

Glutation jako marker fotooxidativního stresu u rostlin vystavených různým intenzitám záření. *In-vitro* studie.

Dominik Chmelík, Miloš Barták, Jaroslava Dubová, Julie Rotkovská

Ústav experimentální biologie, Oddělení fyziologie a anatomie rostlin, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Czech Republic, E-mail: chmelikd@seznam.cz

ABSTRACT

Micropropagation of plants *in vitro* is fast and effective way to obtain proliferation of new plant material. However, *in vitro* cultivated plants may suffer from high light stress when transferred from *in vitro* conditions. In our study, we focused on orchid plants *Potinara* hybr. cultivated *in vitro* and their sensitivity to short-term light stress. The plants were cultivated in temporary immersion system (TIS) RITA®. This system enables complete or partial submersion of plants with liquid nutritive medium. In our experiment, plants were submerged 7 times during 24 hours for 5 minutes. Plants were cultivated one month before beginning of the experiment. We investigated the short-term effects of several different light intensities of photosynthetic active radiation (PAR) on the formation of the antioxidative substrate glutathione. Plants were cultivated under low light intensities of PAR ($15 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). During short-term experiment, the plants were exposed to either 800 or $1400 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ of high light PAR. This exposition lasted for 1 hour. High light-exposed plant material was then subsequently harvested in 20 minute intervals for consequent glutathione analyzes. Concentration of glutathione reduced and oxidized form was measured in plant extract by HPLC. Glutathione thiols were labeled with monobromobimane. When low PAR exposition was used, glutathione concentration showed small increase after 20 minutes, then decrease after 40 minutes and subsequent rapid increase after 60 minutes of the high light exposition. The response of plants to the higher high light PAR ($1400 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) exposition was that the glutathione concentration was much lower after the first 20 minutes and rapid increase of its concentration was measured after 40 and 60 minutes after the high light treatment.

ÚVOD

Světlo je jedním z nezbytných faktorů pro zdravý růst a vývoj rostlin. Pokud jsou však dávky fotosynteticky aktivního záření (PAR) vyšší, než je nezbytné pro účinnou fixaci CO_2 , nastane nerovnováha mezi spotřebou redukované formy NADPH pro fixaci CO_2 a potřebou regenerovaného akceptoru elektronů NADP v elektrontransportním řetězci fotosystému I (PS I) (Foyer and Noctor, 2000). Ve fotosystémech se začínají hromadit volné elektrony, které jako alternativní akceptor využívají O_2 , což následně vede ke vzniku reaktivních forem kyslíku (Demming-Adams and Adams, 1992). Mezi hlavní fotochranné mechanismy, kterými se rostliny vyrovnávají s nadbytkem této absorbované energie fotonů, patří tepelná disipace pomocí xantofylového cyklu a detoxifikace reaktivních forem kyslíku antioxidantním systémem (Logan *et al.*, 1998).

Antioxidační systém je tvořen enzymatickými a neenzymatickými antioxidanty (Asada, 1999). Počátečním produktem redukce kyslíku je superoxid, který je následně přeměněn na peroxid vodíku. Ten je v askorbát-glutathionovém cyklu, lokalizovaném v chloroplastech a cytosolu, rozložen na vodu a kyslík (Noctor *et al.*, 1998). Tento cyklus je tvořen několika

enzymy a jejich substráty, askorbátem a glutathionem. Antioxidační ochrana a s ní související redoxní reakce hrají hlavní roli v aklimaci rostlin k podmínkám prostředí, a tím se glutathion stává vhodným kandidátem stresového markeru (Noctor *et al.*, 1998). Aktivní formou glutathionu je jeho redukovaná forma GSH, která po reakci s radikálem přejde do oxidované disulfidické formy GSSH, která může být regenerována na GSH enzymem glutathion reduktázou za spotřeby molekuly NADPH (Hausladen and Alscher, 1993).

V této práci jsme sledovali vliv krátkodobého působení vysokých intenzit fotosynteticky aktivního záření (PAR) na koncentraci glutathionu u rostlin kultivovaných *in vitro* v bioreaktorech RITA®. Bioreaktory RITA® představují kultivační systémy využívající dočasné zaplavování kultur a umožňující během poměrně krátké doby namnožit dostatečné množství rostlinného materiálu využitelného pro další experimenty. Během kultivace v tomto typu bioreaktoru dochází díky výměně vzduchu v kultivační nádobě k eliminaci morfologických malformací způsobených hyperhydricitou, která je častá u trvale submerzních kultur (Alvard *et al.*, 1993).

MATERIÁL A METODY

Rostlinný materiál a kultivační podmínky

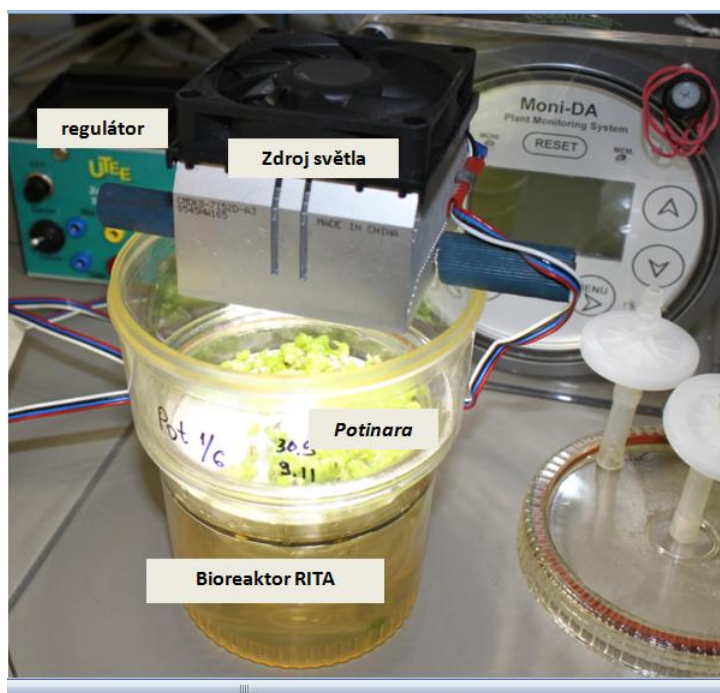
Pro tento experiment byly použity klíčící protokormy orchideje *Potinara* hybr. kultivované v dočasně zaplavovaném bioreaktoru RITA®. Používali jsme 7 intervalů zaplavování rostlin tekutým médiem po dobu 5 minut v průběhu 24 hodin. Složení anorganických solí média bylo podle autorů Murashige a Skoog (1962) s poloviční koncentrací makroelementů. Složení vitamínů bylo podle Gamborgova B5 média (Gamborg *et al.*, 1968). V médiu byla obsažena 2% sacharosa a žádné exogenní růstové regulátory. Rostliny byly kultivovány za konstantních podmínek 16h světlo/8h tma, při intenzitě osvětlení 10 – 15 $\mu\text{mol fotonů na m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Teplota kultivace se pohybovala kolem 20 °C.

Krátkodobé vlivnění experimentálních rostlin

Rostliny byly vystaveny po dobu jedné hodiny dvěma různým intenzitám fotosynteticky aktivního záření (PAR) a to konkrétně 800 nebo 1400 $\mu\text{mol fotonů na m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Jako zdroj vysokých intenzit záření posloužil panel se supersvítivými LED diodami, ovládaný řídicí jednotkou s možností regulace intenzity záření (obr. 1). Intervaly odběru rostlinného materiálu byly zvoleny 20, 40 a 60 minut po expozici rostlin. Po odběru byly rostliny okamžitě zamrazeny v tekutém dusíku a poté vloženy do mrazícího boxu, kde byly uloženy při teplotě - 20 °C pro pozdější analýzu.

Zpracování rostlinného materiálu a stanovení koncentrace glutathionu

Zamražený materiál byl lyofilizován (MAXI DRY; Heto-Holten, Dánsko) a následně rozemletím homogenizován na kulovém mlýnku (Retsch MM 2000; Německo). Pro stanovení celkového a oxidovaného glutathionu byla použita metodika podle Krannera (Kranner, 1998).



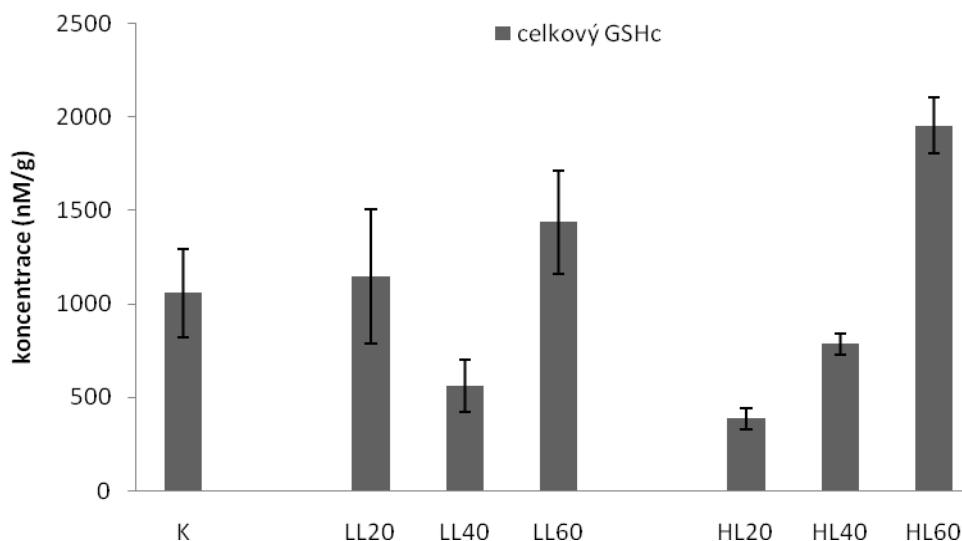
Obr. 1. Ovlivnění rostlin vysokými hodnotami PAR.

Rostlinný materiál byl extrahován v 0,1 M HCl. Zamezení reakce fenolických a thiolových skupin během extrakce bylo zajištěno přidávkem polyvinylpolypyrrolidonu. Celkový i oxidovaný glutathion byl stanoven pomocí značení thiolových skupin monobromobimánem (mBBr) a jejich následnou detekcí na HPLC (Waters, USA) s detektorem fluorescence (detekce při 480 nm). Oxidovaný glutathion byl stanoven po blokaci redukovaných molekul glutathionu N-ethylmaleimidem (NEM) a jejich následném vymytí toluenem. Oxidované molekuly byly před označením mBBr redukovány dithiothreitem (DTT). Koncentrace redukovaného glutathionu (GSH) byla určena jako rozdíl naměřené koncentrace celkového (GSH_c) a oxidovaného glutathionu (GSSH).

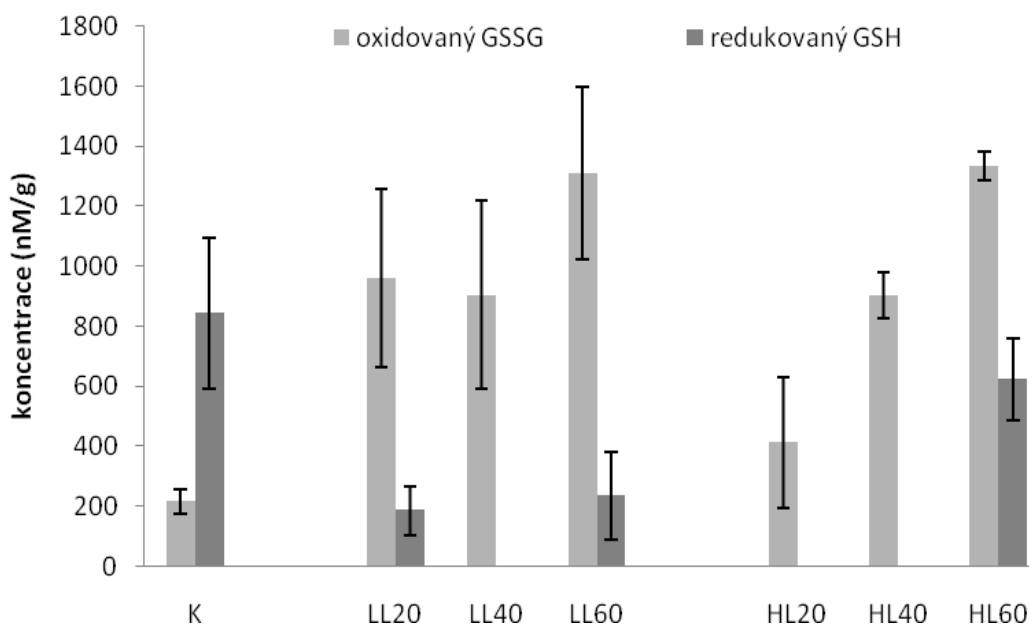
VÝSLEDKY A DISKUZE

Po expozici rostlin vysokým hodnotám PAR (800 nebo 1400 $\mu\text{mol fotonů na m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) měly naměřené koncentrace glutathionu pro obě hodnoty intenzity stejné trendy vývoje ve sledovaném čase (obr. 2). V případě ozáření rostlin intenzitou 800 $\mu\text{mol fotonů na m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ došlo v prvních 20 minutách po expozici k mírnému nárůstu koncentrace celkového glutathionu (GSH_c), ve 40. minutě byl naměřen pokles oproti kontrolní variantě. Tento pokles koncentrace celkového glutathionu byl v případě expozice rostlin zářením o intenzitě 1400 $\mu\text{mol fotonů na m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ zaznamenán již po prvních 20 minutách. V 60. minutě expozice u obou vysokých intenzit PAR již naměřené koncentrace GSH_c překračovaly jeho množství u kontrolní neozářené varianty. Rychlý pokles GSH_c v počátečních fázích expozice vysokou intenzitou PAR lze považovat jako obecnou odpověď rostlin na stres a následný postupný vzrůst jeho obsahu je možné vysvětlit jako aklimační reakci rostlin na způsobenou fotoinhibicí doprovázenou fotooxidativním stresem, který byl vyvolán vysokými hodnotami PAR (Logan *et al.*, 1998). Podobný pokles GSH_c krátce po expozici rostlin vysokým hodnotám PAR naměřili také Barták *et al.* (2003) u lišejníku *U. antarctica*. Rovněž Burrit a

MacKenzie (2003) u rostlin *Begonia sp.* kultivovaných ve stínu a poté přenesených na plné slunce naměřili počáteční pokles GSH_c, a následně došlo k jeho růstu podobně jako v našem experimentu.



Obr. 2. Změny koncentrace celkového glutathionu (nM/g) v rostlinách orchidejí *Potinara* hybr. v závislosti na intenzitě použitého osvětlení a době expozice. Koncentrace je vztažena na 1 g suché hmotnosti rostlin. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku ze tří opakování. K - kontrola ($10 - 15 \mu\text{mol fotonů na m}^{-2} \text{s}^{-1}$), LL – intenzita $800 \text{ fotonů na m}^{-2} \text{s}^{-1}$, HL – $1400 \text{ fotonů na m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Čísla 20, 40, 60 jsou jednotlivé intervaly odběru během expozice rostlin PAR.



Obr. 3. Změny koncentrace redukované a oxidované formy glutathionu (nM/g) v rostlinách orchidejí *Potinara* hybr. v závislosti na intenzitě použitého osvětlení a době expozice. Koncentrace je vztažena na 1 g suché hmotnosti rostlin. Chybové úsečky představují směrodatnou odchylku ze tří opakování. K - kontrola ($10 - 15 \mu\text{mol fotonů na m}^{-2} \text{s}^{-1}$), LL – intenzita $800 \mu\text{mol fotonů na m}^{-2} \text{s}^{-1}$, HL – $1400 \mu\text{mol fotonů na m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Čísla 20, 40, 60 jsou jednotlivé intervaly odběru během expozice rostlin PAR. Redukovanou formu se pro LL40, HL20 a HL40 nepodařilo z důvodu nízké koncentrace naměřit.

K nárůstu obsahu oxidované formy glutathionu (GSSH) došlo od prvního měřeného okamžiku. V případě expozice rostlin PAR 800 $\mu\text{mol fotonů na m}^{-2} \text{s}^{-1}$ byl nárůst největší v prvních 20 minutách, u intenzity PAR 1400 $\mu\text{mol fotonů na m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se koncentrace GSSH zvyšovala postupně (obr. 3).

S rostoucí koncentrací GSSH jsme předpokládali pokles redukované formy (GSH), což se také potvrdilo, s výjimkou 60. minuty odběru při PAR 1400 $\mu\text{mol fotonů na m}^{-2} \text{s}^{-1}$. V tomto vzorku byla koncentrace GSH naměřena vyšší než u kontrolní varianty. Ve 40. minutě PAR 800 $\mu\text{mol fotonů na m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a ve 20. a 40. minutě expozice PAR 1400 $\mu\text{mol fotonů na m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nebyla redukovaná forma glutathionu detekována, pravděpodobně z důvodu velmi nízké koncentrace.

ZÁVĚR

Hodnocení získaných dat a především jejich srovnání s výsledky dalších autorů je poměrně obtížné, neboť většina prací sleduje vývoj koncentrace glutathionu v delším časovém intervalu expozice než je jedna hodina, kterou jsme použili v našem krátkodobém experimentu. Výsledky dlouhodobých experimentů přinášejí informaci o změně konstitutivní koncentrace glutathionu, tedy přítomné i při nepůsobení stresoru. Naše krátkodobé měření sledovalo spíše počáteční průběh aklimační reakce, při náhlém působení vysokých dávek PAR. I přesto se dá z naměřených dat usuzovat, že glutathion hraje důležitou roli při odpovědi rostlin na vysoké dávky PAR. Při srovnávání výsledků našeho experimentu je však rovněž nutné přihlídnout ke skutečnosti, že námi sledované klíčící rostliny orchidejí byly před vlastní expozicí kultivované za velmi nízkých PAR intenzit a vzhledem k použité metodě kultivace měly spíše heterotrofní metabolismus, ve srovnání s materiálem experimentů ostatních autorů. I přes výše zmíněné metodické rozdíly naměřená data ukazují, že glutathion hraje nezanedbatelnou roli při reakci rostlin na stres, v našem případě šlo o stres z nadměrné ozáření. Antioxidační ochrana rostlin glutathionem nespočívá pouze ve schopnosti rostlin regenerovat GSSH na GSH, ale i ve schopnosti zvyšování celkové hladiny GSH.

SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- Alvard D., Cote F. and Teisson C. (1993): Comparison of methods of liquid medium culture for banana propagation. Effects of temporary immersion of explants. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 32: 55-60.
- Asada K. (1999): The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 601–639.
- Barták M., Hájek J., Vráblíková H. and Dubová J. (2004): High-light stress and photoprotection in *Umbilicaria antarctica* monitored by chlorophyll fluorescence imaging and changes in zeaxanthin and glutathione. *Plant Biology, Stuttgart: Thieme, Georg Thieme Verlag*, 6, 3: 333-341, 9 s. ISSN 1435-8603.
- Burritt D. J. and Mackenzie S. (2003): Antioxidant metabolism during acclimation of *Begonia X erythrophylla* to high light levels. *Annals of Botany* 91, 783-794.
- Demming-Adams B. and Adams W.W. III (1992): Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 599-626.
- Gamborg O.L., Miller R.A. and Ojima K. (1968): Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151 – 158.

- Hausladen A. and Alscher R.G. (1993): Glutathione. In: Alscher R.G., Hess J.L., eds. Antioxidant in higher plants. Boca Raton, FL: CRC Press, 1-30.
- Kranner I. (1998): Determination of glutathione, glutathione disulphide and two related enzymes, glutathione reductase and glucose – 6 – phosphate dehydrogenase, in fungal and plant cells. A. Varma (Ed.), Mycorrhizal manual, Springer Verlag, Berlin, Germany, 227-241.
- Logan B.A., Demming-Adams B., Adams W.W. and Grace S.C. (1998): Antioxidants and xanthophyll cycle-dependent energy dissipation in *Cucurbita pepo* L. and *Vinca major* L. acclimated to four growth PFDs in the field. Journal of Experimental Botany 49: 1869-1879.
- Murashige T. and Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Noctor G. and Foyer C. H. (1998): Ascorbate and glutathione: keep active oxygen under control, Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49: 249–279.

PODĚKOVÁNÍ

Podpořeno projektem JMK71070/2010.