

# Možnosti histochemické a mikroskopické detekce mědi v rostlinných pletivech

POSSIBILITIES OF HISTOCHEMICAL AND MICROSCOPICAL DETECTION OF COPPER IN PLANT TISSUES

Petr Babula, Radka Opatřilová, Veronika Kohoutková, Ivana Daňková – Veterinární a farmaceutická univerzita v Brně  
Jaromír Hubálek – VUT v Brně; Josef Zehnálek, Vojtěch Adam, René Kizek – Mendelova univerzita v Brně

Řada analytických postupů, včetně fluorescenční mikroskopie, představuje vhodný nástroj pro studium celé řady procesů a buněčných struktur, zejména při použití specifických fluorescenčních barviv. Ukazuje se, že fluorescenční mikroskopie je vhodná i pro studium anatomie rostlin, kdy se využívá schopnosti biopolymerů (lignin, kutin, suberin) a některých sekundárních metabolitů emitovat záření. Měď představuje esenciální mikroelement potřebný k udržení řady fyziologických procesů. Je součástí enzymů přenášejících elektrony (plastocyanin, cytochromoxidáza), oxidáz a peroxidáz, jejichž činnost je nezbytná pro lignifikaci buněčných stěn, resp. pro biosyntézu ligninu, a participuje rovněž v dusíkatém metabolismu. Cílem práce bylo využití vlastnosti mědi interagovat s komponenty buněčných stěn a díky následným změnám v jejich autofluorescenci detekovat její lokalizaci.

## Materiál a metody

**Experimentální rostliny:** Pro histochemickou a mikroskopickou detekci měďnatých iontů v rostlinných pletivech byly vybrány jednoleté větvičky – stonky smrku pichlavého – *Picea pungens* Engelm. (*Pinaceae*) o délce 10 cm. Ty byly následně kultivovány v roztocích obsahujících měďnaté ionty v koncentracích 0; 0,5; 1; 5; 10 a 20 mM. Pro přípravu roztoků byl použit chlorid měďnatý.

## Výsledky a diskuse

Kultivace segmentů stonků smrku v roztocích obsahujících měďnaté ionty vedla již po 48 hodinách k jejich vertikálnímu a horizontálnímu transportu stonkovým segmentem a k ukládání zejména v elementech vodivých pletiv. Patrný byl jejich transport dřevním radiálním parenchymem a lýkovým parenchymem až do pletiv primární kůry, které představují pletivo plnicí základní metabolické funkce. U nejvyšších koncentrací byla patrná depozice iontů mědi i ve vlastních vodivých elementech xylému, tedy tracheidách. Tracheidy jako sklerenchymatická vlákna s lignifikovanými buněčnými stěnami obsahují vysoký podíl polymeru ligninu, který se vyznačuje přítomností četných volných hydroxylových skupin. Je tedy patrné, že dochází k interakcím mezi těmito skupinami a volnými měďnatými ionty, což značí, že buněčné stěny mohou sloužit vedle vakuol jako místo kompartmentace iontů těžkých kovů. Po tomto zjištění byla jako metoda detekce měďnatých iontů zvolena fluorescenční mikroskopie. Následující experiment vycházel z předpokladu, že pokud dochází k vazbě volných měďnatých iontů na komponenty buněčných stěn, mění se tím i jejich autofluorescence. Ukládání mědi vede k výrazným změnám autofluorescence všech anatomických struktur, zejména pak systému pletiv vodivých, a tyto změny odpovídají lokalizaci mědi detekované pomocí difenylkarbazidu. V nízkých

koncentracích jsou patrné změny v autofluorescenci radiálního dřevního parenchymu, se zvyšující se koncentrací aplikovaných měďnatých iontů dochází i ke změnám autofluorescence vlastních vodivých elementů, tracheid. Tyto výsledky potvrzují možné využití fluorescenční mikroskopie v detekci nejen iontů mědi, ale i iontů dalších těžkých kovů, a jejich *in situ* lokalizaci v jednotlivých anatomických strukturách, což umožňuje predikci jejich vertikálního i horizontálního transportu. Pro potvrzení detekovaných změn byly kultivovány krátké stonkové segmenty přímo v roztoku měďnatých iontů (20 mM) a byly podrobeny mikroskopické studii. Výsledky potvrdily předpoklad vazby mědi na komponenty buněčných stěn, zejména xylémových vodivých elementů. Na základě získaných výsledků lze predikovat transport měďnatých iontů stonkovými segmenty. Ty jsou transportovány jak vertikálně prostřednictvím vodivých elementů xylému, tak i horizontálně přítomným dřevním radiálním parenchymem, ale také i parenchymem lýkovým. Transport horizontální ukazuje transport měďnatých iontů až do základního pletiva primární kůry, zejména do okolí pryskyřičných kanálků. V parenchymu primární kůry mohou být deponovány a dále detoxikovány, např. prostřednictvím peptidů a nízkomolekulárních proteinů. Ve vyšších aplikovaných koncentracích je zřejmé, že dochází k interakcím měďnatých iontů s buněčnými stěnami vlastních tracheid, a ty tedy představují další místo depozice a kompartmentace měďnatých iontů.

**Poděkování:** Tato práce byla podpořena grantem REMEDTECH GA ČR 522/07/0692 a NANIMEL GA ČR 102/08/1546.

**Babula P., Opatřilová R., Kohoutková V., Daňková I., Hubálek J., Zehnálek J., Adam V., Kizek R.: Possibilities of histochemical and microscopical detection of copper in plant tissues**

In this study, an utilization of methods of fluorescence microscopy for detection of heavy metals is demonstrated. Ions of copper(II) were chosen, especially with respect to their phytotoxicity. Results show significant changes in autofluorescence of plant tissues with increasing copper(II) ions concentration, which make their *in situ* localization as well as prediction of their transport possible.

**Key words:** fluorescence microscopy, copper, autofluorescence, heavy metals.

## Kontaktní adresa – Contact address:

doc. PharmDr. Petr Babula, Ph. D., Veterinární a farmaceutická univerzita v Brně, Ústav přírodních léčiv, Palackého 1/3 Brno, Česká republika; e-mail: petr-babula@email.cz