

VLIV OXIDAČNÍHO STRESU NA VIABILITU BUNĚČNÝCH KULTUR ROSTLIN BY-2 A T87

Barbora Hluchníková, Karel Michna

Ostravská univerzita v Ostravě, katedra biologie a ekologie, Chittussiho 10, 710 00 Slezská Ostrava, 732 568 856, hluchnikovab@seznam.cz

Abstrakt

Rostliny se během svého života musí vypořádat s různými formami stresu, které mají negativní dopad na základní fyziologické funkce. Rostliny mají vytvořené obranné mechanismy, kterými se proti stresu brání. Během bezprostřední reakce rostlin na stres dochází k nadměrné tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS) [1]. Za běžných podmínek je tvorba a odbourávání reaktivních forem kyslíku v rovnováze. Pokud dojde k narušení rovnováhy, vzniká tzv. oxidační stres [2]. Jeho důsledkem může být například deaktivace enzymů, peroxidace lipidů, porušení nukleových kyselin nebo oxidace některých látek obsažených v buňce [3].

Rostlinné buněčné kultury jsou potenciálně obnovitelným zdrojem různých látek, u kterých by chemická výroba byla mnohem finančně nákladnější. Z rostlinných buněčných kultur se získávají například barviva, esence, látky potřebné pro výrobu léků, atd. s výrazně vyšším výtěžkem sekundárních metabolitů než z mateřské rostliny. Výhodou kultivace rostlinných buněčných kultur je produkce sekundárních metabolitů za kontrolovatelných podmínek, které nejsou závislé na geografických a klimatických faktorech [4]. Jsou také významným nástrojem pro studium biologických, fyziologických a biochemických procesů rostlin. Rostlinné kultury se čím dál více využívají pro komerční rozmnožování rostlin a genetickou modifikaci. Také se na nich testují různé látky a zkoumá se jejich toxický účinek [5].

Cílem práce bylo stanovit a zavést na naše pracoviště vhodnou metodu pro stanovení viability (životaschopnosti) rostlinných buněk po oxidačním stresu. Testy probíhaly na rostlinných suspenzních kulturách tabáku (BY-2) a huseníčku (T87). Obě suspenze byly poskytnuty Akademií věd České republiky Praha - Lysolaje. Suspenzní kultury byly vystaveny působení gradientu H_2O_2 v koncentraci od 7,5 M po $7,5 \cdot 10^{-5}$ M.

Pro stanovení viability buněk byly vybrány dvě základní metody, a to metoda fluorescenčního barvení za použití fluorescein diacetátu (FDA) s propidium jodidem (PI) a metoda redukce 2,3,5-trifenylyltetrazolium chloridu (TTC) na červený formazán.

V případě metody fluorescenčního barvení jsme postupovali podle metod Pollarda a Walkera [5] a Babuly et al. [6]. K hodnocení vzorků jsme použili jednopaprskový fluorescenční mikroskop Olympus BX53.

Metoda barvení buněk redukcí TTC na červený formazán probíhala podle Pollarda a Walkera [5] a také s použitím TTC o koncentraci $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Vzniklý formazán jsme extrahovali do ethanolu a měřili jeho absorbanci při vlnové délce 485 nm přístrojem SPEKOL 11.

Z provedených testů vyplývá, že všechny výše zmíněné metody jsou dobře využitelné pro stanovení viability rostlinných buněčných kultur.

Metody spojené s fluorescenčním barvením nejsou časově náročné na přípravu vzorků, ale vyhodnocení výsledků (počítání 1000 buněk) je časově náročnější než u metod využívajících TTC. Finanční náklady fluorescenčního barvení jsou výrazně vyšší než u barvení s TTC. Metoda podle Pollarda a Walkera [5] je založena na obarvení živých buněk fluorescein diacetátem, mrtvé buňky zůstávají neobarvené. Hodnocení je pak založeno na srovnávání snímku z fluorescenčního mikroskopu a světelného mikroskopu, což není příliš praktické a může docházet k chybnému vyhodnocení, pokud se například buňky překrývají. Metoda podle Babuly et al. [6] je založena na barvení živých buněk zeleně fluorescein diacetátem a mrtvých červeně propidium jodidem. V našich pokusech u této metody docházelo k nedostatečnému obarvení buněk fluorescein diacetátem. Jako ideální se tedy ukázala metoda

kombinující oba postupy. Použili jsme vyšší koncentraci FDA podle Pollarda a Walkera [5] a přidali PI podle Babuly et al. [6].

Metoda založená na redukci TTC podle Pollarda a Walkera [5] je dobře použitelná v běžné laboratorní praxi. Vyhodnocení výsledků na spektrofotometru je rychlé a pohodlné. Testovaná metoda s přidáním 80 μl 1% TTC do 750 μl růstového média (výsledná hmotnostní koncentrace TTC 1 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$) se ukázala stejně použitelná jako metoda podle Pollarda a Walkera [5]. Spotřeba TTC je však zhruba čtyřikrát nižší. Metodu bude nutné ověřit v dalších opakovaných měřeních, aby byla potvrzena její reprodukovatelnost.

Na naše pracoviště byla zavedena metoda s použitím TTC jako levnější a časově méně náročná metoda pro stanovení viability buněk. Na práci budou navazovat další projekty zabývající se stanovením toxicity různých chemických látek a jejich směsí pro rostlinné buňky.

Klíčová slova: Oxidační stres; rostlinná suspenzní kultura; viabilita; BY-2; T87

Poděkování

Práce byla finančně podpořena projektem SGS31/PřF/2014.

Literatura

- [1.] Pacoda, D., Montefusco, A., Piro, G., Dalessandro, G. *Reactive oxygen species and nitric oxide affect cell wall metabolism in tobacco BY-2 cells*. Journal of plant physiology, 161. 2004, s. 1143 - 1156.
- [2.] Lushchak, V. I. *Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification*. Chemico-Biological Interactions, 224. 2014, s. 164 - 175.
- [3.] Lamb, C., Dixon, R. A. *The oxidative burst in plant disease resistance*. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 48. 1997, s. 251 - 275.
- [4.] Kieran, P. M., MacLoughlin, P. F., Malone, D. M. *Plant cell suspension cultures: some engineering considerations*. Journal of Biotechnology, 59. 1997, s. 39 - 52.
- [5.] Pollard, J. W., Walker, J. M. *Methods in Molecular Biology: Plant Cell and Tissue Culture*. Clifton, New Jersey: Humana Press, 1990. Volume 6. ISBN 0-89603-161-1.
- [6.] Babula, P., Vodička, O., Adam, V., Mummerová, M., Havel, L., Hošek, J., Provazník, I., Skutková, H., Beklová, M., Kizek, R. *Effect of fluoranthene on plant cell model: Tobacco BY-2 suspension culture*. Environmental and Experimental Botany, 78. 2012, s. 117 - 126.