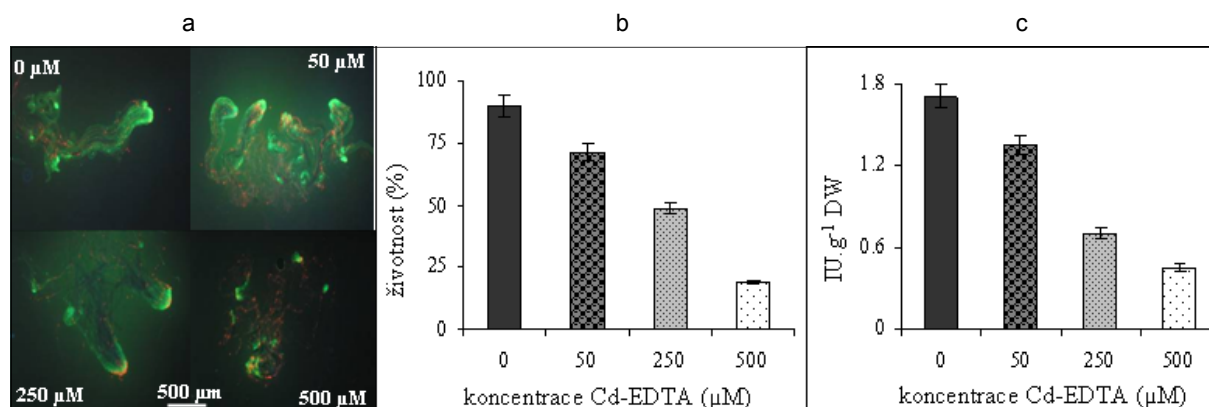
Stanovení životnosti buněk

Aby bylo možné studovat působení abiotických či biotických faktorů na modelové kultury, je naprosto nezbytné znát počet živých buněk. Pro stanovení životnosti bylo vyvinuto několik rozličných, většinou kvalitativních, metod. Nejčastěji se provádí tzv. „dye exclusion test“, při kterém se využívá fluorescenčních barviv propidium jodidu (PI) a fluoresceindiacetátu (FDA). Interpretace výsledků této metody je ovšem v případě kultury RSE velmi obtížná. Nelze dost dobře rozlišit a spočítat jednotlivé buňky RSE a stanovit tak přesně životnost, jak je tomu možné u buněčných suspenzí, např. tabáku. Tento problém je možné vyřešit využitím analýzy obrazu, kdy pomocí programu IMAGE – PRO lze vypočítat zastoupení červeně

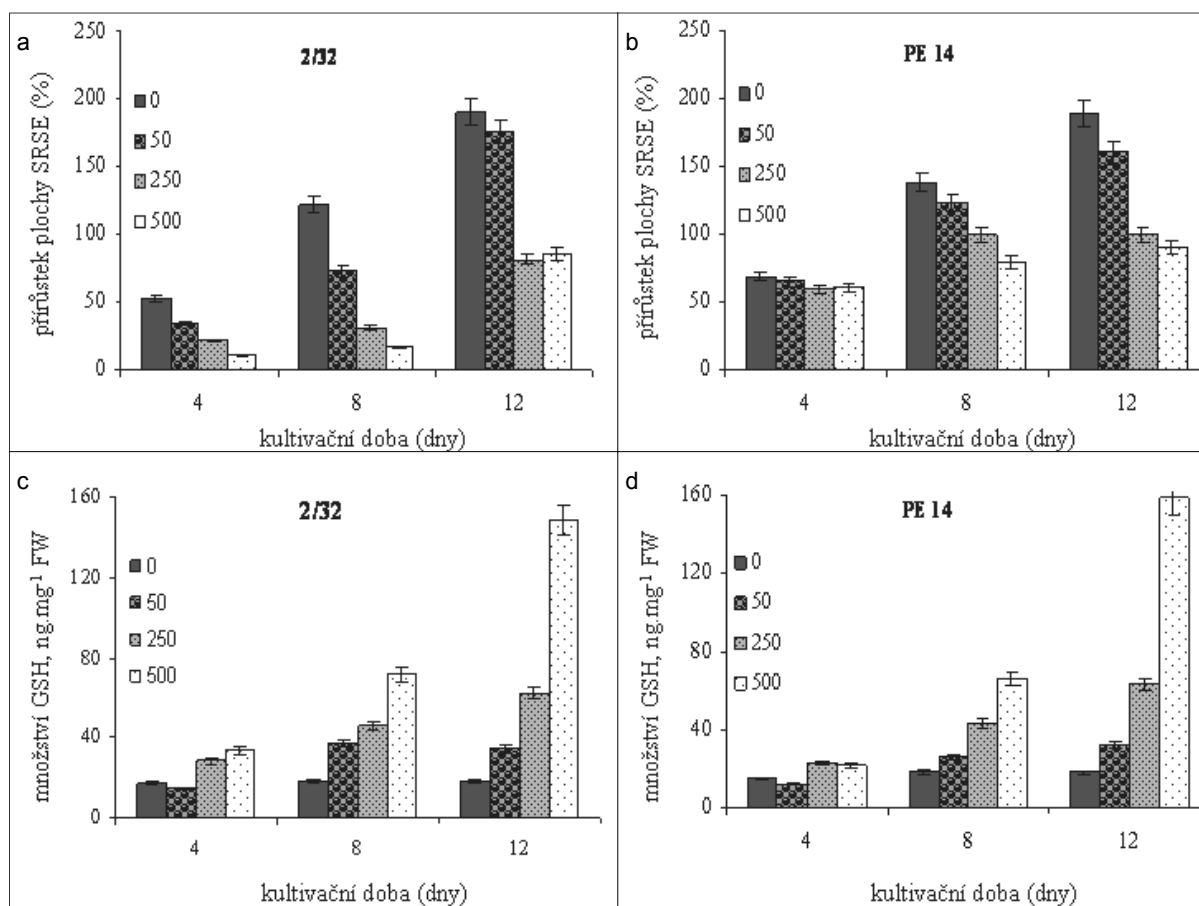
a zeleně zbarvených buněk, tedy buněk mrtvých a živých. Fotografie embryí, která byla barvena PI/FDA a byla následně použita pro výpočet metodou IA, je zobrazena na obr. 5a. Při sledování životnosti RSE smrku ovlivněných Cd-EDTA (50, 250 a 500 μM koncentrace v kultivačním médiu) byl pozorován výrazný pokles životnosti kultury RSE. Již 250 μM Cd-EDTA vedlo k poklesu životnosti na polovinu, avšak koncentrace 500 μM Cd-EDTA usmrtila asi 70 % z celkového počtu RSE (obr. 5b). Tento výsledek potvrdilo i studium aktivity intracelulárních esteras (obr. 5c).

Studium vlivu kadmia na RSE smrku

Těžké kovy jsou díky svým vlastnostem nebezpečnými látkami přítomnými v životním prostředí^{44–49}. Jak již bylo uvedeno výše, vhodným nástrojem pro sledování růstu kultur RSE smrku se ukázala být IA. Na obr. 6a,b je ukázán vliv Cd-EDTA na jednotlivé SRSE smrku ztepilého 2/32 a smrku pichlavého PE 14. Ze zjištěných výsledků lze říci, že se stoupající koncentrací kadmia v kultivačním médiu klesal průměrný přírůstek SRSE. Jak je ze získaných experimentálních výsledků zřejmé, Cd-EDTA půso-



Obr. 5. Sledování životnosti kultury raných somatických embryí smrku pichlavého pomocí fluorescence a enzymatické aktivity; koncentrace kadmia (Cd-EDTA) v kultivačním médiu 0, 50, 250 a 500 µM, 12 dnů kultivace. (a) Vliv Cd-EDTA na životnost RSE; dvojitě barevné fluorescenční barvení. (b) Výpočet životnosti RSE pomocí analýzy obrazu. (c) Stanovení životnosti pomocí aktivity intracelulárních esteraz



Obr. 6. Vliv různých koncentrací kadmia (0, 50, 250 a 500 µM) na růst a obsah glutathionu ve shlucích raných somatických embryí smrku ztepilého, klon 2/32, a smrku pichlavého, klon PE 14. (a) Vliv Cd-EDTA na růst SRSE klonu 2/32 a (b) klonu PE 14. (c) Množství glutathionu u klonu 2/32 a (d) klonu PE 14 ovlivněných kadmíem. Více podrobností naleznete v Obr. 5 a sekci „Materiály a metody“

bila výrazně toxičtěji na klon SRSE 2/32. To je velmi dobře pozorovatelné se vzrůstajícím časem kultivace a rostoucí koncentrací Cd-EDTA (obr. 6a,b). Z výsledků jasně vyplývá, že mezi jednotlivými klony smrku je velmi výrazný rozdíl. Tento fakt pravděpodobně ukazuje na různou schopnost těchto rostlin získat odolnost na environmentální znečištění toxickými sloučeninami, tedy selekční výhodu.

Jak je známo, proti přítomnosti těžkých kovů se rostliny brání syntézou thiolových sloučenin, jako jsou glutathion a fytochelatiny⁴⁴. Ke stanovení thiolových sloučenin lze využít různé analytické metody^{37,50–57}. Pro studium obsahu glutathionu bylo využito elektroanalytické stanovení pomocí adsorptivní přenosové rozpouštěcí diferenční pulzní voltametrie (AdTS DPV) Brdičkovy reakce. Na získaných voltamogramech byly pozorovány elektrochemické odezvy v podobě signálů – Co₁, RS₂Co, Cat₁, Cat₂ a Cat₃. Signál Co₁ odpovídal redukci Co²⁺ na Co⁰ (~–1,0 V), signál označený jako RS₂Co (~–1,0 V) odpovídal komplexu kobaltu s glutathionem (GSH) a další tři katalytické píky Cat₁ (–1,2 V); Cat₂ (–1,3 V) a Cat₃ (–1,4 V) (cit.^{37,38,58}). Redukční signál kobaltu(II), který je pozorován v základním elektrolytu při potenciálu –1,2 V, se posouvá v přítomnosti glutathionu směrem do pozitivních potenciálů. Pozorované změny signálu souvisí s interakcí peptidu se složkami základního elektrolytu za vzniku řady komplexů pravděpodobně i RS₂Co (cit.³⁷). Obsah thiolových sloučenin ve SRSE roste se zvyšující se koncentrací těžkého kovu v kultivačním médiu a s dobou kultivace. Produkce glutathionu byla u obou zkoumaných klonů podobná. U kontrolních variant bez kadmia bylo zjištěno přibližně 18 ng glutathionu na 1 mg svěží hmotnosti kultury. S rostoucí koncentrací chelátu kadmia (Cd-EDTA) a dobou kultivace se zvyšoval obsah glutathionu až na 148 ng mg⁻¹ u klonu 2/32, resp. 158 ng mg⁻¹ u klonu PE 14 (obr. 6c,d). Vzestup hladiny glutathionu souvisí s výraznou toxicitou kadmia, což dokazují také růstové charakteristiky kultur, kde je dobře patrná inhibice jejich růstu vlivem kadmia (obr. 6a,b). Jak je ze získaných dat zřejmé, schopnost RSE přežít v prostředí s vysokými obsahy Cd-EDTA zcela jistě souvisí s aktivací detoxikačních mechanismů vycházejících z glutathionu^{59–61}.

Závěr

Pro zjištění růstových charakteristik bylo využito originální metodiky analýzy obrazu, kterou lze úspěšně sledovat růst a životnost kultury a je tak další alternativou pro sledování kultur v podmínkách *in vitro*. Navíc pomocí elektroanalytických technik byl studován obsah glutathionu u SRSE. Pozorované hladiny glutathionu výrazně vzrůstají a mohou tak souviset s odolností rostlin na environmentální znečištění. Navíc uvedeného postupu by bylo zcela jistě možné využít jako jednoduchého bioindikátoru znečištění prostředí především těžkými kovy, přičemž získané výsledky by mohly umožnit navržení nových genetických modifikací rostlin⁶².

Seznam zkratk

AdTS DPV	adsorptivní přenosová rozpouštěcí diferenční pulzní voltametrie
CCD-kamera	„charge-coupled device“ kamera
DTT	dithiothreitol
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová
FDA	fluoresceindiacetát
GSH	redukováný glutathion
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda
IA	„image analysis“, analýza obrazu
PI	propidium jodid
RSE	rané somatické embryo
SRSE	shluk raných somatických embryí

Práce na tomto příspěvku byla financována grantem: GAČR 525/04/P132, IGA MZ 1A/8666-3 a Výzkumným centrem IM06030.

LITERATURA

- Petrek J., Vitecek J., Vlasinova H., Kizek R., Kramer K. J., Adam V., Klejdus B., Havel L.: *Anal. Bioanal. Chem.* 383, 576 (2005).
- Schachar R. A., Kamangar F.: *Eye* 20, 226 (2006).
- Raadnui S.: *Tribology International* 38, 871 (2005).
- Valero M. A., Panova M., Mas-Coma S.: *J. Helminthol.* 79, 217 (2005).
- Faucitano L., Huff P., Teuscher F., Garipey C., Wegner J.: *Meat Sci.* 69, 537 (2005).
- Carnier P., Gallo L., Romani C., Sturaro E., Bondesan V.: *J. Anim. Sci.* 82, 808 (2004).
- Ibaraki Y., Kenji K.: *Comput. Electron. Agric.* 30, 193 (2001).
- Chi C.-M., Vits H., Staba E. J., Cooke T. J., Hu W.-S.: *Biotechnol. Bioenerg.* 44, 368 (1994).
- Chi C.-M., Zhang C., Steba E. J., Cooke T. J., Hu W.-S.: *Biotechnol. Bioenerg.* 50, 65 (1996).
- Ibaraki Y., Kurata K.: *Plant Cell Tiss. Org. Cult* 65, 179 (2001).
- Giri C. C., Shyamkumar B., Anjaneyulu C.: *Trees-Struct. Funct.* 18, 115 (2004).
- Smiskova A., Vlasinova H., Havel L.: *Biol. Plant.* 49, 451 (2005).
- Uberall I., Vrana J., Bartos J., Smerda J., Dolezel J., Havel L.: *Biol. Plant.* 48, 199 (2004).
- Vlasinova H., Mikulecky M., Havel L.: *Biol. Plant.* 47, 475 (2003).
- Cenklova V., Binarova P., Havel L.: *Biol. Plant.* 46, 167 (2003).
- Hanacek P., Havel L., Truksa M.: *Biologia* 57, 517 (2002).
- Vlasinova H., Havel L.: *J. Plant Physiol.* 154, 212 (1999).
- Havel L., Novak F. J.: *J. Plant Physiol.* 132, 373 (1988).
- Bhansali R. R., Driver J., Durzan D. J.: *J. Horticult. Sci.* 66, 601 (1991).

20. Bhansali R. R., Driver J. A., Durzan D. J.: *Plant Cell Rep.* 9, 280 (1990).
21. Durzan D. J., Gupta P. K.: *Plant Sci.* 52, 229 (1987).
22. Gupta P. K., Durzan D. J., Finkle B. J.: *Can. J. For. Res.-Rev. Can. Rech. For.* 17, 1130 (1987).
23. Gupta P. K., Durzan D. J.: *Bio-Technology* 5, 147 (1987).
24. Durzan D. J.: *In Vitro Cell Develop. Biol.* 21, A56 (1985).
25. Olofsdotter M.: *Plant Cell Rep.* 12, 216 (1993).
26. von Arnold S. J.: *Plant Physiol.* 127, 233 (1987).
27. Havel L., Durzan D. J.: *Int. J. Plant Sci.* 157, 8 (1996).
28. Lopez M. L., Peralta-Videa J. R., Benitez T., Gardea-Torresdey J. L.: *Chemosphere* 61, 595 (2005).
29. Collins R. N., Onisko B. C., McLaughlin M. J., Merrington G.: *Environ. Sci. Technol.* 35, 2589 (2001).
30. Laurie S. H., Tancock N. P., McGrath S. P., Sanders J. R.: *Plant Sci.* 109, 231 (1995).
31. Vassil A. D., Kapulnik Y., Raskin I., Salt D. E.: *Plant Physiol.* 117, 447 (1998).
32. Jones K. H., Senft J. A.: *J. Histochem. Cytochem.* 33, 77 (1985).
33. Mlejnek P., Prochazka S.: *Planta* 215, 158 (2002).
34. Vitecek J., Adam V., Petrek J., Babula P., Novotna P., Kizek R., Havel L.: *Chem. Listy* 99, 496 (2005).
35. Vitecek J., Petrlova J., Petrek J., Adam V., Havel L., Kramer K. J., Kizek R.: *Biol. Plant.* 51, 551 (2007).
36. Vitecek J., Adam V., Petrek J., Vacek J., Kizek R., Havel L.: *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 79, 195 (2004).
37. Kizek R., Vacek J., Trnkova L., Klejdus B., Havel L.: *Chem. Listy* 98, 166 (2004).
38. Vacek J., Petrek J., Kizek R., Havel L., Klejdus B., Trnkova L., Jelen F.: *Bioelectrochemistry* 63, 347 (2004).
39. Zehnalek J., Adam V., Kizek R.: *Chem. Listy* 100, 508 (2006).
40. Gupta P. K., Durzan D. J.: *Bio-Technol.* 4, 643 (1986).
41. Durzan D. J., Jokinen K., Guerra M. P., Santerre A., Chalupa V., Havel L.: *Int. J. Plant Sci.* 155, 677 (1994).
42. Durzan D. J.: *Int. J. Plant Sci.* 157, 17 (1996).
43. Havel L., Durzan D. J.: *Bot. Acta* 109, 268 (1996).
44. Zehnalek J., Adam V., Kizek R.: *Lis. Cukrov. Reparske* 120, 222 (2004).
45. Potesil D., Petrlova J., Adam V., Vacek J., Klejdus B., Zehnalek J., Trnkova L., Havel L., Kizek R.: *J. Chromatogr., A* 1084, 134 (2005).
46. Zehnalek J., Vacek J., Kizek R.: *Lis. Cukrov. Reparske* 120, 220 (2004).
47. Kafka Z., Puncocharova J.: *Chem. Listy* 96, 611 (2002).
48. Kafka Z., Cudova P.: *Chem. Listy* 95, 400 (2001).
49. Prochackova T., Foltin M.: *Chem. Listy* 89, 770 (1995).
50. Vodickova H., Pacakova V., Sestakova I., Mader P.: *Chem. Listy* 95, 477 (2001).
51. Fojta M., Fojtova M., Havran L., Pivonkova H., Dorcak V., Sestakova I.: *Anal. Chim. Acta* 558, 171 (2006).
52. Dorcak V., Sestakova I.: *Bioelectrochemistry* 68, 14 (2006).
53. Sestakova I., Navratil T.: *Bioinorg. Chem. Appl.* 3, 43 (2005).
54. Yosypchuk B., Sestakova I., Novotny L.: *Talanta* 59, 1253 (2003).
55. Dabrio M., Rodriguez A. R., Bordin G., Bebianno M. J., De Ley M., Sestakova I., Vasak M., Nordberg M.: *J. Inorg. Biochem.* 88, 123 (2002).
56. Sestakova I., Vodickova H., Mader P.: *Electroanalysis* 10, 764 (1998).
57. Petrlova J., Mikelova R., Stejskal K., Kleckerova A., Zitka O., Petrek J., Havel L., Zehnalek J., Adam V., Trnkova L., Kizek R.: *J. Sep. Sci.* 29, 1166 (2006).
58. Brazdova M., Kizek R., Havran L., Palecek E.: *Bioelectrochemistry* 55, 115 (2002).
59. Adam V., Zehnalek J., Petrlova J., Potesil D., Sures B., Trnkova L., Jelen F., Vitecek J., Kizek R.: *Sensors* 5, 70 (2005).
60. Klejdus B., Zehnalek J., Adam V., Petrek J., Kizek R., Vacek J., Trnkova L., Rozik R., Havel L., Kuban V.: *Anal. Chim. Acta* 520, 117 (2004).
61. Kizek R., Vacek J., Trnkova L., Klejdus B., Kuban V.: *Chem. Listy* 97, 1003 (2003).
62. Macek T., Mackova M., Truksa M., Cundy A. S., Kotrba P., Yancey N., Schouten W. H.: *Chem. Listy* 90, 690 (1996).

J. Petřek^a, J. Baloun^{a,b}, H. Vlašínová^a, L. Havel^a, V. Adam^{b,c}, J. Vítěček^a, P. Babula^d, and R. Kizek^b
^aDepartment of Plant Biology and ^bDepartment of Chemistry and Biochemistry, Mendel University of Agriculture and Forestry, Brno, ^cDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, ^dDepartment of Natural Drugs, Veterinary and Pharmaceutical University, Brno): **Image Analysis and Activity of Intracellular Esterases as New Analytical Tools for Determination of Growth and Viability of Embryonic Cultures of Spruce (*Picea* sp.) Treated with Cadmium**

Introduction

Image analysis (IA) of plant structures is technique, which enables us to quantify growth and morphological changes. IA is a non-destructive, sterile and simple method.

Material and methods

We utilized CCD-camera, and GRAB-IT and Image-Pro software to digitalize of the images. CCD-camera determined the area of the clusters with deviation of 0.31 % (n=10). IA was utilized for determination of growth of early somatic embryos (ESEs) of spruce. Moreover, IA in connection with double staining can be used for the deter-

mination of viability of the culture. These techniques have been utilized for investigation of the influence of Cd-EDTA (50, 250 and 500 $\mu\text{mol l}^{-1}$) on spruce cultures for twelve days.

Conclusion

We found out that increase in cluster area decreased and number of dead cells increased with elevating concentration of cadmium and time of treatment. Glutathione content has been studied by means of adsorptive transfer stripping differential pulse voltammetry Brdicka reaction. We observed that the content of glutathione was nine times higher in ESEs treated by Cd-EDTA (500 $\mu\text{mol l}^{-1}$) after twelve days in comparison with control ones.

Česká společnost chemická a Ústav chemie a technologie sacharidů VŠCHT Praha

pořádají

konferenci „Polysacharidy III“

Datum a místo konání: 16.11.2007, 8,30 až 16,00 h na Novotného lávce 5, Praha 1

Konference bude zaměřena na průmyslovou výrobu a využití polysacharidů, výskyt, vlastnosti a strukturu biologicky aktivních polysacharidů a deriváty polysacharidů.

Uzávěrka přihlášek je 15. září 2007.

Předpokládá se zájem účastníků a společností bez odborného příspěvku.

Úvodní přednáška: RNDr. Desana Lišková PhD., Chemický ústav SAV Bratislava

Vplyv galaktoglukomananových oligosacharidov (GGMOs) na vývoj rastlín a účasť v obranných reakciách

Vložené:

Člen ČSCH nebo SCHS 700 Kč, ostatní 800 Kč. Po 15. září 2007 činí vložné 1000 Kč.

Vložené zahrnuje: CD s plnými texty přednášek (bude obsahovat ISBN), výtisk Chemických listů č. 9 s abstrakty přednášek a posterů, občerstvení a organizační náklady.

Je možné zajistit ubytování na kolejičkách na Jižním městě.

Vědecký výbor

Doc. Ing. Jana Čopíková, CSc. – Ústav chemie a technologie sacharidů VŠCHT Praha

Ing. Evžen Šárka, CSc. – Ústav chemie a technologie sacharidů VŠCHT Praha

RNDr. Vladimír Erban, CSc. – Výzkumný ústav potravinářský Praha

Prof. Milan Marounek, DrSc. – Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR

Ing. Miroslav Novák, CSc. – Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

Bližší informace na adrese <http://www.csch.cz>

Kontaktní adresa: Česká společnost chemická, Novotného lávka 5, 116 68 Praha 1,

tel.: 221 082 370, tel/fax: 222 220 184, e-mail: chem.listy@csvts.cz, chem.spol@csvts.cz