



Prirodno-matematički fakultet

Biologija

**Seminarski rad :**

**Preživljavanje biljaka u uslovima mineralnog stresa (suficit)**

Mentor : Prof dr Danka Cakovic

Student : Jovana Bojovic 2/21

Podgorica, mart 2022

## **Mineralni stres? Suficit?**

Mineralni stres predstavlja nedostatak(deficit) ili suvišak(suficit) esencijalnih elemenata kod biljaka. Svaki manjak ili višak ovih elemenata od optimuma dovodi do stresa kod biljaka.

Suficit ili kritična koncentracija mineralnih materija kako se češće naziva, relativan je pojam jer apsolutna dovoljnost se ne može odrediti.

## **Kako autohtone trave iz Južne Amerike podnose višak cinka u zemljestu ? Fiziološki pristup**

### **1.Uvod**

Botanička istraživanja koja su sprovedena u prirodnim područjima bioma Pampa omogućila su kategorisanje 2.220 vrsta biljaka od kojih je više od 500 vrsta trava. Najveće geografsko rasprostranjenje imaju vrste *Axonopus affinis*, *Paspalum notatum* i *Paspalum plicatulum*. Ove vrste su evoluirale i prilagodile se na kiselo zemljište koje je siromasno organskim materijama. Ova studija imala za cilj da ispita fiziološke i biohemijske odgovore autohtonih trava Južne Amerike koje su izložene prekomjernoj količini Zn u zemljestu.

### **2.Materijal i metode**

#### **a) Uzorkovanje zemljišta**

Tipično zemljište uzorkovano je na 0-20 m dubine u neantropogenom području u Južnom Brazilu. Uzorci zemljišta su osušeni na vazduhu i propušteni kroz sito od 2 mm.

#### **b) Plodnost zemljišta**

Uzorci su podijeljeni u plastične vreće. U svakoj vreći je bilo po 10 kg zemljišta. Zatim je dodato 230 gr  $\text{CaCO}_3$  i 300 gr  $\text{MgO}$  na 1kg zemljišta. U vrećice je zatim dodata destilovana voda i onda je uslijedila inkubacija 30 dana. Tokom perioda inkubacije, vrećice su se otvarale svaka dva dana radi homogenizacije i vraćanja vlažnosti zemljestu. Zatim je dodato 40 mg P i 100 mg K, superfosfatom ( $\text{PO}_2$ ) i kalijum hloridom (KCL). Kasnije su uzorcima dodate doze Zn: 30, 60, 120 ili 180 mg Zn na 1kg zemljišta, korištenjem  $\text{ZnSO}_4$  i  $\text{ZnCl}_2$ . Vreće su inkubirane još 180 dana, a nakon toga zemljište je osušeno na vazduhu, prosijano i stavljeno u posude od 5 kg.

#### **c) Opis eksperimenta**

Istraživanje je sprovedeno u stakleniku na Univerzitetu Santa Maria (odsjek za biologiju, Južni Brazil). U toku eksperimenta u stakleniku je održavana temperatura vazduha od 24°C i relativna vlažnost vazduha 50%. Eksperimenti su bili: kombinacija četiri doze Zn od 30, 60, 120 ili 180 mg Zn na 1kg zemljišta, i tri vrste trave porijeklom iz bioma Pampa : *Axonopus affinis*, *Paspalum notatum* ili *Paspalum plicatulum*. Nakon što su biljke sakupljene, nadzemni izdanci su bili odvojeni, oprani i prenijeti u plastične kutije od 15 L u kojima je pijesak bio podloga. Biljke su uzgajane tokom 30 dana i snadbijevane hranjivim materijama. Nakon tog

perioda, tri ujednačena izdanka presađena su u svaki lonac od 5 kg koji sadrži zemljište, kao što je prethodno opisano. Nakon 90 dana rasta, izvršene su procjene.

### **Koje procjene su izvršene?**

#### **a) Razmjena gasova**

Razmjena gasova mjerena je nakon 90 dana. Dobijeni su sledeći parametri: neto brzina fotosinteze, međucelijska koncentracija CO<sub>2</sub>, brzina transpiracije, efikasnost korištenja vode.

#### **b) Ekstrakcija fotosintetičkih pigmenata**

Koncentracije hlorofila i karotenoida određivane su prema tačno utvrđenim metodama i formulama. Uzorci koji sadrže 0,05 g smrznutog uzorka listova u 40 ml dimetilsulfoksida inkubirani su na 65 °C. Apsorbancija supernatanta mjerena je spektrofotometrom na 663, 645 i 470 nm za određivanje hlorofila α, hlorofila β, odnosno karotenoida.

#### **c) Vodonik peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Količina od 0,1 gr svježeg materijala je homogenizovana u 2 mL trihlorsircetne kiseline, zatim centrifugirana tokom 15 minuta. Najveći dio ovog ekstrakta (0,5 mL) je pomiješan s 0,5 mL kalijum-fosfatnog pufera i 1 mL kalijum jodida. Nakon toga, apsorbancija je određena na 390 nm.

#### **d) Akumulacija suve mase i nutritivni sastav**

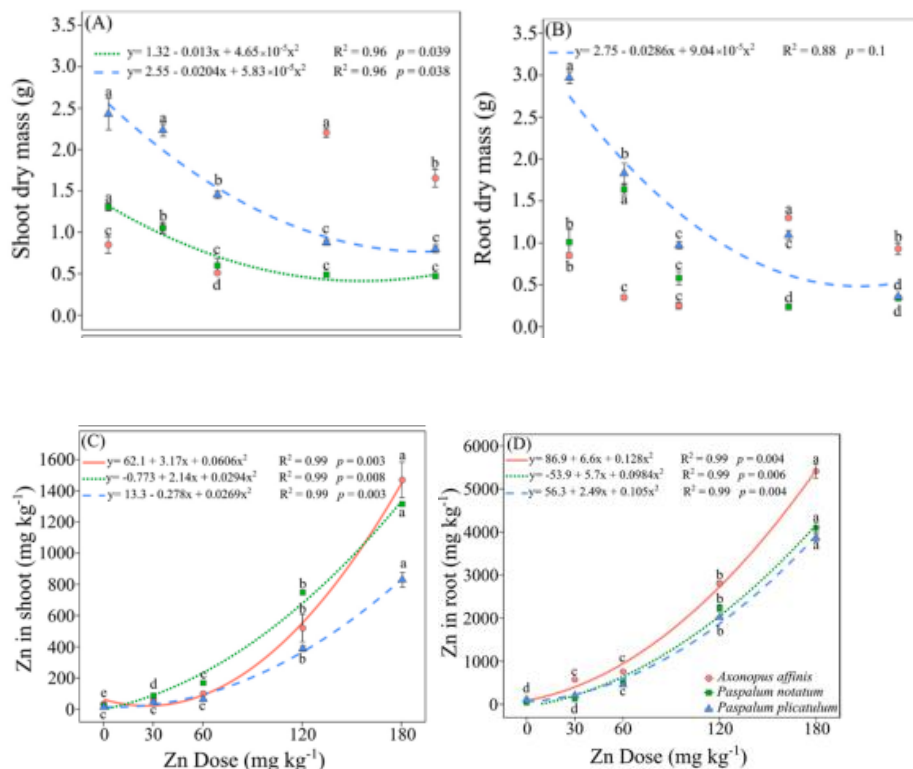
Dvije biljke iz svakog ponavljanja (eksperiment se ponavljao četiri puta) korištene su za određivanje suve mase i za određivanje nutritivnog sastava. Uzorci korijena i izdanaka stavljeni su u papirne vrećice i sušeni u susilici s prisilnom cirkulacijom vazduha na 65 °C. Za određivanje suve mase organa korištena je vaga visoke preciznosti. Osušeni uzorci su mljeveni u Wiley mlinu. Koncentracije Ca, Mg, Cu, Zn, Fe i Mn analizirane su u atomskom apsorpcijskom spektrofotometru. Koncentracija P i koncentracija K određena je korištenjem UV-vidljivog spektrofotometra na 882 nm.

#### **e) Raspodjela cinka u biljnim organima**

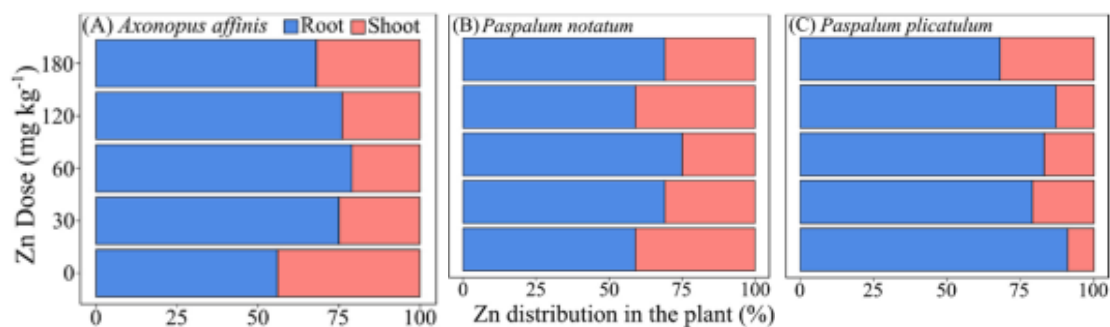
Ukupna količina Zn nakupljena u biljnim organima dobijena je množenjem koncentracije Zn u svakom organu.

### 3.Rezultati

a) Nakupljanje suve mase na izdancima *Paspalum notatum* i *Paspalum plicatulum* smanjivala se kako su se doze Zn u zemljestu povećavale (slika 3A). Isto tako, akumulacija suve mase korijena ovih vrsta smanjivala se s povećanjem Zn u ispitivanju zemljestu (slika 3B). Vrsta *Axonopus affinis* pokazala je suprotno ponašanje od ostalih. Za ovu vrstu, akumulacija suve mase izdanaka i korijena bila je veća u najvišim dozama Zn. Koncentracija cinka u izdancima i korijenu ove tri vrste rasla je kako su se povećavale doze Zn u zemljestu.



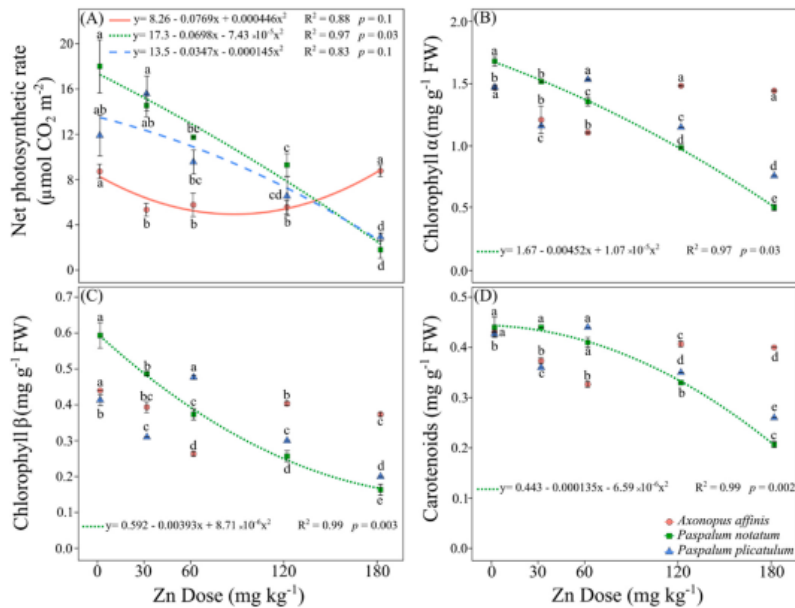
Veće doze Zn uticale su i na unutrašnju distribuciju Zn u biljkama. Sveukupno, tkivo korijena biljaka nakupilo je veće količine Zn, od izdanaka.



Slika 4 : Relativna distribucija unosa cinka (Zn) u biomasu korijenova i izdanaka tri autohtone vrste trave Pampa.

## b) Fizioloske karakteristike biljaka

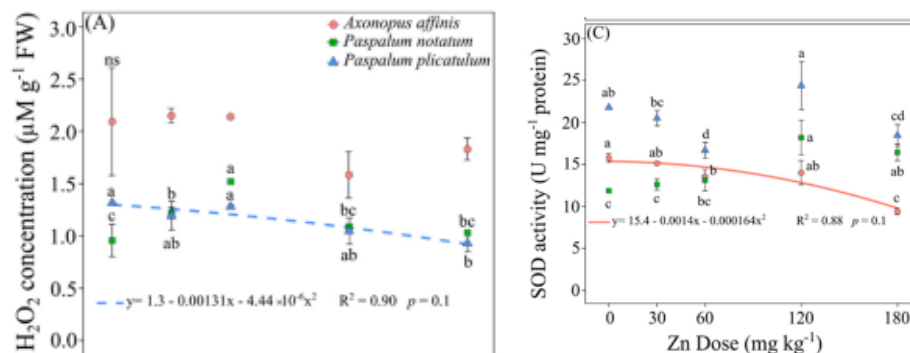
Neto brzina fotosinteze i koncentracija fotosintetskih pigmenata (hlorofili i karotenoidi) imali su slično ponašanje unutar doza Zn za vrste *Paspalum notatum* i *Paspalum plicatum*, koje je pokazalo smanjenje ovih parametara s najvećim dozama Zn (slika 5). S druge strane, vazno je istaci da je *Axonopus affinis* povećao i brzinu fotosinteze i koncentraciju fotosintetskih pigmenata (slično ponašanje kao uočeno za proizvodnju biomase), što ukazuje na toleranciju i prilagodljivost ove biljne vrste na zemljišta koja su kontaminirana Zn-om.



Slika 5 : Neto brzina fotosinteze(A), koncentracija hlorofila  $\alpha$  (B), hlorofila  $\beta$  (C) i karotenoida (D) tri autohtone vrste trava (*Axonopus affinis*, *Paspalum notatum* i *Paspalum plicatum*)

## c) Aktivnost antioksidativnih enzima I indikatori oksidativnog stresa

Koncentracija  $H_2O_2$  u izdancima *Paspalum plicatum*-a i *Paspalum notatum*-a opadala je s povećanjem Zn u tlu, zato što se povećavala aktivnost antioksidativnih enzima superoksid dismutase i gvajakol peroksidaze. Aktivnost superoksid dismutaze *Axonopus affinis*-a i gvajakol peroksidaze smanjena je nakon što je Zn bio povećan u tlu.



## **4.Diskusija**

### **a) Promjene u rastu biljke kao odgovor na toksičnost Zn**

Značajan gubitak vitalnosti celija na vrhovima korijena i povećan nivo lignifikacije ovog tkiva imali su značajnu ulogu. U tom pogledu zanimljivo je primijetiti da je prisutnost kristala u parenhimu biljaka uzgojenih u visokim koncentracijama Zn koja je otkrivena mikroskopskim studijama ometala transport hranjivih materija i, prema tome uticala na smanjen rast korijena. S druge strane, *Axonopus affinis* se ponašao drugačije od drugih vrsta budući da je povećao proizvodnju biomase čak i pod vrlo visokim koncentracijama Zn. Ovaj specifični ishod sugerise da *Axonopus affinis* ima veću brzinu rasta nego kod drugih vrsta, što ima za rezultat veći kapacitet usvajanja hranjivih materija, a samim time i akumulaciju u biljnim tkivima.

### **b) Promjene u fotosintezi**

Smanjenje brzine fotosinteze *Paspalum notatum* i *Paspalum plicatum* kada su rasli u zemljištu s visokim dozama Zn mogu biti povezani s negativnim učincima Zn na koncentraciju fotosintetskih pigmenta. Višak Zn u biljci stimulise zamjenu Mg u aktivnom mjestu enzima Rubisco, smanjujući njegovu enzimsku aktivnost i inhibirajući PSII i na taj način smanjujući asimilaciju C. S druge strane, za vrstu *Axonopus affinis*, koncentracija pigmenta i neto brzina fotosinteze bile su veće kako se povećavala količina dostupnosti Zn u tlu.

### **c) ROS i antioksidativni sistem kao odgovor na toksičnost Zn**

Biljke prirodno proizvode ROS, uglavnom u hloroplastima i mitohondrijima, kao nusproizvode aerobnog metabolizma i fotooksidativnih procesa. Kada su biljke u stresnim situacijama, kao što je višak dostupnosti Zn u tlu, može se započeti prekomjerna proizvodnja ROS. Kako bi se izbjeglo štetno djelovanje prekomjerne proizvodnje ROS-a biljke imaju složen antioksidativni obrambeni sistem. Enzimi superoksid dismutaza (SOD) i guaiacol peroksidaza (POD) dio su ovog sistema, koji djeluju tako da prilagode nivo ROS-a kako bi spriječili oksidativna oštećenja. Ove tri vrste *Axonopus affinis*, *Paspalum plicatum* i *Paspalum notatum* razlikovale su se u pogledu skladištenja metala u tkivima, u pogledu intenziteta oksidativnog stresa, brzine fotosinteze i proizvodnje biomase, i to sve ukazuje na različitu prilagodljivost tlima kontaminiranim Zn-om.

## **5.Zaključak**

U ovoj studiji koristene su trave porijeklom iz Južne Amerike: *Axonopus affinis*, *Paspalum notatum* i *Paspalum plicatum*. Pokazale su zanimljive osobine koje su važne za kontrolu velikih količina Zn u zemljištu. Vrsta *Axonopus affinis* je povećavala koncentraciju fotosintetskih pigmenata i brzinu fotosinteze uz veću dostupnost Zn, i povećavala akumulaciju biomase. Osim toga, kada je *Axonopus affinis* kultivisana pod prekomjernom količinom Zn, nije pokazala povećanje vodonik peroksida što sugerise da ova vrsta nije bila pod stresom. S druge strane, osjetljive su bile vrste *Paspalum plicatum* i *Paspalum notatum* na visoke koncentracije Zn u zemljištu, kada njihova antioksidativna obrana nije bila sposobna da umanjí oksidativna oštećenja, što je rezultiralo smanjenom brzinom fotosinteze, malom proizvodnjom biomase i smanjenim rastom. Dakle, vrsta *Axonopus affinis* pokazuje velike biohemijske i fiziološke adaptacije koje su od velikog značaja za fitoremedijaciju u vinogradarskim zemljištima koja su kontaminirana Zn.