



Sběr nezralých šišek – materiálu pro indukci embryonální kultury



# VLIV ABIOTICKÉHO STRESU NA METABOLISMUS POLYAMINŮ V SOMATICKÝCH EMBRYÍCH SMRKU

Zuzana Vondráková, Kateřina Eliášová, Lenka Gemperlová, Bedřich Pešek, Alena Trávníčková, Jiří Malbeck a Milena Cvikrová

Ústav experimentální botaniky AV ČR, Rozvojová 263, 16502 Praha 6 - Lysolaje

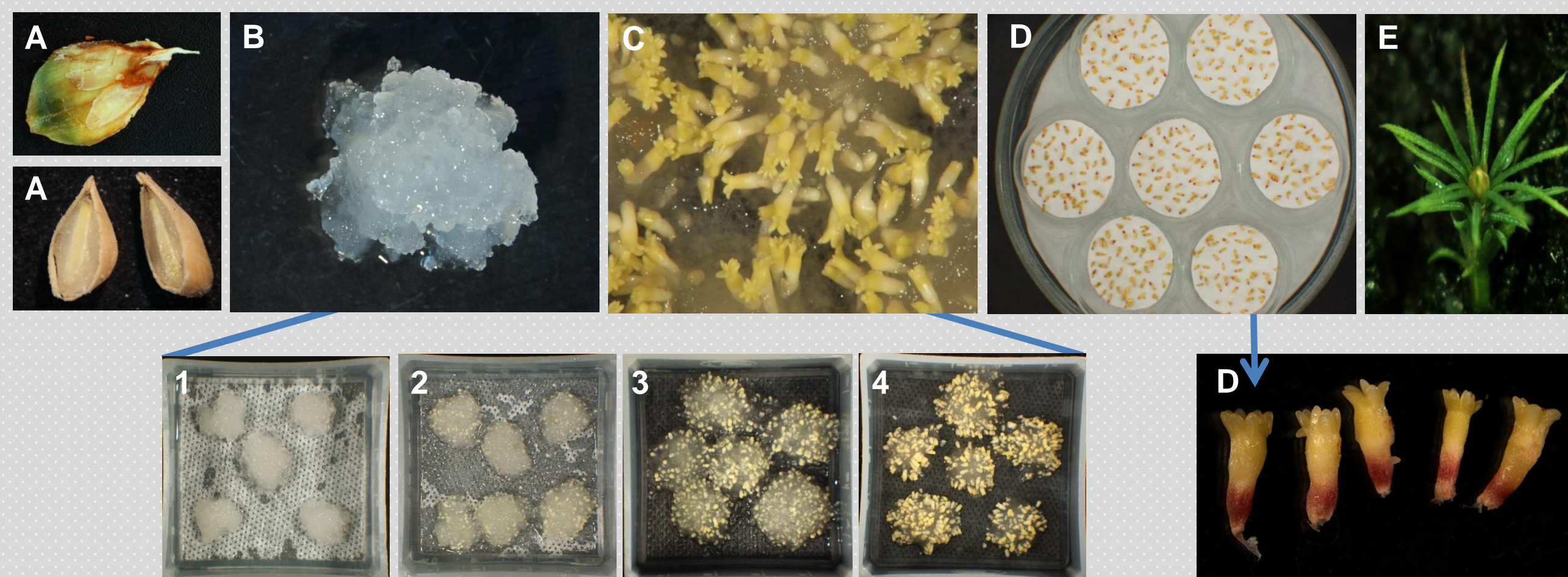
E-mail: [vondrakova@ueb.cas.cz](mailto:vondrakova@ueb.cas.cz)

## Úvod

Zvýšené UV-B záření (obdobně jako působení dalších abiotických stresorů) vyvolává v rostlinách změny na úrovni fyziologických a biochemických procesů stejně jako změny v morfologii rostlin. Zvýšená produkce reaktivních forem kyslíku (ROS), která je spojena s odpovědí rostliny na UV-B záření působí jako primární elicit, který spouští obrannou odpověď rostliny. Současně však může být původcem oxidativního poškození enzymových komplexů a struktury DNA.

Důležitou obrannou strategií proti UV-B záření je stimulace antioxidačních enzymů (např. superoxid-dismutázy, peroxidázy, glutathion-oxidázy, NADPH-oxidázy). Neenzymatické obranné reakce zahrnují syntézu širokého spektra sekundárních metabolitů, včetně látek s antioxidačními vlastnostmi a fenylypropanů s UV-B ochranným charakterem. Vedle této funkce „UV filtru“ představují fenolické látky velmi významnou roli při zhašení reaktivních kyslíkových radikálů. Mezi vysoce efektivní antioxidanty se řadí též polyaminy (PA) - především putrescin, spermidin a spermin.

Sledovali jsme vliv UV-B záření na embryonální kulturu smrku (*Picea abies*) v průběhu maturace somatických embryí a v desikaci. Účinky jednotlivých dávek UV-B (0,1 a 0,6 W m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>) jsme vyhodnotili 7 dní po aplikaci stanovením změn v obsahích polyaminů, v akumulaci fenolických látek a v lokalizaci kyseliny ferulové a flavonoidů. Jako marker míry oxidativního stresu byly stanoveny hodnoty malondialdehydu (MDA).



## Somatická embryogeneze smrku

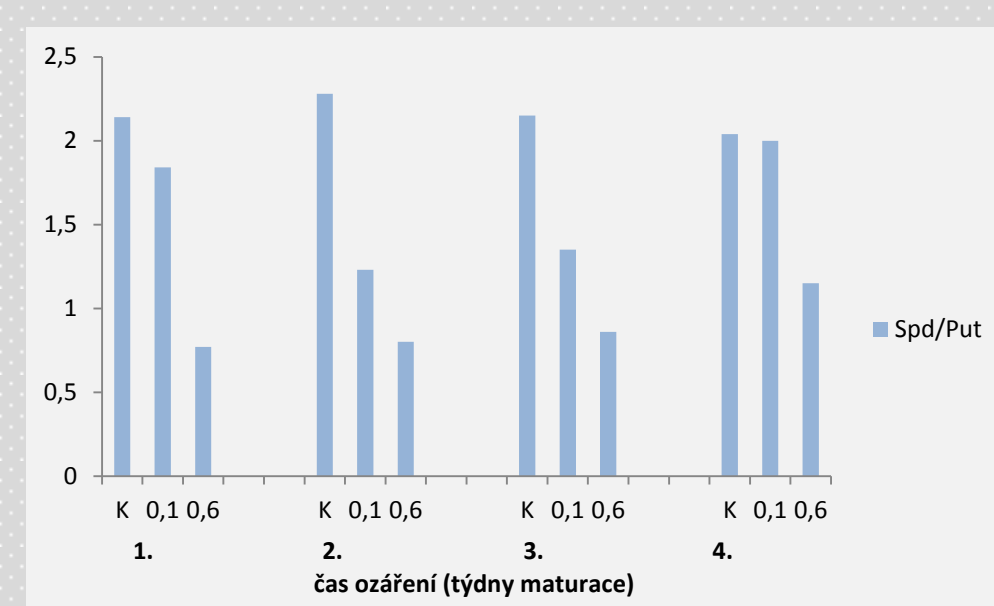
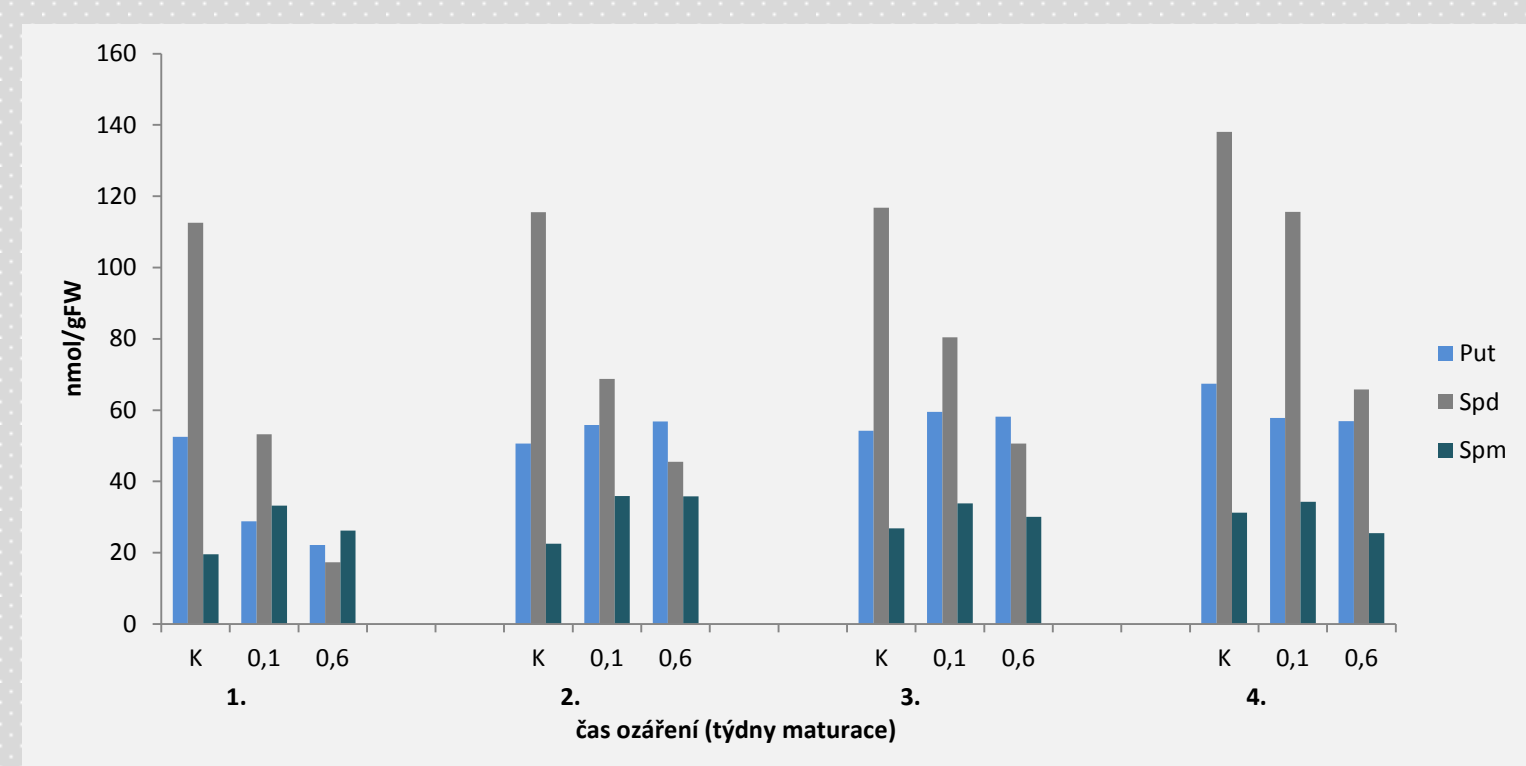
- A) Indukce - vznik embryonální kultury ze zygotických embryí
- B) Proliferace - vývoj nezralých somatických embryí
- C) Maturace - zrání somatických embryí
- D) Desikace - příprava na klíčení
- E) Klíčení a kultivace ex vitro

- 1), 2), 3), 4) průběh zrání embryí: embryonální kultura v 1., 2., 3. a 4. týdnu maturace
- D) Embrya v desikaci (detail)

Porovnávali jsme efekt UV-B záření aplikovaného na embryonální kulturu AFO v různém stádiu vývoje. Ozařovali jsme kulturu v 1., 2., 3. a 4. týdnu maturace. Vliv záření na vývoj embryí ukazují rozdíly ve výnosu zralých embryí na konci maturace (v 6. týdnu). Ovlivnění vývoje desikovaných embryí ozářením se projevuje změnami klíčení embryí.

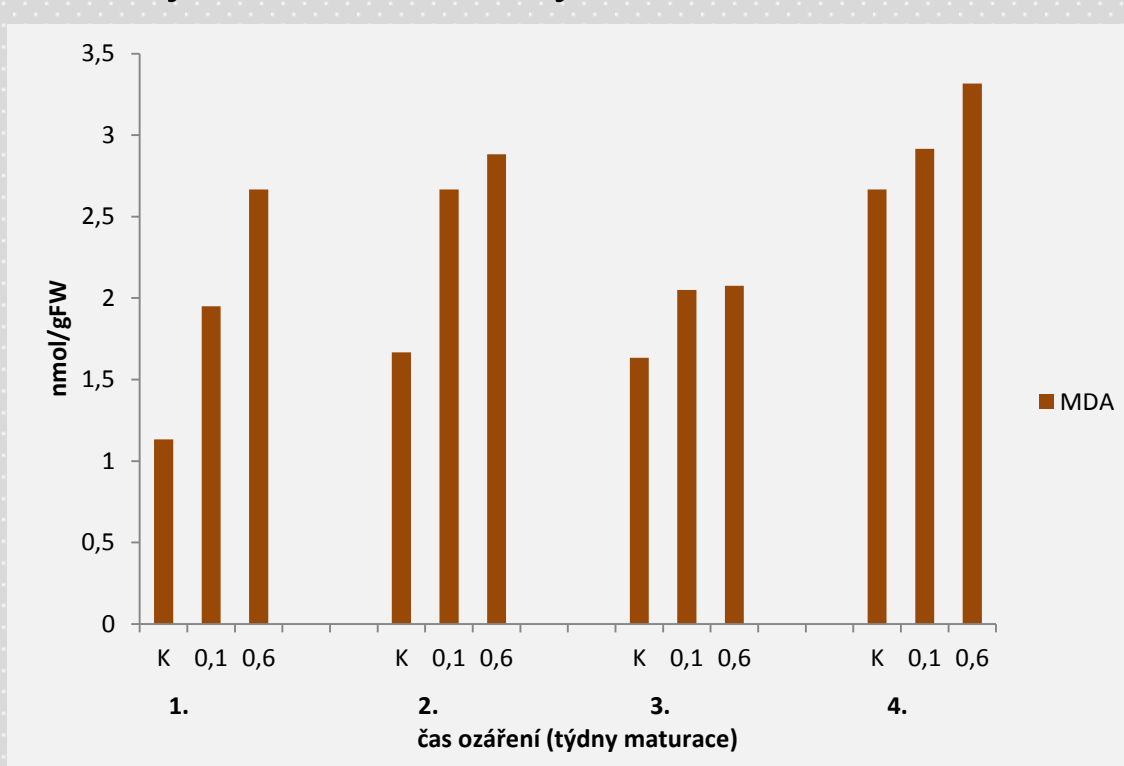
## Vliv UV-B záření (0,1 a 0,6 W m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>) na embryonální kulturu v průběhu maturace; porovnání s neozářenou kontrolou

### Změny obsahu polyaminů vyvolané UV-B zářením



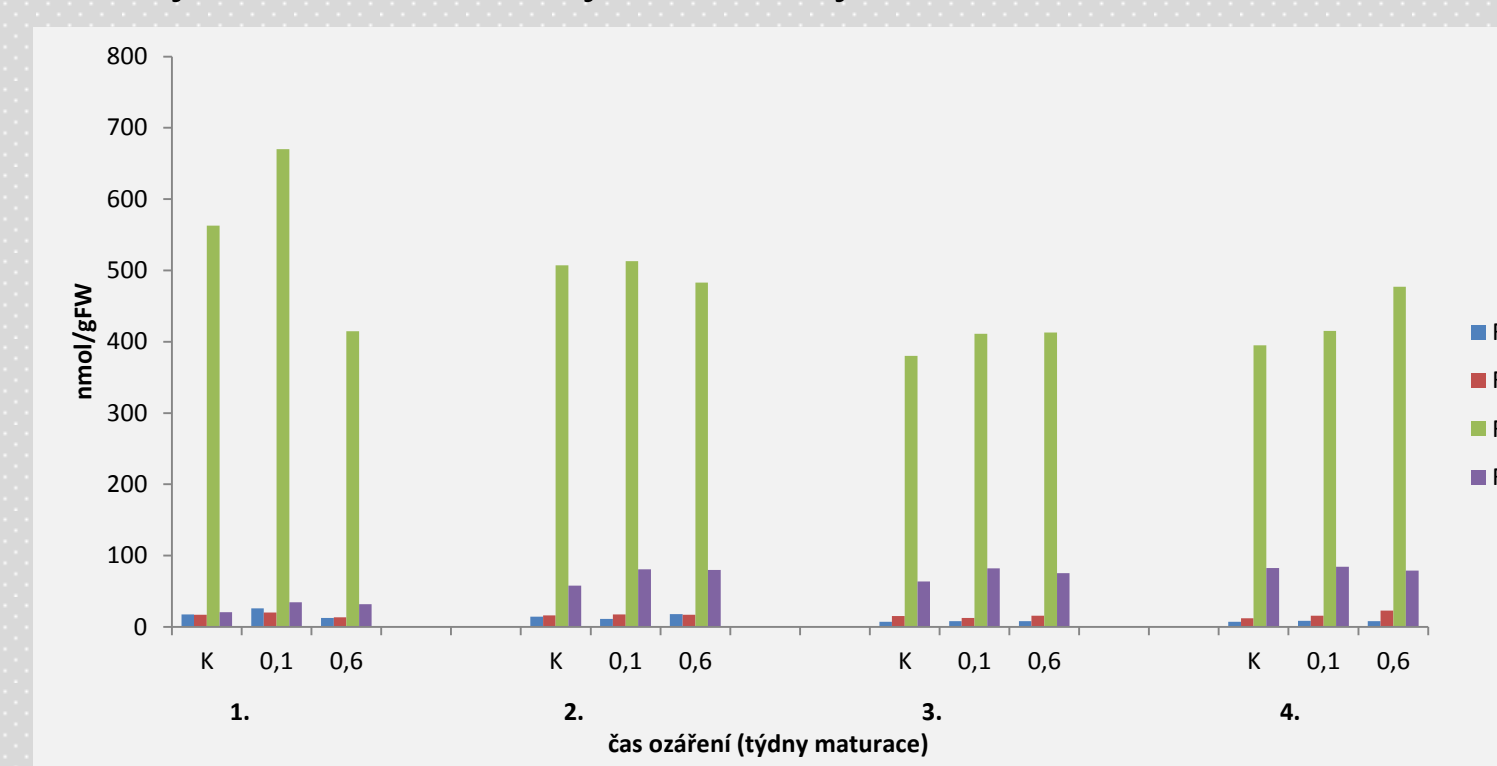
Odpověď embryonální kultury na UV-B záření je především výrazný pokles obsahu Spd. Významným kritériem negativního účinku záření je poměr hladin Spd a Put, který hraje zásadní roli při somatické i zygotické embryogenezi. K poklesu Spd/Put dochází po ozáření v 1., 2., 3. i 4. týdnu maturace. Větší dávka UV-B vyvolává výraznější efekt.

### Změny obsahu MDA vyvolané UV-B zářením



Vzrůst obsahu MDA v ozářené embryonální kultuře ukazuje výrazné zvýšení míry stresu po ozáření v 1. a 2. týdnu maturace a intenzivnější stresovou odpověď po vyšší dávce záření.

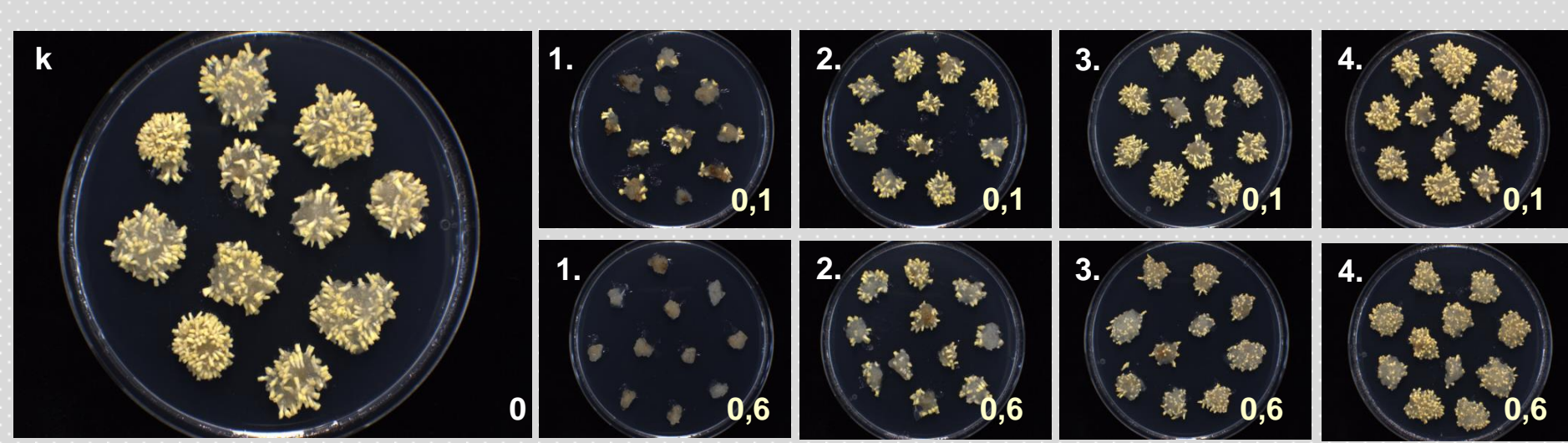
### Změny obsahu fenolických látek vyvolané UV-B zářením



Vliv UV-B záření na obsah volných ani vázaných fenolických látek v embryonální kultuře není výrazný.

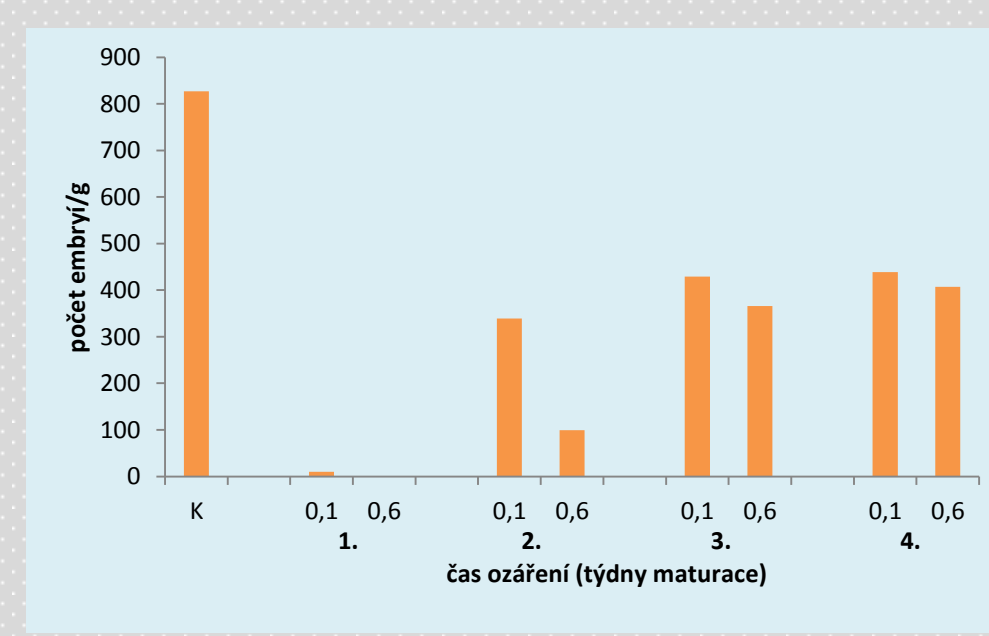
V metanolovém extraktu bylo v rozpustné formě detekováno 6 volných (F1), esterických (F2) a glykosidických (F4) vázaných fenolických kyselin - 4 deriváty kys. benzoové (protocatechová, *p*-hydroxybenzoová, vanilová a anisová) a 2 deriváty kys. skořicové (*p*-kumarová a ferulová). Největší podíl z celkového obsahu tvoří glykosidicky vázané fenolické kyseliny. Dominantní byl obsah kyseliny vanilové a ve snižujících se koncentracích následovaly kys. *p*-hydroxybenzoová, protocatechová a anisová. Ve frakci fenolických kyselin kovalentně vázaných na polysacharidy buněčných stěn (F3) byl nejvyšší obsah kyseliny ferulové.

### Vliv UV-B na výnos somatických embryí na konci maturace (6. týden)



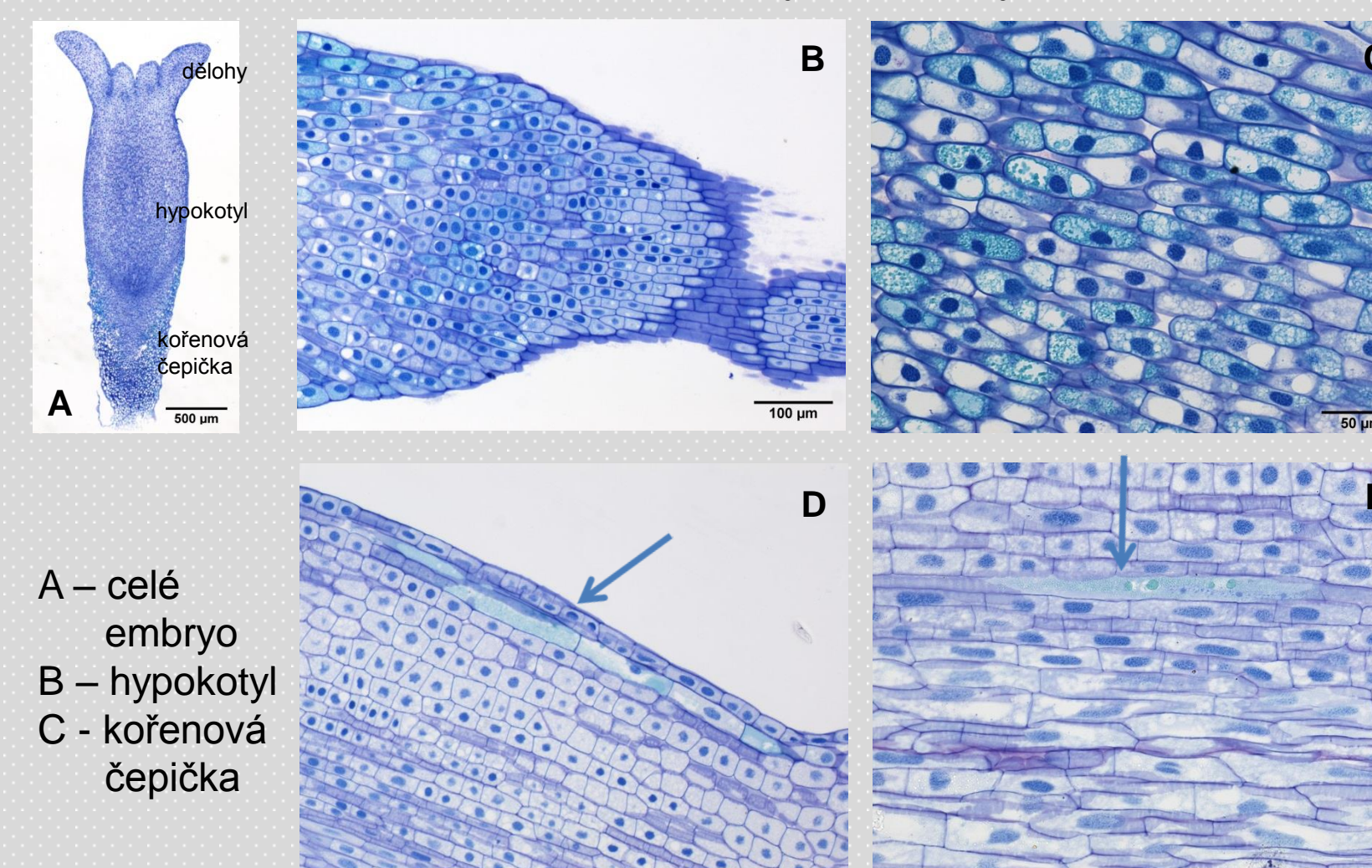
K – výnos embryí v kontrole bez ozáření; výnos embryí po ozáření dávkou 0,1 W m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> nebo 0,6 W m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> v 1., 2., 3. a 4. týdnu maturace

### Celkový počet embryí na konci maturace



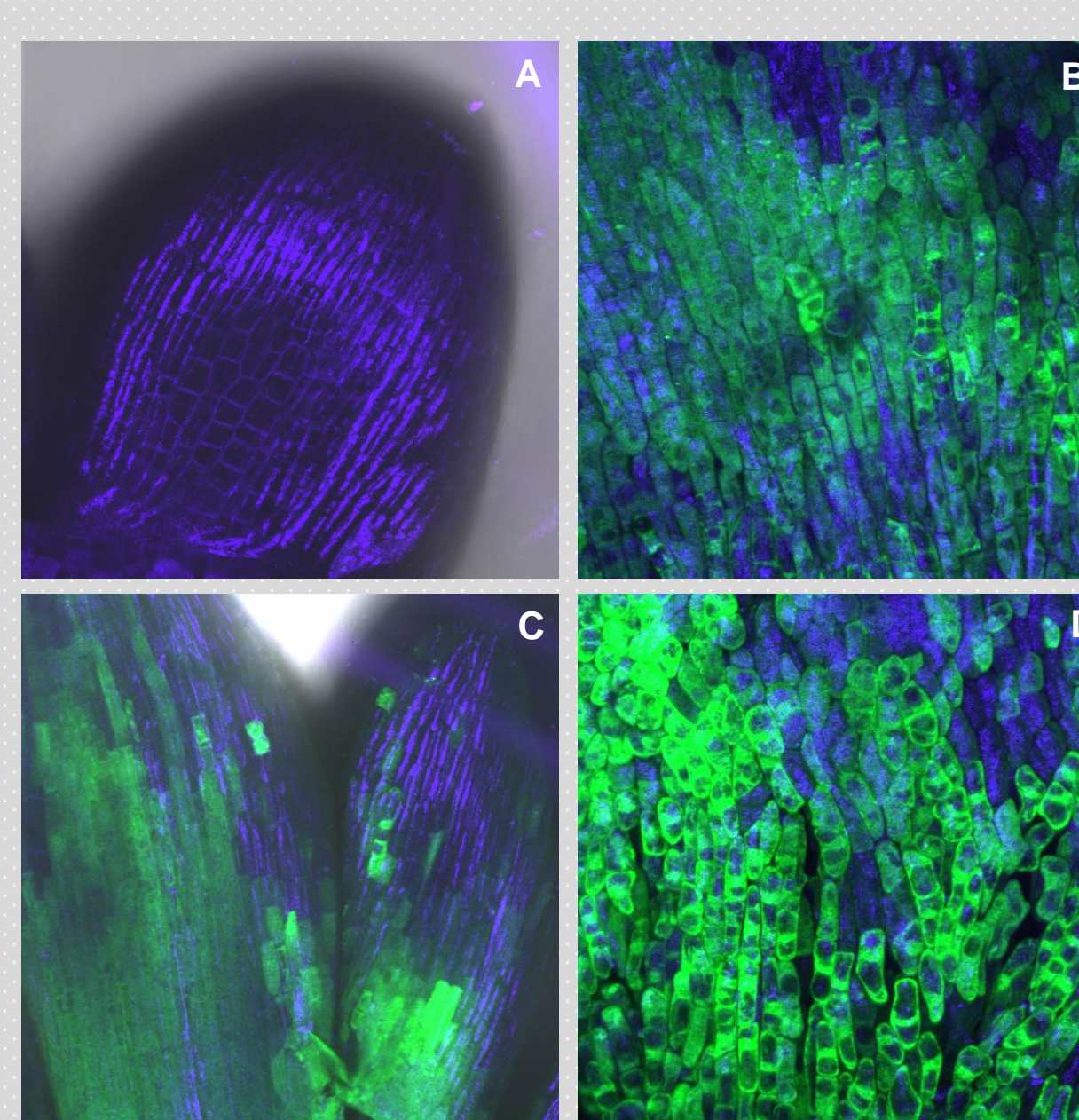
Výnos zralých embryí z 1 g nasazené embryonální kultury je ozářením inhibován, efekt je nejsilnější po ozáření kultury na počátku maturace.

### Detekce toluidinovou modří – methakrylátové řezy



Celulózní buněčné stěny a jádra jsou obarvena modře, fenolické látky zeleně. Fenolické látky jsou uloženy také v idioblastech pod pokožkou (D) a ve středním válci (E) hypocotylu.

### Autofluorescence fenolických látek – v čerstvém materiálu



Byla prokázána přítomnost katechinů a kondenzovaných taninů v kořenové čepičce embryí v obou variantách; po ozáření byly detekovány i v hypocotylu a často také v dělohách.

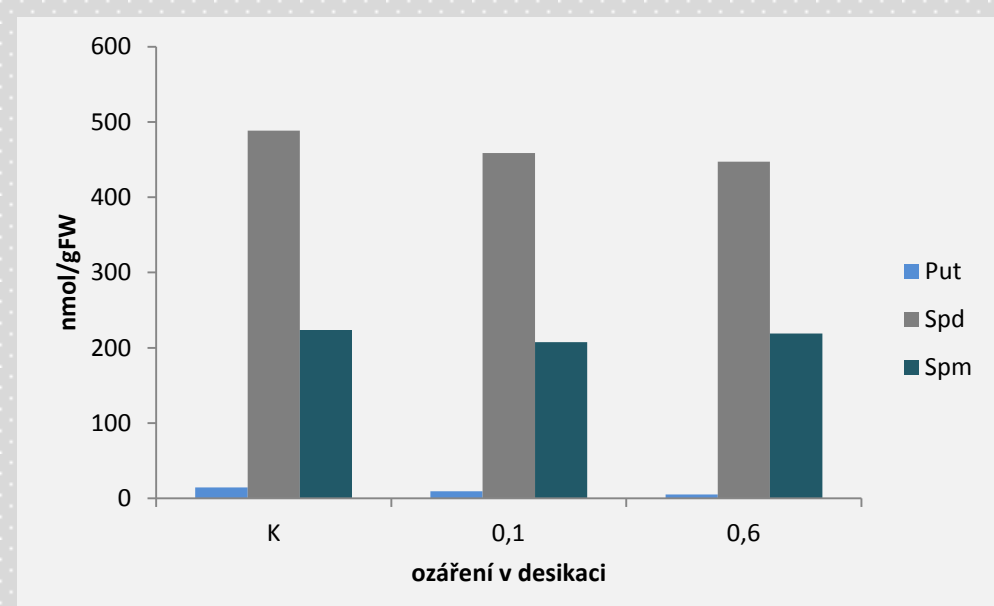
Deriváty kyseliny skořicové, např. kyselina ferulová - excitace 405 nm (fialová barva) a flavonoidy – excitace 488 nm (zelená barva) byly detekovány pomocí konfokálního mikroskopu.

A – kontrola, děloha neozářeného embrya, lokalizace kyseliny ferulové v buněčných stěnách  
B – kontrola, přechod mezi hypocotylem a kořenovou čepičkou neozářeného embrya, lokalizace flavonoidů ve vakuolách  
C – děloha po ozáření  
D – přechod mezi hypocotylem a kořenovou čepičkou po ozáření

Zvýšená autofluorescence flavonoidů po ozáření indikuje jejich zvýšenou produkci.

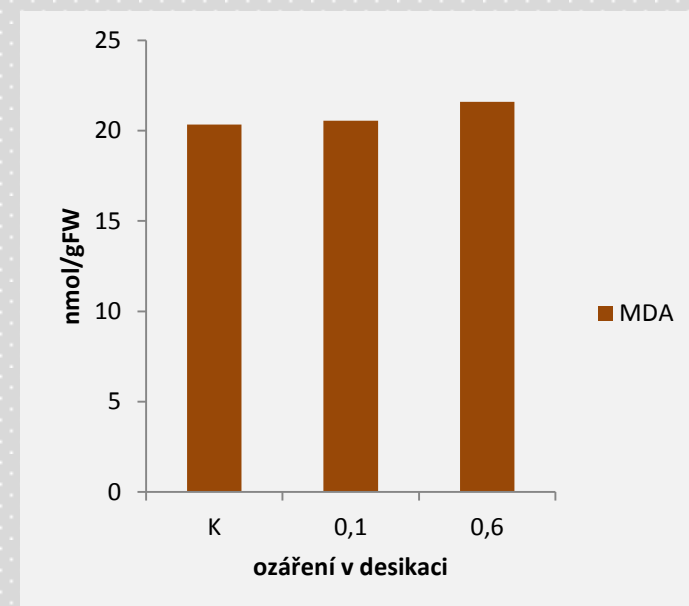
## Vliv UV-B záření (0,1 a 0,6 W m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup>) na somatická embrya v polovině desikace; porovnání s neozářenou kontrolou

### Změny obsahu polyaminů vyvolané UV-B zářením



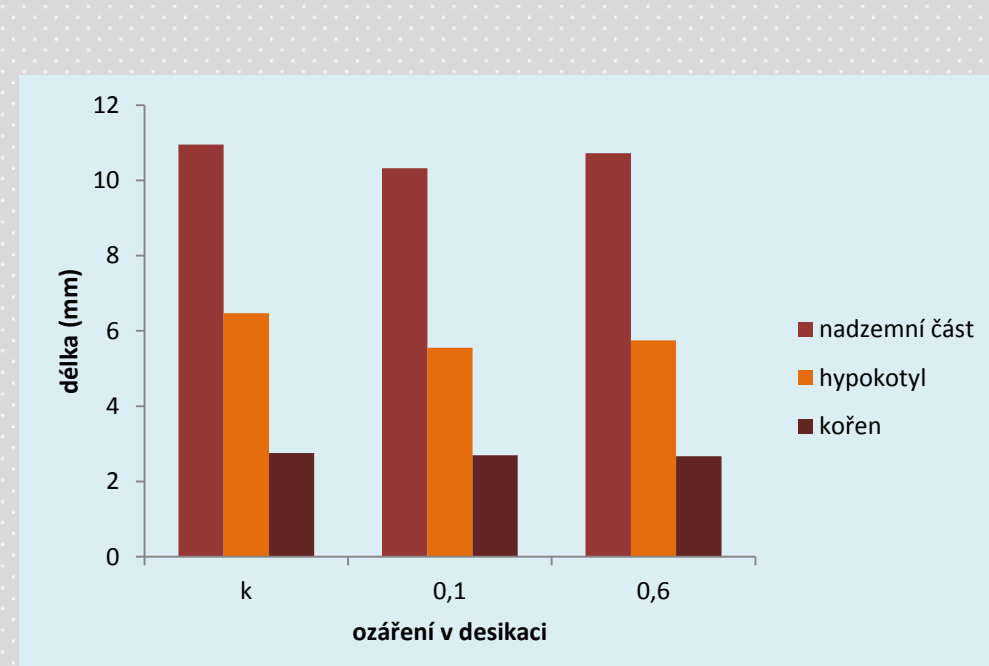
V embryích ozářených v desikaci dochází k mírnému snížení hladiny Spd.

### Změny obsahu MDA vyvolané UV-B zářením



Obsah MDA v ozářených embryích je ovlivněn jen minimálně.

### Růst klíčících rostlin – 3 týdny klíčení



Klíčení ozářených embryí není téměř ovlivněno.

## Metodika

Embryonální kultura smrku, genotyp AFO byla získána z laboratoře AFOCEL z Francie.

Použité metody jsou detailně popsány a publikovány:

- kultivace a příprava materiálu - Gemperlová, L. et al. Polyamine profiles and biosynthesis in somatic embryo development and comparison of germinating somatic and zygotic embryos of Norway spruce, *Tree Physiol* 29(10): 1287-1298, 2009
- aplikace UV záření - Cvikrová, M. et al.: The impact of UV-B irradiation applied at different phases of somatic embryo development in Norway spruce on polyamine metabolism. *Trees - Structure and Function*, in press, 2015
- stanovení obsahu polyaminů - Vondráková, Z. et al.: Cryotolerance in Norway spruce and its association with growth rates, anatomical features and polyamines of embryogenic cultures. *Tree Physiol* 30(10): 1335-1348, 2010
- stanovení obsahu fenolických látek - Cvikrová, M. et al.: Induced changes in phenolic acids and stilbenes in embryogenic cell cultures of Norway spruce by culture filtrate of *Ascochyta blight*. *J. Plant Dis. Protect.* 115 (2): 57-62, 2008
- detekce fenolických látek - Svobodová, H. et al.: Somatic embryogenesis in Norway spruce: Anatomical study of embryo development and influence of polyethylene glycol on maturation process. *Plant Physiol and Biochem* 37:209-221, 1999; Gutmann M.: Improved staining procedures for photographic documentation of phenolic deposits in semithin sections of giant tissue. *J Microscopy* 179:277-281, 1995; Agati, G. et al.: Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Sci* 196:67-76, 2012