

Katarzyna CIEŚLIŃSKA, Aleksandra SKALSKA, Dorota CISZEK,
Jacek KRZYŻAK, Marta POGRZEBA*

MIKORYZA ARBUSKULARNA WYBRANYCH GATUNKÓW ROŚLIN ENERGETYCZNYCH UPRAWIANYCH NA TERENIE ZANIECZYSZCZONYM METALAMI CIĘŻKIMI

Celem pracy było wdrożenie metod badawczych dotyczących kolonizacji mikoryzowej korzeni roślin energetycznych uprawianych na terenie rolniczym zanieczyszczonym metalami ciężkimi. Pobrano korzenie trzech gatunków wieloletnich traw: *Miscanthus giganteus*, *Panicum virgatum*, *Spartina pectinata*. Próbkę barwiono wg zmodyfikowanej metody Phillipsa-Haymana (1970). Na podstawie obserwacji mikroskopowych przygotowanych preparatów wprowadzono modyfikacje w etapie trawienia w KOH (dobór odpowiedniej temperatury i czasu) oraz wybrano PVLG jako najlepsze medium zamykające spośród trzech testowanych (DPX, laktoglicerol, PVLG). Wprowadzone zmiany umożliwiły uzyskanie dobrej jakości obrazów mikroskopowych, co pozwoliło na prawidłowe rozpoznanie struktur mikoryzowych występujących w korzeniach badanych roślin. W wyniku przeprowadzonych badań u wszystkich testowanych gatunków roślin wykryto obecność struktur charakterystycznych dla mikoryzy arbuskularnej. Badania te miały charakter wstępny, ich rezultatem jest wdrożenie metod pozwalających na poprawną analizę kolonizacji mikoryzowej u wybranych roślin energetycznych uprawianych na terenie zanieczyszczonym metalami ciężkimi.

1. WSTĘP

1.1. UPRAWA ROŚLIN ENERGETYCZNYCH NA TERENACH ZANIECZYSZCZONYCH METALAMI CIĘŻKIMI

Zgodnie z założeniami „Polityki Energetycznej Polski do 2030 roku”, uwzględniającymi cele stawiane przez Unię Europejską, Polska powinna zwiększyć udział energii ze źródeł odnawialnych w całkowitym zużyciu energii, osiągając w 2020 roku poziom

* Instytut Ekologii Terenów Uprzemysłowionych, Zakład Badań i Rozwoju, Zespół Remediacji Środowiska, ul. Kossutha 6, 40–844 Katowice, skalaska@ietu.katowice.pl.

15%. W kolejnych latach powinien następować dalszy wzrost tego udziału [10]. W Polsce głównym kierunkiem rozwoju odnawialnych źródeł energii (OZE) jest wykorzystanie biomasy [9]. Zakładanie plantacji roślin uprawianych na cele energetyczne nie powinno konkurować z uprawami rolniczymi i oddziaływać negatywnie na sektor żywnościowy – gleby dobrej klasy powinny być wykorzystywane do uprawy roślin konsumpcyjnych, natomiast pod uprawę roślin energetycznych mogą być przeznaczone gleby gorszej jakości i tereny zdegradowane [8].

Jednym z najpowszechniejszych czynników degradacji gleby jest jej zanieczyszczenie metalami ciężkimi. Zawartość tych pierwiastków w glebach wynika z ich naturalnej obecności w skale macierzystej oraz z dopływu pochodzenia antropogenicznego, będącego skutkiem przemysłowej, gospodarczej i rolniczej działalności człowieka. Spośród tych czynników największy wpływ na zanieczyszczenie gleb metalami ciężkimi ma emisja związana z wydobywaniem i przetwórstwem rud metali. Problem ten dotyczy szczególnie obszaru Górnego Śląska, gdzie skupia się znaczna część krajowego przemysłu górniczo-hutniczego [5, 19]. Ponad połowę powierzchni województwa śląskiego stanowią użytki rolne [4], przy czym od 5% do 10% z nich jest zanieczyszczonych kadmem, cynkiem i ołowiem [19].

Wśród roślin uprawianych na cele energetyczne wymienić można drzewa i krzewy (wierzba, robinia akacja, topola, róża wielokwiatowa), byliny (ślazowiec pensylwański, sylfium przerosłe, topinambur), a także wieloletnie trawy (miskant olbrzymi, spartina prioria, proso różgocate), będące przedmiotem niniejszej pracy [21]. Wymienione gatunki traw przeprowadzają fotosyntezę typu C_4 , dzięki czemu, w porównaniu do rodzimych gatunków, wykazują wyższą efektywność wiązania dwutlenku węgla, prowadzą oszczędniejszą gospodarkę wodną, są bardziej odporne na suszę i charakteryzują się lepszym plonowaniem. Szybki przyrost biomasy i jej wysoka wartość opałowa, odporność na szkodniki i choroby oraz niewielkie wymagania siedliskowe sprawiają, że rośliny te mogą być z powodzeniem wykorzystywane na cele energetyczne. Ponadto, ze względu na wysoki plon biomasy wymienione trawy mogą pobierać z zanieczyszczonej gleby znaczne ilości metali, wykazują więc potencjał fitoremediacyjny [8, 21]. Akumulacja metali ciężkich w częściach nadziemnych roślin energetycznych wiąże się jednak z ryzykiem reemisji zanieczyszczeń do atmosfery w przypadku nieodpowiedniego spalania zanieczyszczonej biomasy [13]. Ważnym czynnikiem wpływającym na zwiększenie tolerancji roślin na zanieczyszczenie gleby metalami ciężkimi oraz mogącym modyfikować pobór metali i ich transport do części nadziemnych roślin jest mikoryza arbuskularna [6].

1.2. MIKORYZA ARBUSKULARNA

Mikoryza jest to symbiotyczny związek pomiędzy grzybami i korzeniami roślin wyższych. Istotą tej symbiozy jest przekazywanie substancji pomiędzy partnerem grzybowym i roślinnym – strzępki zewnętrznych korzeniowych przerastające podłoże umożliwiają grzybom pobieranie znacznych ilości substancji mineralnych (zwłaszcza fosforu

i azotu, a także potasu, cynku, wapnia, magnezu i miedzi), które są następnie transportowane do korzeni roślin. W zamian grzyby, będące heterotrofami, otrzymują od partnera roślinnego produkty przeprowadzanej przez niego fotosyntezy [7, 24].

Ze względu na sposób kolonizacji korzeni wyróżnia się trzy główne typy mikoryzy: ektomikoryzę, endomikoryzę i typ pośredni – ektendomikoryzę. Najbardziej rozpowszechnionym typem tej symbiozy jest endomikoryza, do której należą: mikoryza storczykowa, erikoidalna oraz mikoryza arbuskularna. W każdym z tych typów endomikoryzy strzępki grzybni są obecne zarówno w przestrzeniach międzykomórkowych, jak również wewnątrz komórek kory korzeni. Mikoryza arbuskularna (ang. *arbuscular mycorrhiza*, AM) jest najstarszym filogenetycznie i najbardziej powszechnym typem mikoryzy. Ten rodzaj mutualistycznej symbiozy roślin z zasiedlającymi ich korzenie grzybami z gromady *Glomeromycota* dotyczy ponad 80% roślin lądowych [6, 20, 22]. Grzyby zaangażowane w ten rodzaj symbiozy, nazywane arbuskularnymi grzybami mikoryzowymi (ang. *arbuscular mycorrhizal fungi*, AMF), wytwarzają różnego rodzaju struktury wewnątrz- i zewnątrzkorzeniowe. Do najbardziej charakterystycznych należą arbuskule, od których pochodzi nazwa omawianego typu mikoryzy. Arbuskule są drzewkowatymi strukturami powstającymi wewnątrz komórek kory korzenia poprzez wielokrotne, dychotomiczne rozgałęzianie się strzępek grzybni. W procesie formowania się arbuskul strzępki wnikają do wnętrza komórek poprzez ścianę komórkową i tworzą wgłębienia w błonie komórkowej, nie naruszając jej integralności, a zarazem zwiększając powierzchnię wymiany substancji pomiędzy symbiontami. Innymi ważnymi strukturami, obecnymi tylko u grzybów AM, są pęcherzyki (wezykule). Są to kuliste bądź eliptyczne rozdęcia strzępek wewnątrzkorzeniowych, powstające wewnątrz strzępki lub na jej końcach. Wielkość pęcherzyków wynosi 30–100 μm . Mogą one występować zarówno w komórkach korzeni roślin, jak i w przestworach międzykomórkowych. Wewnątrz pęcherzyków gromadzone są kropelki tłuszczu – struktury te pełnią więc głównie rolę organów magazynujących substancje zapasowe, ale mogą także (u niektórych gatunków AMF) spełniać funkcję propagul (struktur, z których powstaje nowa grzybnia). Nie wszystkie arbuskularne grzyby mikoryzowe wytwarzają pęcherzyki, ocenia się, że występują one u około 80% AMF [1, 5, 6, 20].

Arbuskule i pęcherzyki są dwoma strukturami charakterystycznymi dla mikoryzy arbuskularnej, umożliwiającymi jej jednoznaczne rozpoznanie. Poza nimi, do struktur obecnych w tkankach korzeni należą jeszcze strzępki wewnątrzkorzeniowe, mogące penetrować wnętrze komórek rośliny lub pozostawać w przestworach międzykomórkowych. Strzępki te zawierają substancje zapasowe i uczestniczą w transporcie związków absorbowanych z gleby przez strzępki zewnątrzkorzeniowe, kierując pobrane substancje do arbuskul lub bezpośrednio do komórek korzeni. Strzępki występują w obrębie tkanek korzeni w postaci nierozgałęzionej lub tworzą H- i Y-kształtne rozgałęzienia. Ponadto mogą tworzyć zwoje, najczęściej w pobliżu miejsca wniknięcia grzybni w głąb korzenia, choć także w innych miejscach – ich lokalizacja oraz częstość występowania są bowiem zależne od rodzaju AMF [1].

Do zewnątrzkorzeniowych struktur mikoryzy arbuskularnej należą strzępki grzybni znajdujące się poza korzeniem rośliny (ekstramatrykalne) oraz zarodniki (spory). Strzępki arbuskularnych grzybów mikoryzowych wyróżnia brak poprzecznych sept. W miejscu wnikania strzępki do wnętrza korzenia powstaje charakterystyczne zgrubienie, nazywane apresorium. Rolą strzępek zewnątrzkorzeniowych jest przede wszystkim pobieranie wody i substancji pokarmowych oraz wytwarzanie spor (pojedynczych, wielojądrowych komórek, otoczonych grubą, często wielowarstwową ścianą komórkową). Grzyby z gromady *Glomeromycota* rozmnażają się bowiem bezpłciowo, poprzez spory (azygospory, chlamydospory) wytwarzane na końcach zewnątrzkorzeniowych strzępek (rzadziej spory mogą występować również wewnątrz korzenia). Strzępki ekstramatrykalne umożliwiają ponadto tworzenie połączeń pomiędzy korzeniami sąsiadujących ze sobą roślin i dzięki temu przekazywanie między nimi substancji pokarmowych, a także uczestniczą w procesach glebotwórczych, poprzez łączenie cząstek gleby w agregaty [1, 5, 20].

Obecność mikoryzy arbuskularnej wpływa pozytywnie na kondycję roślin m.in. poprzez zwiększenie powierzchni chłonnej korzeni, co umożliwia roślinom lepszy dostęp do wody i substancji mineralnych zawartych w glebie. Wyniki licznych badań wskazują, że rośliny skolonizowane przez AMF wykazują większą odporność na czynniki stresu środowiskowego, takie jak niedobór substancji odżywczych, długotrwała susza, zasolenie gleby, wysokie temperatury, a także organiczne i nieorganiczne zanieczyszczenia, w tym skażenie gleby metalami ciężkimi [3]. Kolonizacja mikoryzowa wpływa zatem na poprawę warunków siedliskowych i stymuluje wzrost roślin uprawianych na terenach zanieczyszczonych, co ma istotne znaczenie podczas prowadzenia upraw roślin energetycznych na terenach zdegradowanych [22]. Ponadto obecność mikoryzy arbuskularnej może wpływać na procesy migracji zanieczyszczeń w układzie gleba/korzeń/część nadziemna rośliny – poprzez wiązanie metali ciężkich w obrębie grzybni AMF mogą unieruchamiać metale w ryzosferze i zapobiegać ich przemieszczaniu do części nadziemnych roślin [5, 14, 22].

1.3. DSE – NIEMIKORYZOWE ENDOFITY

Korzenie roślin naczyniowych mogą być zasiedlane nie tylko przez grzyby mikoryzowe, ale także inne endofity. Często spotykaną i szeroko rozpowszechnioną grupę grzybów kolonizujących korzenie stanowią ciemnostrzępkowe grzyby endofityczne z przegrodami (ang. *dark septate endophytes*, DSE). Jak wskazuje nazwa, cechą charakterystyczną DSE jest występowanie septowanych strzępek o ciemnym zabarwieniu, wynikającym z obecności melaniny. DSE mogą tworzyć w obrębie korzeni skupiska ściśle upakowanych komórek – mikrosklerocja, będące formą grzybni przetrwalnikowej [15, 17, 23]. Grzyby te kolonizują korzenie roślin występujących zarówno w naturalnych ekosystemach, jak i w uprawach rolnych, a także zasiedlających tereny zdegradowane, w tym zanieczyszczone metalami ciężkimi. Mogą być obecne w korzeniach

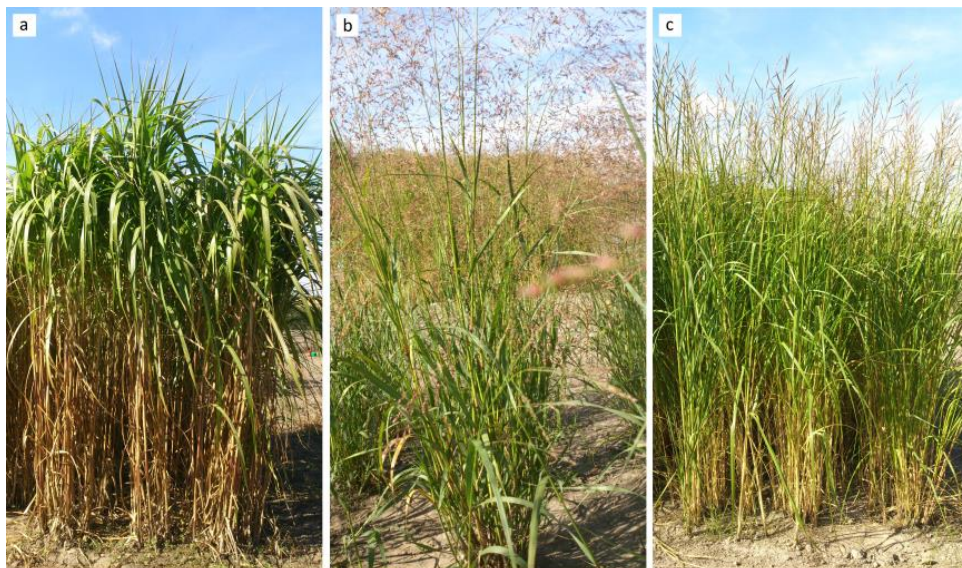
roślin mikoryzowych i kolonizować je wspólnie z grzybami mikoryzowymi, lub występować samodzielnie, bowiem wykryto je także w korzeniach roślin klasyfikowanych jako niemikoryzowe. W odróżnieniu od arbuskularnych grzybów mikoryzowych, których pozytywny wpływ na rośliny został szeroko udokumentowany, rola DSE w środowisku pozostaje niejasna [11, 17, 18, 23].

Celem przeprowadzonych badań było wdrożenie metod badawczych dotyczących kolonizacji mikoryzowej korzeni wybranych roślin energetycznych uprawianych na terenie rolniczym zanieczyszczonym metalami ciężkimi.

2. MATERIAŁY I METODYKA BADAŃ

2.1. CHARAKTERYSTYKA TERENU

Do badań wytypowano następujące trzy gatunki roślin energetycznych: miskant olbrzymi, proso różgowe, spartina periwia. Trawy te uprawiane są na założonych w 2014 roku poletkach doświadczalnych Instytutu Ekologii Terenów Uprzemysłowionych (rysunek 1). Rośliny każdego z wybranych gatunków rosną na osobnym poletku, każde o wymiarach 4×4 m, z zachowaniem 4 metrowej strefy buforowej. Na każdym z poletek posadzonych zostało 49 roślin. Poletka doświadczalne zlokalizowane są w województwie śląskim, na granicy Bytomia i Piekar Śląskich (50°20'43,8"N, 18°57'20,3"E), na gruntach należących do Rolniczej Spółdzielni Produkcyjnej. Teren ten znajduje się w odległości około 1 km od nieczynnej już huty cynku i ołowiu, będącej częścią ZGH „Orzeł Biały”. Na skutek kilkudziesięcioletniego oddziaływania przemysłu górnico-hutniczego w tym obszarze doszło do znacznego zanieczyszczenia gleb metalami ciężkimi. Grunty, na których znajdują się poletka zaklasyfikowane zostały jako glina pylasta (udział poszczególnych frakcji: 28% piasek, 56% pył, 16% il) [13]. Stężenie całkowite Pb, Cd i Zn w glebie na tym obszarze wynosi odpowiednio: 373–541 mg/kg, 14–20 mg/kg i 1369–1835 mg/kg (dane z 2014 roku, niepublikowane), a więc przekracza dopuszczalne wartości stężeń tych metali dla użytków rolnych, zawarte w rozporządzeniu Ministra Środowiska z dnia 9 września 2002 r., w sprawie standardów jakości gleby oraz standardów jakości ziemi [16]. Stężenie biodostępnych form Cd i Zn wynosi odpowiednio: 0,5–1,5 mg/kg i 24,2–88,0 mg/kg. Stężenie biodostępnych form Pb znajduje się poniżej granicy oznaczalności (dane z 2014 roku, niepublikowane).



Rys. 1. Rośliny na polkach badawczych: a) miskant olbrzymi (*Miscanthus × giganteus*); b) proso różgowate (*Panicum virgatum*); c) spartina preriowa (*Spartina pectinata*) (wrzesień 2015 r.)

2.2. POBÓR I PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU KORZENIOWEGO

Materiał korzeniowy pobierano w okresie czerwiec – wrzesień 2015 roku. Pobór ten obejmował próbki korzeni miskanta olbrzymiego, prosa różgowatego i spartiny preriowej, w trzech powtórzeniach (próbki korzeni trzech roślin z każdego polka). Próbkę pobierano z głębokości 5–30 cm, za pomocą łopaty ogrodniczej. Pobrane korzenie po przetransportowaniu do laboratorium zostały oczyszczone z gleby poprzez wstępne płukanie w wodzie bieżącej, a następnie w płuczce ultradźwiękowej. Oczyszczony materiał utrwalono w 50% alkoholu etylowym i przechowywano w lodówce w temperaturze 4 °C.

2.3. PRZYGOTOWANIE PRÓBEK DO BADAŃ MIKROSKOPOWYCH

Utrwalony materiał korzeniowy opłukano w kilku zmianach wody destylowanej, w celu usunięcia alkoholu. Fragmenty korzeni barwiono stosując zmodyfikowaną metodę Phillipsa-Haymana (1970) [12]. Korzenie poddano trawieniu w 10% KOH (przez 48 godzin), kilkakrotnie opłukano w wodzie destylowanej, zakwaszono w 5% kwasie mlekowym (przez 24 godziny), a następnie barwiono w 0,05% roztworze błękitu aniliny w laktoglicerolu (80% kwas mlekowy: glicerol: woda destylowana, w stosunku 1:1:1). Każdą z tak przygotowanych próbek korzeniowych podzielono na dwie części: jedna

z nich do czasu przygotowania preparatów mikroskopowych przechowywana była w roztworze barwnika, druga natomiast po 24-godzinnym barwieniu została opłukana w wodzie destylowanej zakwaszonej niewielką ilością kwasu octowego (0,3% roztwór) i przeniesiona do laktoglicerolu.

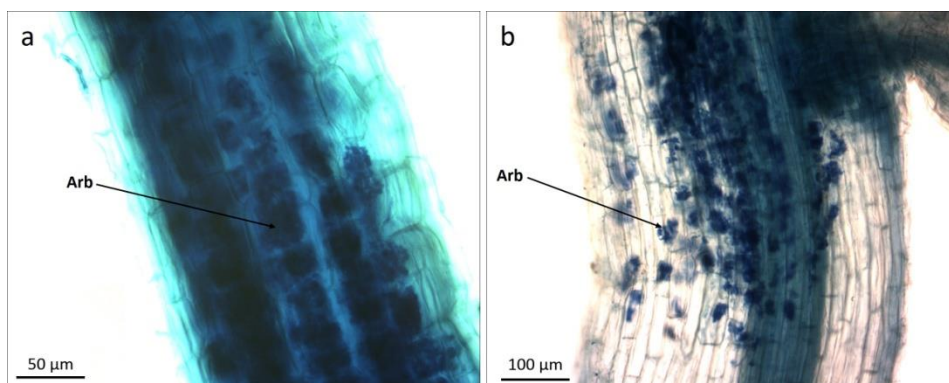
Przed przystąpieniem do sporządzenia preparatów mikroskopowych próbki korzeni przechowywane w roztworze błękitu aniliny odpłukano z nadmiaru barwnika w zakwaszonej wodzie destylowanej, natomiast próbki przechowywane w samym laktoglicerolu nie były powtórnie płukane. Następnie korzenie podzielono na mniejsze, około jednocentymetrowe fragmenty, które umieszczano na szkiełku podstawowym. Do zamykania preparatów przetestowano trzy rodzaje mediów zamykających: laktoglicerol, syntetyczną żywicę DPX oraz roztwór alkoholu poliwinylowego z laktoglicerolem (ang. *polyvinyl-lacto-glycerol*, PVLG). Z każdej próbki korzeniowej utworzono po 2 preparaty zawierające 15 jednocentymetrowych fragmentów korzeni. Przygotowane w ten sposób preparaty poddano obserwacji mikroskopowej, mającej na celu wykrycie i identyfikację struktur mikoryzowych w korzeniach badanych gatunków roślin oraz ocenę jakości przygotowanych preparatów. Badania mikroskopowe prowadzono w jasnym polu, stosując powiększenia 100×, 200× i 400×.

Na podstawie uzyskanych wyników (omówionych w dalszej części pracy) zdecydowano o wprowadzeniu następujących modyfikacji w procesie przygotowania materiału do badań: zmniejszenie objętości próbki korzeniowej poddanej trawieniu w KOH, zmiana czasu trawienia i temperatury, w której prowadzony jest ten proces. Przygotowanie kolejnych próbek do badań rozpoczęto od podzielenia korzeni na mniejsze, około 2–4 cm fragmenty, zmniejszono też ilość korzeni w stosunku do objętości roztworu KOH. Tak przygotowany materiał (uprzednio utrwalony w 50% alkoholu etylowym i opłukany w wodzie destylowanej) poddano trawieniu w 10% KOH, prowadząc proces w 80°C (w łaźni wodnej), przez 1 godzinę. Następnie korzenie kilkakrotnie opłukano w wodzie destylowanej, zakwaszono w 5% kwasie mlekowym (przez 24 godziny) i barwiono w 0,05% roztworze błękitu aniliny w laktoglicerolu (przez 24 godziny). Nadmiar barwnika odpłukano w wodzie z dodatkiem kwasu octowego, próbki do czasu przygotowania preparatów mikroskopowych przechowywano w laktoglicerolu. Do zamykania preparatów użyto PVLG. Po obserwacji mikroskopowej przygotowanych w ten sposób preparatów i analizie uzyskanych wyników, zdecydowano o wprowadzeniu dalszych modyfikacji czasu trawienia w KOH. W celu dobrania czasu trawienia odpowiedniego dla właściwego oczyszczenia korzeni poszczególnych gatunków roślin, z każdej próbki materiału korzeniowego utworzono 5 subpróbek, dla których proces trawienia (prowadzony w 80°C, w łaźni wodnej) przerywano po upływie: 15, 25, 35, 45 i 55 minut. Pozostałe etapy oczyszczania, barwienia i przechowywania materiału korzeniowego oraz przygotowania preparatów nie uległy zmianie i przebiegały zgodnie z procedurą opisaną powyżej. Przygotowane w ten sposób preparaty poddano obserwacji mikroskopowej.

3. WYNIKI BADAŃ

3.1. DOBÓR METODYKI PRZYGOTOWANIA I BARWIENIA MATERIAŁU KORZENIOWEGO WŁAŚCIWEJ DLA BADANYCH ROŚLIN

Wynikiem przeprowadzonych badań są obrazy mikroskopowe, zamieszczone w dalszej części niniejszej pracy. Obserwacje preparatów przygotowanych z materiału korzeniowego przechowywanego w roztworze barwnika oraz tych, które przygotowano z fragmentów korzeni przechowywanych w laktoglicerolu wykazały, że korzystniejsze jest przenoszenie wybarwionych fragmentów korzeni do laktoglicerolu. W przypadku większości badanych fragmentów komórki korzeni przechowywanych w laktoglicerolu były mniej zabarwione niż miało to miejsce w korzeniach pozostawionych w roztworze barwnika (rysunek 2), co umożliwiło uzyskanie lepszego kontrastu pomiędzy wybarwionymi strukturami mikoryzowymi, a tkanką roślinną (która powinna pozostać niewybarwiona).

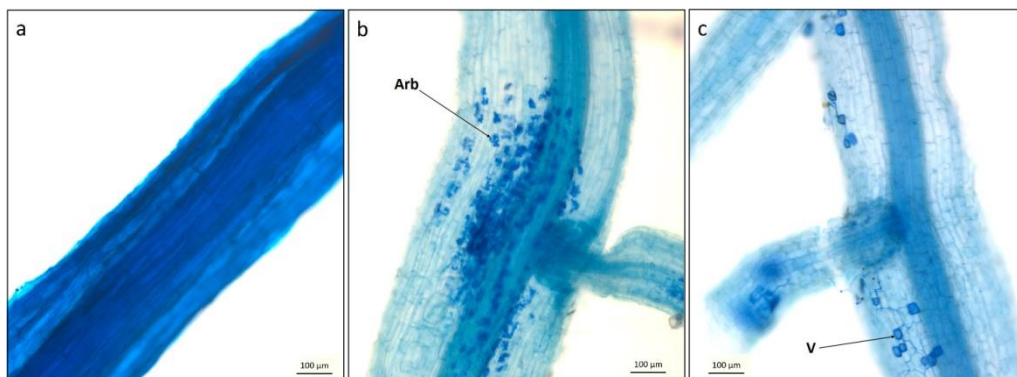


Rys. 2. Obrazy mikroskopowe fragmentów korzeni miskanta olbrzymiego: a) przechowywanych w roztworze błękitu aniliny; b) przechowywanych w laktoglicerolu; Arb – arbuskule

Wyniki testów trzech mediów zamykających: żywicy DPX, laktoglicerolu i PVLG, wykluczyły stosowanie żywicy DPX w procesie przygotowywania preparatów z fragmentów korzeni badanych gatunków roślin. DPX jest medium pozwalającym na szybkie i skuteczne tworzenie trwałych preparatów mikroskopowych, jednak substancja ta okazała się nieprzydatna w odniesieniu do tworzenia preparatów mikoryzowych z korzeni wybranych gatunków roślin. Obrazy mikroskopowe uzyskane w wyniku obserwacji fragmentów korzeni w DPX były bardzo ciemne, warstwy komórek nakładały się na siebie, tkanki korzenia były silnie zabarwione (rysunek 3a) co utrudniało, a w wielu przypadkach zupełnie uniemożliwiało obserwację struktur mikoryzowych.

Obrazy uzyskane z preparatów, dla których medium zamykającym był laktoglicerol były bardziej czytelne, a struktury grzybów mikoryzowych – lepiej widoczne (rysunek

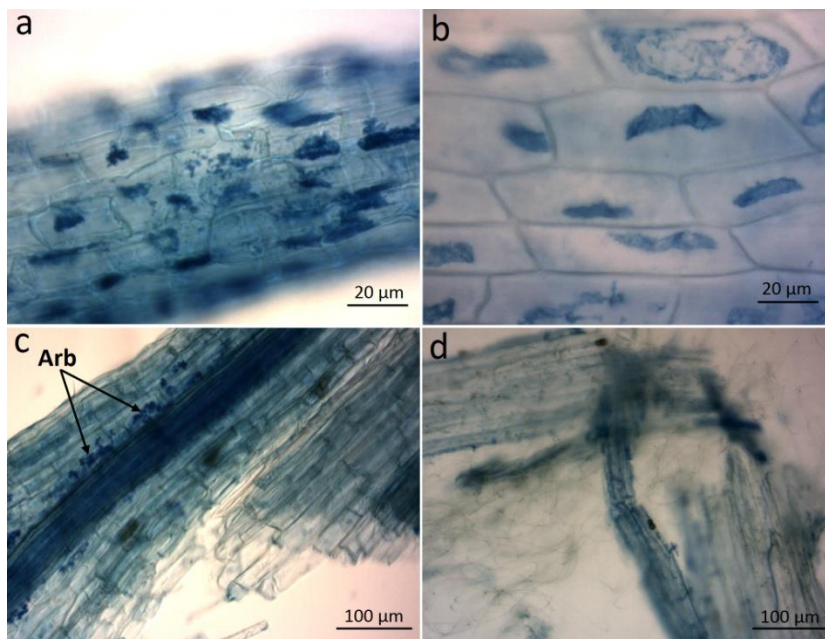
3b). Laktoglicerol wydaje się więc być lepszym medium niż DPX, jednak przygotowane przy jego użyciu preparaty są nietrwałe, szkiełko nakrywkowe przesuwa się wzdłuż powierzchni szkiełka podstawowego zmieniając położenie fragmentów korzeni, a roztwór często wypływa spomiędzy szkiełek. Spośród przetestowanych mediów zamykających substancją, której użycie przyniosło najkorzystniejsze efekty był PVLG (rysunek 3c). Zastosowanie PVLG pozwoliło na uzyskanie trwałych preparatów, których obserwacja dostarczyła dobrej jakości obrazów o odpowiednim kontraście.



Rys. 3. Obrazy fragmentów korzeni miskanta olbrzymiego w trzech różnych mediach zamykających: a) żywicy DPX; b) laktoglicerolu; c) PVLG; Struktury mikoryzowe widoczne na zdjęciach: Arb – arbuskule, V – pęcherzyki (ang. *vesicles*)

Istotną przeszkodę w prowadzeniu obserwacji struktur charakterystycznych dla mikoryzy arbuskularnej stanowiła obecność pozostałości cytoplazmy w nie dość skutecznie oczyszczonych komórkach korzeni (rysunek 4 a, b). Materiał ten uległ zabarwieniu i utrudniał prawidłową obserwację i identyfikację badanych struktur. Substancją służącą do oczyszczania i zmiękczenia korzeni oraz usuwania cytoplazmy z ich komórek jest KOH. Na nieskuteczne oczyszczenie komórek wpływ może mieć kilka czynników, do których należą: zbyt krótki czas trawienia w roztworze KOH, za niska temperatura prowadzenia tego procesu lub zbyt duża objętość próbki badanego materiału w stosunku do objętości roztworu. W celu wyeliminowania błędów i poprawnego oczyszczenia korzeni wprowadzono zmiany w procedurze przygotowania materiału korzeniowego do barwienia, modyfikując objętość próbki, temperaturę roztworu i czas trawienia. Jak podaje Brundrett i in. [2], wstępnie oczyszczone w wodzie korzenie powinny zostać podzielone na 2–4 cm fragmenty, a masa pojedynczej próbki nie powinna przekraczać 2 gram. Tak przygotowany materiał można umieścić w roztworze KOH i autoklawować w temperaturze 121°C przez 15–20 minut (w razie potrzeby dłużej: 25–60 minut) lub podgrzewać roztwór KOH w łaźni wodnej do temperatury 60–90°C. W tym wypadku czas oczyszczania korzeni należy dobrać eksperymentalnie, zależy on m.in. od grubości

korzenia i stopnia jego pigmentacji. Zbyt krótki czas prowadzi do niepełnego oczyszczenia komórek, natomiast fragmenty korzeni zbyt długo trawione w KOH ulegają rozpadowi.

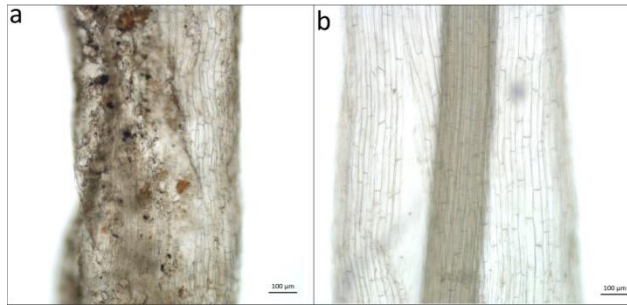


Rys. 4. Nieskutecznie oczyszczone komórki korzeni: spartiny preriowej (a) i prosa różgowatego (b) oraz zdeintegrowane tkanki korzeni: miskanta olbrzymiego, Arb – arbuskule (c) i spartiny preriowej (d)

Jak wykazały badania mikroskopowe, wprowadzenie zmian w procedurze oczyszczania korzeni (zmniejszenie objętości pojedynczej próbki materiału korzeniowego oraz podzielenie korzeni na mniejsze fragmenty i trawienie w 10% KOH, w temperaturze 80°C przez 1 godzinę) przyniosło pozytywny rezultat w postaci lepszego oczyszczenia komórek korzeni. Równocześnie zaobserwowano jednak, że wiele fragmentów uległo częściowej lub znacznej degradacji (rysunek 4 c, d).

Celem kolejnego etapu badań było wyznaczenie odpowiedniego czasu trawienia w KOH, pozwalającego na uzyskanie optymalnych rezultatów dla poszczególnych gatunków roślin. Na podstawie przeprowadzonych obserwacji mikroskopowych stwierdzono, że najbardziej optymalny czas trawienia korzeni w 10% KOH (w łaźni wodnej w temperaturze 80°C) wynosi: 35 minut dla miskanta olbrzymiego, 45 minut dla prosa różgowatego oraz 25 minut dla spartiny preriowej.

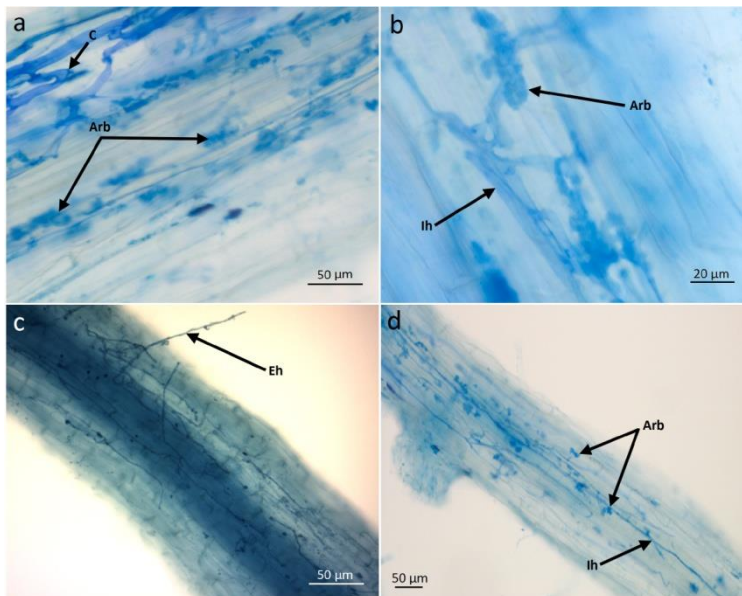
Zastosowanie podgrzewania w 10% roztworze KOH pozwoliło na skuteczne odbarwienie (usunięcie pigmentu) korzeni wybranych gatunków roślin (co przedstawiono na rysunku 5 na przykładzie korzeni miskanta olbrzymiego) oraz lepsze oczyszczenie komórek korzeni, a dobór odpowiedniego czasu trawienia zapobiegł dezintegracji tkanek.



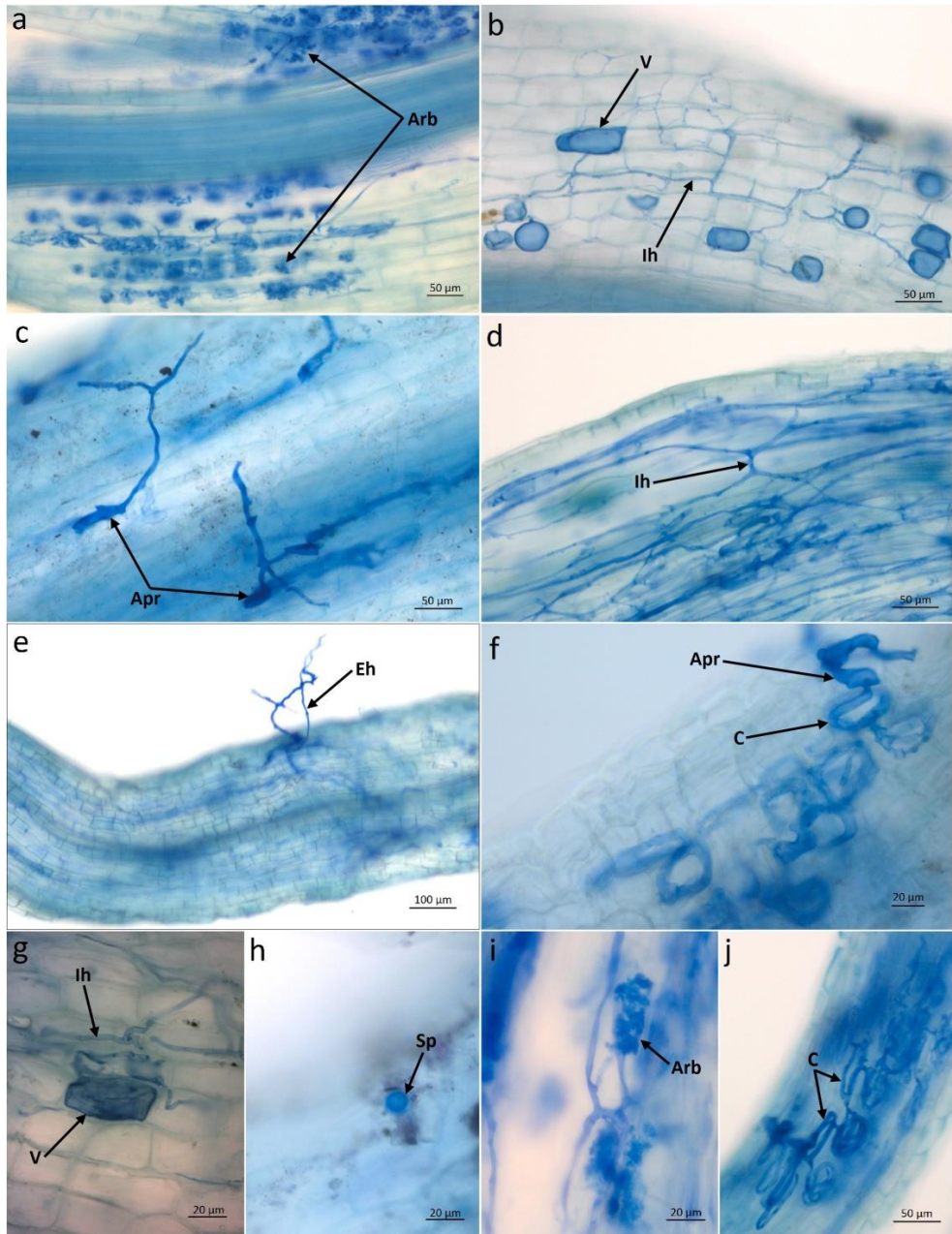
Rys. 5. Mikroskopowy obraz niebarwionych fragmentów korzeni miskanta olbrzymiego: a) fragment nie trawiony w KOH; b) fragment poddany trawieniu w 10% KOH przez 35 min. w temp. 80°C

3.2. MIKORYZA ARBUSKULARNA WYBRANYCH GATUNKÓW ROŚLIN

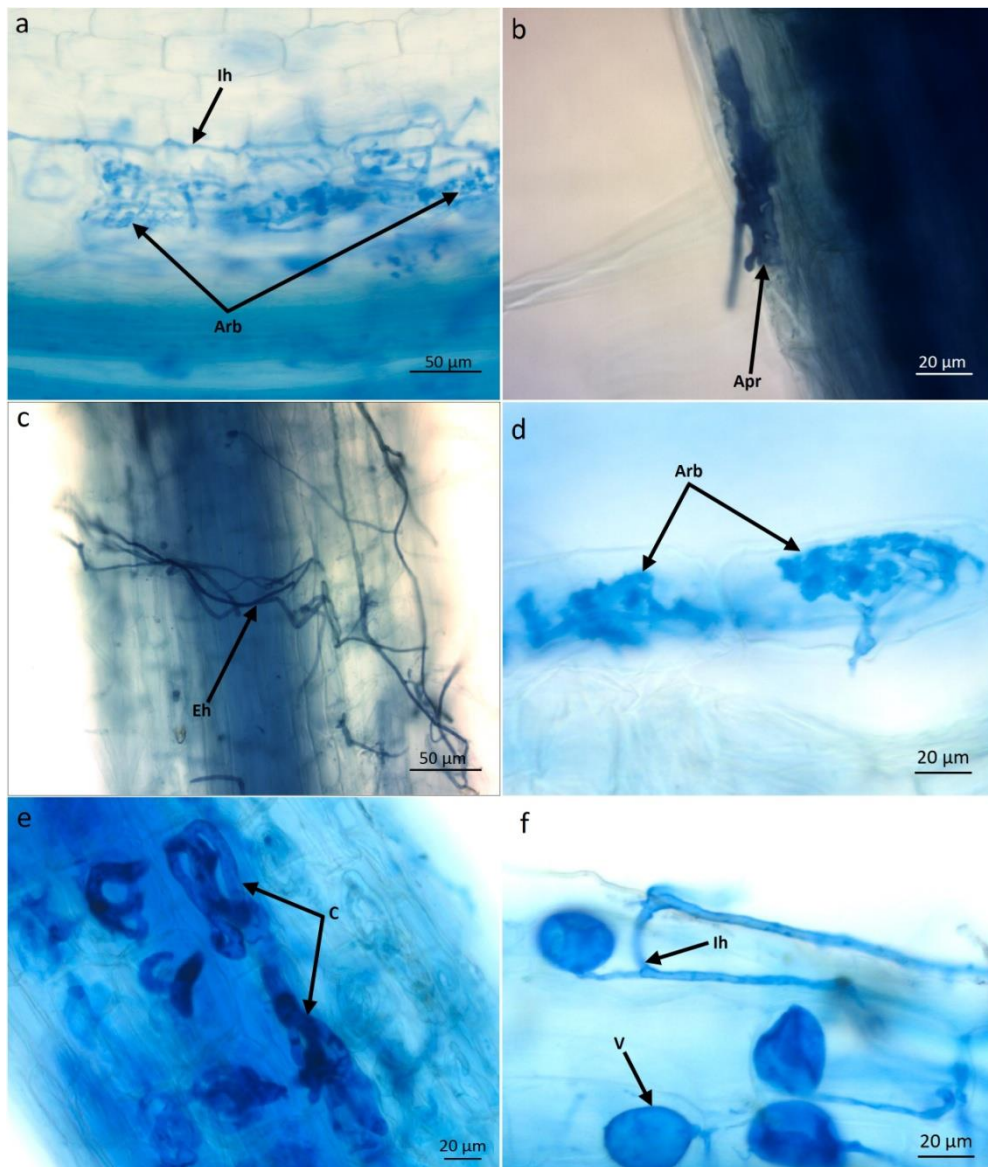
U wszystkich badanych gatunków roślin stwierdzono obecność arbuskularnych grzybów mikoryzowych. W wyniku barwienia błękitem aniliny struktury mikoryzowe wybarwiły się na kolor niebieski. W analizowanych fragmentach korzeni obserwowano występowanie struktur charakterystycznych dla mikoryzy arbuskularnej: arbuskul i pęcherzyków oraz innych zewnątrz- i wewnątrzkorzeniowych struktur AMF, wybrane przedstawiono na rysunkach 6–8.



Rys. 6. Struktury mikoryzowe w korzeniach prosa różgawatego: a) arbuskule (Arb) i zwój (C – ang. *coil*); b) arbuskula (Arb) i strzępki wewnątrzkorzeniowe (Ih – ang. *intraradical hyphae*); c) strzępki zewnątrzkorzeniowe (Eh – ang. *extraradical hyphae*); d) arbuskule (Arb) i strzępki wewnątrzkorzeniowe (Ih)

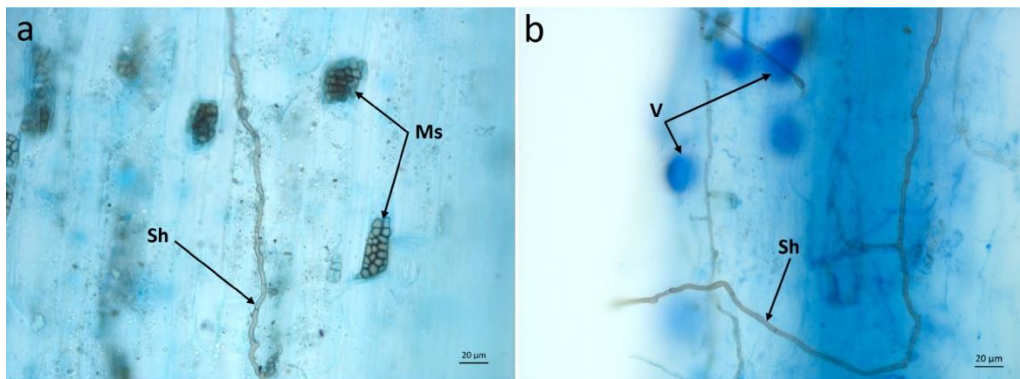


Rys. 7. Struktury mikoryzowe w korzeniach miskanta olbrzymiego: a) arbuskule (Arb); b) pęcherzyk (V – ang. *vesicle*) i strzępki wewnątrzkorzeniowe (Ih); c) apresorium (Apr); d) strzępki wewnątrzkorzeniowe (Ih) tworzące rozgałęzienie H-kształtne; e) strzępki zewnątrzkorzeniowe (Eh); f) apresorium (Apr) i zwoj (C); g) pęcherzyk (V) i strzępki wewnątrzkorzeniowe (Ih); h) spora (Sp); i) arbuskula (Arb); j) zwoje (C)



Rys. 8. Struktury mikoryzowe w korzeniach spartiny preloensis: a) arbuskule (Arb) i strzępki wewnątrzkorzeniowe (Ih); b) apesorium (Apr); c) strzępki zewnątrzkorzeniowe (Eh); d) arbuskule (Arb); e) zwoje (C); f) pęcherzyk (V) i strzępki wewnątrzkorzeniowe (Ih) tworzące rozgałęzienie Y-kształtne

Poza strukturami mikoryzowymi, w analizowanych fragmentach korzeni występowały struktury świadczące o obecności DSE – mikrosklerocja oraz ciemne, septowane strzępki, które nie wybarwiły się na niebiesko, lecz pozostały brązowe. Obrazy mikroskopowe struktur DSE przedstawiono na rysunku 9.



Rys. 9. Ciemnostrzępkowe endofity (DSE): a) mikrosklerocja (Ms) i septowane strzępki DSE (Sh) w korzeniu miskanta olbrzymiego; b) strzępki DSE w korzeniu spartiny preriowej, w tle widoczne pęcherzyki (V) arbuskularnych grzybów mikoryzowych

4. WNIOSKI

Przeprowadzone badania mikroskopowe umożliwiły sformułowanie następujących wniosków:

1. Wszystkie badane gatunki roślin energetycznych (miskant olbrzymi, proso różgowe, spartina preriowa) uprawiane na terenie zanieczyszczonym metalami ciężkimi tworzą związki mikoryzowe z grzybami z gromady *Glomeromycota*.
2. O obecności mikoryzy arbuskularnej w badanych fragmentach korzeni świadczy występowanie struktur charakterystycznych dla tego typu symbiozy: arbuskul i pęcherzyków.
3. Poza występowaniem arbuskularnych grzybów mikoryzowych, w korzeniach badanych roślin stwierdzono także obecność innych grzybowych endofitów – DSE.
4. Dobór odpowiednich metod przygotowania, trawienia, barwienia i przechowywania materiału korzeniowego oraz sporządzania preparatów mikroskopowych z tego materiału umożliwia uzyskanie wysokiej jakości obrazów mikroskopowych i ułatwia poprawne rozpoznanie struktur mikoryzowych.

Przedstawione wyniki zostały wykonane w Instytucie Ekologii Terenów Uprzemysłowionych w ramach pracy finansowanej z dotacji Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz projektu „Phyto2Energy”, realizowanego w ramach działań Marie Curie-Skłodowskiej 7 programu ramowego UE.

LITERATURA

- [1] BŁASZKOWSKI J., *Glomeromycota*, W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków 2012.
- [2] BRUNDRETT M., BOUGHER N., DELL B., GRAVE T., MALAJCZUK N., *Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture*, Australian Centre for International Agricultural Research, Monograph 32, Canberra 1996.
- [3] FUSCONI A., BERTA G., *Environmental Stress and Role of Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis*, [w:] *Abiotic Stress Responses in Plants: Metabolism, Productivity and Sustainability*, pod red. P. Ahmad, M.N.V Prasad, Springer, New York 2012, 197–214.
- [4] Główny Urząd Statystyczny, *Rocznik statystyczny rolnictwa 2014*, Warszawa 2014.
- [5] GUCWA-PRZEPIÓRA E., *Udział mikoryzy arbuskularnej w procesach fitoremediacji – mikoryzoremediacja*, *Wiadomości Botaniczne*, 2012, Vol. 56, No. 1/2, 5–19.
- [6] GUCWA-PRZEPIÓRA E., KUCHARSKI R., SAS-NOWOSIELSKA A., *Status mikoryzowy wybranych gatunków roślin na zwale popłuczkowym ZGH „Orzeł Biały” w Piekarach Śląskich*, *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 2010, Vol. 545, 253–263.
- [7] JUNG S.C., MARTINEZ-MEDINA A., LOPEZ-RAEZ J.A., POZO M.J., *Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses*, *Journal of Chemical Ecology*, 2012, Vol. 38, 651–664.
- [8] KABAŁA C., KARCZEWSKA A., KOZAK M., *Przydatność roślin energetycznych do rekultywacji i zagospodarowania gleb zdegradowanych*, *Zeszyty Naukowe UP we Wrocławiu, Rol.*, XCVI, 2010, Vol. 576, 97–118.
- [9] Ministerstwo Gospodarki, *Krajowy plan działania w zakresie energii ze źródeł odnawialnych*, Warszawa 2010.
- [10] Ministerstwo Gospodarki, *Polityka energetyczna Polski do 2030 roku*, Warszawa 2010.
- [11] NEWSHAM K.K., *A meta-analysis of plant responses to dark septate root endophytes*, *New Phytologist*, 2011, 190, 3, 783–793.
- [12] PHILLIPS J.M., HAYMAN D.S., *Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection*, *Transactions British Mycological Society*, 1970, Vol. 55, 158–161.
- [13] POGRZEBA M., KRZYŻAK J., SAS-NOWOSIELSKA A., *Environmental hazards related to *Miscanthus × giganteus* cultivation on heavy metal contaminated soil*, *E3S Web of Conferences*, 2013, 1, 29006.
- [14] RABĘDA I., WOŹNY A., KRZESŁOWSKA M., *Bakterie i grzyby mikoryzowe zwiększają wydajność roślin w fitoremediacji metali śladowych*, *Kosmos*, 2011, Vol. 60, No. 3–4, 423–433.
- [15] RODRIGUEZ R.J., WHITE F.A. Jr, ARNOLD A.E., REDMAN R.S., *Fungal endophytes: diversity and functional roles*, *New Phytologist*, 2009, Vol. 182, No. 2, 314–330.
- [16] Rozporządzenie Ministra Środowiska w sprawie standardów jakości gleby oraz standardów jakości ziemi z dnia 9 września 2002 roku. *Dz. U. Nr 165, poz. 1359*.
- [17] SARAVESI K., RUOTSALAINEN A.L., CAHILL J.F., *Contrasting impacts of defoliation on root colonization by arbuscular mycorrhizal and dark septate endophytic fungi of *Medicago sativa**, *Mycorrhiza*, 2014, Vol. 24, 239–245.
- [18] SATHIYADASH K., MUTHUKUMAR T., UMA E., *Arbuscular mycorrhizal and dark septate endophyte fungal associations in South Indian grasses*, *Symbiosis*, 2010, Vol. 52, 21–32.
- [19] SIEBIELEC G., STUCZYŃSKI T., TERELAK H., FILIPIAK K., KOZA P., KORZENIOWSKA-PUCULEK R., ŁOPATKA A., JADCZYSZYN J., *Uwarunkowania produkcji rolniczej w regionach o dużym udziale gleb zanieczyszczonych metalami śladowymi*, *Wybrane zagadnienia systemów informacji przestrzennej i obszarów problemowych rolnictwa w Polsce*, *Studia i Raporty IUNG-PIB*, 2008, Vol. 12, 113–133.

- [20] SMITH S.E., READ D.J., *Mycorrhizal symbiosis, 3rd edn*, Academic Press, London 2008.
- [21] SZCZUKOWSKI S., TWORKOWSKI J., STOLARSKI M., KWIATKOWSKI J., KRZYŻANIAK M., LAJSZNER W., GRABAN Ł., *Wieloletnie rośliny energetyczne: monografia*, Multico Oficyna Wydawnicza, Warszawa 2012.
- [22] TURNAU K., JURKIEWICZ A., GRZYBOWSKA B., *Rola mikoryzy w bioremediacji terenów zanieczyszczonych*, Kosmos, 2002, Vol. 51, No. 2, 185–194.
- [23] ZHAO D., LI T., SHEN M., WANG J., ZHAO Z., *Diverse strategies conferring extreme cadmium (Cd) tolerance in the dark septate endophyte (DSE), Exophiala pisciphila: Evidence from RNA-seq data*, Microbiological Research, 2015, Vol. 170, 27–35.
- [24] ZUBEK S., *Czy symbiotyczne grzyby arbuskularne mogą sprzyjać inwazji roślin?* Kosmos, 2012, Vol. 61, No. 4, 657–666.

ARBUSCULAR MYCORRHIZA OF SELECTED ENERGY CROPS CULTIVATED ON HEAVY METALS CONTAMINATED SITE

The aim of these studies was to implement methods for the detection and observation of arbuscular mycorrhizal colonization of energy crops grown on heavy metals contaminated agricultural soil. Root samples of three perennial grasses (*Miscanthus × giganteus*, *Panicum virgatum*, *Spartina pectinata*) were collected. The samples were stained according to modified Phillips and Hayman (1970) method. Based on microscope observations of prepared samples several modifications of clearing in KOH procedure were made. Three mounting media were also tested (DPX, lactoglycerol, PVLG) and PVLG was found to be the most suitable. Selection of optimal parameters for processing, clearing, staining and storage root samples has improved the visualization of arbuscular mycorrhizal structures in field-collected roots of selected species. All three plant species examined has been found to form arbuscular mycorrhizal associations. These preliminary studies should allow to correctly quantify mycorrhizal colonization of selected energy crop species in the next stage of the research.