

ZMIANY POZORNEJ POWIERZCHNI WŁAŚCIWEJ KORZENI ŻYCICY
WIELOKWIATOWEJ (*LOLIUM MULTIFLORUM* L.) DETERMINOWANE
TOKSYCZNOŚCIĄ KADMU

Olga Kosynets¹, Alicja Szatanik- Kloc², Justyna Szerement²

¹Wydział Ekologii i Biologii, Lwowski Uniwersytet Rolniczy w Dublanach,
ul. V. Velukogo 1, Ukraina

²Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego PAN, Doświadczalna 4, 20-290 Lublin
e-mail a.kloc@ipan.lublin.pl

Streszczenie. Badania przeprowadzono na korzeniach *Lolium multiflorum* L.. Rośliny pochodziły ze stacji badawczej w Dublanach, Uniwersytetu Rolniczego we Lwowie. Przed siewem nasion, do gleby (czarnoziem leśno-stepowy, wylugowany, wytworzony z lessu o pH = 6,8) dodano roztwór CdCl₂ w ilościach kadmu 0 (obiekt kontrolny), 3, 15, 30 mg·kg⁻¹ gleby. Rośliny zebrano w fazie kwitnienia i w fazie pełnej dojrzałości nasion. Pozorną powierzchnię właściwą korzeni tych roślin wyznaczano z izoterm adsorpcji pary wodnej, których pomiar przeprowadzono zgodnie z Polską Normą PN-Z-19010- 1. Do opisu danych doświadczalnych adsorpcji-desorpcji pary wodnej zastosowano model równania BET. Korzenie roślin pochodzące z obiektów z Cd⁺² charakteryzowały się mniejszą wielkością pozornej powierzchni właściwej niż korzenie z obiektów kontrolnych. Stwierdzono że, ilości kadmu 15 i 30 mg·kg⁻¹ gleby wpłynęły istotnie na spadek wielkości pozornej powierzchni właściwej korzeni *Lolium multiflorum* L. w fazie kwitnienia. Dla korzeni zebranych w fazie pełnej dojrzałości nasion, istotny spadek tego parametru wykazano dla dawki kadmu 30 mg·kg⁻¹ gleby. Kadm dodany do gleby w ilości 3 mg·kg⁻¹ tylko nieznacznie wpłynął na wielkość pozornej powierzchni właściwej korzeni *Lolium multiflorum* L. Dawki kadmu dodane w ilości 30 mg·kg⁻¹, spowodowały, że względne zmiany wielkości pozornej powierzchni właściwej korzeni starszych (faza pełnej dojrzałości nasion) były większe niż dla korzeni zebranych w fazie kwitnienia roślin. Intensywność zmian pozornej powierzchni właściwej korzeni zależała nie tylko od odporności roślin i stężenia czynnika stresowego, ale również od czasu ekspozycji rośliny na stres. Obserwowane zmiany pozornej powierzchni właściwej badanych korzeni, związane były prawdopodobnie ze zmianami w procesach fizjologicznych, które zachodziły w roślinie pod wpływem przedłużającego się stresu.

Słowa kluczowe: kadm, korzenie rajgrasu, pozorna powierzchnia właściwa

¹Stypendystka projektu Interregionalnego Centrum Edukacji w Instytucie Agrofizyki PAN w Lublinie, współfinansowanego przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach programu sąsiedztwa Polska – Białoruś – Ukraina INTERREG IIIA/TACIS CBC 2004-2006.

WSTĘP

Zanieczyszczenie gleb kadmem jest istotnym zagrożeniem skażenia roślin. Niektóre ich gatunki wykazują dużą tolerancję na ten metal i to właśnie ze względu na nią, a także z uwagi na wyjątkową łatwość biokumulacji, kadm może stanowić zagrożenie, zarówno dla zwierząt jak i człowieka. Rola kadmu w roślinach nie jest dostatecznie poznana i aktualnie pierwiastek ten zaliczany jest do zbędnych. Rośliny pobierają kadm stosunkowo łatwo (głównie przez korzenie) i wprost proporcjonalnie do czasu ekspozycji i stężenia Cd^{2+} w roztworze glebowym (Appel i Ma 2002, Wójcik i Tukiendorf 2005). Szczególnie istotnym czynnikiem wpływającym na wzrost fitoprzyzwajalności kadmu jest kwaśny odczyn gleby (Kabata-Pendias i Pendias 1999). Przy dużych stężeniach kadmu w podłożu tj. roztworze glebowym lub pożywce, metal ten kumuluje się głównie w korzeniach roślin. Stres spowodowany toksycznością kadmu w środowisku wzrostu korzeni wpływa na procesy metaboliczne i fizjologiczne, a także na zmiany anatomiczne i morfologiczne w roślinie (Alcantara i in. 2001).

Reakcją roślin na stres, wywołany toksycznością metali ciężkich jest również zmiana powierzchni właściwej korzeni roślin (Szatanik-Kloc i in. 2007a, Hrebela i in. 2008). Powierzchnia właściwa korzeni jest jedną z fizykochemicznych wielkości charakteryzujących sorpcję wody oraz jonów (zarówno niezbędnych jak i pierwiastków toksycznych, takich jak kadm) przez korzeń. Do pomiarów powierzchni właściwej korzeni roślin, wykorzystuje się najczęściej metody sorpcyjne. Jedną z takich metod jest wyznaczenie powierzchni właściwej metodą adsorpcji-desorpcji polarnego adsorbentu (pary wodnej). Metodę tę zastosowano w niniejszej pracy.

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu stężenia jonów Cd^{+2} i czasu trwania stresu kadmowego na wielkość pozornej² powierzchni właściwej korzeni życicy wielokwiatowej – syn. rajgras włoski³ (*Lolium multiflorum* L.) w fazie kwitnienia i pełnej dojrzałości nasion.

MATERIAŁ I METODY

Korzenie *Lolium multiflorum* L., które wykorzystano w badaniach pochodziły ze stacji badawczej w Dublinach, stanowiącej obiekt doświadczalny Uniwersyte-

² Definicja powierzchni właściwej oparta na równaniu adsorpcji BET wyprowadzona była dla adsorbentów, u których wyraźnie można wyznaczyć granicę pomiędzy procesem adsorpcji a absorpcji. W przypadku adsorbentów organicznych, granica ta jest trudna do wyznaczenia, dlatego też zamiast terminu *surface area* – powierzchnia właściwa, stosuje się termin *apparent surface area* – pozorna powierzchnia właściwa (Chiou i in. 1990).

³ Rajgras włoski jest to nazwa rośliny używana w wielu krajach. W Polsce używa się najczęściej nazwy życicy wielokwiatowa, której synonimem jest rajgras włoski.

tu Rolniczego we Lwowie. Około 300 m² pola podzielono na poletka doświadczalne o powierzchni 2 m². Przed siewem, do gleby (czarnoziem leśno-stepowy, wylugowany, wytworzony z lessu, o pH = 6,8) dodano CdCl₂ w dawkach kadmu 0 (obiekt kontrolny), 3, 15, 30 mg·kg⁻¹ gleby. Badano korzenie w fazie kwitnienia i w fazie pełnej dojrzałości nasion. Pozorną powierzchnię właściwą korzeni wyznaczano z izoterm adsorpcji pary wodnej. Pomiar izoterm adsorpcji-desorpcji pary wodnej przeprowadzono zgodnie z Polską Normą PN-Z-19010- 1. Badany materiał umieszczono w szczelnych naczynkach wagowych, w komorze próżniowej, w temperaturze 293K, nad roztworami kwasu siarkowego o kolejno malejącej a następnie rosnącej gęstości (wzrost i spadek względnej prężności pary wodnej). Po 48 godzinach (czas ustalania się równowagi adsorpcyjnej) obecności materiału badawczego w komorze próżniowej, metodą ważenia określano masę próbek. Natomiast względną prężność (p/p_0) pary wodnej w komorze, określano poprzez pomiary gęstości kwasu siarkowego. Ilość zaadsorbowanej pary wodnej przy danym p/p_0 obliczono z różnicy masy próbki określonej przy danych p/p_0 i suchej masy tej próbki. Suchą masę określono po 24 godzinach suszenia próbek w temperaturze 378 K. Do opisu danych doświadczalnych adsorpcji-desorpcji pary wodnej zastosowano model równania BET (Ościk,1983). Model ten zakłada tworzenie się wielocząsteczkowych warstw adsorpcyjnych bez wakansów i w postaci liniowej wyraża się równaniem:

$$y/a = 1/ (a_m + C) + (C-1) / (a_m C) \quad (1)$$

gdzie: $y = x / (1-x)$, $x = p/p_0$ – względna prężność adsorbentu, p_0 (Pa) – ciśnienie pary nasyconej w temperaturze pomiaru T (K), a (g·g⁻¹) – ilość adsorbentu (pary wodnej) zaadsorbowanego przy danym ciśnieniu pary p (Pa), a_m (g·g⁻¹) – pojemność monowarstwy, $C = \exp[(E_a - E_c)/RT]$ – stała zależna od energii adsorpcji E_a (J·mol⁻¹) oraz energii kondensacji E_c (J·mol⁻¹) adsorbentu, R (J·mol⁻¹·K⁻¹) – stała gazowa.

Na podstawie równania BET, dla danych adsorpcji z zakresu względnych ciśnień adsorbentu p/p_0 pomiędzy 0, 5-0, 35 wyznaczono statystyczną pojemność monowarstwy (a_m), w oparciu o którą wyliczono powierzchnię właściwą korzeni, S (m²·g⁻¹):

$$S = L \cdot \omega \cdot a_m / M \quad (2)$$

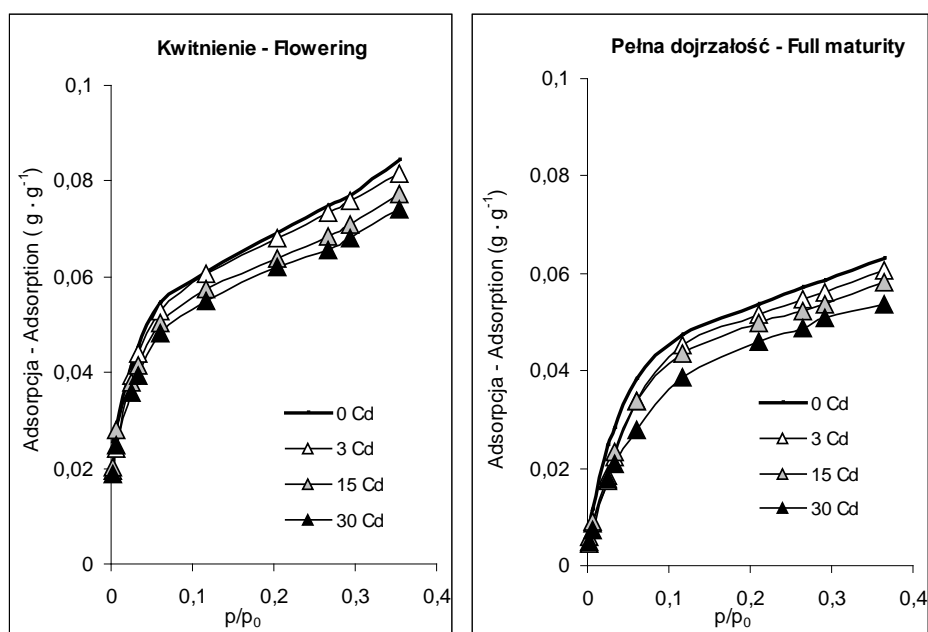
gdzie: ω (m²) – powierzchnia zajmowana przez jedną molekułę adsorbentu (pary wodnej), czyli powierzchnia siadania, L (mol⁻¹) – liczba Avogadro, M (kg·mol⁻¹) – masa cząsteczkowa adsorbentu, a_m – pojemność monowarstwy (g·g⁻¹).

Powierzchnię właściwą definiowano, jako rzeczywistą, biorącą udział w adsorpcji powierzchnię adsorbentu (korzeni), przypadającą na jednostkę masy, którą należy traktować, jako względną wielkość powierzchni adsorbentu i rozumieć,

jako powierzchnię adsorbentu z jej nieregularnościami o wymiarach większych lub porównywalnych z wielkościami cząstek adsorbentu (Ościk 1983).

WYNIKI I DYKUSJA

Na rysunku 1 przedstawiono fragmenty izoterm (z zakresu względnych ciśnień adsorbentu, z których wyliczono pozorną powierzchnię właściwą) adsorpcji pary wodnej na korzeniach *Lolium multiflorum* L. Na korzeniach eksponowanych (w tym kontekście) na jony kadmu, zmniejszyła się ilość zaadsorbowanej pary wodnej w porównaniu z korzeniami, które rosły w glebie nie skażonej tym metalem przyjętej za obiekt kontrolny.



Rys. 1. Izotermy adsorpcji H₂O na korzeniach (faza kwitnienia i pełnej dojrzałości) *Lolium multiflorum* L. rosnących w glebie o różnej zawartości Cd⁺². Liczba przed symbolem pierwiastka oznacza ilość w mg·kg⁻¹ kadmu dodanego do gleby

Fig. 1. H₂O adsorption isotherms for roots (stage of flowering and full maturity) of *Lolium multiflorum* L. growing in soils with different content of Cd⁺². The number before the symbol of the element is the amount in mg kg⁻¹ of cadmium added to soil

Najmniejszą adsorpcją pary wodnej charakteryzowały się korzenie *Lolium multiflorum* L. pochodzące z poletek, do których dodano kadm w ilości 30 mg·kg⁻¹

gleby. Pozorną powierzchnię właściwą badanych korzeni obliczono w oparciu o dane eksperymentalne z powyższych fragmentów izoterm adsorpcji. Dla korzeni *Lolium multiflorum* L., które rosły w glebie z dodatkową ilością kadmu, pozorna powierzchnia właściwa była mniejsza (w odniesieniu do korzeni z obiektów kontrolnych) w całym zakresie stosowanych ilości kadmu, tj. 3, 15, 30 mg·kg⁻¹ gleby (tab. 1). Przeprowadzona analiza statystyczna uzyskanych wielkości pozornej powierzchni właściwej programem StatSoft Statistica 10 wykazała, że kadm istotnie wpłynął na zmianę pozornej powierzchni właściwej badanych korzeni. W celu zbadania, które stężenie kadmu istotnie wpłynęło na zmianę wielkości pozornej powierzchni właściwej korzeni wykorzystano jeden z testów post – hoc – Test RIR Tukeya analizujący rzeczywiste istotne różnice średnich.

Tabela 1. Pozorna powierzchnia właściwa (S) korzeni *Lolium multiflorum* L. (wielkości S, przedstawione, jako średnie z 3 powtórzeń ± odchylenie standardowe). Wartości zaznaczone pogrubioną czcionką różnią się istotnie (p < 0,05) od wartości w obiekcie kontrolnym. Test RIR Tukeya

Table 1. Apparent surface area (S) of *Lolium multiflorum* L. of roots (the S values are presented as averages of 3 replications ± standard deviation). The values indicated in bold differ significantly (p < 0.05) from control values in the object. Test RIR Tukeya

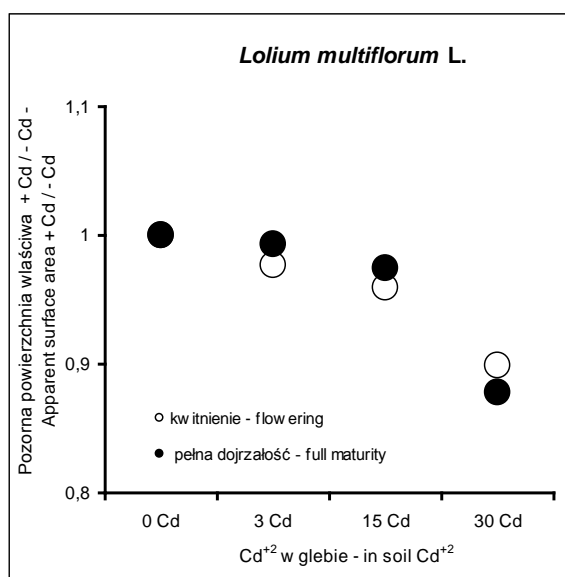
Obiekt – Object	Kwitnienie – Flowering S (m ² ·g ⁻¹)	Pełna dojrzałość – Full maturity S (m ² ·g ⁻¹)
0 Cd	198,6±1,97	154,6±6,84
3 Cd	193,9±2,23	153,3±6,07
15 Cd	186,9±6,64	150,6±3,97
30 Cd	178,5±1,66	135,8±6,10
*F _(0,05;3;11)	16,4	6,2

*F – Wartość statystyki testowej F dla analizy wariancji – The value of the test statistics F for analysis of variance.

Istotne różnice pomiędzy korzeniami kontrolnymi (bez dodatku czynnika stresowego) a korzeniami rosnącymi w skażonym środowisku odnotowano dla dawek kadmu w ilości 30 mg·kg⁻¹ gleby. Mniejsze wielkości pozornej powierzchni właściwej przy tym stężeniu czynnika stresowego (30 mg·kg⁻¹) zaobserwowano zarówno dla korzeni zebranych w fazie kwitnienia jak i dla korzeni starszych zebranych w fazie pełnej dojrzałości nasion. Dla korzeni zebranych w fazie kwitnienia istotnie mniejsze wielkości pozornej powierzchni właściwej odnotowano również przy dawce kadmu 15 mg·kg⁻¹ gleby. Kadm dodany do gleby w ilości 3 mg·kg⁻¹ tylko nieznacznie wpłynął na wielkości pozornej powierzchni właściwej badanych korzeni.

Z uwagi na dobrze rozwinięty system korzeniowy *Lolium multiflorum* charakteryzuje się dość dobrą tolerancją na kadm (Jasińska i Kotecki, 2003). Stosowane zatem w doświadczeniu najniższe dawki kadmu, tj. $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ gleby nie wpłynęły w istotny sposób na zmiany pozornej powierzchni właściwej badanych korzeni.

Na rysunku 2 przedstawiono tendencje zmian wielkości pozornej powierzchni właściwej korzeni *Lolium multiflorum* L., determinowane różną zawartością kadmu w glebie. Bez względu na fazę rozwoju rośliny dawki kadmu stosowane w doświadczeniu w podobny sposób wpłynęły na wielkość (mniejsza dla korzeni pochodzących z obiektów skażonych kadmem) pozornej powierzchni właściwej badanych korzeni. Niemniej jednak kadm dodany do gleby w ilości $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ spowodował, że względne zmiany wielkości pozornej powierzchni właściwej korzeni starszych (faza pełnej dojrzałości nasion) były większe niż dla korzeni zebranych w fazie kwitnienia roślin.



Rys. 2. Względne zmiany pozornej powierzchni właściwej korzeni rosnących w glebie z różną zawartością kadmu (+Cd²⁺) w stosunku do korzeni z obiektów kontrolnych (-Cd²⁺)

Fig. 2. Relative changes in the apparent surface area of the roots growing in soils with different content of cadmium (+Cd²⁺) in relation to the roots of control objects (-Cd²⁺)

Uzyskane wyniki potwierdziły rezultaty wcześniejszych badań gdzie stwierdzono, że reakcja roślin na stres zależna jest nie tylko od odporności roślin i stężenia czynnika stresowego, ale również od czasu ekspozycji rośliny na stres (Siedlecka i in. 2001, Wójcik i Tukiendorf 2005, Hrebela i in. 2008, Szatanik-Kloc i in. 2007b). Z dotychczasowych badań wynika, że głównym mechanizmem obronnym roślin w stosunku do kadmu, jest detoksykacja przy udziale fitochelatyn, metalotionein i akumulacja w ścianie komórkowej (Baranowska-Morek 2003, Wójcik i in.

2006, Olko 2009). Za akumulację jonów Cd^{+2} w ścianie komórkowej odpowiedzialne są przede wszystkim grupy karboksylowe pektyn i hemiceluloz. Są to również grupy charakteryzujące polarne centra adsorpcyjne w korzeniu. Zatem zaobserwowane w doświadczeniu obniżenie adsorpcji pary wodnej i dalej zmniejszenie się wielkości pozornej powierzchni właściwej dla korzeni stresowanych, może być między innymi wynikiem blokowania przez kadm centrów adsorpcyjnych, na których sorbuje się polarny adsorbat – para wodna. Na stwierdzone zmiany wielkości pozornej powierzchni właściwej badanych korzeni *Lolium multiflorum* L., prawdopodobnie mogły również wpłynąć, zmiany morfologiczne, anatomiczne, fizjologiczne, do których mogło dojść w korzeniu pod wpływem wysokich stężeń kadmu. Na podstawie przeprowadzonych badań możemy wyciągnąć następujące wnioski.

WNIOSKI

1. Korzenie *Lolium multiflorum* L. rosnące w środowisku skażonym kadmem (3, 15, 30 $mg \cdot kg^{-1}$) charakteryzowały się mniejszą wielkością pozornej powierzchni właściwej niż korzenie z obiektów kontrolnych, przy czym intensywność tych zmian zależała od dawek metalu i fazy rozwoju roślin.
2. Kadm w dawkach 3 i 15 $mg \cdot kg^{-1}$ gleby powodował większe zmiany pozornej powierzchni właściwej korzeni *Lolium multiflorum* L. w fazie kwitnienia niż w fazie pełnej dojrzałości nasion. Odwrotne zależności wykazano dla dawek kadmu 30 $mg \cdot kg^{-1}$ gleby.
3. Dawka kadmu w ilości 30 $mg \cdot kg^{-1}$ gleby spowodowała największy spadek powierzchni właściwej korzeni roślin *Lolium multiflorum* L. zebranych w fazie pełnej dojrzałości nasion.

PIŚMIENNICTWO

- Alcantara A., Ginhaus A.M., Ojeda M.A., Benitez M.J., Benlloch M., 2001. Metal accumulation by different plant species grown in contaminated media. W.J. Horst *et. al.* (Eds.) Plant nutrition – Food security and sustainability of agro-ecosystems, 460-461.
- Appel C., Ma L., 2002. Concentration, pH and surface charge effects on cadmium and lead in three tropical soils. *J. Environ. Qual.*, 31, 581-589.
- Baranowska-Morek A., 2003. Roślinne mechanizmy tolerancji na toksyczne działanie metali ciężkich. *Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych*, T. 52, Nr 2-3, 283-298.
- Chiou C.T., Lee J.F., Boyd S.A., 1990. The surface area of organic matter. *Environ. Sci. Technol.*, 24, 1164-1166.
- Hrebela N., Szatanik-Kloc A., Sokołowska Z. 2008. Wpływ jonów kadmu na pozorną powierzchnię właściwą korzeni jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.). *Acta Agrophysica*, 12(2), 337-347.
- Jasińska Z., Kotecki A. 2003. Szczegółowa uprawa roślin. (Praca zbiorowa pod redakcją Jasińskiej i Koteckiego). tom II, Wydawnictwo Akademii Rolniczej, Wrocław.

- Kabata-Pendias A., Pendias H., 1999. Biogeochemia pierwiastków śladowych. Wydawnictwo PWN, Warszawa.
- Olko A., 2009. Fizjologiczne aspekty tolerancji roślin na metale ciężkie. *Kosmos*, 58, 1-2, 221-228.
- Ościk J., 1983. Adsorpcja. PWN Warszawa.
- Polska Norma PN-Z-19010-1, 1997. Jakość gleby. Oznaczenie powierzchni właściwej gleb metodą sorpcji pary wodnej (BET). Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa.
- Siedlecka A., Tukiendorf A., Skórzyńska-Polit E., Maksymiec W., Wójcik M., Baszyński T., Krupa Z., 2001. Angiosperms.[W:] Metals in the environment. Analysis by biodiversity. Prasad M. N. V. (red). Marcel Dekker, Inc. New York, Hyderabad, India, 171-217.
- Szatanik-Kloc A., Sokołowska Z., Hrebela N., 2007a. Effect of Pb-stress on selected physicochemical surface properties of barley (*Hordeum vulgare* L.) roots. *Int. Agrophysics*, 21 (4), 399-403.
- Szatanik-Kloc A., Sokołowska Z., Hrebela N., 2007b. Wpływ pH w warunkach stresu kadmowego na ładunek powierzchniowy korzeni jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.), *Acta Agrophysica* 10 (2), 473-482.
- Wójcik M., Tukiendorf A., 2005. Cadmium uptake, localization and detoxification in *Zea mays*. *Biology Plantarum*, 49(2), 237-245.
- Wójcik M., Skórzyńska-Polit E., Tukiendorf A., 2006. Organic acid accumulation and antioxidant enzyme activities in *Thlaspi carelessness* under Zn and Cd stress. *Plant Growth Regulation*, 48, 145-155.

CHANGES IN APPARENT SURFACE AREA OF ROOTS OF RYEGRASS (*LOLIUM MULTIFLORUM* L.), DETERMINED BY Cd STRESS

Olga Kosynets¹, Alicja Szatanik-Kloc², Justyna Szerement²

¹Department of Ecology and Biology, Lviv State Agrarian University
ul. V. Velukogo 1, Dublyany, Ukraine

²Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences, Doświadczalna 4, 20-290 Lublin
e-mail: akloc@ipan.lublin.pl

Abstract. The *Lolium multiflorum* roots were studied. The plants were taken from the research field of the Dublany Experimental Station of the Lviv State Agrarian University. Before sowing the seeds, a solution of CdCl₂ in amounts of cadmium 0 (control), 3, 15, 30 mg kg⁻¹ soil was added to the soil (humus forest-steppe, leached, formed from loess, with pH = 6.8). Plants were harvested at flowering stage and at full maturity of seeds. The apparent surface area of the roots of the plants were determined from adsorption isotherms of water vapour. Measurements of adsorption-desorption isotherms of water vapour were carried out according to the Polish Standard PN-Z-19 010-1. To describe the experimental data of adsorption-desorption of water vapour the BET equation model was used. The apparent surface area of the roots in the flowering stage and in the maturity stage was studied. Under the influence of Cd⁺² ions the apparent surface area decreased. The apparent surface area of the roots in the flowering stage decreased significantly under the effect of Cd⁺² in the concentration of 15 and 30 mg kg⁻¹ while the apparent surface area of the roots in the maturity stage decreased under the effect of Cd⁺² in the concentration of 30 mg kg⁻¹. Cadmium added to soil at 3 mg kg⁻¹ soil caused only a slight impact, reducing the value of the test surface of the roots of ryegrass. No matter what stage of development, cadmium concentrations used in the experiment had a similar influence, causing a decrease in the apparent surface area of the roots of *Lolium multiflorum*. Doses of cadmium added to soil in an amount of 30 mg kg⁻¹ resulted in

a greater relative changes in the size of the root surface of the older roots (full seed maturity phase) than of roots harvested in the flowering stage of the plant. The intensity of changes in the apparent surface area is likely to depend not only on the resistance of plants and the concentration of stressor but also on the exposure time of plants to stress. The observed changes in apparent surface area of the roots of *Lolium multiflorum* are probably associated with changes in physiological processes that occur in the plant under the influence of prolonged stress.

Key words: apparent surface area, cadmium, ryegrass roots