

Katarzyna Malinowska*, Małgorzata Mikiciuk*, Adam Berdzik*

**ZMIANY WYBRANYCH PARAMETRÓW FIZJOLOGICZNYCH WIERZBY
WICIOWEJ (*SALIX VIMINALIS* L.) WYWOŁANE ZRÓŻNICOWANYM
STĘŻENIEM KADMU W PODŁOŻU**

**CHANGES OF SELECTED PHYSIOLOGICAL PARAMETERS
OF BASKET WILLOW (*SALIX VIMINALIS* L.) CAUSED BY
A DIFFERENTIATED CONCENTRATION OF CADMIUM
IN THE MEDIUM**

Słowa kluczowe: bilans wodny, chlorofil, kadm, karotenoidy, wierzba wiciowa.

Key words: water balance, chlorophyll, cadmium, carotenoids, basket willow.

Two clones – Bjor and Tora – of basket willow were used in the studies. The experiment was carried out by the aquatic cultures method. After the cuttings had rooted and the shoots had formed, cadmium was added to the medium in the amounts of 1.4; 2.8; 28; 280 mg·dm⁻³. The determination of the physiological parameters was carried out on the 7th, 14th, 21st and 28th day after the day on which the doses of cadmium were applied. It was shown that the doses of cadmium significantly decreased the content of chlorophyll a, b and carotenoids and the value of the index of the relative content of water in leaves of the examined clones. It was shown that there was a significant correlation between the concentration of cadmium and the content of chlorophyll a + b in the leaves of the examined willow clones. A clone more resistant to the stress caused by a high content of cadmium in the medium was Bjor. It was characterised by higher values of the determined physiological parameters.

* Dr inż. Katarzyna Malinowska, dr inż. Małgorzata Mikiciuk, mgr Adam Berdzik – Zakład Fizjologii Roślin, WKŚiR, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie; ul. Słowackiego 17, 71-434 Szczecin; kontakt: tel. 449 63 81, e-mail: katarzyna.malinowska@zut.edu.pl

1. WPROWADZENIE

Wzrost poziomu kadmu w środowisku jest wynikiem gospodarczo-przemysłowej działalności człowieka. Pierwiastek ten cechuje największa wartość wskaźnika koncentracji zarówno w glebie, jak i roślinie, w porównaniu z innymi metalami [Kabata-Pendias 2000]. Reakcja roślin na stres spowodowany obecnością w środowisku metali ciężkich, w tym także kadmu, objawia się m.in. zmianami zachodzącymi w aparacie asymilacyjnym roślin oraz w procesach fizjologicznych [Chen, Kreeb 1990, Kabata-Pendias, Pendias 1999, Krzesłowska 2004, Pacha, Galimska-Stypa 1984].

Wierzba wiciowa (*Salix viminalis* L.) znajduje zastosowanie w fitoremediacji oraz fitoekstrakcji gleb zanieczyszczonych metalami ciężkimi, a także innymi toksycznymi związkami. Dzięki wysokim zdolnościom do akumulacji substancji szkodliwych oraz ich degradacji wierzba wiciowa jest wykorzystywana do nasadzeń ochronnych wokół zakładów przemysłowych, składowisk odpadów oraz wzdłuż autostrad [Eltrop i in. 1991, Šottníková i in. 2003, Szczukowski, Tworkowski. 1999, Wrzosek i in. 2008]. Warunkiem sukcesu plantacji energetycznej jest dobór właściwej odmiany lub klonu do antropogenicznie zdegradowanego obszaru. Odporność roślin na toksyczne właściwości kadmu jest bardzo zróżnicowana i zależy nie tylko od ich właściwości genetycznych, ale też fizjologicznych. Do oceny przydatności roślin w rekultywacji terenów zdegradowanych wykorzystuje się między innymi parametry fizjologiczne roślin.

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu zróżnicowanego stężenia kadmu (0; 1,4; 2,8; 28; 280 mg·dm⁻³) na zawartość barwników asymilacyjnych (chlorofil a, b, karotenoidy) i bilans wodny klonów wierzby wiciowej (*Salix viminalis* L.) Tora i Bjor, uprawianej w kulturach wodnych z pożywką Hoaglanda, oraz ocena przydatności tych klonów w zagospodarowaniu gleb zanieczyszczonych kadmem.

2. MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto klony wierzby wiciowej Tora i Bjor. Zrzezy wierzby wykorzystane w doświadczeniu zostały pobrane z plantacji Zakładu Fizjologii Roślin Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Materiał mateczny natomiast pochodził z plantacji w Danii, objętej certyfikatem zdrowotności. Wykonano dwie serie doświadczeń w trzech powtórzeniach w warunkach laboratoryjnych. Hodowlę wierzby wiciowej przeprowadzono w kulturach wodnych wypełnionych 1,5-krotnie stężoną pełną pożywką Hoaglanda o pH =5,8 (kontrola) oraz różnymi dawkami kadmu. Kadm wprowadzony został do pożywki w formie CdCl₂. W doświadczeniu uwzględniono następujące kombinacje:

- 1) kontrola (pożywka pełna wg Hoaglanda),
- 2) żywka pełna + dawka Cd (1,4 mg·dm⁻³),
- 3) żywka pełna + dawka Cd (2,8 mg·dm⁻³),

- 4) pożywka pełna + dawka Cd ($28 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$),
- 5) pożywka pełna + dawka Cd ($280 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$).

Założone kultury wodne zawierały po cztery zrzesy wierzbowe o długości 22 cm. Po ukorzenieniu zrzesów oraz wykształceniu pędów dodano do pożywki zróżnicowane dawki kadmu, zgodnie z kombinacją doświadczalną.

Oznaczenia parametrów fizjologicznych wykonano w czterech terminach: w 7 (I termin), 14 (II termin), 21 (III termin) i 28 (IV termin) dniu od momentu zastosowania dawek Cd.

Zawartość barwników asymilacyjnych w liściach (chlorofil a i b, całkowity i karotenoidy) oznaczono metodą Lichtenthalera i Welburna [1983]. Bilans wodny określano za pomocą wskaźnika RWC (względnej zawartości wody) i WSD (deficytu wysycenia wodą) [Bandurska 1991]. Uzyskane wyniki opracowano metodą dwuczynnikowej wariancji, wykorzystując test Tukeya na poziomie istotności $\text{NIR}_{0,05}$. Za pomocą współczynnika korelacji (r) przedstawiono zależność między koncentracją kadmu w liściach a zawartością barwników asymilacyjnych.

3. WYNIKI I DYSKUSJA

Przeprowadzone badania wykazały istotne zmiany w badanych parametrach fizjologicznych wierzby wiciowej w warunkach skażenia pożywki kadmem.

Zawartość barwników asymilacyjnych w roślinach jest cechą charakterystyczną dla gatunków i odmian. Wpływ wielu czynników środowiskowych i antropogenicznych znacznie modyfikuje zawartość tych barwników w roślinach (Chen, Kreeb 1990, Kozłowski i in. 2001, Krzesłowska 2004). Stwierdzono, że wzrastające stężenie kadmu w pożywce spowodowało zmniejszenie zawartości barwników asymilacyjnych w liściach badanych klonów wierzby wiciowej. Zaobserwowano również niekorzystny wpływ długości okresu oddziaływania dodanych dawek kadmu do pożywki na oznaczane parametry fizjologiczne.

Największa z zastosowanych dawek Cd – $280 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ – spowodowała u klonu Bjor zmniejszenie koncentracji chlorofilu a o 50,8% w 7 dniu badań do 74,6% w 28 dniu badań, u klonu Tora natomiast odpowiednio o 48,9% w 7 dniu badań, do 75,7% w 28 dniu badań (tab. 1). Zawartość chlorofilu b w liściach klonu Bjor i Tora przy najwyższej dawce kadmu stanowiła odpowiednio 45,7% i 31,3% w 28 dniu w stosunku do rośliny kontrolnej (tab. 1).

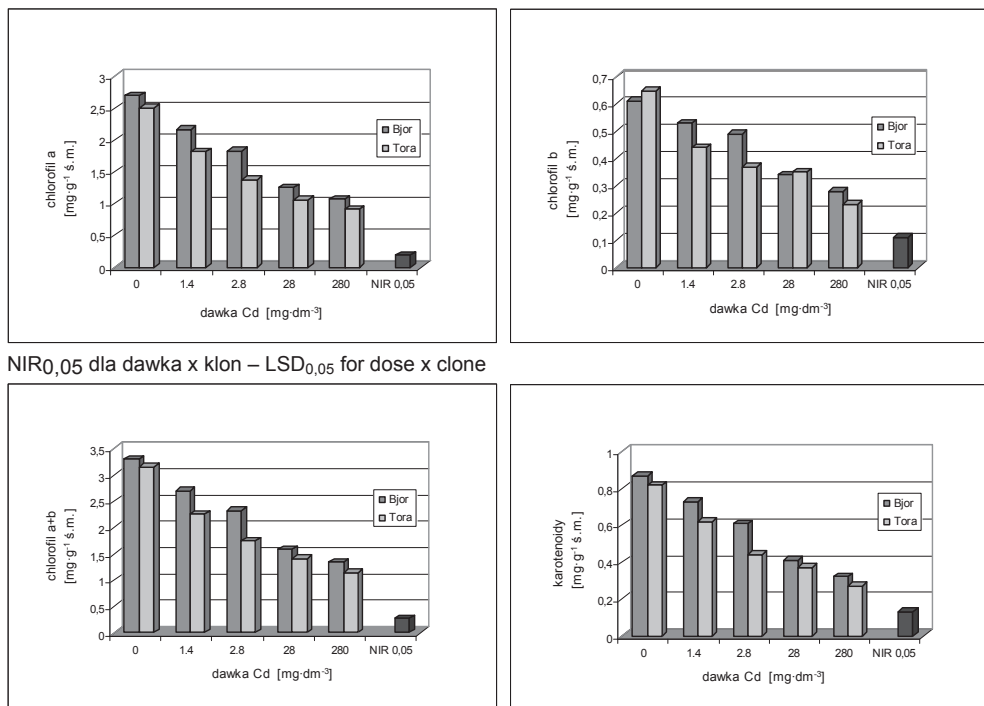
Skażenie pożywki kadmem spowodowało również istotne zmniejszenie zawartości karotenoidów w liściach badanych klonów. Największe zmniejszenie zawartości w stosunku do zawartości w liściach rośliny kontrolnej tego barwnika stwierdzono w 14 dniu badań, przy zastosowanej największej dawce kadmu – o 74,3% u klonu Bjor i o 80% u klonu Tora w (tab. 1). Istotne zmniejszenie tego parametru uzyskano u klonu Tora uprawianego w obecności $280 \text{ mg Cd dm}^{-3}$: o 70,7% w stosunku do próby kontrolnej i o 47,5% w stosunku do I terminu badań (tab. 1). Chen i Kreeb [1990] odnotowali ponad dwukrotne

Tabela. 1. Toksyczne oddziaływanie kadmu na zawartość barwników fotosyntetycznych u badanych klonów wierzby wiciowej**Table 1.** The toxic impact of cadmium on the content of photosynthetic pigments in the examined clones of basket willow

Dawka Cd [mg·dm ⁻³]	Chlorofil a [mg·g ⁻¹ ·s.m.] (% do kontroli)							
	termin badań (doba)				termin badań (doba)			
	7	14	21	28	7	14	21	28
	Klon Bjor – Clone Bjor				Klon Tora – Clone Tora			
0	3,09±0,79 (100)	3,46±0,59 (100)	2,51±0,32 (100)	1,73±0,77 (100)	2,84±0,87 (100)	3,06±0,29 (100)	2,56±0,47 (100)	1,56±0,32 (100)
1,4	2,11±0,25 (68,3)	3,26±0,35 (94,2)	1,83±0,39 (72,9)	1,48±0,25 (85,5)	2,04±0,55 (71,8)	2,42±0,33 (79,1)	1,40±0,18 (54,7)	1,41±0,25 (90,4)
2,8	1,75±0,16 (56,6)	2,86±0,28 (82,6)	1,33±0,21 (52,9)	1,39±0,31 (80,3)	1,66±0,61 (58,4)	1,94±0,19 (63,4)	1,06±0,12 (41,4)	0,87±0,14 (55,8)
28	1,62±0,20 (52,4)	1,72±0,24 (49,7)	1,09±0,12 (43,4)	0,55±0,05 (31,8)	1,52±0,23 (53,5)	1,48±0,12 (48,4)	0,73±0,08 (28,5)	0,51±0,08 (32,7)
280	1,52±0,32 (49,2)	1,39±0,19 (40,2)	0,91±0,08 (36,2)	0,44±0,06 (25,4)	1,45±0,28 (51,1)	1,19±0,09 (38,9)	0,62±0,10 (24,2)	0,38±0,03 (24,3)
Chlorofil b [mg·g ⁻¹ ·s.m.] (% do kontroli)								
0	0,50±0,04 (100)	0,51±0,22 (100)	0,83±0,89 (100)	0,59±0,08 (100)	0,55±0,05 (100)	0,62±0,11 (100)	0,94±0,21 (100)	0,48±0,15 (100)
1,4	0,45±0,03 (90,0)	0,46±0,11 (90,2)	0,75±0,30 (90,4)	0,45±0,06 (76,3)	0,40±0,04 (72,7)	0,30±0,02 (48,4)	0,47±0,10 (50,0)	0,58±0,012 (120,8)
2,8	0,42±0,01 (84,0)	0,55±0,09 (107,8)	0,51±0,09 (61,4)	0,48±0,03 (81,3)	0,37±0,04 (67,3)	0,39±0,03 (62,9)	0,41±0,05 (43,6)	0,29±0,05 (60,4)
28	0,47±0,02 (94,0)	0,29±0,05 (56,8)	0,37±0,05 (44,6)	0,21±0,01 (35,6)	0,41±0,03 (74,5)	0,35±0,02 (56,4)	0,36±0,03 (38,3)	0,27±0,03 (56,2)
280	0,29±0,01 (58,0)	0,23±0,03 (45,1)	0,33±0,06 (39,7)	0,27±0,02 (45,7)	0,38±0,02 (69,1)	0,20±0,01 (32,2)	0,20±0,02 (21,3)	0,15±0,02 (31,3)
Karotenoidy [mg·g ⁻¹ ·s.m.] (% do kontroli)								
0	0,72±0,11 (100)	1,01±0,24 (100)	1,08±0,13 (100)	0,68±0,09 (100)	0,68±0,07 (100)	0,90±0,08 (100)	1,05±0,18 (100)	0,65±0,12 (100)
1,4	0,56±0,07 (77,8)	0,91±0,01 (90,1)	0,81±0,11 (75,0)	0,65±0,05 (95,6)	0,53±0,02 (77,9)	0,65±0,05 (72,2)	0,59±0,08 (56,2)	0,72±0,08 (110,7)
2,8	0,39±0,02 (54,2)	0,82±0,05 (81,2)	0,57±0,02 (52,8)	0,65±0,08 (95,6)	0,40±0,02 (58,8)	0,43±0,04 (47,8)	0,50±0,04 (47,6)	0,43±0,04 (66,2)
28	0,53±0,03 (73,6)	0,36±0,03 (35,6)	0,49±0,06 (45,4)	0,26±0,03 (38,2)	0,60±0,03 (88,2)	0,29±0,06 (32,2)	0,32±0,02 (30,5)	0,25±0,05 (38,5)
280	0,31±0,01 (43,1)	0,26±0,02 (25,7)	0,43±0,04 (39,8)	0,29±0,02 (42,6)	0,40±0,01 (58,8)	0,18±0,02 (20,0)	0,32±0,01 (30,5)	0,19±0,02 (29,3)

zmniejszenie zawartości chlorofilu u kukurydzy pod wpływem działania metali ciężkich, w porównaniu do kontroli. Obniżoną zawartość chlorofilu a – o 46%, chlorofilu b – o 32% i karotenoidów – o 48% uzyskali u *Lemna minor* po zastosowaniu dawki kadmu 20 mg·l⁻¹ Hou i in. [2007].

W przeprowadzonych badaniach zaobserwowano również nieznaczny wzrost chlorofilu b i karotenoidów u klonu Tora rosnącego przez 28 dni w pożywce z dodatkiem najmniejszej dawki Cd – 1,4 mg Cd dm⁻³. Koncentracja chlorofilu b w liściach tego klonu zwiększyła się o 20,8%, karotenoidów natomiast o 10,7% w stosunku do koncentracji w roślinie kontrolnej (rys. 1).

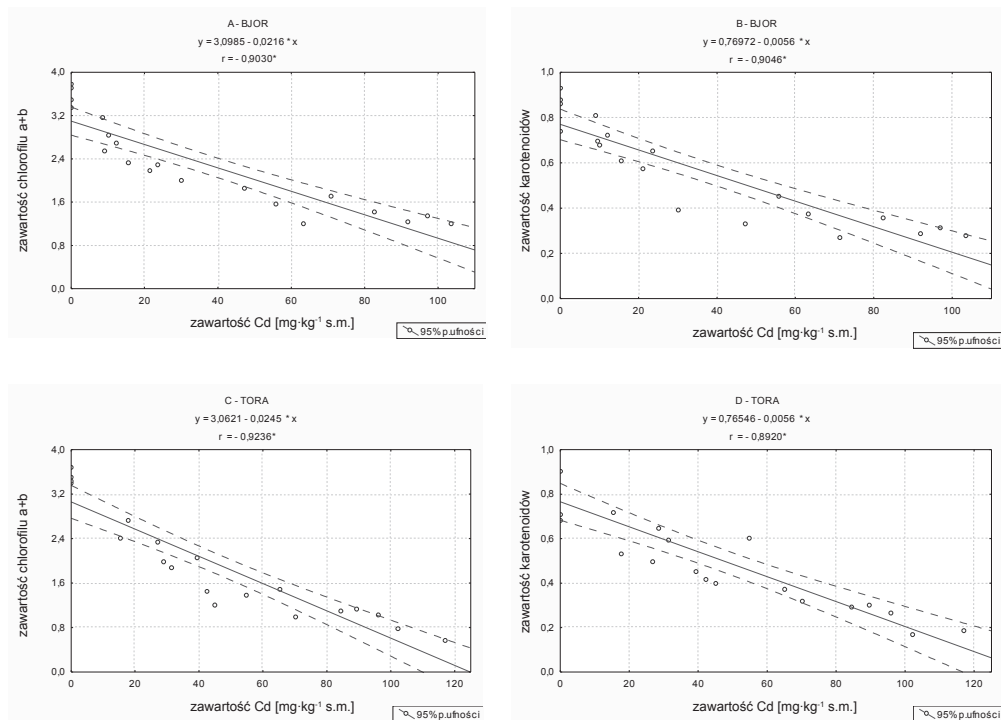


Rys. 1. Średnia zawartość barwników fotosyntetycznych ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ś.m.) w liściach badanych klonów wierzby wiciowej w zależności od dawki kadmu w pożywce

Fig. 1. An average content of photosynthetic pigments ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ of fresh matter) in the leaves of examined clones of basket willow in relation to the cadmium dose in the medium

Zwiększoną ilość chlorofilu b u rozchodnika, uzyskali po zastosowaniu dawki kadmu w ilości 10^{-4} M Zhou i Qiu [2005]. Badania przeprowadzone przez Nikolić i in. [2008] wykazały u topoli rosnącej w środowisku o koncentracji kadmu 10^{-4} M Cd zwiększenie się zawartości chlorofilu b o 49%, a karotenoidów o 10% w stosunku do zawartości tych barwników w roślinie kontrolnej.

Na podstawie wartości współczynnika korelacji stwierdzono ujemną istotną zależność korelacyjną między zawartością barwników fotosyntetycznych (chlorofilu a+b i karotenoidów) a koncentracją kadmu w liściach badanych klonów wierzby (rys. 2). Łukasik i in. [2004] oraz Malinowska [2006] w swoich badaniach stwierdzili ujemną istotną korelację pomiędzy zawartością kadmu a zawartością chlorofilu a+b w liściach. Kadm przez kumulację w chloroplastach niszczy strukturę tych organelli i w następstwie hamuje syntezę barwników fotosyntetycznych [Romero-Puertas i in. 2004, Sandalio i in. 2001, Weigel 1985]. Może powodować także uszkodzenie błon chloroplastów oraz tylakoidów, przez zwiększoną produkcję wolnych rodników [Halliwell, Gutteridge 1984].

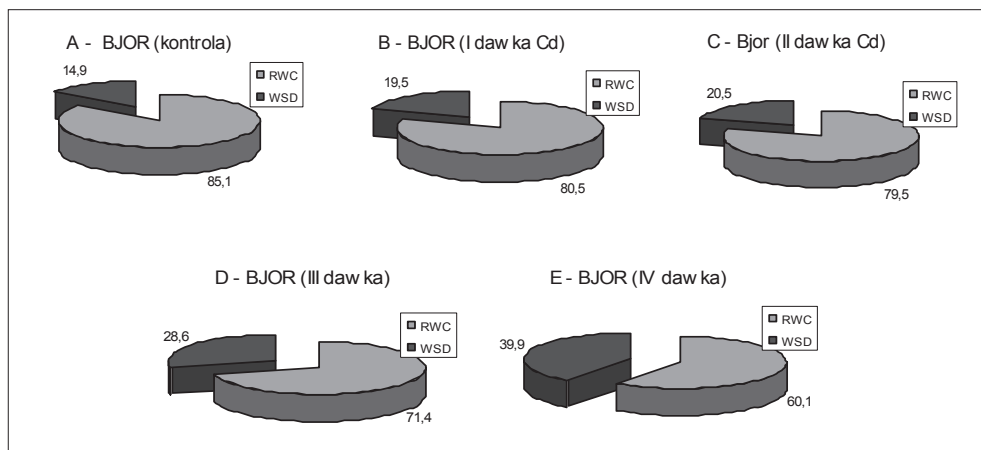


Rys. 2. Korelacje między zawartością barwników fotosyntetycznych w mg·g⁻¹ św.m. a zawartością kadmu w liściach klonu BJOR (rys. A, B) oraz klonu Tora (rys. C, D)

Fig. 2. Correlation between the content of photosynthetic pigments (mg·g⁻¹ of fresh matter) and the content of cadmium in the leaves of clone BJOR (Fig. A, B) and clone Tora (Fig. C, D)

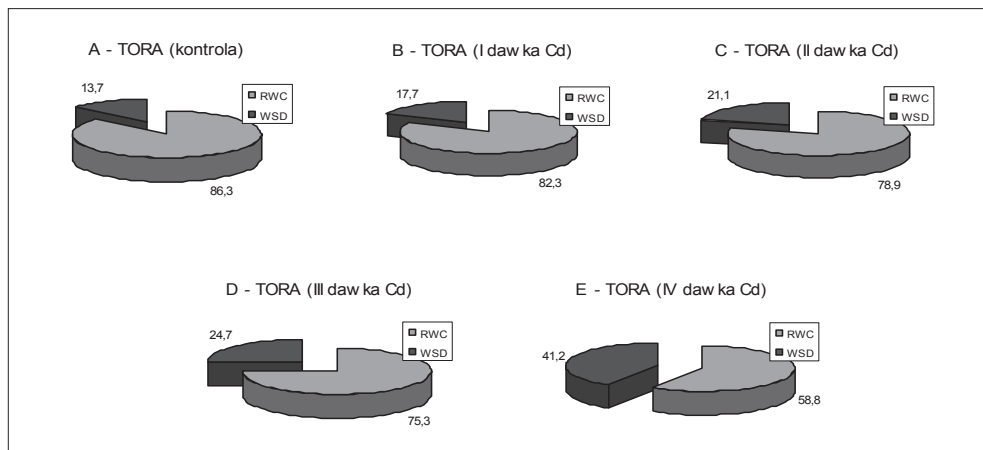
Wskaźnikiem zmian bilansu wodnego w roślinie jest m.in. wskaźnik względnej zawartości wody RWC i deficyt wysycenia wodą WSD. Wskaźnik względnej zawartości wody w tkankach kształtował się w granicach 85,1 – 60,1% u klonu BJOR (rys. 3) oraz 86,3 – 58,8% u klonu Tora (rys. 4). Zwiększanie dawki kadmu spowodowało zmniejszenie zawartości wody w liściach badanych klonów. Największe zmniejszenie wskaźnika względnej zawartości wody, o 25% u BJOR i o 27,5% u Tora, w stosunku do roślin kontrolnych (rys. 3 i 4) zaobserwowano po zastosowaniu największej dawki kadmu.

Obserwowane zmiany intensywności badanych parametrów fizjologicznych mogą być w niekorzystnych warunkach efektem zarówno stresu, jak i mechanizmów naprawczych [Starck 2002]. Uzyskane wyniki badanych parametrów fizjologicznych mogą być przydatne do oceny odporności badanych klonów wierzby na stres wywołany kadmem i ich przydatności w rekultywacji terenów antropogenicznie zdegradowanych. Klon BJOR wierzby wiciowej cechowały większe wartości oznaczanych parametrów fizjologicznych, co sugeruje, że wykazuje także większą tolerancję na stres wywołany dużą zawartością kadmu w podłożu.



Rys. 3. Wskaźniki wodne (%) wierzby wiciowej – klonu BJOR, w zależności od dawki kadmu w pożywce

Fig. 3. Water indices (%) of basket willow – clone BJOR, in relation to the cadmium dose in the medium



Rys. 4. Wskaźniki wodne (%) wierzby wiciowej – klonu Tora, w zależności od dawki kadmu w pożywce

Fig. 4. Water indices (%) of basket willow – clone Tora, in relation to the cadmium dose in the medium

4. WNIOSKI

1. Stwierdzono zmniejszenie zawartości barwników asymilacyjnych w liściach klonów Bjor i Tora w 28 dniu badań po zastosowaniu dawki kadmu 2,8; 28; 280 mg·dm⁻³ w stosunku do zawartości tych barwników w roślinie kontrolnej.
2. Wykazano istotną zależność korelacyjną między koncentracją kadmu a zawartością chlorofilu a+b w liściach badanych klonów wierzby.
3. Zwiększenie dawki kadmu powodowało zmniejszenie wartości wskaźnika względnej zawartości wody w liściach badanych klonów wierzby wiciowej.
4. Klon wierzby Bjor wykazywał większą tolerancję na stres spowodowany dużą zawartością kadmu w podłożu.

PIŚMIENNICTWO

- BANDURSKA H. 1991. The effect of proline on nitrate reductase activity in water – stressed barley leaves. *Acta Physiol. Plant.* 1: 3–11.
- CHEN T., KREEB H.K. 1990. Investigation of combined effects of Pb, NaCl and water deficit on *Zea mays* L. In: (ed.) Boháč J. Proceedings of the VI international conference – Bioindicators Deterioration Regionis. Institute of Landscape Ecology CAS, České Budějovice: 348–356.
- DAS P., SAMANTARAY S., ROUT R. 1998. Studies on cadmium toxicity in plants. *Environ. Pollut.* 98(1): 29–36.
- ELTOP L., BRON G., JOACHIM O., BRINKMANN K. 1991. Lead tolerance of *Betula* and *Salix* in the mining area of Mechnich. *Plant and Soil.* 131: 275–285.
- HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219: 1–14.
- HOU W., CHEN X., SONG G., WANG Q., CHANG CH. 2007. Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*). *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 62–69.
- KABATA-PENDIAS A. 2000. Biogeochemia kadmu. Kadm w środowisku – problemy ekologiczne i metodyczne. *Zesz. Nauk. PAN „Człowiek i Środowisko”.* 26: 17–24.
- KABATA-PENDIAS A., PENDIAS H. 1999. Biogeochemia pierwiastków śladowych. PWN, Warszawa.
- KOZŁOWSKI S., GOLIŃSKI P., GOLIŃSKA B. 2001. Barwniki chlorofilowe jako wskaźniki wartości użytkowej gatunków i odmian traw. *Zesz. Prob. Post. Nauk Rol.* 474: 215–223.
- KRZESŁOWSKA M. 2004. Metale śladowe. W: *Komórki roślinne w warunkach stresu*, t. I, cz. II (red. Woźny A., Przybył K.). Wyd. Nauk. UAM, Poznań: 103–164.
- LICHTENTHALER H.K., WELLBURN A.R. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extracts in different solvents. *Bioch. Soc. Trans.* 11: 591–592.

- ŁUKASIK I., PALOWSKI B., CIEPAŁ R. 2004. Correlation between heavy metals contents and chlorophyll pigments concentration in plant tissues around Power plant „Elektrownia Jaworzyno SA” 11(2-3), 201–208.
- MALINOWSKA K. 2006. Relationship of the content of heavy metals and the number of assimilation dyes in the leaves of Norway maple (*Acer platanoides* L.) in the area of Gdynia. Ecol. Chem. and Engin. 13(6), 547–552.
- NIKOLIĆ N., KOJIĆ D., PILIPOVIĆ A., PAJEVIĆ S., KRSTIĆ B., BORIŠEV M., ORLOVIĆ S. 2008. Responses of hybrid poplar to cadmium stress: photosynthetic characteristics, cadmium and praline accumulation and antioxidant enzyme activity. Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica 50/2: 95–103.
- PACHA J., GALIMSKA-STYPA R. 1984. Właściwości mutagenne wybranych związków kadmu, cynku, miedzi i ołowiu. Acta Biol. Sile. 15: 20–27.
- ROMERO-PUERTAS M.C., RODRIGUEZ-SERRANO M., CORPAS F.J. 2004. Cadmium-induced subcellular accumulation of O_2^- and H_2O_2 in pea leaves. Plant Cell Environ. 27: 1122–1134.
- SANDALIO L.M., DALURZO H.C., GOMEZ M. 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. J. Exp. Bot. 52: 2115–2126.
- ŠOTTNIKOVÁ A., LUNÁČKOVÁ L., MASAROVÍČOVÁ E., LUX A., STREŠKO V. 2003. Changes in the rooting and growth of willows and poplars induced by cadmium. Biologia Plantarum. 46(1): 129–131.
- STARCK Z. 2002. Mechanizmy integracji procesów fotosyntezy i dystrybucji biomasy w niekorzystnych warunkach środowiska. Zesz. Prob. Post. Nauk Rol. 481:113–123.
- SZCZUKOWSKI S., TWORKOWSKI J. 1999. Gospodarcze i przyrodnicze znaczenie krzewiastych wierzb *Salix* sp. Zesz. Prob. Post. Nauk Rol. 486: 69–77.
- WEIGEL H.J. 1985. Inhibition of photosynthetic reaction of isolated spinach chloroplasts by cadmium. J. Plant Physiol. 119: 179–189.
- WRZOSEK J., GAWROŃSKI S., GWOREK B. 2008. Zastosowanie roślin energetycznych w technologii fitoremediacji. Ochr. Środ. i Zas. Natur. 37: 139–151.
- ZHOU W., QIU B. 2005. Effects of cadmium hyperaccumulation on physiological characteristics of *Sedum alfredii* Hance (Crassulaceae). Plant Science 169: 737–745.