

MIKROSKOPICKÁ DETEKCE POLYFENOLICKÝCH LÁTEK VE ZRALÝCH SOMATICKÝCH EMBRYÍCH SMRKU PO OZÁŘENÍ UV-B



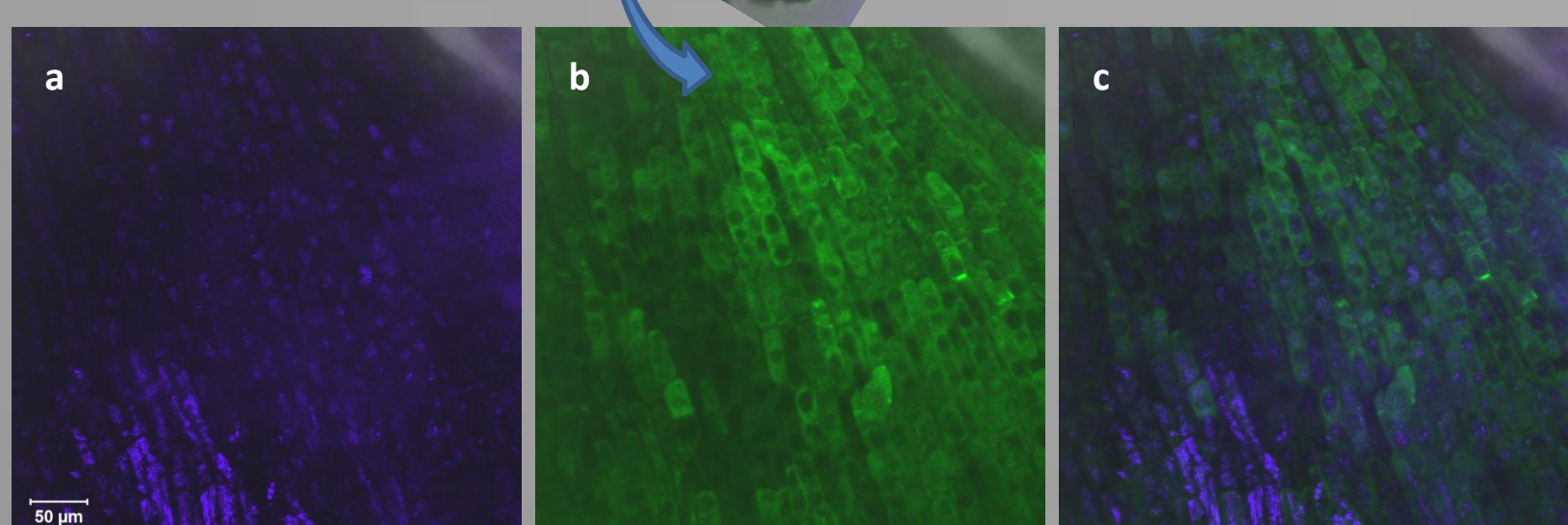
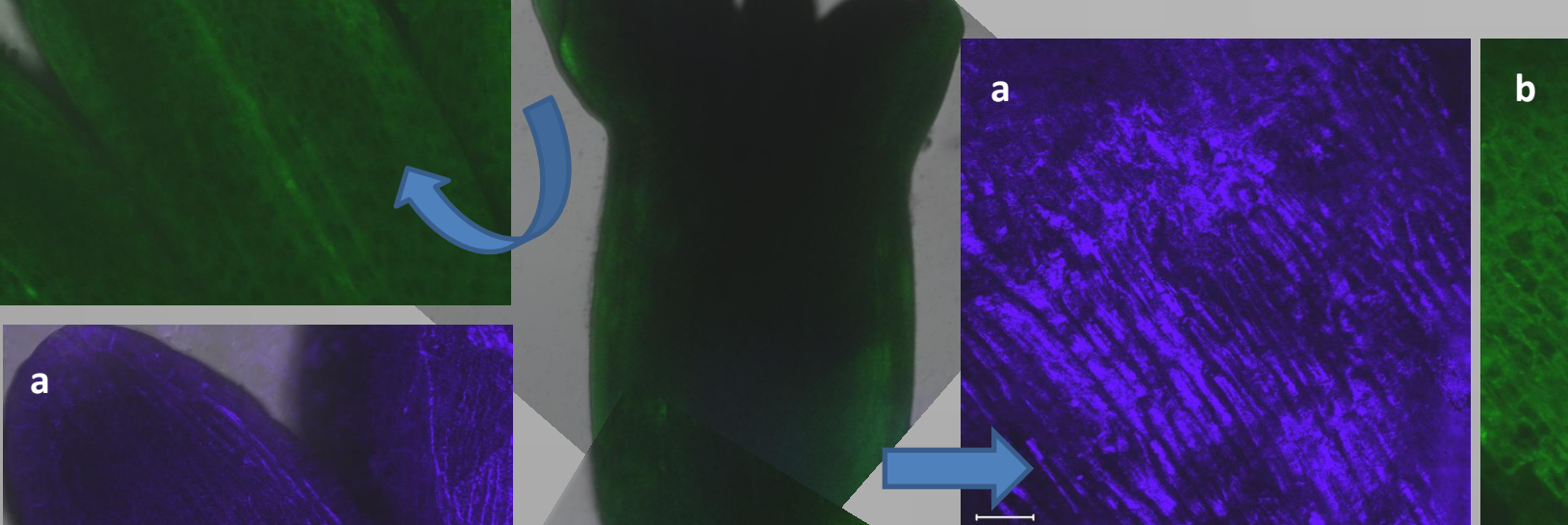
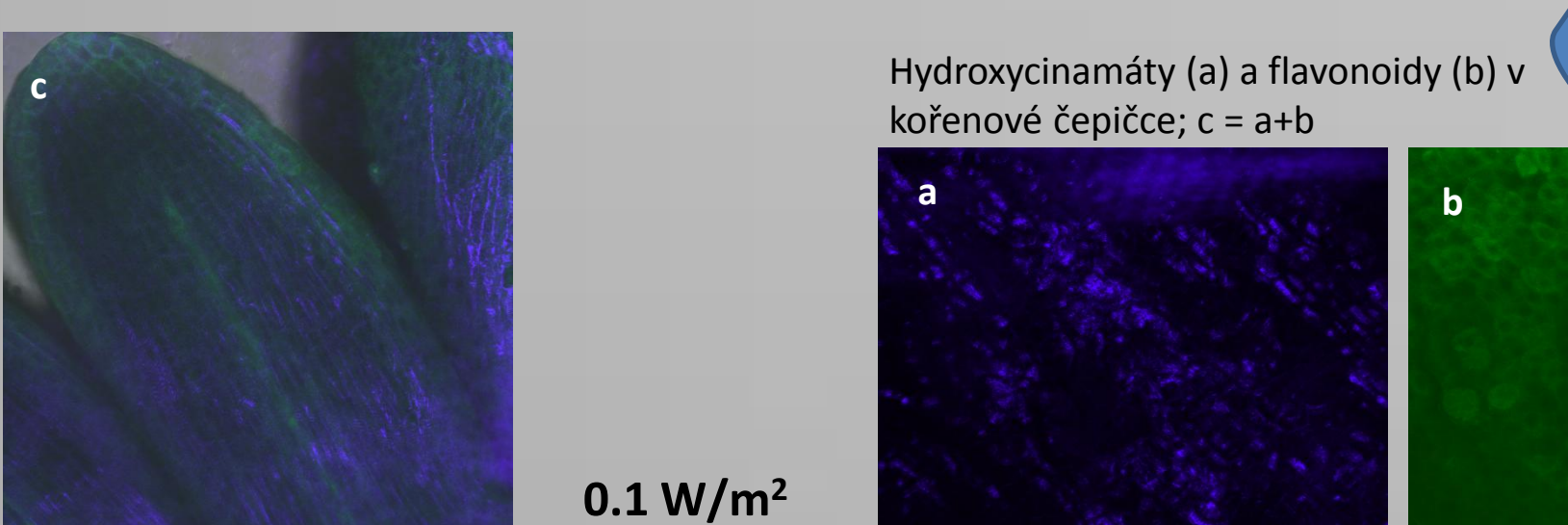
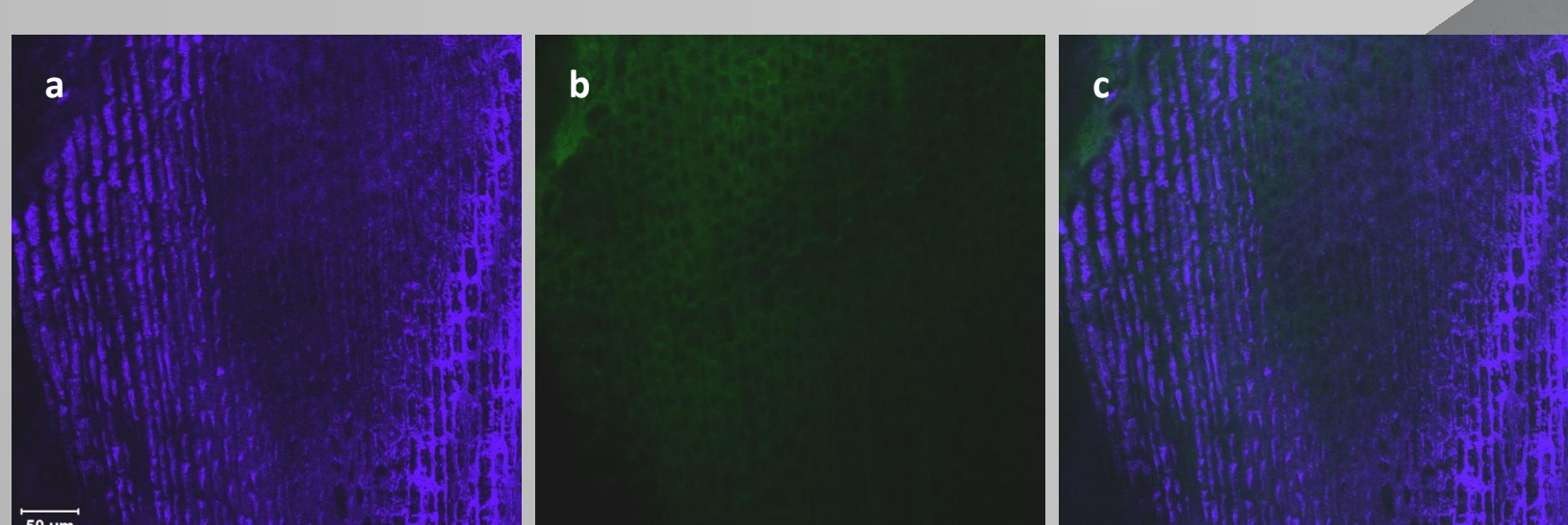
Kateřina Eliášová, Zuzana Vondráková, Milena Cvikrová
 ÚEB AVČR, v.v.i., Rozvojová 263, 165 02, Praha 6 – Lysolaje, ČR
eliasova@ueb.cas.cz

Úvod

Nízká úroveň UV-B radiace působí jako přirozený regulátor genové exprese, buněčných a metabolických aktivit, ovlivňuje růst a vývoj rostlin. Ve vysokých dávkách je ultrafialové záření zhoubné. Rostliny odpovídají na UV-B záření syntézou sekundárních metabolitů, které mají antioxidantní vlastnosti a zachycují značnou část UV-B záření. Patří mezi ně především flavonoidy (převážně ve vakuolách) a deriváty kyseliny skořicové – hydroxyskořicové kyseliny (ferulová, kávová a p-kumarová – vázané v buněčných stěnách). Tyto látky jsou zdrojem autofluorescence v modré a zelené oblasti spektra. Této vlastnosti jsme využili při jejich pozorování. Vzhledem k tomu, že u somatických embryí (SE) smrku dochází během desikace k červenání v oblasti kořenové čepičky, testovali jsme přítomnost polyfenolických látek také histochemicky.

Dvoukanálovou spektrální analýzou jsme prokázali deriváty kyseliny skořicové v buněčných stěnách pokožkových buněk a flavonoidy v buněčných povrchových vrstvách embryí.

Hydroxycinamátů (a) a flavonoidů (b) v buňkách hypokotylu; c = a+b



Závěry

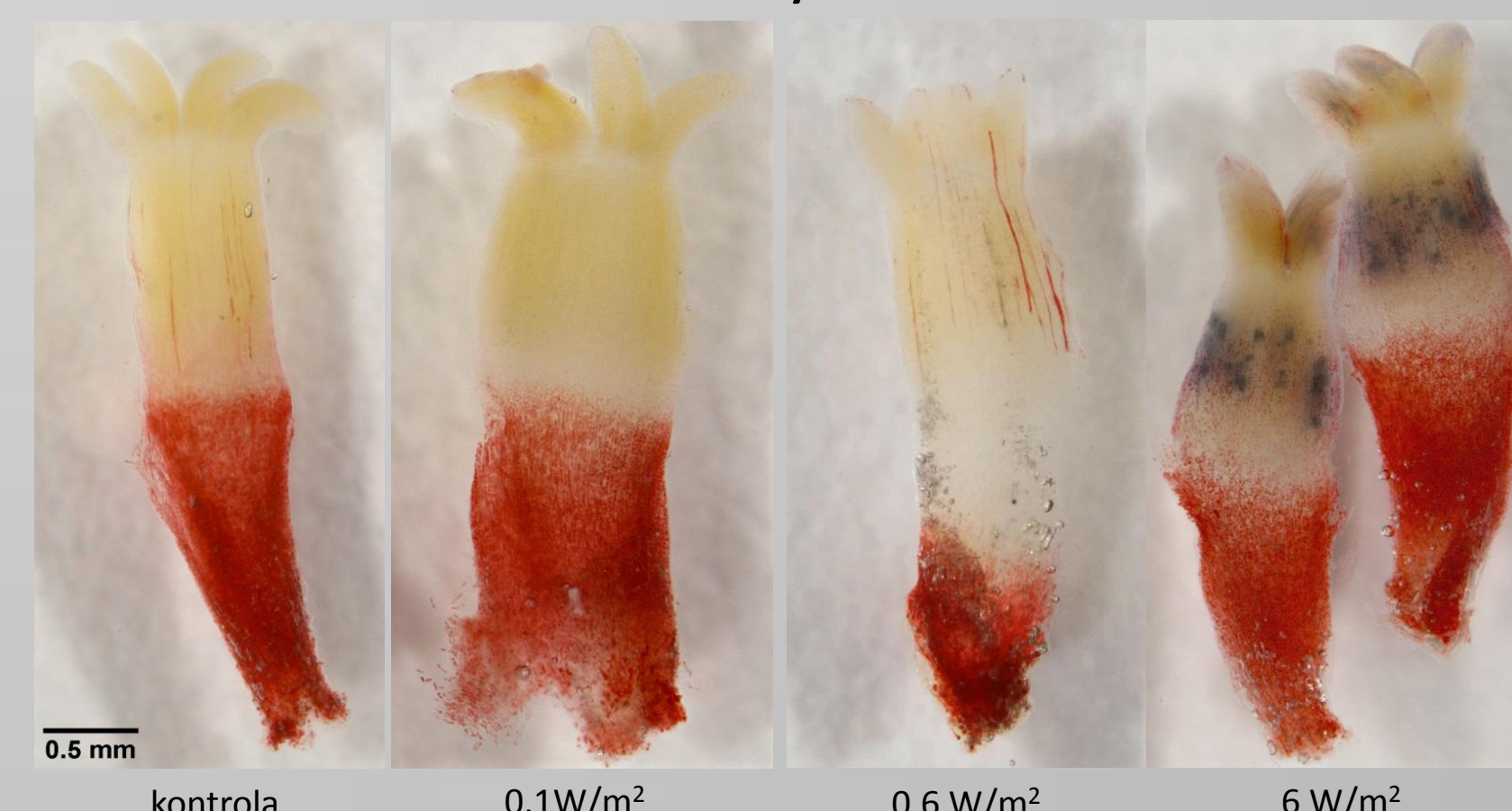
- Oba histochemické testy prokázaly ve zralých SE po 10 dnech desikace přítomnost polyfenolických látek v oblasti kořenové čepičky ve všech variantách nezávisle na ozáření UV-B; v případě vanilínového testu se obtížně odlišuje zda se jedná o výsledek chemické reakce nebo přirozené zbarvení antokyany. Oba testy také prokázaly mírné zvýšení množství fenolických látek v povrchových vrstvách hypokotylu i děloh po ozáření; zvýšení bylo přímo úměrné intenzitě záření.
- Spektrální analýza v konfokálním mikroskopu potvrdila možnost detekovat deriváty kyseliny skořicové a flavonoidy na základě jejich autofluorescence v UV a modrém světle. Tyto látky byly přítomné v SE ve všech variantách, nejvíce v oblasti kořenové čepičky. Hydroxycinamátů byly pozorovány především v buněčných stěnách pokožkových buněk děloh a hypokotylu, ve špičce čepičky pak i uvnitř buněk; jejich detekci ztěžovala interference krycího sklíčka. Flavonoidy se nacházely především v pokožkových buňkách, ale i v idioblastech hypokotylu a děloh; po ozáření UV-B se autofluorescence zvýšila. Nejvyšší intenzita záření povrch embryí poškozuje, což se projevilo intenzivní bodovou autofluorescencí.

Linie AFO 541 ozářená UV-B po 10-denní desikaci



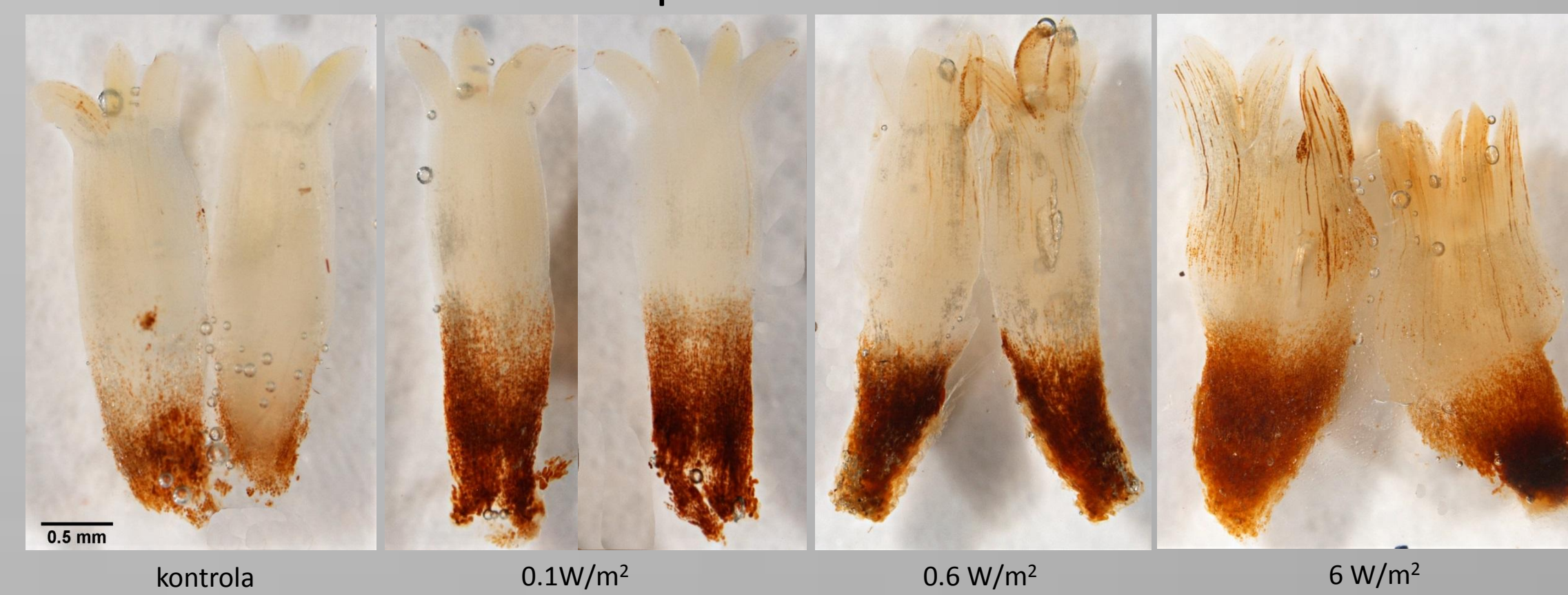
Somatická embrya smrku, která byla po 10 dnech desikace ozářena UV-B o různé intenzitě, byla analyzována 7. den po ošetření. Červené zbarvení kořenových čepiček je typickou vlastností této linie; objevuje se během desikace na světle (po období maturace, která probíhá ve tmě) nezávisle na ozáření UV-B.

Vanilínový test



Červené zbarvení, které je výsledkem reakce vanilinu a HCl s kondenzovanými taniny, kopíruje původní zbarvení kořenového pólu, kromě toho se objevují (i v kontrolních vzorcích) červené podélné pruhy v povrchových vrstvách hypokotylu, svědčící o fenolickém obsahu idioblastů. Po ozáření 6 W/m² se kondenzované taniny vyskytly i v buňkách hypokotylu a děloh, černé skvrny značí nekrozu pletiv.

Hoepfner – Vorsatzův test



Výsledkem tohoto testu je zbarvení různými odstíny žluté až hnědé podle toho, jaké fenolické látky se v pletivu vyskytují. Vizualní hodnocení je velmi subjektivní a tudíž obtížné; podle jantarově hnědého zbarvení v oblasti kořenové čepičky ve všech variantách a v oblasti hypokotylu a děloh po vyšších dávkách UV-B záření bylo možno usuzovat pravděpodobně i na přítomnost kvercetinu.

Cíl práce – detekovat polyfenolické látky mikroskopicky a zjistit, zda se jejich produkce po ozáření UV-B zvýší

Materiál a metody

Materiál: zralá somatická embrya smrku ztepilého (*Picea abies* L. (Karst.) linie AFO 541, desikovaná 10 dní; embrya byla ozářena UV-B v intenzitách 0, 0.1, 0.6 a 6 W/m²; vzorky byly analyzovány 7. den po ozáření

Metody detekce polyfenolů na čerstvých podélných řezech:

- Vanilínový test** – kondenzované taniny (proanthokyanidiny) reagují v kyselém prostředí s vanilinem za vzniku červeného produktu - řezy umístí do nasyceného roztoku vanilinu v etanolu, přidat shodný objem koncentrované HCl, nechat působit 3 minuty; montovat do glycerolu okyseleného H₂SO₄
- Hoepfner-Vorsatzův test** - širokospektrální důkaz přítomnosti polyfenolických látek v barevné škále od žluté, přes červenou po hnědou podle typu fenolické látky – řezy umístí do směsi 10% dusitanu sodného, 10% kyseliny octové a 20% močoviny (v poměru 1:1:1), po 3 minutách přidat 2N NaOH
- Spektrální analýza autofluorescence pomocí konfokální mikroskopie** hydroxyskořicové kyseliny (modrá barva) – excitace 405 nm, emise BP 470 – 500 nm; flavonoidy (zelená barva) – excitace 488 nm, emise BP 530 – 600 nm; autofluorescence byla zvýšena aplikací 0.1% Naturstoffreagentz A (2- aminoethyl difenylborinát) ve fosfátovém pufru (pH 6.8) s 1% NaCl
- Histochemické testy** byly vyhodnoceny pomocí světelného trasmisního mikroskopu Zeiss Jena, vybaveného kamerou Nikon DS-5M, obraz byl zpracován softwarem pro analýzu obrazu NIS-Elements (Laboratory Imaging, Praha)
- Autofluorescence hydroxycinamátů a flavonoidů** jsme pozorovali v konfokálním mikroskopu Zeiss LSM 5 Duo

Práce byla financována grantem MŠMT: projekt LD13051.