

Aleksandra Koźmińska, Ewa Hanus-Fajerska, Dawid Kocot

Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

e-mails: ola.kozminska.88@gmail.com; e.hanus@ogr.ur.krakow.pl; dawid_2608@vp.pl

WPLYW JONÓW KADMU NA *ALYSSUM MONTANUM* W WARUNKACH KULTUR *IN VITRO*

THE EFFECT OF CADMIUM IONS ON *ALYSSUM MONTANUM* CULTURED *IN VITRO*

DOI: 10.15611/pn.2016.461.10

Streszczenie: Celem przeprowadzonych badań było zbadanie wpływu jonów kadmu na galmanowy ekotyp *Alyssum montanum* w warunkach kultury *in vitro*. Zastosowano dodatek 1; 2,5 i 5 μM chlorku kadmu do pożywki namnożeńiowej. W trakcie trwania kultury sprawdzano współczynnik namnażania, prowadzono pomiary biometryczne, oceniano świeżą i suchą masę regenerowanych organów oraz kondycję fizjologiczną kultur poprzez pomiar zawartości chlorofili. Badany ekotyp można efektywnie rozmnażać wegetatywnie w obecności jonów kadmu w podłożu hodowlanym, jednak poszczególne stężenia CdCl_2 w różny sposób oddziaływały na oceniane cechy morfometryczne mnożonych mikro roślin. Wyższe wartości pomiarów uzyskano w kulturach prowadzonych na pożywkach wzbogaconych w chlorek kadmu aniżeli na pożywkach kontrolnych bez dodatku CdCl_2 . Najwyższą masę pędów, wynoszącą ponad 11 mg, uzyskano w trakcie kultywacji badanego ekotypu na zmodyfikowanej pożywce WPM wzbogaconej w 0,5 μM CdCl_2 , natomiast największą liczbę pędów na pożywce wzbogaconej w 5 μM tej soli.

Słowa kluczowe: smagliczka, kadm, ekotyp galmanowy, kultury *in vitro*.

Summary: The aim of this study was to determine an impact of cadmium ions on calamine ecotype of *Alyssum montanum*, using *in vitro* culture. The propagation medium was supplemented with different concentrations of cadmium chloride, that is 0.5 μM ; 2.5 μM and 5 μM . During the cultivation of microshoots propagation coefficient, leaf blade surface coefficient, fresh, dry weight and numerous biometric features were evaluated. Studied ecotype can be propagated *in vitro* on modified WPM medium supplemented with cadmium ions, but individual CdCl_2 concentrations differentially affected evaluated morphometric traits of studied culture. The higher values of some traits were obtained on media supplemented with cadmium chloride in comparison to control ones. The highest shoot mass (above 11 mg) was obtained on modified WPM supplemented with 0,5 μM CdCl_2 , whereas the highest number of regenerated shoots were obtained on the same medium supplemented with 5 μM of the same salt.

Keywords: alysson, cadmium, calamine ecotype, *in vitro* trial.

1. Wstęp

Badania dotyczące wpływu poszczególnych substancji wywołujących zanieczyszczenie środowiska na rośliny umożliwiają poszerzenie doboru gatunków przydatnych do praktycznego wykorzystania w oczyszczaniu środowiska z wszelakich zanieczyszczeń, w tym również z metali ciężkich [Mierek-Adamska i in. 2009; Hanus-Fajerska i in. 2011]. W prezentowanej pracy określano wpływ zawartości jonów kadmu w podłożu na *Alyssum montanum*, gatunek należący do rodzaju znanego z licznych hiperakumulatorów metali ciężkich [Mengoni i in. 2009; Abou-Shanab i in. 2010]. Przeprowadzono ocenę reakcji *A. montanum* na zróżnicowaną zawartość pierwiastka balastowego w podłożu na przykładzie kadmu. Materiał wyjściowy do badań w warunkach kultury *in vitro* stanowiły pobrane z terenu pędy naturalnej populacji galmanowej, czyli populacji przystosowanej do wzrostu i rozwoju na terenach o ekstremalnie wysokich stężeniach Zn i Pb z domieszką Cd. Z tego względu zastosowano wzrastające dawki jonów kadmu, które aplikowano do pożywki w formie chlorku kadmu. Celem przeprowadzonych badań było zbadanie wpływu jonów kadmu na efektywność rozmnażania *in vitro* galmanowego ekotypu *Alyssum montanum*. Perspektywnym celem podjętych badań jest wyselekcjonowanie linii o podwyższonym stopniu odporności na kadm.

2. Materiał i metody

Materiał roślinny stanowił jeden z gatunków *Alyssum* (*Brassicaceae* Burnett, synon. krzyżowe, *Cruciferae* Juss.). Do badań wybrano smagliczkę pagórkową (*Alyssum montanum* L), a w prezentowanej pracy zajmowano się ekotypem galmanowym tego gatunku. Pędy i nasiona pozyskano ze stanowisk zlokalizowanych w okolicy Olkusza, w obrębie hałd o wysokiej zawartości cynku i ołowiu. Pilotażowy etap doświadczeń polegał na uzyskaniu aseptycznej kultury badanego gatunku, co z kolei umożliwiło rozmnażanie materiału za pośrednictwem kultur tkankowych. Apikalne fragmenty pędów umieszczono pionowo w pożywce inicjacyjnej [E. Muszyńska, dane nie publikowane]. W trakcie rozpoczynania doświadczenia zdrowe, witalne pędy o długości 15-20 mm przenoszono na zestaloną pożywkę opartą na zmodyfikowanym składzie WPM [Lloyd, McCown 1980] (tab. 1) o pH 5,8. W trakcie jej sporządzania do poszczególnych objętości dodano odpowiednie stężenia chlorku kadmu (1; 2,5 bądź 5 μM), co oznaczono w zestawieniu tabelarycznym I, II, III (tab. 1). Pożywka kontrolna o analogicznym składzie nie zawierała chlorku kadmu. Naczynia do wzrostu kultur stanowiły kolby Erlenmayera o pojemności 250 cm^3 , które zawierały 20 cm^3 podłoża do wzrostu kultur. Kultury prowadziło w komorze vegetacyjnej z regulowaną temperaturą ($24^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$) i wilgotnością powietrza, nasświetlanej światłem białym z zachowaniem fotoperiodu 16/8h, przy użyciu światła białego o natężeniu promieniowania kwantowego 80 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (PAR).

Tabela 1. Skład pożywek stosowanych w trakcie namnażania *Alyssum montanum*

Rodzaj pożywki	Makroelementy [mg × dm ⁻³]	Mikroelementy [mg × dm ⁻³]	Związki organiczne [mg × dm ⁻³]	Inne składniki [g × dm ⁻³]
Kontrolna	400 NH ₄ NO ₃ 96 CaCl ₂ · 2H ₂ O 370 MgSO ₄ · 7H ₂ O 170 KH ₂ PO ₄ 556 Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O 990 K ₂ SO ₄	27,8 FeSO ₄ × 7H ₂ O 37,3 Na ₂ EDTA × 2H ₂ O 6,2 H ₃ BO ₃ 29,43 MnSO ₄ · 4H ₂ O 8,6 ZnSO ₄ · 7H ₂ O 0,25 NaMoO ₄ · 2H ₂ O 0,25 CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,1 tiamina 0,5 pirydoksyna 0,5 kwas nikotynowy 100 mezoinozytol 1,0 glicyna 2,5 2iP; 1 NAA	20 Sacharoza 8 Difco Agar 0,6 Węgiel aktywowany 0,5 PVP 0,65 mg glukonian wapnia
I	jw.	jw.	jw.	jw. + 1 μM CdCl ₂
II	jw.	jw.	jw.	jw. + 2,5 μM CdCl ₂
III	jw.	jw.	jw.	jw. + 5 μM CdCl ₂

Źródło: badania własne.

Doświadczenie prowadzono w trzech powtórzeniach dla każdego stężenia CdCl₂, w związku z czym zastosowano 3 traktowania kontrolne. Jako powtórzenie traktowano pojedyncze naczynie hodowlane, zawierające 10 eksplantatów (pędów), przy czym cały układ eksperymentalny przeprowadzono dwukrotnie.

Po upływie sześciu tygodni od momentu założenia doświadczenia dokonywano parametrów biometrycznych. Liczono oraz mierzono długość zregenerowanych mikropędów i korzeni przybyszowych, określano współczynnik namnażania kultur (proporcja liczby uzyskanych pędów do liczby eksplantatów), liczbę międzywęźli (dane niepokazane), współczynnik powierzchni blaszki liściowej (iloczyn długości i szerokości liścia), określono świeżą i suchą masę pędów oraz korzeni metodą wagowo-suszarkową. Suchą masę uzyskano przez suszenie tkanek w temperaturze 105°C do uzyskania stałej masy.

Zawartość chlorofili została oznaczona spektrofotometrycznie według metodyki zaproponowanej przez Lichtenthaler [1987]. Zgodnie z przyjętą procedurą 0,1 g świeżego materiału zmieszano z 15 ml 80% acetonu, następnie ekstrakt wytrząsano przez 1 h w temp. 4°C, po czym odwirowano (15 min, 3000 rpm). Odzielono supernatant i finalnie dokonano pomiaru absorbancji przy zastosowaniu długości fali 663 nm, 646 nm i 470 nm. Weryfikowano zawartość chlorofilu a (*chl. a*) i chlorofilu b (*chl. b*), a uzyskane wartości przeliczano zgodnie ze wzorem zaproponowanym przez Wellburna [1994].

Dane liczbowe poddano analizie statystycznej, wykorzystując program komputerowy STATISTICA 10 firmy StatSoft. Do określenia istotności różnic pomiędzy średnimi wartościami określonych pomiarów wyznaczono grupy jednorodne przy zastosowaniu testu Tukeya i przy poziomie istotności $\alpha \leq 0,05$.

3. Wyniki

Badany ekotyp *Alyssum montanum* bez trudności rozmnażano wegetatywnie w warunkach kultury *in vitro*. Mnożone pędy nie zamierały w trakcie wzrostu na pożywkach z dodatkiem jonów kadmu, jednakże zastosowane stężenia chlorku kadmu wywierały zróżnicowany wpływ na odpowiedź morfogenetyczną kultywowanych mikro roślin. Uzyskana w trakcie prowadzonego eksperymentu wartość współczynnika namnażania na pożywkach wzbogaconych w jony kadmu wynosiła w poszczególnych wariantach od 3,0 do 3,8 i była wyższa w porównaniu do traktowania kontrolnego, w którym wynosiła 2,3 (tab. 1 i 2). Po upływie sześciu tygodni od momentu założenia doświadczenia długość mnożonych pędów była wyraźnie zróżnicowana i dla poszczególnych stężeń Cd^{2+} zawierała się w przedziale od 1,7 do 2,5 cm (rys. 1A). Najwyższą średnią liczbę 117 pędów potomnych otrzymano na pożywce wzbogaconej o $0,5 \mu\text{M CdCl}_2$, natomiast najniższą, wynoszącą 68 – na pożywce kontrolnej. Niemniej nie stwierdzono jednoznacznej zależności pomiędzy liczbą zregenerowanych pędów potomnych, a ich długością odnośnie grup jednorodnych. Najwyższy współczynnik powierzchni blaszki liściowej, wynoszący 42, osiągnęły liście pędów kultywowanych na pożywce zawierającej $0,5 \mu\text{M CdCl}_2$ (tab. 2). Większość liści zregenerowanych w trakcie trwania kultury była rozwinięta w prawidłowy sposób, choć sporadycznie na blaszkach liściowych mikro roślin mnożonych na pożywce z dodatkiem $5 \mu\text{M CdCl}_2$ zaobserwowano drobne brunatne bądź chlorotyczne plamki, co można uznać jako symptom toksyczności jonów kadmu. Z kolei liczba międzywęźli pędów potomnych była stosunkowo wyrównana dla wszystkich zastosowanych stężeń stosowanej soli (dane niepokazane). Kolejne etapy ryzogenezy zachodziły w zbliżony sposób we wszystkich wariantach doświadczenia, a liczba korzeni oraz ich długość były wyrównane (tab. 2, rys. 1B). Nie zaobserwowano wyraźnych zależności pomiędzy liczbą uzyskanych korzeni a ich długością.

Tabela 2. Średnie wartości parametrów morfometrycznych uzyskanych w 6-tygodniowych kulturach *Alyssum montanum*, mnożonych na pożywkach z dodatkiem chlorku kadmu oraz na pożywce kontrolnej

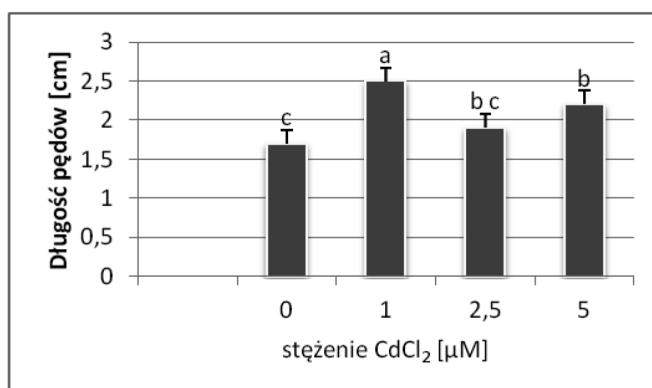
CdCl_2 stężenie [μM]	Liczba pędów	Współczynnik mikrorozmnażania	Liczba korzeni	Blaszka liściowa – współczynnik
0	68c	2,3b	32a	13,8c
0,5	117a	3,9a	28a	42a
2,5	91b	3,0a	28a	33,6b
5	113a	3,8a	30a	17,5c

* Wartości oznaczone taką samą literą nie różnią się istotnie między sobą przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

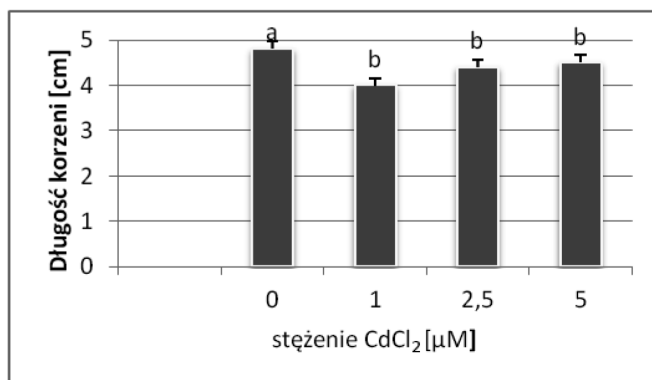
Źródło: badania własne.

Dodatek chlorku kadmu do podłoża skutkował względną redukcją zawartości barwników fotosyntetycznych w zregenerowanych pędach *Alyssum montanum*. Zawartość *chlorofilu a* zmniejszyła się relatywnie wraz ze wzrostem stężenia CdCl_2 (rys. 2). Po sześciu tygodniach kultury na zmodyfikowanej pożywce WPM z dodatkiem różnych stężeń chlorku kadmu obniżenie zawartości *chlorofilu b* było wyraźnie silniejsze w grupie pędów rozmnażanych na podłożu zawierającym $5 \mu\text{M}$ CdCl_2 (6 razy niższa *chl. b* w porównaniu z obiektami kontrolnymi) niż w odniesieniu do kultury prowadzonej na pożywce z dodatkiem $2,5 \mu\text{M}$ CdCl_2 (3 razy niższa zawartość względem kontroli) i 2-krotnie niższa u roślin z pożywki zawierającej $1 \mu\text{M}$ tej soli, chociaż różnice te nie były statystycznie istotne.

A

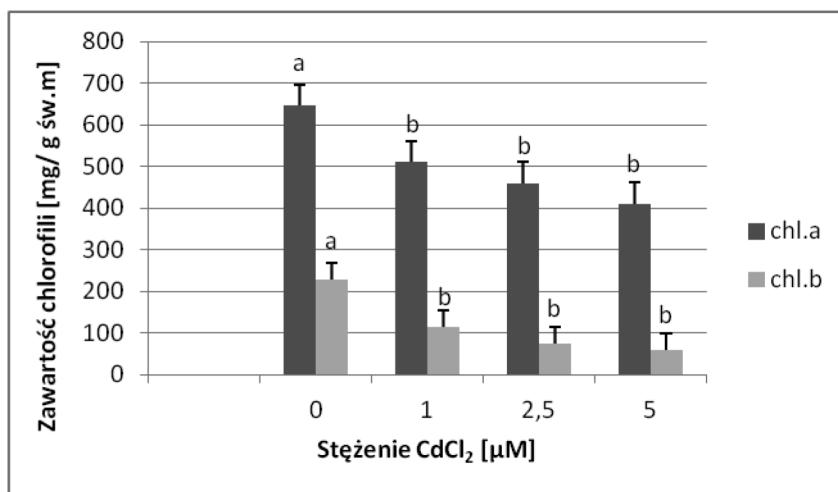


B



Rys. 1. Wykresy przedstawiające średnie wartości długości mikropędów (A) i zregenerowanych korzeni przybyszowych (B) *Alyssum montanum* kulturowanej przez 6 tygodni na pożywce kontrolnej lub z dodatkiem CdCl_2

Źródło: badania własne.



Rys. 2. Zawartość chlorofilu a (chl. a) i chlorofilu b (chl. b) wyrażona w mg/g⁻¹ ś.w.m., oznaczona w mikropędach *Alyssum montanum*, po sześciu tygodniach wzrostu na pożywkach zawierających chlorek kadmu oraz na pożywce kontrolnej

Źródło: badania własne.

4. Dyskusja

Reakcje roślin na kadm w dużej mierze są uzależnione od stężenia tego pierwiastka w środowisku ich wzrostu oraz od genotypu badanej populacji [Irfan 2013]. W odniesieniu do materiału roślinnego do podstawowych objawów toksyczności kadmu zalicza się plamistość chlorotyczną i nekrotyzację blaszek liściowych, zaczerwienienia nerwacji liści i ich kędzierzawienie, a także ograniczenie wzrostu elongacyjnego korzeni. Kadm powoduje również zaburzenia fotosyntezy, destrukcyjne przemiany związków azotowych, zmiany przepuszczalności błon komórkowych i degradację struktury DNA [Porębska, Gworek 1999; Kabata-Pendias, Pendias 2001]. Dobór gatunku i odmiany rośliny wpływa znacząco na możliwości pobierania jonów kadmu za pośrednictwem systemu korzeniowego [Ociepa-Kubicka 2012]. Reakcja poszczególnych gatunków na jony kadmu jest przedmiotem badań kilku zespołów naukowych, lecz prowadzone są one w warunkach *in vivo* [Porębska, Gworek 1999; Irfan i in. 2013; Marmioli i in. 2013]. Zastosowanie technik *in vitro* w odniesieniu do przedstawicieli flory galmanowej daje możliwość uzyskania cennego materiału roślinnego w niezwykle szybkim czasie. Mikrorozmnażanie umożliwia podwyższenie współczynnika namnażania w porównaniu z efektem, który można uzyskać w warunkach naturalnych. Co więcej – opracowanie skutecznych technik umożliwia zachowanie cennych genotypów tolerujących czynniki stresowe oraz stwarza nowe możliwości badawcze [Kopyra, Gwóźdź 2004; Rybczyński, Mikula 2006]. Poten-

cjał fitoekstrakcyjny kadmu przez dwa gatunki z rodzaju *Alyssum* został zbadany przez Barzantiego i in. [2011]. Zespół ten poddał analizie ekotyp seprentynitowy *A. bertoloni*, a także dwie populacje *A. montanum* – populację serpentynitową (zadaptowaną do wzrostu na glebach serpentynitowych) oraz referencyjną populację z nieskażonego terenu. Kadm aplikowano w formie siarczanu kadmu. Populacja serpentynitowa *A. montanum* wykazała wysoki poziom tolerancji i zdolność do akumulacji jonów kadmu [Barzanti i in. 2011]. Autorzy wzmiankowanej publikacji uważają za niezbędne w celu weryfikacji przydatności określonego ekotypu *Alyssum* do fitoekstrakcji kadmu przeprowadzenie badań terenowych. Analogiczne podejście stosujemy w przypadku niniejszych badań. Aby potwierdzić przydatność galmanowego ekotypu *A. montanum* do fitoekstrakcji kadmu, w chwili obecnej prowadzone są doświadczenia mikropoletkowe. Na podstawie wyników prezentowanych eksperymentów, a także zgodnie z danymi literaturowymi [Olko 2008] należy stwierdzić, że wyniki mogą być obiecujące. Tak sprecyzowany cel długoterminowy ma aspekt aplikacyjny, w przyszłości bowiem istnieje szansa wykorzystania wyselekcjonowanych klonów *Alyssum montanum* do oczyszczania terenów skażonych kadmem.

5. Wnioski

1. Galmanowy ekotyp *Alyssum montanum* można efektywnie rozmnażać wegetatywnie w warunkach *in vitro* z dodatkiem chlorku kadmu.

2. Stężenia 1; 2,5 i 5 μM CdCl_2 zastosowane w pożywce namnożeniowej wywarły różnicowany wpływ na cechy morfometryczne *A. montanum* – stymulowały namnażanie i wzrost elongacyjny mikropędów, lecz nie odziaływały wyraźnie na ryzogenezę i na długość regenerowanych korzeni przybyszowych.

3. Ekotyp *Alyssum montanum* naturalnie porastający hałdy galmanowe wykazał w teście *in vitro* przystosowanie do podwyższonych zawartości kadmu w podłożu.

Literatura

- Abou-Shanab R.A.I., van Berkum P., Angle J.S., Delorme T.A., Chaney R.L., Ghazlan H.A., Ghanem K., Moawad H., 2010, *Characterization of Ni-resistant bacteria in the rizosphere of the hyperaccumulator Alyssum murale by sequence analysis of 16S gene*, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 26, s. 101-108.
- Barzanti R., Colzi I., Arnetoli M., Gallo A., Pignattelli S., Gabbriellini R., Gonnelli C., 2011, *Cadmium phytoextraction potential of different Alyssum species*, Journal of Hazardous Materials, 196, s. 66-72.
- Hanus-Fajerska E., Augustynowicz J., Muszyńska E., Koźmińska A., 2011, *Organizmy przydatne w oczyszczaniu środowiska z nadmiernych stężeń pierwiastków metalicznych*, Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych, 50, s. 180-192.
- Irfan M., Ahmad A., Hayat S., 2014, *Effect of cadmium on the growth and antioxidant enzymes in two varieties of Brassica juncea*, Saudi Journal of Biological Sciences, 21, s. 125-131.
- Kabata-Pendias A., Pendias H., 2001, *Biogeochemia pierwiastków śladowych*, WN PWN, Warszawa.

- Kopyra M., Gwóźdź E.A., 2004, *The role of nitric oxide in plant growth regulation and responses to abiotic stresses*, Acta Physiologiae Plantarum, 26(4), s. 459-472.
- Lichtenthaler H.K., 1987, *Chlorophylls and Carotenoids, the Pigments of Photosynthetic Biomembranes*, [w:] Douce R., Packer L. (eds.), *Methods in Enzymology* 148, Academic Press Inc., New York, s. 350-382.
- Lloyd G., Mc Cown B. BH., 1980, *Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, Kamia latifolia by use of shoot-tip culture*, Proceeding of International Plant Propagators Society, 30, s. 42-427.
- Marmioli M., Imperiale D., Maestri E., Marmioli N., 2013, *The response of Populus spp. to cadmium stress: Chemical, morphological and proteomics study*, Chemosphere, 93, s. 1333-1344.
- Mengoni A., Pini F., Huang L.N., Shu W.S., Bazzicalupo M., 2009, *Plant-to-plant variation of bacterial communities associated with leaves of the nickel hyperaccumulator Alyssum bertolonii*, Desv. Microbial Ecology, 58, s. 660-667.
- Mierek-Adamska A., Dąbrowska G., Goc A., 2009, *Rośliny modyfikowane genetycznie, a strategie oczyszczania gleb z metali ciężkich*, Postępy Biologii Komórki, 36, s. 649-662.
- Ociepa-Kubicka A., 2012, *Toksyczne oddziaływanie metali ciężkich na rośliny, zwierzęta i ludzi*, Inżynieria i Ochrona Środowiska, 15(2), s. 169-180.
- Olko A., 2008, *Fizjologiczne aspekty tolerancji roślin na metale ciężkie*, Kosmos, Problemy Nauk Biologicznych, 58, s. 221-228.
- Porębska G., Gworek B., 1999, *Ocena przydatności roślin w remediacji gleb zanieczyszczonych metalami ciężkimi*, Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych, 17, s. 91-89.
- Rybczynski J.J., Mikula A., 2006, *Engagement of biotechnology in the protection of threatened plant species in Poland*, Biodiversity Research and Conservation, 3-4, s. 361-368.
- Wellburn A.R., 1994, *The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution*, Journal of Plant Physiology, 144 (3), s. 307-313.