

Preživljavanje biljaka u uslovima suše

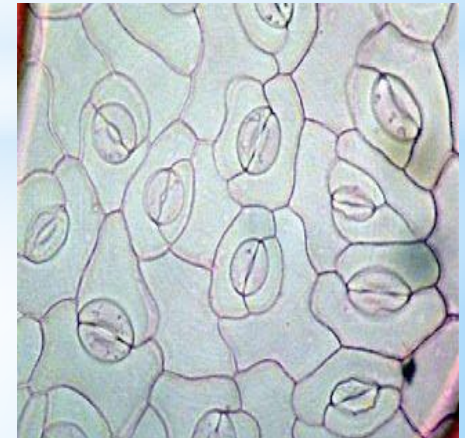
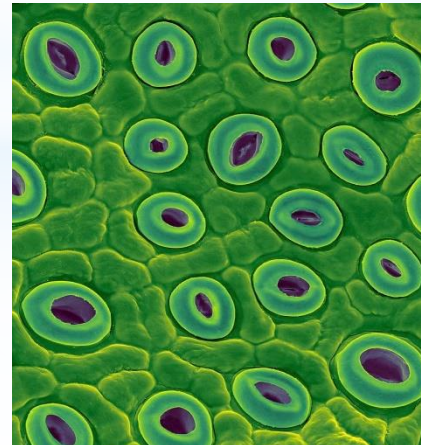
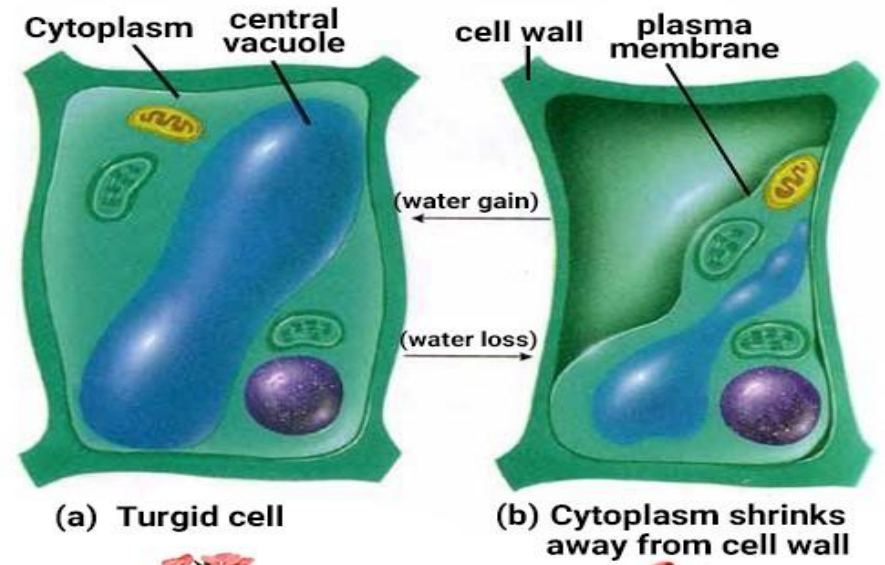
Marina Vučinić 4/20

Šta je suša? I kako utiče na biljni svijet?

Suša je abiotički činilac koji utiče na sve žive organizme. Javlja se kada su vlažnost zemljišta i vazduha niski, a temperatura vazduha visoka. Iako je voda najzastupljenije jedinjenje na Zemlji, njena dostupnost u najvećoj mjeri ograničava produktivnost biljaka, u odnosu na druge abiotičke činioce. Nedostatak vode ima veoma kompleksno dejstvo na fiziološke procese kod biljaka.



- Gubitak turgora
- Zatvaranje stoma
- Smanjenje inteziteta fotosinteze
- Smanjenje veličine hloroplasta
- Narušavanje membranske strukture tilakoida
- Smanjen rast biljke



Naučni rad br.1

***Fiziološki i molekularni aspekti tolerantnosti
šećerne repe prema suši - doktorska disertacija
dr Marina Putnik-Delić***



Uvod

Šećerna repa (*Beta vulgaris*) je dvogodišnja biljka iz porodice *Chaenopodiaceae*, koja u prvoj godini stvara zadebljali korjen (repu) i rozetu listova, a u drugoj cvjetno stablo, cvijet, plod i sjeme.

Šećerna repa se gaji zbog zadebljalog dijela korjena (repe), koji je bogat šećerom. Zadebljali korjen šećerne repe sadrži u doba berbe (vađenja repe) prosječno oko 75% vode i oko 25% suve materije, od čega 16—18% šećera (saharoze) i 7,5% drugih materija. Smanjenjem vode tj. nastankom suše, dolazi do promjena u intezitetu disanja i gubitku šećera u korjenu repe. Ako se voda u korjenu smanji za 15% aktivnost enzima invertaze se povećava čak 6 puta, intenzivirajući razgradnju saharoze i njenu transformaciju u druge ugljene hidrate. S druge strane kao mehanizam odbrane na uslove suše dolazi do povećane sinteze **PROLINA** (*indikator tolerantnosti prema suši*).



Cilj rada

Cilj ovog rada je definisanje fizioloških i molekularnih parametara koji ukazuju na povećanu tolerantnost šećerne repe prema nedostatku vode tj. tolerisanje abiotičkog stresa – suše.



Materijal i metode

- Eksperiment je postavljen u stakleniku Instituta za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad, a laboratorijske analize su sprovedene na Poljoprivrednom fakultetu. Eksperiment se vršio u kontrolisanim i polukontrolisanim uslovima .
- Istraživanja su sprovedena na jedanaest genotipova (označeni od 1 do 11) šećerne repe (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*, L.

3 grupe:

- netolerantni (2, 5, 6 i 8) genotipovi,
- srednje tolerantni (3, 7, 9 i 11) genotipovi,
- tolerantni (1, 4 i 10) genotipovi .



• 90 dana vlažnost zemljišta je održavana na nivou od 80% . Nakon 90 dana vršeno je mjerenje dnevne potrošnje vode tako što je mjerena masa kadica sa biljkama prije i posle zalivanja tokom tri dana i zalivanje je vršeno u skladu sa evapotranspiracijom. Biljke su tada bile u fazi 6-12 listova u lisnoj rozeti. Nakon toga je izazvan vodni deficit prestankom zalivanja, dok je kod kontrolnih biljaka zalivanje nastavljeno. Pet dana po prestanku zalivanja uzeti su uzorci biljnog materijala za analizu fizioloških i molekularnih parametara.

Slika 1. Genotipovi šećerne repe gajeni u polukontrolisanim uslovima
(lijeva posuda-kontrola; desna posuda-tretman)



- Ispitivani su sledeći parametri:
 - a) sadržaj vode / suve materije u zemljištu
 - b) sadržaj vode / suve materije u biljnom materijalu
 - c) relativan sadržaj vode (RWC)
 - d) koncentracija slobodnog prolina
 - e) broj listova
- Sve analize su rađene u tri ponavljanja.

a) Sadržaj vode / suve materije u zemljištu

% vlažnosti zemljišta = $m_{vl} - m_{suv} / m_{vl} * 100$, (Ćulafić i sar., 1992),

m_{vl}-masa uzorka prije sušenja

m_{suv}- masa uzorka nakon sušenja

b) Sadržaj vode / suve materije u biljnom materijalu.

$$\% \text{ suve materije} = 100 - \frac{m_{vl} - m_{suv}}{m_{vl}} * 100$$

m_{vl}-masa uzorka prije sušenja, **m_{suv}**- masa uzorka nakon sušenja.

c) Relativan sadržaj vode (RWC)

Određuje se na osnovu trenutnog sadržaja vode u biljnom tkivu, maksimalnog sadržaja vode (dobijenog kvašenjem tkiva) i sadržaja suve materije. Kružnim nožem je isječeno 15 diskova lista i izmjerena im je masa. Isječki su potopljeni u posudu sa destilovanom vodom i ostavljeni 3-4 časa. Višak vode sa površine listova je otklonjen filter hartijom, a potom je mjerena masa isječaka. Isječki su sušeni u sušnici do konstantne mase na temperaturi od 105-130°C do apsolutno suvog stanja (Maksimović i Pajević, 2002).

$$RWC = \frac{\text{masa isečaka na početku ogleda} - \text{masa apsolutno suvih isečaka}}{\text{masa isečaka potpuno zasićenih vodom} - \text{masa apsolutno suvih isečaka}}$$

d) Koncentracija slobodnog prolina

Odmjeren je 1g svježeg biljnog materijala koji je potom homogenizovan u prisustvu 10ml 3% sulfosalicilne kiseline. Homogenat je potom profiltriran. Napravljena je reakciona smješa (2ml filtrata, kisjelog ninhidrinskog reagensa i glacijalne sirćetne kiseline). Reakcija je nastavljena u vodenom kupatilu, 15 minuta na 100°C. Epruvete su zatim premještene na led da bi se reakcija prekinula. Bojeno jedinjenje je ekstrahovano toluolom (4ml) da bi se slojevi razdvojili. Kad je rastvor doveden na sobnu temperaturu sloj toluola je prenešen u kivetu za spektrofotometrisanje. Vrijednosti su očitane na spektrofotometru. Dobijene vrijednosti su očitane sa standardne krive kao koncentracija prolina u μg u 2ml rastvora. Sadržaj prolina je izračunat na osnovu obrasca:

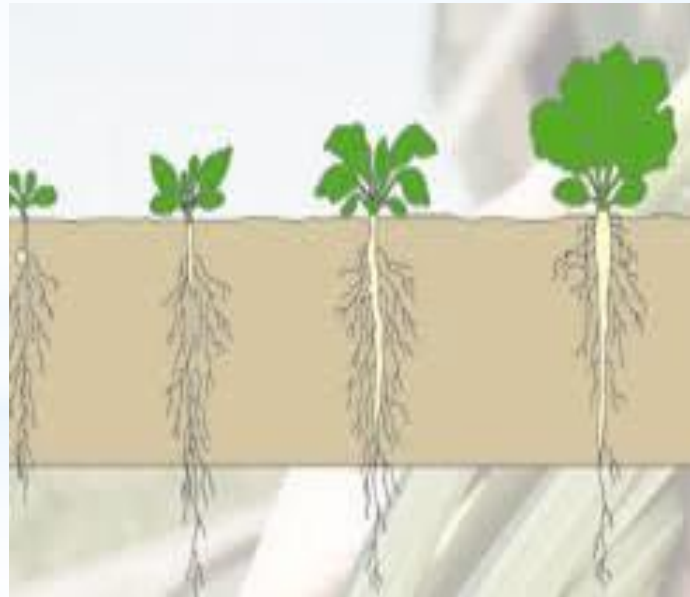
$$\text{Sadržaj prolina} = \frac{X \cdot 5}{\text{odvaga u g}} (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \text{ sveže mase})$$

gde je X – koncentracija prolina očitana sa standardne krive u μg prolina u 2ml

5 – razblaženje pri ekstrakciji (1g u 10 ml, i od toga je 2 ml uzeto za reakciju i dalje ekstrahovanje toluolom)

Rezultati rada i diskusija

- Genotipovi šećerne repe koji su korišćeni u eksperimentu u polukontrolisanim uslovima su vrlo različito reagovali na petodnevni nedostatak vode. Opadanje turgora u različitoj mjeri je bilo zastupljeno kod svih genotipova.



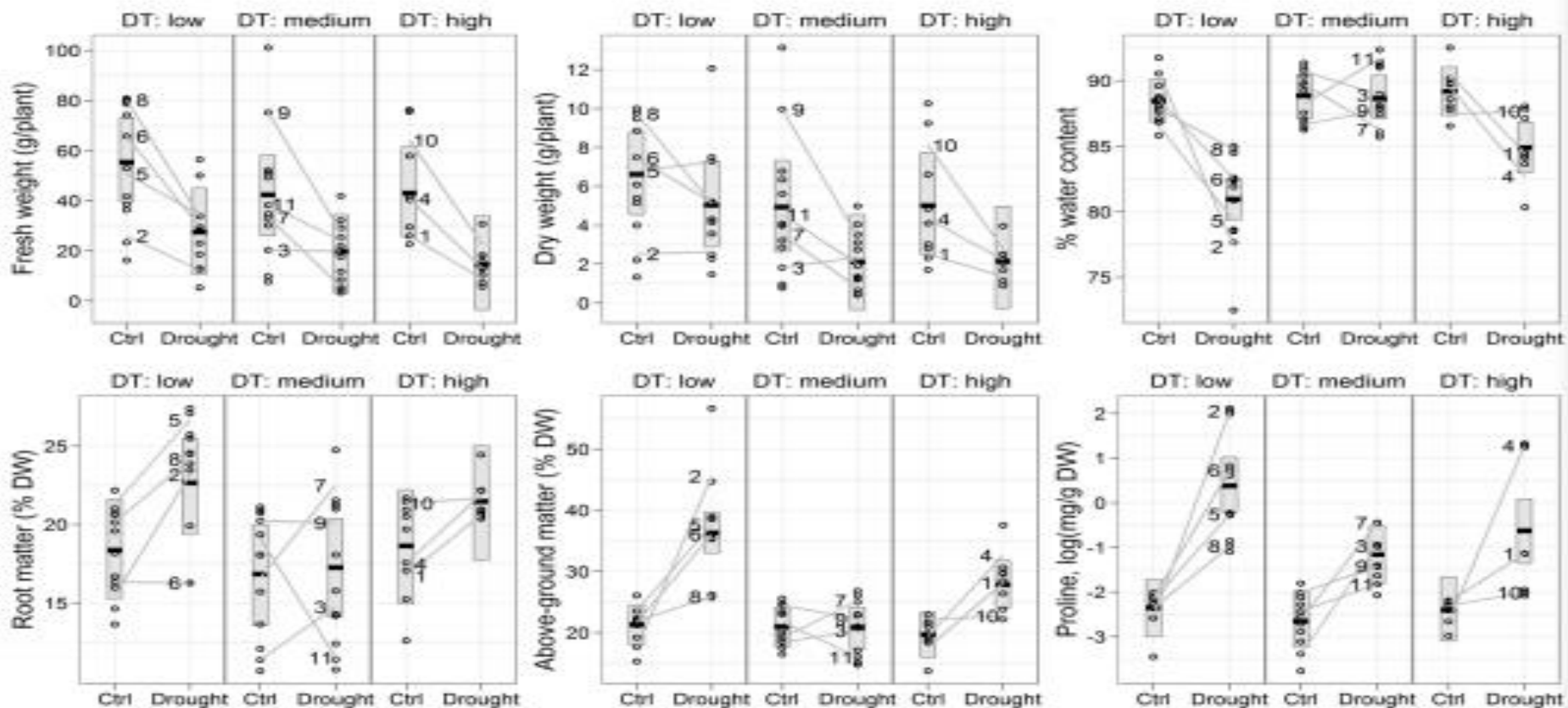
• Na osnovu testiranih parametara relativni sadržaj vode (RWC), % suve materije (SM) lista, stabla i korjena, % vlage u zemljištu u kom su biljke gajene i sadržaj slobodnog prolina ustanovljene su razlike između genotipova (tabela 2.), kao i razlike između kontrolnih i biljaka izloženih tretmanu .

Tabela 2. Prosječne vrijednosti relativnog sadržaja vode (RWC), % suve materije (SM) u listu, stablu i korjenu, % vode u zemljištu i sadržaj slobodnog prolina kod mladih biljaka šećerne repe

Genotip	Tretman	RWC	%SM list	% SM stablo	% SM koren	% vode u zemljištu	Prolin (mg/g suve mase)
1	kontrola	78,75	9,15	8,38	16,74	34,76	109,01
	suša	50,67	16,65	11,53	20,64	15,10	318,74
2	kontrola	74,57	9,20	8,18	15,49	38,17	75,86
	suša	40,60	28,40	17,19	23,17	23,20	7793,79
3	kontrola	84,46	10,04	8,36	11,38	40,57	33,83
	suša	58,04	12,24	8,10	14,75	11,88	381,21
4	kontrola	78,24	10,10	9,28	17,50	34,62	70,27
	suša	63,32	19,71	12,93	21,93	13,94	3599,94
5	kontrola	81,89	12,74	10,87	21,27	35,39	113,38
	suša	56,19	20,34	17,25	26,65	11,46	774,61
6	kontrola	81,98	11,57	10,05	16,33	30,40	118,18
	suša	61,82	22,42	13,64	16,28	27,87	2060,34
7	kontrola	63,87	10,00	9,13	16,58	41,07	72,67
	suša	58,84	15,71	9,50	22,49	17,59	639,26
8	kontrola	81,42	11,05	10,82	20,13	38,90	94,50
	suša	74,58	12,63	13,23	24,16	24,08	378,79
9	kontrola	86,71	11,43	13,02	20,24	40,17	133,20
	suša	81,67	11,07	11,16	20,12	35,19	242,24
10	kontrola	87,23	11,52	10,58	21,35	40,62	100,07
	suša	74,37	12,05	10,68	21,67	20,54	133,66
11	kontrola	82,51	11,17	10,57	19,11	44,26	87,85
	suša	76,56	8,74	7,23	11,52	21,90	160,83

(RWC-relativni sadržaj vode, %SM-%suve materije)

• **Slika 4.** Efekti stresa izazvanog sušom na rast i koncentraciju prolina kod biljaka gajenih u polukontrolisanim uslovima. (**DT-** tolerantnost prema suši; **low**-niska; **medium**-srednja; **high**-visoka; **Ctrl**-kontrola; **Drought**-nedostatak vode; **Fresh weight (g/plant)**-sjeveža masa (g/biljci); **Dry weight (g/plant)**-suva masa (g/biljci); **% water content**- % vode; **Root matter (%DW)**- % suve materije korijena; **Above-ground matter (%DW)** - % suve materije nadzemnog dijela; **Proline log (mg/g DW)** - koncentracija prolina nakon logaritamske transformacije originalnih promjenljivih (mg/g SM))



- Prosječne vrijednosti za suhu masu, % SM, broj listova i prolin, potvrđuju uticaj stresa na ukupnu suhu masu, , čak sa 38% smanjenja SM, dok je uticaj na broj listova, % SM i prolin znatno veći.

Biljke izložene stresu u prosjeku imaju oko tri lista manje, za 4% veći % SM i sedmostruko veći sadržaj prolina (tabela 4.)

Parametar	Jedinica	Vrednost/ promena
Suva masa		
Kontrola	g/biljci	4,49
Razlika usled stresa	%	-38
Broj listova/biljci		
Kontrola	N	13,4
Razlika usled stresa	N	-2,7
% suve materije		
Kontrola	%	11,2
Razlika usled stresa	%	4,2
Sadržaj prolina		
Kontrola	µg/g SM	83
Razlika usled stresa	%	+704

Tabela 4. Uticaj vodnog deficita na sadržaj SM, broj listova, % SM i sadržaj prolina

5. ZAKLJUČAK

Biljke izložene stresu u prosjeku imaju oko tri lista manje, za četiri procenta veći % SM i sedmostruko veći sadržaj prolina.

Sinteza prolina je bila stimulirana nedostatkom vode u polukontrolisanim uslovima kod svih genotipova, a posebno kod nekih iz slabo tolerantne (2, 6) i visoko tolerantne (4) grupe, sa povećanjem od 160%. Genotipovi kod kojih je koncentracija prolina najmanje promijenjena su bili iz srednje (9, 11) i visoko (10) tolerantne grupe.

Prolin kao potencijalni parametar - indikator tolerantnosti genotipova prema suši je adekvatniji od ukupne suve mase.

Takodje ispitivanjem dokazano je da sadržaj vode u biljkama šećerne repe u toku vegetacionog perioda, kao i voda prisutna u korjenu repe nakon vađenja, značajno utiče na intenzitet disanja. Biljke gajene u uslovima nedostatka vode imaju veći intenzitet disanja od biljaka optimalno obezbjeđenih vodom. Intenzitet disanja i gubitak šećera u korjenu repe značajno zavise od količine vode prisutne u biljci u momentu vađenja. Suša pored efekta smanjenja sadržaja vode u biljnim tkivima, može u ranim fazama da izazove i sintezu nekih specifičnih jedinjenja u korjenu. Po ovom konceptu korjen je veoma značajan „senzor“ promjena u zemljištu (ne samo nedostataka vode već i promjena u mehaničkom sastavu) o kojima „obavještava“ izdanak putem „hemijskih signala suše“.

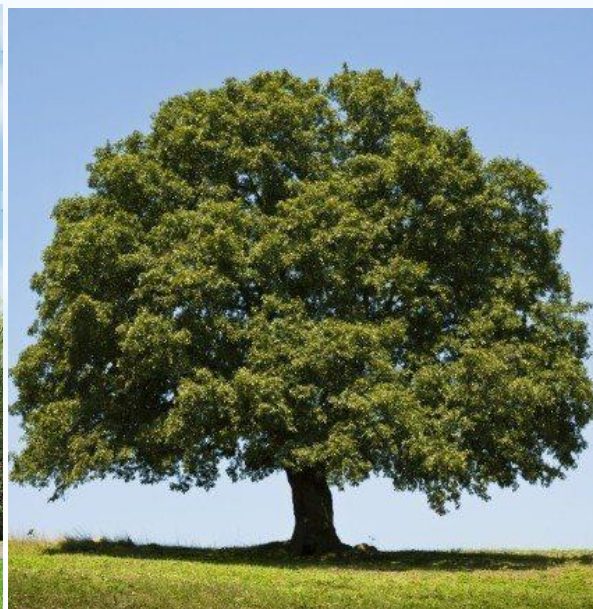
Naučni rad br.2

***Fiziološki aspekti otpornosti hrasta
lužnjaka (Quercus robur L.), cera
(Quercus cerris L.) i crne topole (Populus
nigra L.) u uslovima vodnog deficita-
Doktorska disertacija Topić, M., Novi
Sad: Prirodno-matematički fakultet,
Departman za biologiju i ekologiju***



Cilj rada

Cilj ovog rada je utvrđivanje znanja o fiziološkim otpornostima klonova crne topole (*Populus nigra* L.) i populacija hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.) i cera (*Quercus cerris* L.) na stresne uslove suše, kao i ispitivanje sposobnosti njihovog oporavka nakon ponovnog uspostavljanja optimalnog vodnog režima.



Materijal i metode

Eksperiment je izvodjen u trajanju od dvije godine u polu-kontrolisanim uslovima (stakleniku).

U prvoj godini istraživanja u eksperimentu je korišćen pet klonova crne topole:

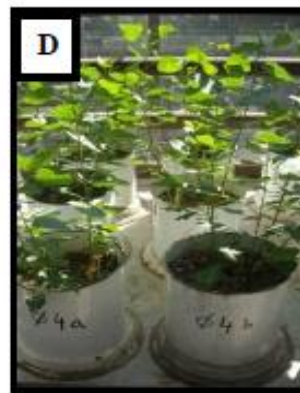
klon VII/25,

klon IX/30,

klon X/32,

klon XI/36

klon I/2 (Slika 1).



Slika 1. Klonovi crne topole (*Populus nigra* L.) gajeni u polu-kontrolisanim uslovima: klon VII/25 (A); klon IX/30 (B); X/32 (C); XI/36 (D); I/2 (E)

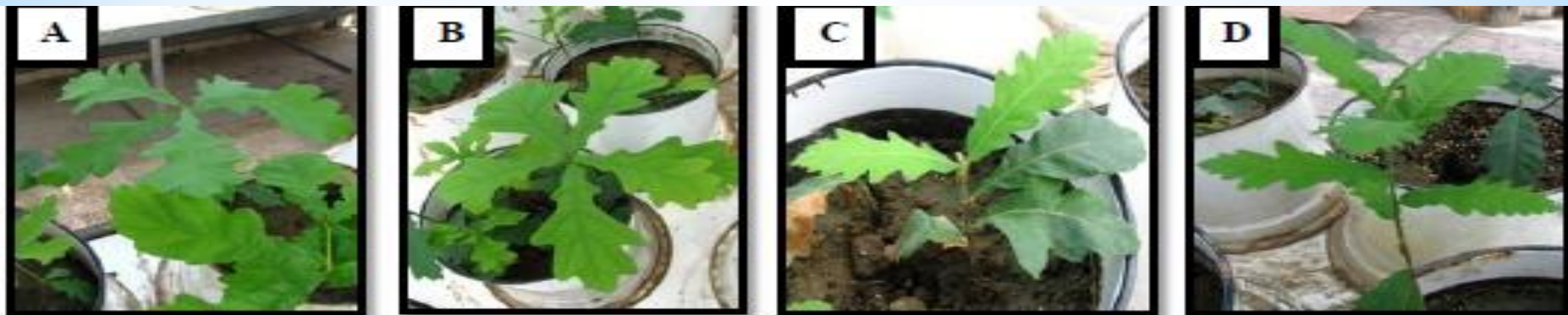
U drugoj godini u ogledu su korišćene četiri populacije hrasta

- **populacije hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.):**

1. populacija sa lokaliteta Morović (u daljem tekstu L1) (Slika 7A)
2. populacija sa lokaliteta Fruška gora, Ležimir (u daljem tekstu L2) (Slika 7B)

- **populacije hrasta cera (*Quercus cerris* L.):**

1. populacija sa lokaliteta Fruška gora, Ležimir, Ravne 1 (u daljem tekstu C1) (Slika 7C)
2. populacija sa lokaliteta Fruška gora, Ležimir, Ravne 2 (u daljem tekstu C2) (Slika 7D)



Slika 2. Populacije hrasta gajene u polu-kontrolisanim uslovima: prva populacija hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.) L1 (A); druga populacija hrasta lužnjaka (*Quercus robur* L.) L2 (B); prva populacija hrasta cera (*Quercus cerris* L.) C1 (C); druga populacija hrasta cera (*Quercus cerris* L.) C2 (D)

Biljke stare tri mjeseca podvrgnute su tretmanima. Prvi tretman je bio kontrolni (optimalna vlažnost zemljišta) (K), drugi je predstavljao sušu praćenu oporavkom nakon ponovnog uspostavljanja optimalne vlažnosti zemljišta (S1), a treći je bio tretman konstantne suše (S2).

Morfo-anatomska ispitivanja

	<i>Naziv parametra</i>	<i>Jedinica</i>
Morfometrijski parametri	Relativna promena visine biljaka	%
	Apikalni rast	cm
	Relativna promena broja listova	%
	Relativni stepen rasteња	
	Indeks tolerancije na stres izračunat na osnovu visine biljke	%
Parametri koji se odnose na stome	Dužina stoma	μm
	Širina stoma	μm
	Površina stoma	μm^2
	Gustina stoma	broj stoma mm^{-2}
	Gustina epidermalnih ćelija	broj ep.ćel. mm^{-2}
	Indeks stoma	%

Broj stoma i broj epidermalnih ćelija, kao i dimenzije stoma (dužina, širina i površina) na abaksijalnom epidermisu hrastova određeni su sa otisaka epidermisa koji su uzimani uz pomoć bezbojnog laka za nokte i selotejpa. Uzeto je 15 otisaka po populaciji (5 za svaki tretman).

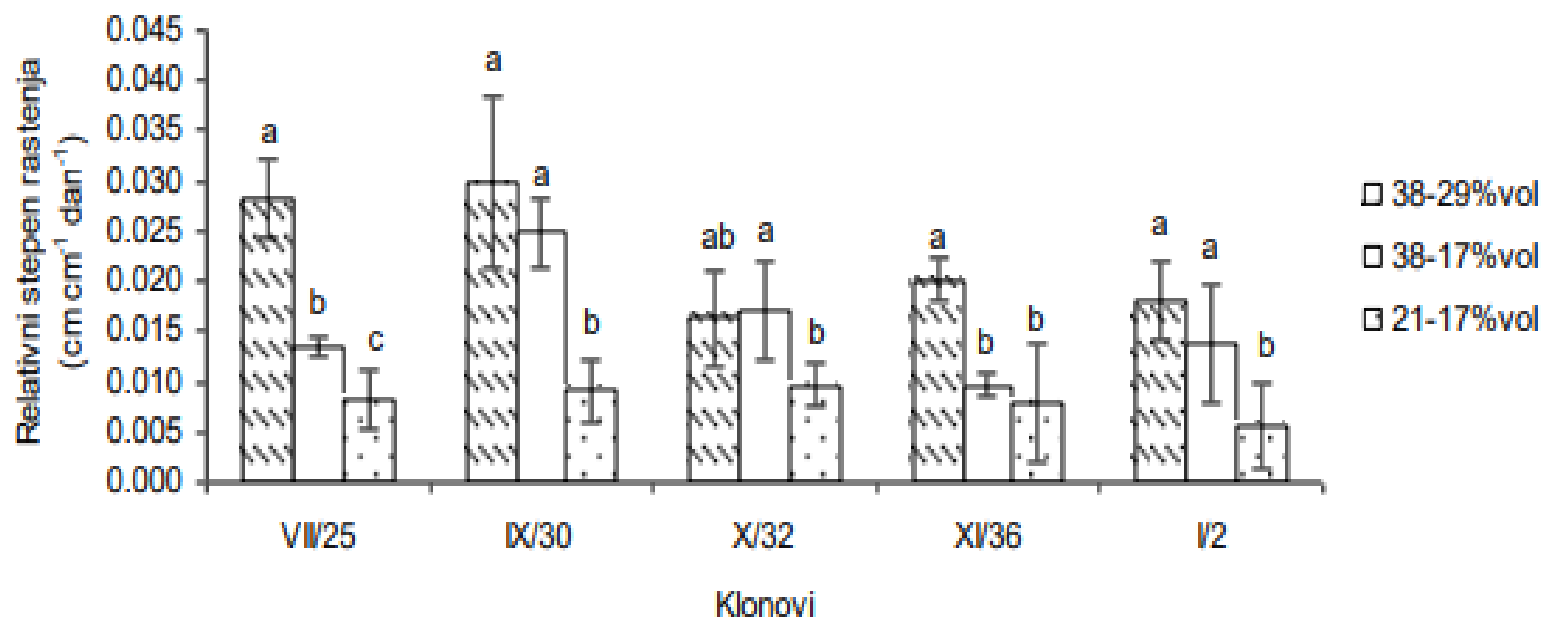
• **Biohemijska istraživanja**

Sadržaj prolina. Sadržaj amino-kiseline prolin određen je metodom po Bates et al. (1973). 1 g mladih listova usitnjen je i suspendovan u 10 ml 3% sulfosalicilne kiseline, čime je izvršeno taloženje. Centrifugiranjem (10 minuta na 3000 o min⁻¹) su odstranjeni proteini i ostaci ćelija. U svaku epruvetu je odmereno po 2 ml bistrog rastvora prolina iz supernatanta, kiselog ninhidrinskog reagensa i glacijalne sirćetne kiseline. Epruvete su potom inkubirane 15 minuta u vodenom kupatilu na 100 stepeni, pri čemu je nastalo jedinjenje prolina i ninhidrina crvene boje – Ruhemann-ov ljubičasti kompleks. Nakon inkubacije, epruvete su premještene na led da bi se zaustavila dalja reakcija. Formirani bojeni kompleks ninhidrina i prolina je ekstrahovan dodavanjem 4 ml toluola u ohladjene uzorke. Apsorbanca toluolskog ekstrakta prolina očitana je na UV-VIS spektrofotometru (model DU-65, Beckman) na talasnoj dužini od 520 nm. Koncentracija slobodnog prolina je izražena u µg g⁻¹ svježe biljne mase.

Rezultati rada I diskusija

- Prva godina istraživanja

Klonovi crne topole

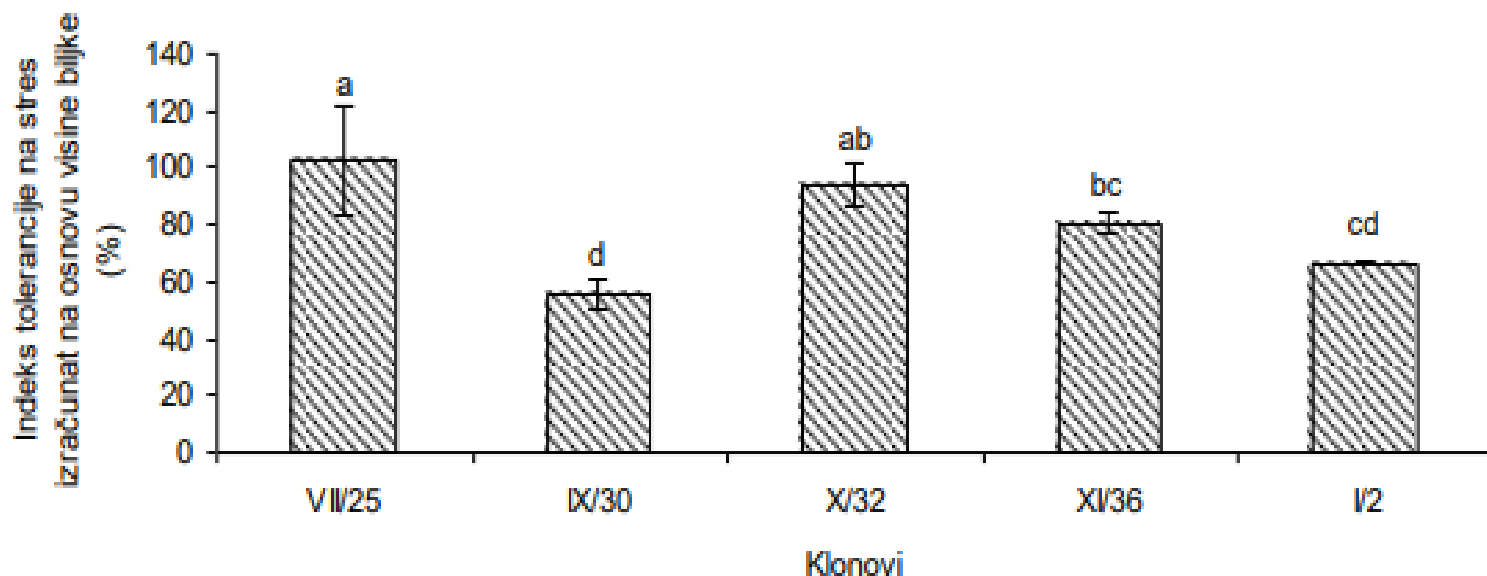


Slika 17. Relativni stepen rastenja u zavisnosti od momentalne vlažnosti zemljišta

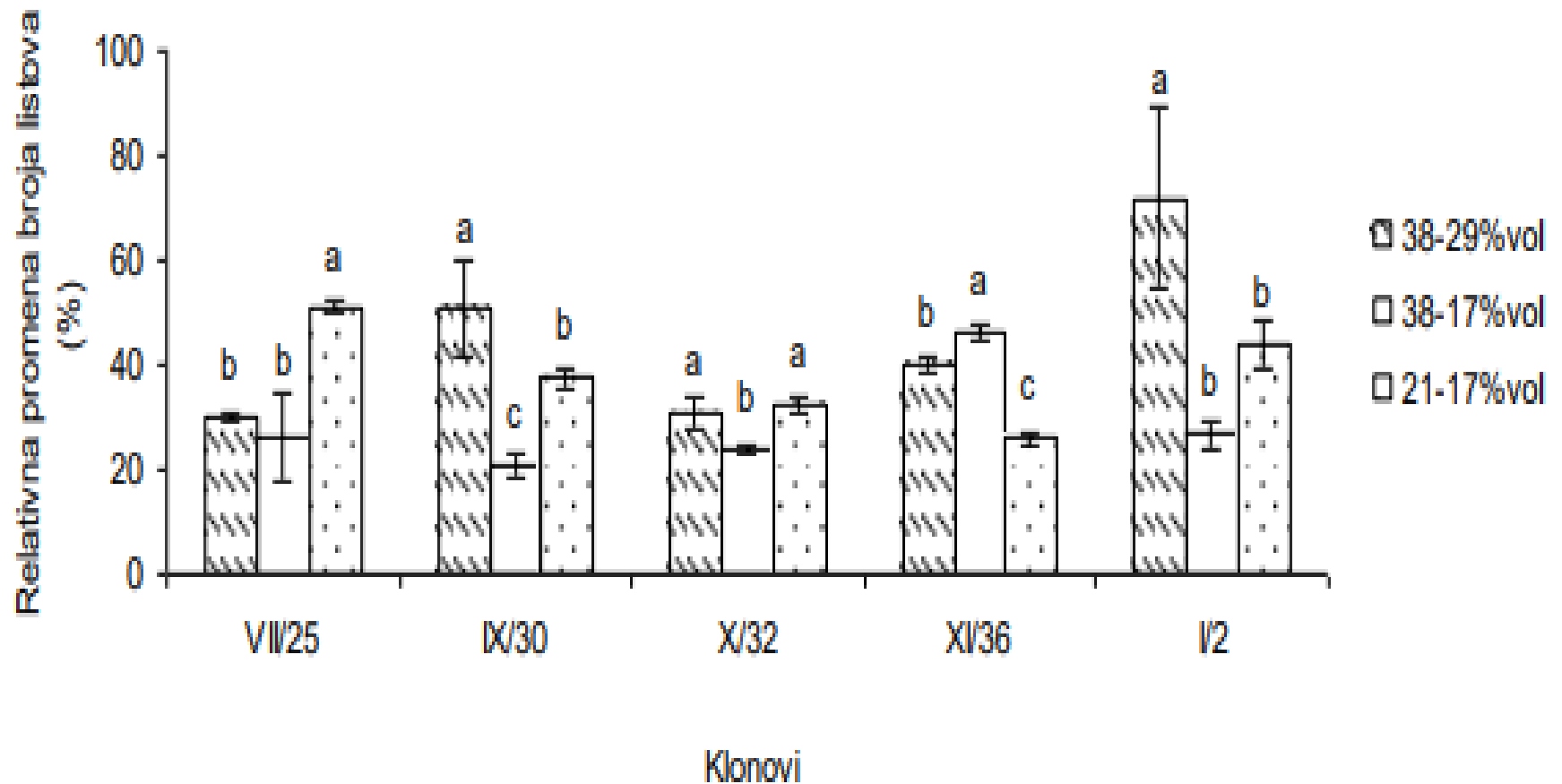
(NZR redom po klonovima: 0,005; 0,009; 0,007; 0,006; 0,008)

Vrijednosti indeksa tolerancije na stres izračunatog na osnovu visine biljke (eng. Plant height stress tolerance index, PHSI) ukazuju na specifična variranja medju ispitivanim genotipovima . Najveća vrijednost ovog indeksa je uočena kod klona VII/25, i bila je skoro duplo veća od one kod klona IX/30, koji je pokazao najmanji PHSI.

$$PHSI(\%) = \frac{\text{visina biljke koja je izložena tretmanu stresa}}{\text{visina biljke na kontrolnom tretmanu}} * 100$$

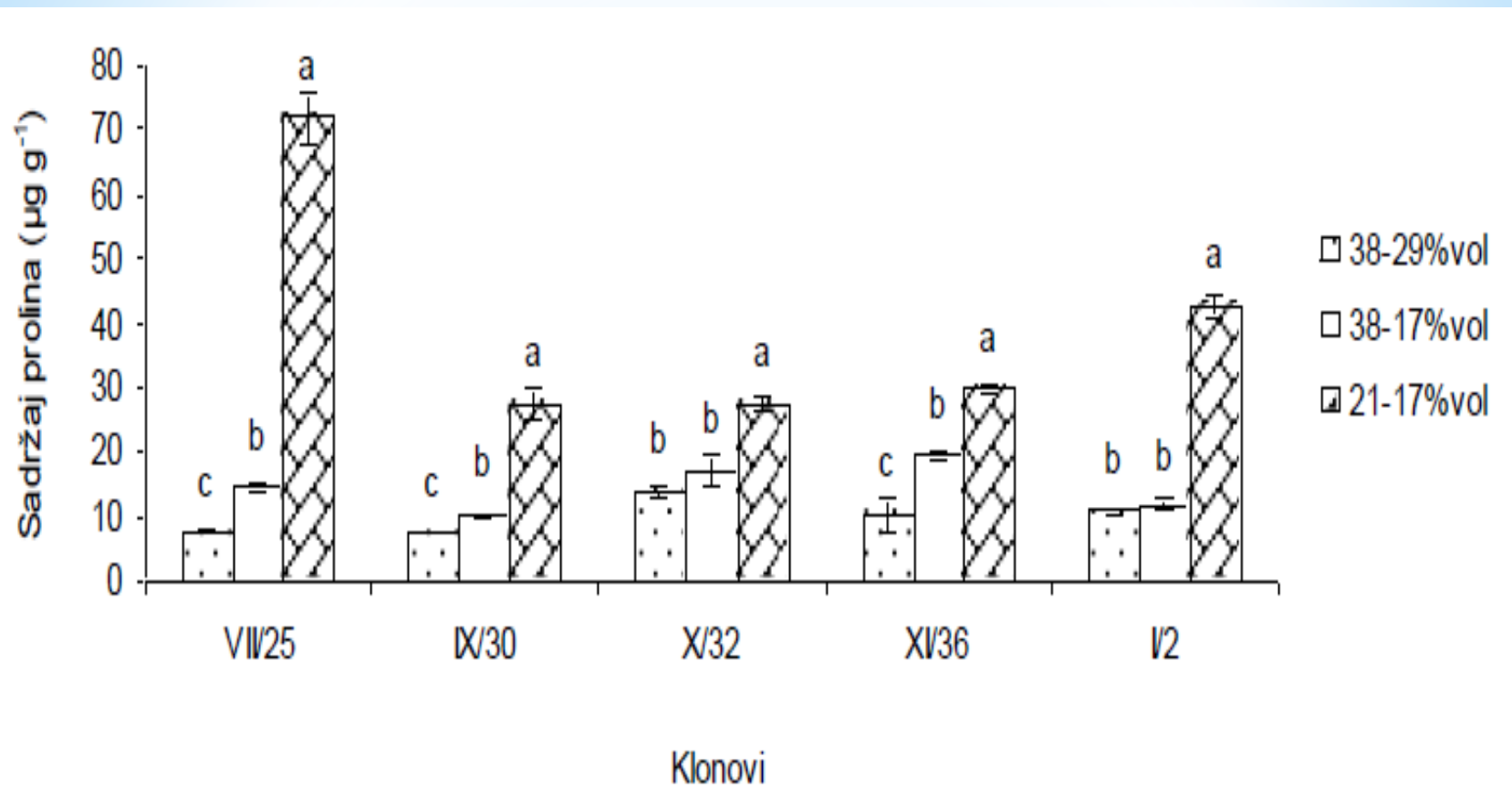


Slika 18. Indeks tolerancije na na stres izračunat na osnovu visine biljke kod ispitivanih klonova topole (NZR: 14,607)



Slika 16. Relativna promena broja listova u zavisnosti od momentalne vlažnosti zemljišta (NZR redom po klonovima: 7,688; 8,840; 3,178; 2,182; 16,630)

Biohemijske analize

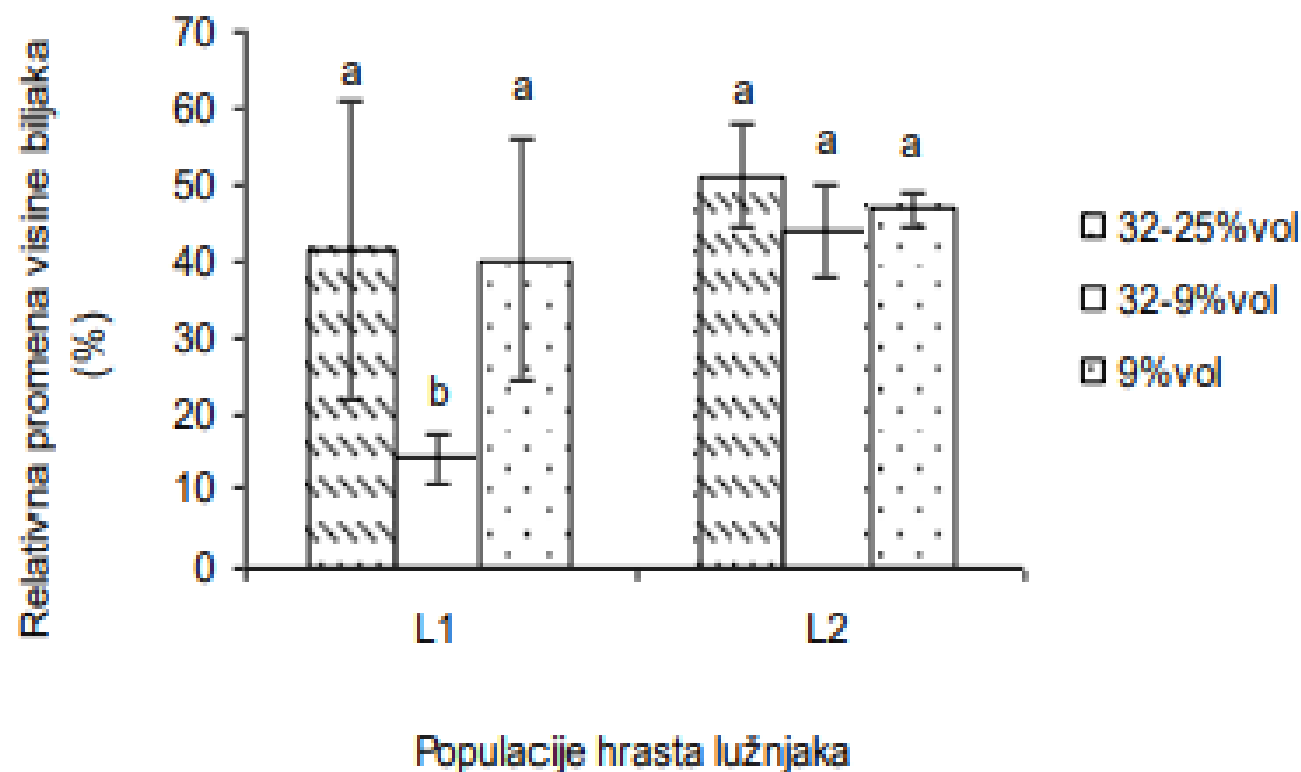


Slika 3. Sadržaj prolina u zavisnosti od momentalne vlažnosti zemljišta

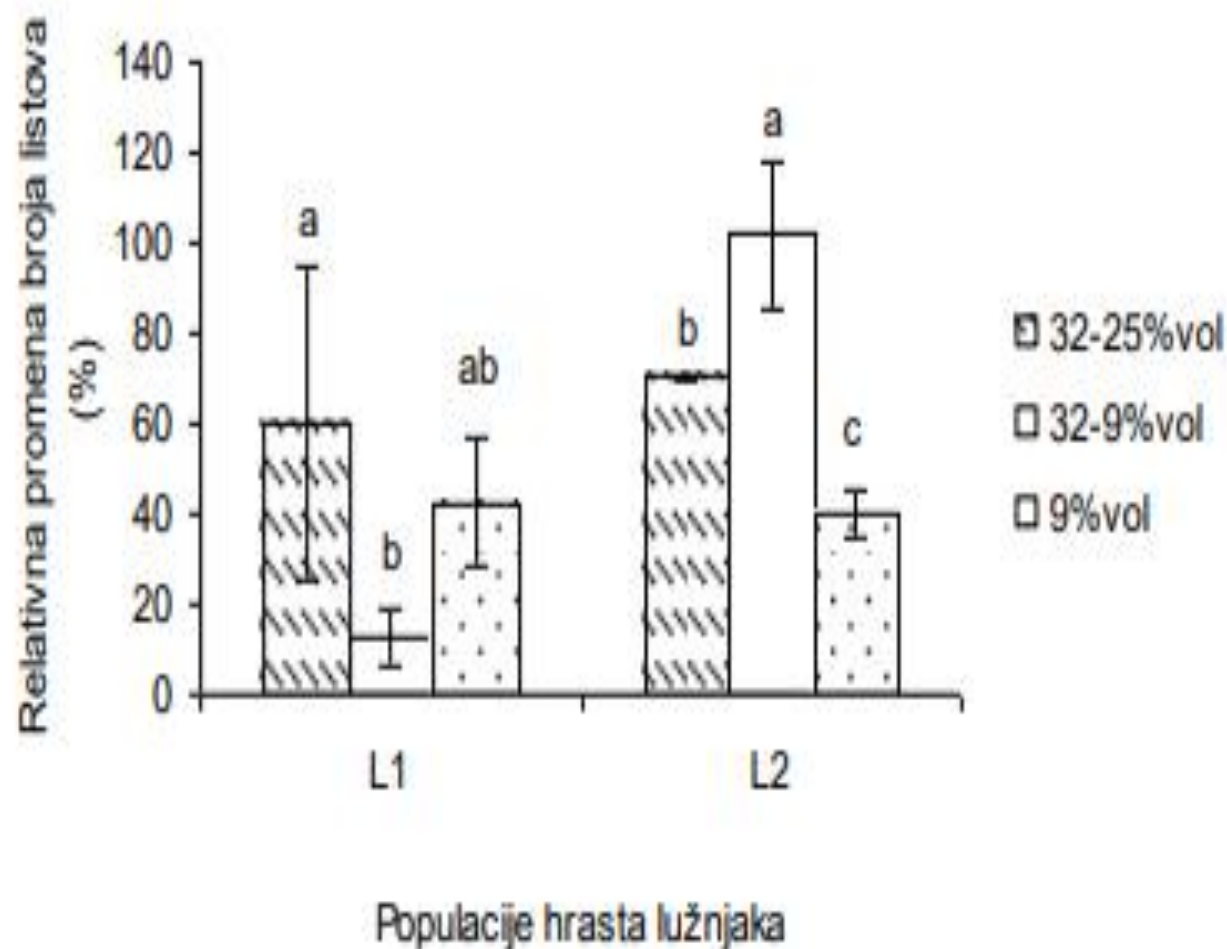
(NZR redom po klonovima: 4,665; 2,711; 3,449; 3,005; 2,285)

•Druga godina istraživanja

Populacije hrasta lužnjaka

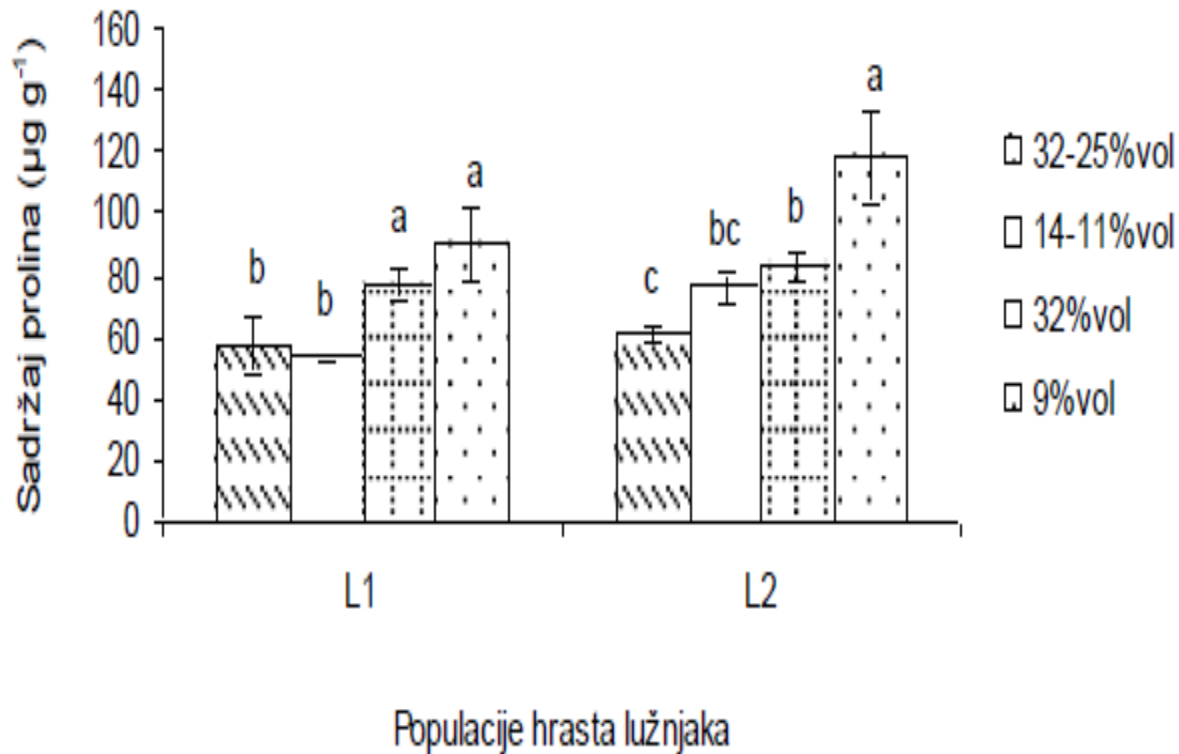


Relativna promena visine biljaka kod populacija hrasta lužnjaka u zavisnosti od momentalne vlažnosti zemljišta (NZR za L1: 23,355; NZR za L2: 8,487)



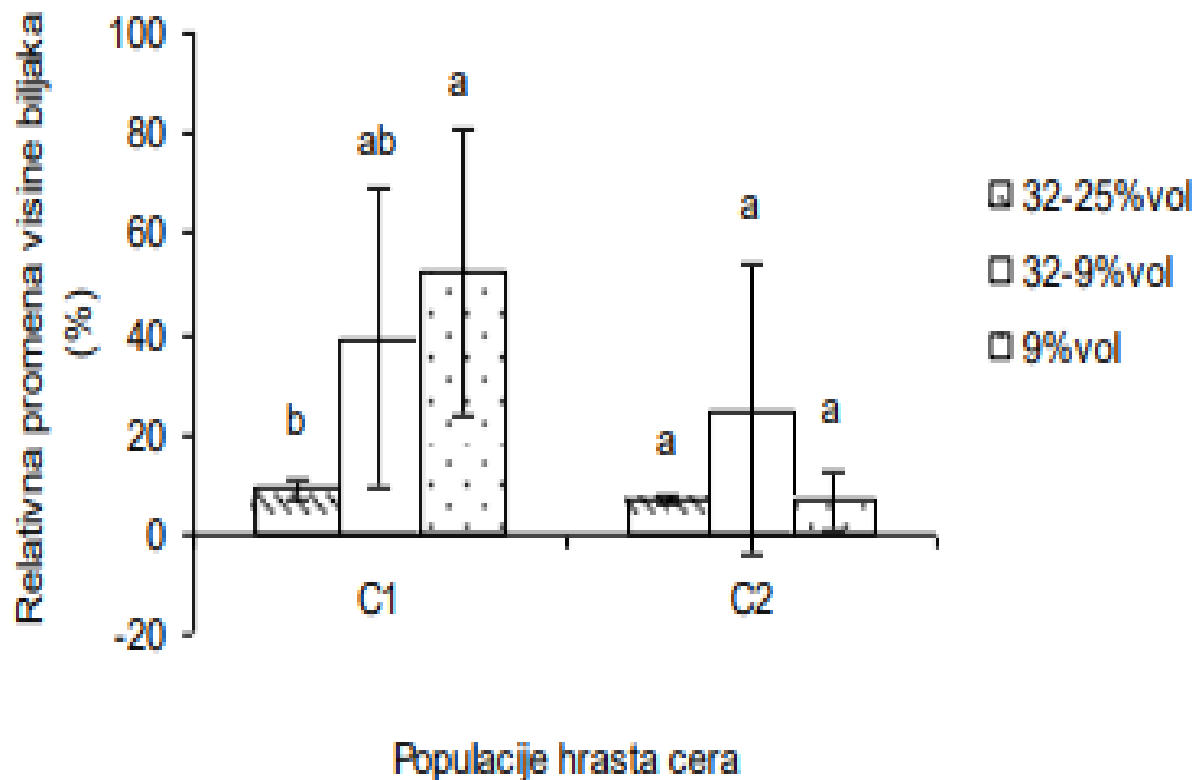
46. Relativna promena broja listova kod populacija hrasta lužnjaka u zavisnosti od momentalne vlažnosti zemljišta (NZR za L1: 34,944; NZR za L2: 15,973)

Biohemijska analiza



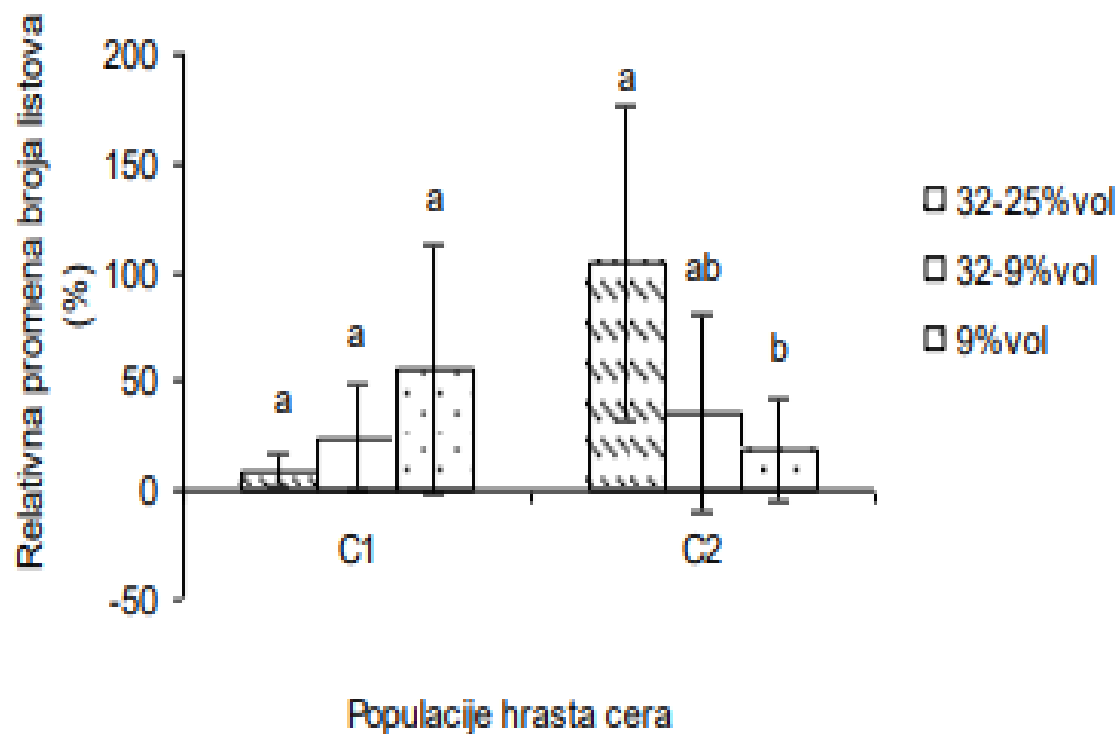
Slika 4. Sadržaj prolina kod populacija hrasta lužnjaka u zavisnosti od momentalne vlažnosti zemljišta (NZR za L1: 14,511; NZR za L2: 15,762)

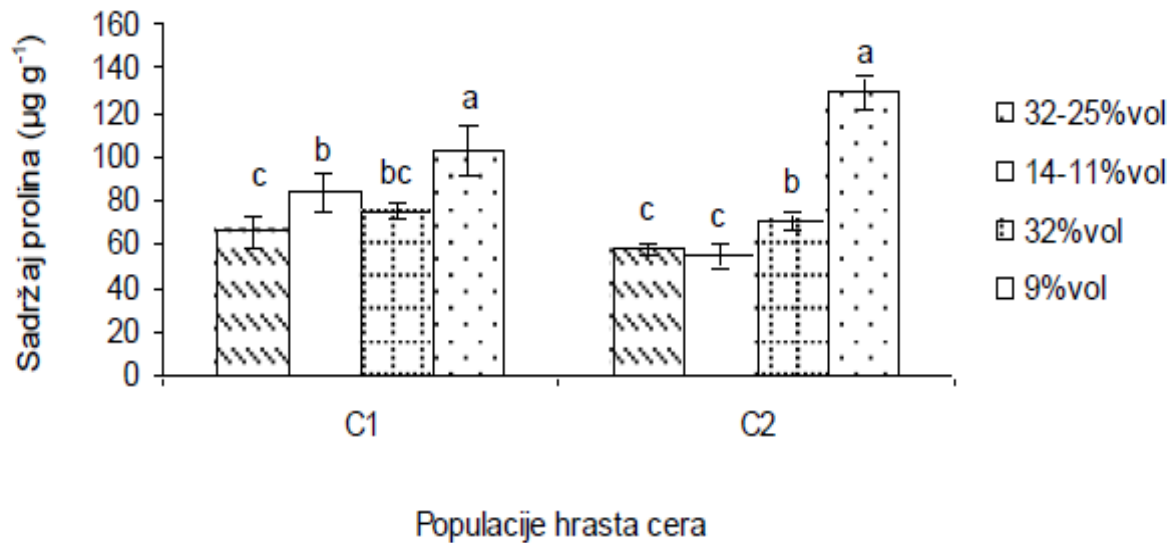
Populacije hrasta cera



48. Relativna promena visine biljaka kod populacija hrasta cera u zavisnosti od nomenatne vlažnosti zemljišta (NZR za C1: 38,181; NZR za C2: 27,624)

Sušni tretmani (32-9% vol i 9% vol) su takodje usloveli populacijski-specifično variranje i kada je u pitanju relativni broj listova. Kod populacije C2, vrijednosti ovog parametra imale su tendenciju opadanja, a kod populacije C1 tendenciju povećanja, sa smanjenjem momentalne vlažnosti zemljišta. Dobijene vrijednosti na sušnim tretmanima se nisu razlikovale u odnosu na kontrolu kod populacije C1. Međutim, kod populacije C2, relativan broj listova je na tretmanu konstantne suše (9% vol) bio značajno manji nego na kontroli.



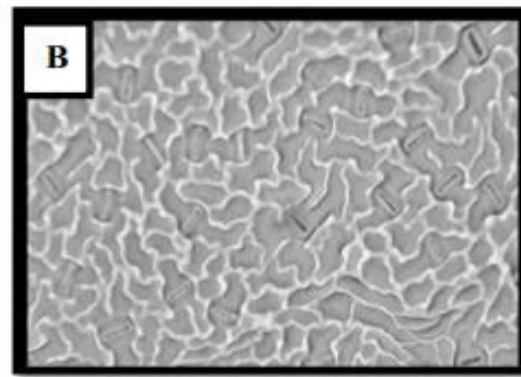
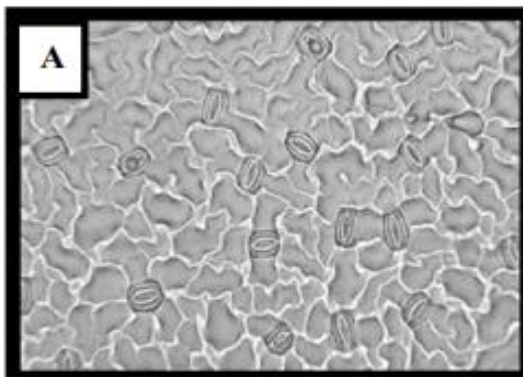


Slika 5. Sadržaj prolina kod populacija hrasta cera u zavisnosti od momentalne vlažnosti zemljišta (NZR za C1: 15,583; NZR za C2: 10,219)

Povećanje sadržaja prolina pod uticajem vodnog deficita, bilo je dominantno na tretmanu konstantne suše (S2) u oba ogleđa. Najveća koncentracija prolina u listovima na pomenutom tretmanu u odnosu na kontrolu zabilježena je kod klonova topole VII/25 i I/2, populacije hrasta lužnjaka L2 i populacije hrasta cera C2. Oporavak na tretmanu S1 je uslovio redukciju ovog parametra, a dobijene vrijednosti su bile slične ili veće od onih na kontroli.

Broj stoma i broj epidermalnih ćelija, i dimenzije stoma

Kod tretmana konstantne suše (S2) je u većoj mjeri uticao na redukciju dimenzija stoma nego tretman suše praćene oporavkom (S1). Populacija hrasta lužnjaka L2 pokazala je veliki stepen prilagodjenosti na sušu jer je na tretmanu S2 imala značajno veću gustinu stoma i manje dimenzije stoma u poredjenju sa kontrolom. Kod biljaka iz populacije hrasta cera C2, takodje su uočene značajno manje dimenzije stoma u uslovima jake suše (S2) kao vid adaptacije na vodni deficit. Kod populacije hrasta lužnjaka L1 i populacije hrasta cera C1 nisu utvrdjene značajne razlike medju tretmanima u dimenzijama stoma, a takodje niti u njihovoj gustini.



Zaključak

Akumulacija prolina u uslovima vodnog deficita smatra se adaptivnim odgovorom koji povećava opstanak biljaka i vodni status biljnih tkiva. Sadržaj prolina u listovima ispitivanih biljnih vrsta zavisio je od jačine vodnog deficita, kao i to da je promjena sadržaja prolina bila genotipski specifična.

Zaključujemo da se prolin ponaša kao osmotski aktivna supstanca i tako sprečava gubitak vode iz ćelija i štiti biljku od isušivanja. Ovo se može smatrati kao fiziološki odgovor biljaka na sušu, pa se prolin može koristiti kao biohemijski marker inteziteta stresa izazvanog ovim poremećajem okoline.

Relativan broj listova je kod populacije C1 takodje je pokazao tendenciju povećanja sa napredovanjem vodnog deficita na primjenjenim tretmanima. Na osnovu uticaja tretmana konstantne suše (S2) na visinu biljke i apikalni rast u odnosu na kontrolu, može se uočiti veći stepen tolerantnosti na vodni deficit hrastova u odnosu na topole.

Što se tiče stoma, uočene su značajno manje dimenzije stoma I veća gustina stoma u uslovima jake suše (S2) kao vid adaptacije na vodni deficit.

Hvala na pažnji!