

METALLOMIC STUDY OF EFFECT OF CADMIUM IONS ON PLANT TISSUE CULTURES OF SUNFLOWER

Kryštofová O., Zehnálek J., Adam V., Kizek R.

Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: olga.krystofova@seznam.cz, kizek@sci.muni.cz

ABSTRACT

In the eight-days-long experiment, we investigated the influence of cadmium(II) ions (0, 5, 10, 50, 100 and 500 μM) on sunflower callus culture. We mainly focussed our attention on the growth. The obtained results were evaluated using the standard procedure, in which dependence of the fresh weight on the applied concentration was determined. We also used linear regression to evaluate the obtained results. Based on the slopes of the lines, we determined the degree of inhibition of growth in various experimental variants. The results obtained suggest that sunflower callus growth was most inhibited by concentrations of 500 μM of cadmium(II) ions and slightly stimulated by 10 μM of cadmium(II) ions compared with control.

In the second part of our work, we optimized the determination of antioxidant activity of three different techniques (DPPH, and ABTS free radicals). The optimization were compared two types of standard (gallic acid and trolox). The results obtained were found to be more appropriate standard for evaluating antioxidant activity in real samples, gallic acid.

Key words: sunflower, callus, cadmium, phytoremediation

Acknowledgments: This work was supported by grant IGA MENDELU IP 7/2010, REMEDTECH GA ČR 522/07/0692 and IGA MENDELU TP 1/2010

ÚVOD

Z médií zaznívají čím dál častěji debaty o klimatických změnách. Velmi často bývá při těchto debatách diskutována souvislost mezi znečištěním životního prostředí a přirozeným během. Je pravdou, že znečišťujících látek v životním prostředí přibývá a ovlivňují tak kvalitu našeho života. Způsobů, jak jejich množství snížit, známe hned několik. Prvním a nejdůležitějším je lidské uvědomění, ukáznění a chuť následky své činnosti řešit. Druhým je vyvíjet pro řešení následků účinné dekontaminační techniky, které jsou vůči životnímu prostředí šetrné. Mezi takové techniky patří remediace. Remediace jsou ozdravným procesem využívajícím fyzikální, chemické a biologické principy. Za nejšetrnější lze považovat principy biologické. Ty využívají k nápravě životního prostředí jak mikroorganismů (rhizoremediace), tak rostlin (fytoremediace). Každý z uvedených principů je schopen fungovat samostatně i ve společné kombinaci. Lze jimi odstraňovat kontaminanty organické i anorganické povahy. Mezi nejzávažnější kontaminanty anorganické povahy patří těžkými kovy. Těžké kovy jsou dle jedné z mnoha definic chemické prvky, mezi které patří zejména přechodné kovy, některé polokovy, lanthanoidy a aktinoidy. Ukládají se v živých organismech (rostlinách i živočiších) a vstupují tak do potravního řetězce, kde se mohou kumulovat až do koncentrací, které jsou pro organismu smrtelné (Krystofova a kol., 2009). Příkladem toxického těžkého kovu je kadmium. Jeho nebezpečnost spočívá ve vysoké afinitě k síře, a protože není esenciálním prvkem, může při zvýšené koncentraci na organismus působit toxicky. Jeho příjem rostlinou nezávisí pouze na přirozených metabolických systémech, ale také na jeho vstupu přes mechanismy určené pro příjem jiných esenciálních kovů (Krystofova a kol., 2010). To, do jaké míry je kadmium schopno kumulovat se v rostlinných pletivech, nezávisí jen na metabolických systémech, ale také na rostlinném druhu a koncentraci živin v půdě potřebných rostlinný růst (Hagemeyer a kol., 1993; Prasad, 1995). Důsledkem toxického působení kadmia na rostliny může být narušení fotosyntézy, respiračního řetězce, narušení příjmu živin, listová nekróza či celkový pokles biomasy s potenciálním snížením výnosnosti u zemědělských plodin o 5 až 22 % (Makovnikova a kol., 2006). Existuje mnoho studií zabývajících se vlivem kadmia na rostliny, avšak jen velmi málo z nich se zabývá jeho vlivem na slunečnici (Azevedo a kol., 2005). Tyto práce se převážně zabírají hledáním odolného kultivaru slunečnice, který bude mít zároveň dobré akumulační vlastnosti. Při výzkumech se nejčastěji aplikují dva pohledy jak posoudit vhodnost rostliny pro akumulaci kadmia a to i) srovnáváním schopnosti různých kultivarů slunečnice hromadit ve svých pletivech kadmium a ii) výběrem kultivarů ovlivněných kadmii s nejlepšími morfogenetickými znaky. Díky těmto dvěma směrům bude jednou možné zvolit vhodný genotyp, který může být použitelný pro fytoremediace kadmia, nebo napomohou ke zvolení vhodných rodičů pro vývoj lepších kultivarů (dos Santos a kol., 2000; C. V. Santos a kol., 2002).

Většina výzkumných prací je prováděna na celistvých rostlinách a jen málo je známo o vlivu kadmia na *in vitro* kultury. Přesto studium *in vitro* kultur by mohlo být přínosné nejen z důvodu navržení genetických modifikací za účelem zvýšení fytořediačních schopností slunečnice, ale také umožňuje snadnější testování rostlin za velmi dobře definovaných podmínek (Diopan a kol., 2008; Kaiser a kol., 2009; Kotrba a kol., 2009; Krystofova a kol., 2009; Macek a kol., 2008; Macek a kol., 2007; Mackova a kol., 2007). Za další výhodu při práci s *in vitro* kulturami je použití geneticky jednotného materiálu, což nám umožňuje v protetických a genomických studiích lépe pochopit rozdíly mezi liniemi na kadmium tolerantními a na kadmium citlivými (Azevedo a kol., 2005).

V naší práci jsme se zabývali vlivem různých koncentrací kademnatých iontů (0, 5, 10, 50, 100 a 500 μM) na růst kalusů slunečnice roční kultivaru Aloha a na změny jejich antioxidační aktivity.

MATERIÁL A METODIKA

Příprava kalusových kultur

Kalusové kultury byly odvozeny následujícím způsobem. Namořené komerčně dodávané našky slunečnice roční kultivaru Aloha byly vydezinfikovány v roztoku Sava (20% v/v, po dobu 20 min.), následně několikrát omyty ve sterilizované destilované vodě a vysazeny na kultivační médium Murashige a Skoog (MurashigeaSkoog, 1962) bez růstových regulátorů podle Santos a Caldeira (C. SantosCaldeira, 1998). Osm dnů stará rostlina byla rozdělena na části (kořeny, hypokotyl) a ty byly pěstovány na modifikované MS médium doplněném o 5 g/l KNO_3 , 0,5% (w/v) polyvinylpyrrolidonu (PVP), 2,7 μM α -naftylacetovou kyselinu (NAA), 2,2 μM 6-benzylaminopurin (BAP), a 0,2 μM gyberelovou kyselinu (GA_3), upraveného na pH 5,7. Kalusy byly kultivovány při 24 ± 1 °C s fotoperiody na 16 h a intenzita světla 93 ± 1 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$. Shluky měsíc starých kalusů (přibližně stejných rozměrů) byly pasážovány na modifikované MS médium obsahující 0, 5, 10, 50, 100 nebo 500 μM kadmium dodané v podobě $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$. Tyto kalusy byly kultivovány v kultivačním boxu za stejných podmínek, jak je uvedeno výše u podmínek pro odvozování kalusů.

Antioxidační aktivita u kalusů vystavených působení kademnatých iontů byla měřena třemi různými technikami. Postupy byly následující:

Stanovení antioxidační aktivity pomocí DPPH[•] testu

Tato metoda je považována za jednu ze základních metodik pro posouzení antioxidační aktivity čistých látek i různých směsných vzorků. Spočívá v reakci testované látky se stabilním radikálem difenylpicrylhydrazylem – DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl), kdy při reakci dochází k redukci radikálu za vzniku DPPH-H.

Postup měření pro automatický analyzátor: Do plastových kyvet bylo pipetováno 200 μl $9.5 \cdot 10^{-5}$ M roztoku DPPH, následně bylo přidáno 20 μl vzorku či standartu (kyselina gallová, trolox) a vše bylo pečlivě promícháno. Po dobu 25 minut byla zaznamenávána v 15 sekundových intervalech

absorbance při vlnové délce $\lambda = 515$ nm. Výsledná hodnota antioxidační aktivity se vypočítá dle vzorce: změna absorbance (%) = $100 - [(A_{25}/A_0) \times 100]$.

Stanovení antioxidační aktivity pomocí metody ABTS

Metoda pomocí ABTS radikálu, literárně též označovaná jako „Trolox Equivalent Antioxidant Capacity“ (TEAC), je jednou z nejčastěji používaných metod k určení koncentrace radikálů. Je založena na neutralizaci radikálkationtu vzniklého jedno elektronovou oxidací syntetického chromoforu ABTS[•] (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonátu) na radikál ABTS[•] – e-ABTS⁺⁺.

Postup měření pro automatický analyzátor: Do plastových kyvet bylo pipetováno 245 μ l roztoku 7 mM ABTS[•] s 4.95 mM peroxodisíranem draselným, následně bylo přidáno 5 μ l vzorku či standartu (kyselina gallová, trolox) a vše bylo pečlivě promícháno. Po dobu 25 minut byla zaznamenávána v 15 sekundových intervalech absorbance při vlnové délce $\lambda = 670$ nm. Výsledná hodnota antioxidační aktivity se vypočítá dle vzorce: změna absorbance (%) = $100 - [(A_{25}/A_0) \times 100]$.

Stanovení antioxidační aktivity pomocí metody Free Radicals

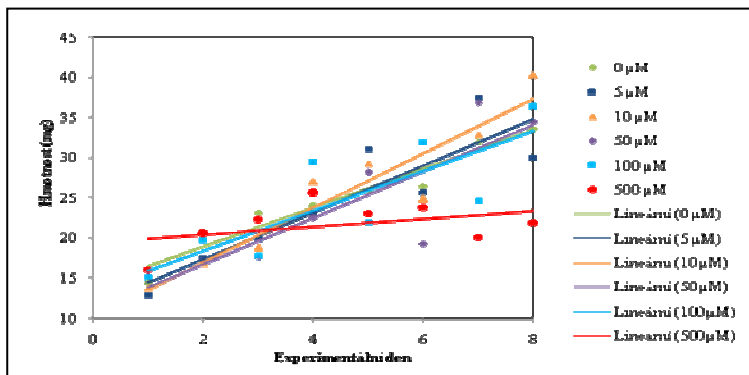
Stanovení volných radikálů je založeno na schopnosti chlorofylinu (sodno-měďnatá sůl chlorofylu) přijímat a odevzdávat elektrony za současné stabilní změny absorpčního maxima. Tento efekt je podmíněn alkalickým prostředím a přidavkem katalyzátoru.

Postup měření pro automatický analyzátor: Pro stanovení byl použit komerčně dodávaný kit od firmy Sedium, který obsahoval reakční pufr, koncentrát chlorofilu a katalyzátor. Tyto roztoky byly smíchány v poměru dle příbalového letáku. Do plastových kyvet bylo pipetováno 200 μ l připravené reagentie, následně bylo přidáno 8 μ l vzorku či standartu (kyselina gallová, trolox) a vše bylo pečlivě promícháno. Absorbance byla měřena po dobu 10 minut a zaznamenávána v 15 sekundových intervalech při $\lambda = 450$ nm. Získané výsledky byly vyhodnoceny pomocí kalibrační křivky.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Kalusy slunečnice roční kultivaru Aloha byly po dobu osmi dnů vystaveny působení kadmiových iontů o koncentracích 0, 5, 10, 50, 100 a 500 μ M. Každý den bylo odebráno a zváženo deset shluků z každé experimentální varianty. Průměrný denní přírůstek hmotnosti pro jednotlivé varianty se pohyboval v prvních čtyřech dnech experimentu v rozmezí 0,5 – 4 mg a v období 4. až 8. dne experimentu v rozmezí 1 – 6 mg (Obr. 1). V časovém úseku prvních čtyř dnů vykazovaly kalusy v porovnání s kontrolou pro aplikované koncentrace kadmia 5, 10, 50 a 100 μ M inhibici růstu. Výjimkou byla koncentrace 500 μ M, která ve 2. až 4. dnu experimentu rostla lépe než kontrola a to o 1 až 2 mg za den. Od 4. dne experimentu nastala stimulace růstu v porovnání s kontrolou u kalusů vystavených 5, 10, a 50 μ M koncentrací kadmia a u kalusů vystavených koncentracím 100 a 500 μ M byl růst zpomalen až zastaven. Tento trend se již do konce experimentu neměnil. Ze získaných výsledků bylo zjištěno, že i přes zpomalení růstu v prvních čtyřech dnech experimentu

působí kadmium na kalusy vystavených koncentraci 5, 10 a 50 μM stimulačně a na kalusy vystavené působení koncentraci 100 a 500 μM .

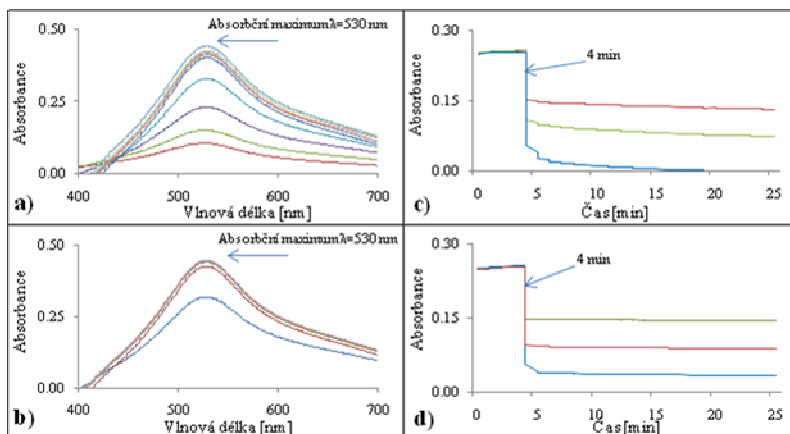


Obr. 1 Vliv kadmia na růst kalusů slunečnice roční kultivaru Aloha po dobu osmidenního experimentu.

V další části práce jsme se zabývali optimalizací tří různých metod pro stanovení antioxidační aktivity. V procesu optimalizace jsme porovnávali odezvy dvou typů standardů (kyselina gallová a trolox) a následně optimalizované metody použili pro stanovení v reálných vzorcích.

Cílem bylo stanovit omezení, časové průběhy reakcí, reakční kinetiku, tři rozdílných fotometrických testů - DPPH, ABTS a Free Radicals při plně automatizovaném uspořádání. Na spektrofotometru (SPECORD 210) byly stanoveny nejvhodnější vlnové délky pro měření antioxidační aktivity pomocí jednotlivých metod a na automatickém analyzátoru byly pro všechny metody zaznamenány časové průběhy reakcí a jejich reakční kinetika.

Stanovení nejvhodnější vlnové délky pro měření bylo vyzkoušeno na patnácti různých koncentracích standardu. Jak můžeme vidět na obrázku 2a) a 2b) oba použité standardy mají shodné absorpční maximum, ale je vidět že u většiny koncentrací troloxu (2b) dochází k překrývání absorpčních průběhů což má asi i vliv na časové průběhy reakcí jak můžeme vidět na obrázku 2c) a 2d). U časového průběhu troloxu, kde oproti průběhům standardům kyseliny gallové jsou křivky blíže u sebe a může nastat jejich překrytí a tak i nesprávné stanovení antioxidační aktivity a reakční kinetiky u reálných vzorků.



Obr. 2 Optimalizace stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH. **a)** Stanovení absorpčního maxima na kyselinou galovou **(b)** na trolox. Časový průběh reakce antioxidační aktivity pro DPPH **c)** u kyseliny gallové a **d)** u troloxu pro koncentrace standardu 0.1; 1 a 100 mg/ml.

ZÁVĚR

Ze získaných výsledků vyplývá, že ionty kadmia vyskytující se v životním prostředí mohou být akumulovány do rostlin a ovlivňovat tak jejich růst. Při pokusech na explantátových kulturách slunečnice roční byla prokázána počáteční inhibice růstu, ale to jen do té doby, než došlo k adaptaci explantátové kultury, poté již docházelo ke stimulaci růstu. Ke stimulaci růstu již však nedochází po účinku příliš vysokých koncentrací kadmiových iontů (500 μM a více). Tyto koncentrace prokazovaly nejvyšší inhibici růstu. V další části naší práce jsme na základě optimalizačních analýz zjistili, že kyselina gallová je vhodnějším standardem k porovnávání antioxidačních aktivit u reálných vzorků.

Poděkování: výsledky byly získány za laskavé podpory projektů IGA MENDELU IP 7/2010, REMEDTECH GA ČR 522/07/0692 a IGA MENDELU TP 1/2010.

LITERATURA

- Azevedo H., Pinto C.G.G., Santos C. (2005): Cadmium effects in sunflower: Nutritional imbalances in plants and calluses. *J. Plant Nutr.* 28(12):2221-2231.
- Diopan V., Shestivska V., Adam V., Macek T., Mackova M., et al. (2008): Determination of content of metallothionein and low molecular mass stress peptides in transgenic tobacco plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 94(3):291-298.
- dos Santos C.L.V., Gomes S., Caldeira G. (2000): Comparative responses of *Helianthus annuus* plants and calli exposed to NaCl: II. Selection of stable salt tolerant calli cell lines and evaluation of osmotic adjustment and morphogenic capacity. *J. Plant Physiol.* 156(1):68-74.

Hagemeyer J., Lohrmann D., Breckle S.W. (1993): Development of annual xylem rings and shoot growth of young beech (*Fagus-sylvatic* L) grown in soil with various Cd and Zn levels. *Water Air Soil Pollut.* 69(3-4):351-361.

Kaiser J., Galiova M., Novotny K., Cervenka R., Reale L., et al. (2009): Mapping of lead, magnesium and copper accumulation in plant tissues by laser-induced breakdown spectroscopy and laser-ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectroc. Acta Pt. B-Atom. Spectr.* 64(1):67-73.

Kotrba P., Najmanova J., Macek T., Ruml T., Mackova M. (2009): Genetically modified plants in phytoremediation of heavy metal and metalloid soil and sediment pollution. *Biotechnol. Adv.* 27(6):799-810.

Krystofova O., Shestivska V., Galiova M., Novotny K., Kaiser J., et al. (2009): Sunflower Plants as Bioindicators of Environmental Pollution with Lead (II) Ions. *Sensors* 9(7):5040-5058.

Krystofova O., Zehnalek J., Adam V., Trnkova L., Babula P., et al. (2010): Effect of cadmium(II) ions on sunflower callus culture. *Listy Cukrov. Reparske* 126(11):400-400.

Macek T., Kotrba P., Svatos A., Novakova M., Demnerova K., et al. (2008): Novel roles for genetically modified plants in environmental protection. *Trends Biotechnol.* 26(3):146-152.

Macek T., Rezek J., Vrchotova B., Beranova K., Uhlik O., et al. (2007): Phytoremediation. *Lis. Cukrov. Repar.* 123(9-10):312-314.

Mackova M., Francova K., Najmanova J., Lovecka P., Novakova M., et al. (2007): Molecular aspect of phytoremediation. *Lis. Cukrov. Repar.* 123(9-10):315-319.

Makovnikova J., Barancikova G., Dlapa P., Dercova K. (2006): Inorganic contaminants in soil ecosystems. *Chem. Listy* 100(6):424-432.

Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15(3):473-497.

Prasad M.N.V. (1995): Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Environ. Exp. Bot.* 35(4):525-545.

Santos C., Caldeira G. (1998): Callus formation and plant regeneration from protoplasts of sunflower calli and hypocotyls. *Acta Soc. Bot. Pol.* 67(1):31-36.

Santos C.V., Falcao I.P., Pinto G.C., Oliveira H., Loureiro J. (2002): Nutrient responses and glutamate and proline metabolism in sunflower plants and calli under Na₂SO₄ stress. *J. Plant Nutr. Soil Sci.-Z. Pflanzenernahr. Bodenkd.* 165(3):366-372.