
EFFECT OF CADMIUM ON TOBACCO CELL SUSPENSION BY-2

Štěpán Z., Klemš M., Zítka O., Havel L.

Department of Plant Biology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno,
Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: Zdenek279@gmail.com

ABSTRACT

Our objective was to clarify the character of influence of cadmium as a significant pollutant on tobacco cell suspension BY-2. Cadmium hardly damages tobacco cells, namely by oxidative stress. Concretely was studied the influence of cadmium on viability of suspension, number of cells of suspension, raising of pH of medium, morphology of suspension, dry matter of suspension and the content of glutathione in suspension cells. Viability was measured by means of fluorescence microscopy on Olympus IX 70 microscope, number of cells on Fuchs-Rosenthal hematocytometer, dry matter by means of lyophilisation, pH on pH meter, morphology microscopically on Olympus E 410 microscope, glutathione spectrophotometrically after reaction with Ellmann surfactant. All characteristics were influenced by cadmium. Viability was in both variants in which cadmium was added lower in comparison with control variants without content of this metal. The number of cells was in fifth and eighth day of experiment lower by variants with cadmium in comparison with variants with the same pH but without cadmium. Cadmium caused raise of medium pH from pH 3.5 to pH 5.5. It also caused decrease of dry matter of suspension cells in fifth and eight day of cultivation by cultivation in medium with pH 3.5. In case of glutathione, only the reduced form of it raised up, the oxidized form remained low. The experiment led to enrichment of knowledge about the influence of cadmium on plant cell

Key words: cadmium, tobacco cell suspension, BY-2, viability, cell number, glutathione

Acknowledgement: this experiment was supported by the help of collective grant IGA 7/2011

ÚVOD

Suspenze rostlinných buněk představují významný experimentální materiál, který se ve větším měřítku používá od druhé poloviny 20. století. Úspěšnost mnoha pokusů prováděných na suspenzích rostlinných buněk je dána do značné míry tím, že tyto suspenze představují jednodušší systémy, než jsou intaktní rostliny, a proto se u nich dá dobře odlišit vliv jednotlivých faktorů, jimiž jsou ovlivňovány. Disponují celou řadou fyziologických charakteristik, které velmi rychle a ochotně reagují na změnu podmínek či ošetření. Jednou z oblastí botaniky, ve které hrají suspenze rostlinných buněk významnou roli, je studium vlivu polutantů (například těžkých kovů) na rostlinnou buňku. Těžké kovy způsobují u buněk suspenzí řadu negativních změn, jako jsou například negativní změny v membránových přenosech, negativně ovlivňují fotosyntézu, činnost ATPázy, dělení buněk, jejich morfologii a viabilitu a způsobují oxidativní stres (ŽRÓBEK-SOKOLNIK et al., 2009). Rostlina na tyto negativní vlivy reaguje například tvorbou stresových proteinů, fytochelatinů, imobilizací buněčné stěny, programovanou buněčnou smrtí a celou řadou jiných fyziologických reakcí. Tyto jevy jsou u suspenzí rostlinných buněk dobře pozorovatelné a umožňují využití v oblastech studia vlivu polutantů na buněčnou morfologii a subcelulární struktury rostlinných buněk, na metabolismus na buněčné úrovni, na depozici těžkých kovů v rámci buněk suspenze a na procesy detoxikační, adaptační či degenerativní.

MATERIÁL A METODIKA

Vliv kadmia byl testován za použití 4 variant – varianta kontrola pH 5,5, varianta kontrola pH 3,5, varianta s obsahem kadmia pH 5,5 a varianta s obsahem kadmia pH 3,5. Dvě různé hodnoty pH byly použity z toho důvodu, že nižší hodnota pH podporuje příjem kadmia tím, že zvyšuje jeho rozpustnost. Odběry a pozorování byly prováděny celkem ve čtyřech termínech – 0 dní, 2 dny, 5 dní a 8 dní. Suspenze byla kultivována na modifikovaném médiu Linsmayer a Skoog (1964). Do každé varianty byl přidán 1 μM 2,4-D a do variant, které měly obsahovat kadmium, bylo přidáno 25 μM $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$. Byl stanoven počet buněk suspenze (pomocí Fuchs-Rosenthalova hematocytometru), viabilita (za použití fluorescenční mikroskopie na mikroskopu Olympus IX 70 a barvený fluorescein diacetátem a propidium jodidem), tvorba sušiny (lyofilizací), pH média (měřením na pH metru) a koncentrace glutathionu v oxidované a redukované formě (pomocí reakce thiol-selektivní Ellmannovy reagentie s volnými $-\text{SH}$ skupinami, vzniklý produkt byl měřen spektrofotometricky).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Při studiu všech v metodice zmíněných charakteristik se u variant s přídatkem kadmia prokázal vliv tohoto toxického kovu. Viabilita byla snížena oproti variantám bez obsahu kadmia (viz graf 1), počet buněk byl nejvyšší u varianty kontrola s pH 5,5 a nejnižší u varianty s pH 3,5 s přídatkem

kadmia (viz graf 2). Významné snížení viability buněk tabákové suspenze po dodání kadmia pozorovali KUTHANOVÁ et al. (2004), oni ale použili dvakrát vyšší koncentraci (50 μM), než jaká byla použita v našem případě. To naznačuje, že kadmium má negativní efekt na viabilitu rovněž v nižších koncentracích. Morfologie suspenze byla u varianty s přidavkem kadmia kultivované na pH 3,5 výrazně horší, než u varianty kontrola s pH 5,5 (viz obr. 1 a obr. 2). Buňky byly u variant s obsahem kadmia výrazně protáhlejší (podobně, jako to pozorovali KUTHANOVÁ et al. 2003), u těchto variant se ovšem hojně vyskytovaly i clustery kulovitých buněk; u obou kontrolních variant bylo těchto clusterů pouze velice málo.

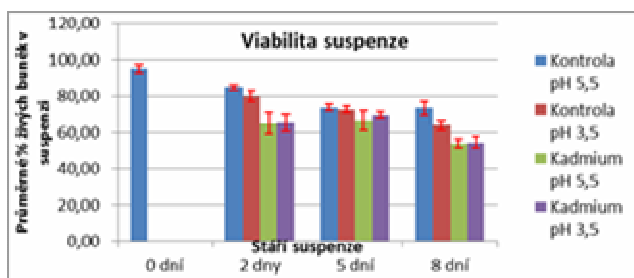
obr. 1 varianta s obsahem kadmia pH 3,5 8. den (zvětšeno 100X)



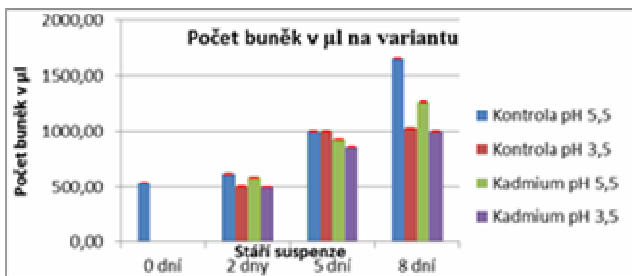
obr. 2 kontrola pH 5,5 5. den (zvětšeno 100X)



graf 1

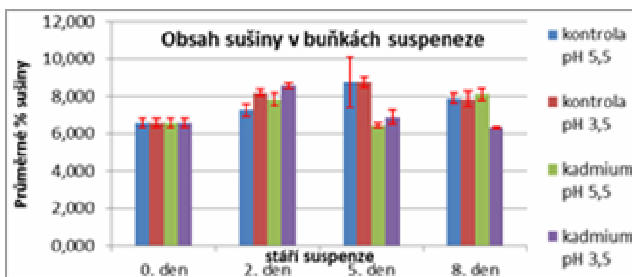


graf 2

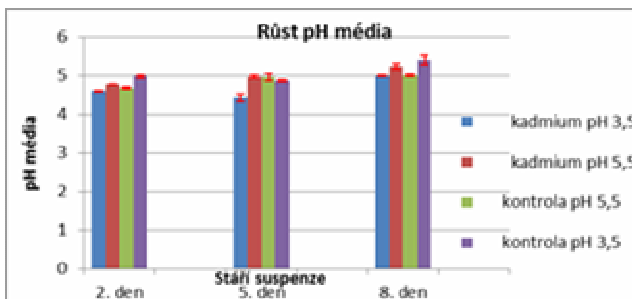


Kadmium způsobilo snížení sušiny buněk v 5. a 8. dni růstu suspenze při kultivaci v médiu pH 3,5 (viz graf 3). Rovněž způsobilo zvýšení pH média z 3,5 na 5,5 (viz graf 4). Redukovaný glutathion se zvyšoval v suspenzích kultivovaných za přítomnosti kadmia po celou dobu kultivace, oxidovaný od 5. do 8. dne kultivace (viz grafy 5 a 6).

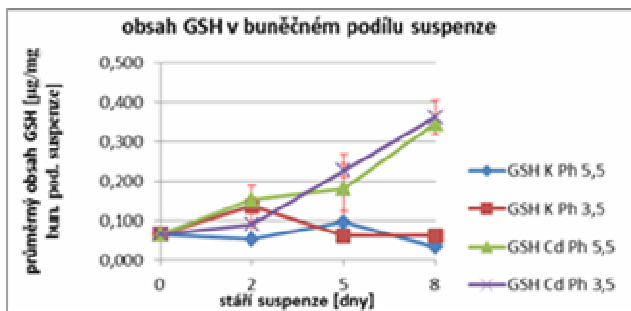
graf 3



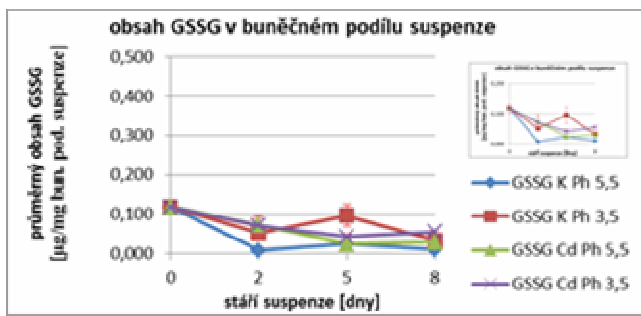
graf 4



graf 5



graf 6



ZÁVĚR

Bylo potvrzeno, že kadmium představuje významný polutant, který silně ovlivňuje růst, viabilitu a antioxidační aktivitu suspenzí rostlinných buněk. Zhoršuje výrazně všechny fyziologické parametry růstu suspenze. Zvyšuje obsah redukovaného a částečně i oxidovaného glutathionu, který slouží k jeho detoxikaci.

LITERATURA

Žróbek-Sokolnik A., Asard H., Górska-Koplińska K., Górecki R. J. (2009): Cadmium and zinc-mediated oxidative burst in tobacco BY-2 cell suspension cultures. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31(1): 43-49.

Kuthanová A., Gemperlová L., Zelenková S., Eder J., Macháčková I., Opatrný Z., Cvikrová M. (2004): Cytological changes and alterations in polyamine contents induced by cadmium in tobacco BY-2 cells. *Plant Physiology and Biochemistry* 42 (2004): 149–156.