

Uticaj azot-monoksida na koncentraciju hlorofila a i b kod vrste *Pisum sativum* L.

Ispitivan je uticaj azot-monoksida (NO) na koncentraciju hlorofila a i b kod graška – *Pisum sativum*. U eksperimentu su praćene 2 grupe jedinjenja kojima je grašak tretiran: kalijum-heksacijanoferat(III), kao druga kontrola, i natrijum-nitroprusid (SNP), kao donor azot-monoksida. Voda je predstavljala prvu kontrolu. Koncentracije sa kojima je rađeno varirale su 0.1-100 μM . Za određivanje količine hlorofila a i b korišćene su dve metode: ekstrakcija hlorofila iz biljnog materijala i spektrofotometrija dobijenih rastvora ekstrakata. Koncentracija $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ pri kojoj je došlo do stvaranja najveće količine hlorofila a i b (81.69 $\mu\text{mol/L}$) iznosila je 10 μM , što inače predstavlja i najveću ostvarenu ukupnu koncentraciju hlorofila, dok je analogna koncentracija SNP (na kojoj je prisutno 65.33 $\mu\text{mol/L}$ hlorofila) iznosila 100 μM . Na povećanje koncentracije hlorofila b uticao je $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, dok je sa druge strane SNP doveo do povećanja količine hlorofila a. Azot-monoksid je ostvario bolji efekat na ukupnu koncentraciju hlorofila a i b kod *Pisum sativum* u odnosu na vodu, dok se od njega boljim pokazao kalijum-heksacijanoferat(III) i to za 17.5%.

Uvod

Biljke kao fotoautotrofi su sposobne da uz pomoć apsorbovane sunčeve svetlosti od neorganskih (CO_2 , H_2O), proizvode organske materije neophodne za svoje razviće i rast. Apsorpciju svetlosti određenih talasnih dužina obavljaju pigmenti, među kojima su najznačajniji hlorofili. Više biljke poseduju hlorofile a i b (Nešković i sar. 2003). Oba hlorofila apsorbuju crveni i plavi deo sunčevog spektra u opsegu 400-700 nm talasne dužine.

Količina usvojene svetlosti proporcionalna je koncentraciji hlorofila. Na koncentraciju hlorofila utiče veliki broj unutrašnjih i spoljašnjih faktora. Rast i razviće biljaka, starost listova, botanička pripadnost i zdravstveno stanje predstavljaju unutrašnje činioce, a najvažniji spoljašnji faktor koji utiče na formiranje i sadržaj hlorofila je svetlost (Sarić 1979). Ustanovljeno je da postoji zavisnost između koncentracije hlorofila i elemenata mineralne ishrane. Za njegovo obrazovanje neophodno je gvožđe, makar u tragovima, mada ne ulazi u sastav molekula hlorofila. Biljke gajene bez primesa gvožđa imaju simptome hloroze, jer gvožđe utiče na sintezu hlorofila (Sarić 1979).

Među svim elementima koje biljke usvajaju iz zemljišta naročito mesto zauzima azot. On ulazi u sastav molekula hlorofila i bez njega biljke su blede. Slobodan molekularni azot (N_2) potpuno je nepristupačan višim biljkama. Stoga listovi i koren biljaka mogu usvajati azot u vidu jedinjenja (amonijaka, oksida i soli azota), prisutnih u zemljištu i atmosferi. Njihova količina u vazduhu je toliko mala da nije dovoljna za normalno razviće biljaka, tako da svoje potrebe za azotom u naj-većoj meri biljke podmiruju iz zemljišta. Vrlo važnu ulogu u razvoju biljaka među azotovim oksidima zauzima azot-monoksid (NO). NO je esencijalni, vrlo difuzan molekul koji nastaje kao produkt metabolizma živih organizama. Smatra se da NO (gasoviti prenosilac signala) postupa kao biljni hormon koji je ekvivalent etilenu (Yamasaki 2005). Azot-monoksid brzo prolazi kroz biološke membrane, stoga za kratko vreme omogućava različite procese (Beligni i Lamattina 2001). NO ima više funkcija kod biljaka – regulatornu, signalizirajuću, citotoksičnu i citozaštitnu funkciju (Graziano *et al.* 2002). Pritom azot-monoksid

Danijela Miloradović (1989), Kragujevac, s. Bečevica (Toponica), učenica 2. razreda Druge kragujevačke gimnazije

Jelena Mikić (1989), Velika Plana, Višnjićeva 3, učenica 2. razreda Gimnazije u Velikoj Plani

MENTOR:
Jelena Savić, dipl. biolog

može indukovati različite procese u biljkama, uključujući programiranu ćelijsku smrt (Neill *et al.* 2003), germinaciju semena i neutralizaciju inhibitornog efekta teških metala (Kopyra i Gwozdz 2003). Slobodni radikal azot-monoksida veoma brzo obrazuje kompleksna jedinjenja sa jonima prelaznih metala u vodenim rastvorima. Zahvaljujući ovoj osobini NO poboljšava dostupnost i transport gvožđa, samim tim i biosintezu hlorofila u biljci (Graziano *et al.* 2002).

Cilj ovog rada je da se proverí da li NO utiče na povećanje koncentracije hlorofila kod graška, kao predstavnika viših biljaka.

Materijal i metode

Po 30 iskljalih semena graška – *Pisum sativum* (sorta Mali provansalac) – postavljeno je u devet plastičnih kutija. U jednoj kutiji (kontrola K₁) korenčići su bili potopljani samo u vodi, u četiri kutije (kontrola K₂) – u kalijum-heksacijanoferat(III)-u (K₃[Fe(CN)₆]), a u preostale četiri kutije (test-grupa SNP) u natrijum-nitroprusidu (Na₂[Fe(CN)₅NO]). Biljke su gajene pod identičnim svetlosnim i temperaturnim uslovima. Kalijum-heksacijanoferat(III) je uzet kao druga kontrola kako bi se eliminisao mogući uticaj trovalentnog gvožđa na povećanje koncentracije hlorofila u SNP. Tokom ispitivanja korišćene su četiri koncentracije kompleksnih jedinjenja – 0.1, 1.0, 10 i 100 μM.

Kada su se listovi graška dovoljno razvili, pristupilo se određivanju koncentracije hlorofila a i b metodom koja se sastoji iz dva koraka – ekstrakcije hlorofila i spektrofotometrijskog određivanja apsorbanca ekstrakata.

Za acetonsku ekstrakciju hlorofila korišćena je metoda opisana od strane Čulafića i saradnika (Čulafić i sar. 2000). Dobijenim acetonskim rastvorima hlorofila spektrofotometrijski je izmerena apsorbanca. Apsorbance su merene na 645 i 663 nm po četiri puta, a na 720 nm – jedanput. Prve dve talasne dužine uzete su iz razloga što su u 80%-nom acetonu hlorofili a i b na maksimumu apsorpcije u crvenoj oblasti i imaju sledeće milimolarne ekstinkcione koeficijente:

$$\text{Hlorofil a: } e_{663}^{1 \text{ cm}} = 73.30; \quad e_{645}^{1 \text{ cm}} = 14.97$$

$$\text{Hlorofil b: } e_{663}^{1 \text{ cm}} = 8.41; \quad e_{645}^{1 \text{ cm}} = 41.38$$

Merenje na talasnoj dužini 720 nm vršeno je zbog činjenice da hlorofil na toj talasnoj dužini ne apsorbuje svetlost, već dobijena apsorbanca potiče isključivo od nečistoća. Stoga je apsorbanca na 720 nm oduzimana od vrednosti dobijenih na 645 nm i

663 nm, pa su iz tih rezultata izračunate srednje vrednosti koje predstavljaju konačne apsorbanca za svaki od devet ekstrakata.

Nakon dobijanja konačnih apsorbanca njihove vrednosti su zamenjene u formulama za određivanje koncentracija hlorofila a i b u μmol/L:

$$C_a = 14.92 \cdot A_{663} - 2.90 \cdot A_{645} \quad (1)$$

$$C_b = 25.21 \cdot A_{645} - 5.15 \cdot A_{663} \quad (2)$$

Sabiranjem jednačina (1) i (2) dobijena je jednačina za ukupnu koncentraciju hlorofila:

$$C_{a+b} = 22.31 \cdot A_{645} + 9.07 \cdot A_{663}.$$

Rezultati i diskusija

Iz table 1 se vidi da apsorbanca hlorofila na talasnoj dužini 645 nm ima najmanju vrednost (0.86) kod graška gajenog u vodi (K₁), a najveću (2.58) kod graška gajenog u K₃[Fe(CN)₆] koncentracije 0.1 μM. Hlorofil graška tretiranog kalijum-heksacija–noferat(III)-om (K₂) ima najmanju apsorbanca (1.74) pri koncentraciji 1 μM K₃[Fe(CN)₆], a najveću (2.58) pri koncentraciji 0.1 μM ovog jedinjenja. Pri koncentraciji 0.1 μM SNP apsorbanca hlorofila je najmanja i iznosi 1.35, a pri koncentraciji 100 μM SNP najveća – 1.62. Dakle, najveća vrednost apsorbanca hlorofila na 645 nm dobijena je pri minimalnoj (0.1 μM) koncentraciji K₃[Fe(CN)₆], odnosno maksimalnoj (100 μM) koncentraciji SNP.

Apsorbanca hlorofila na talasnoj dužini 663 nm ima najmanju vrednost (1.97) kod graška gajenog u vodi (K₁), a najveću (3.21) kod graška gajenog u SNP koncentracije 100 μM. Hlorofil graška tretiranog kalijum-heksacijanoferat(III)-om (grupa K₂) ima najmanju apsorbanca (2.31) pri koncentraciji 1 μM K₃[Fe(CN)₆], a najveću (3.21) pri koncentraciji 10 μM ovog jedinjenja. Pri koncentraciji 0.1 μM SNP apsorbanca hlorofila je najmanja i iznosi 2.73, a pri koncentraciji 100 μM SNP je najveća (3.21).

Iz table može se uočiti razlika između ukupnih koncentracija hlorofila a i b kod graška gajenog u vodi i graška tretiranog SNP-om, odnosno kalijum-heksacijanoferat(III)-om.

Tabela 1. Koncentracije hlorofila a i b u eksperimentalnim grupama. C_a – koncentracija hlorofila a, C_b – koncentracija hlorofila b i C_{a+b} – ukupna koncentracija oba hlorofila kod *Pisum sativum*

Uzorak	A645	A663	C_a	C_b	C_{a+b}
K ₁	0.86	1.97	26.89	11.45	36.96
K ₂ (0.1 μM)	2.58	2.58	30.99	51.66	80.85
K ₂ (1 μM)	1.74	2.31	29.35	31.96	59.68
K ₂ (10 μM)	2.36	3.21	41.01	43.01	81.69
K ₂ (100 μM)	1.88	3.15	41.50	31.19	70.48
SNP (0.1 μM)	1.35	2.73	36.84	20.07	55.00
SNP (1 μM)	1.59	3.04	40.73	24.36	62.97
SNP (10 μM)	1.43	2.91	39.21	21.17	58.34
SNP (100 μM)	1.62	3.21	43.17	24.41	65.33

Kao što se može videti iz tabele, ukupna količina hlorofila a i b vrste *Pisum sativum* tretirane K₃[Fe(CN)₆] koncentracije 0.1 μM, veća je za 32% nego kod iste koncentracije SNP. Na koncentraciji 1 μM dolazi do promene; SNP je ostvario bolji efekat za 5%. Kao i u prvom slučaju, pri koncentraciji 10 μM kontrola 2 se pokazala efikasnijom za 29% od test-supstance. Na 100 μM, do većeg povećanja količine hlorofila a i b ponovo dovodi kalijum-heksacijanoferat(III); razlika je 7%.

Koncentracija K₃[Fe(CN)₆] na kojoj je došlo do stvaranja najveće količine hlorofila a i b (81.69 μmol/L) iznosi 10 μM, što inače predstavlja i najveću ostvarenu ukupnu koncentraciju hlorofila, a kod SNP (65.33 μmol/L) iznosi 100 μM.

Zaključak

Ukupna koncentracija hlorofila a i b graška tretiranog azot-monoksidom (čiji je donor SNP) bila je veća nego u grašku izraslom u vodi. Kalijum-heksacijanoferat(III) je imao bolji efekat na povećanje koncentracije hlorofila od NO. Ovakvi rezultati ukazuju na to da trovalentno gvožđe nije bilo od presudnog uticaja na povećanje koncentracije hlorofila, te se kao moguće objašnjenje dobijanja većih koncentracija hlorofila u grašku tretiranom K₃[Fe(CN)₆] uzima uticaj kalijuma.

U hloroplastima najveći procenat, među pigmentima, zauzima hlorofil a, zatim hlorofil b, dok najmanje ima karotenoida (Kojić 1988). Generalno gledano, hlorofil a dominira u odnosu na hlorofil b u listovima

graška korišćenog u toku ovog istraživanja. Do većih promena dolazi u drugoj kontroli pri koncentraciji 0.1 μM gde hlorofila b ima za 40% više od hlorofila a.

Na povećanje koncentracije hlorofila b najpovoljnije utiče K₃[Fe(CN)₆]; maksimalni efekat je ostvaren pri koncentraciji 0.1 μM. S druge strane, SNP dovodi do povećanja količine hlorofila a i najbolji efekat ostvaruje na koncentraciji 100 μM.

Zahvalnost. Autori se zahvaljuju svom mentoru Jeleni Savić i rukovodiocu seminara biologije Vladimiru Jovanoviću na stručnim savetima i pomoći u realizaciji projekta. Velika zahvalnost se upućuje i Nemanji Marijanoviću, starijem polazniku seminara biologije (sada studentu prve godine molekularne biologije u Beogradu), za uzgoj biljaka graška.

Literatura

Beligni M.V. and Lamattina L. 2001. Nitric oxide in plants: the history is just beginning. *Plant, Cell and Environment*, **24**: 267

Ćulafić Lj., Naunović G., Cerović Z., Konjević R. 2000. *Fiziologija biljaka – praktikum*. Beograd: NNK-International

Graziano M., Beligni M.V., Lamattina L. 2002. Nitric oxide improves internal availability in plants. *Plant Physiology*, **130**: 1852.

Kojić M. (1988). *Botanika*. Beograd: Naučna knjiga

Kopyra M., Gwozdz E.A. 2003. Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the

inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **41**: 1011.

Leshem Y.Y., Wills R.B.H., Veng-Va Ku V. 1998. Evidence for the function of the free radical gas – nitric oxide (NO) – as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. *Plant Physiol. Biochem.*, **36**: 825.

Maksimov N. 1961. *Fiziologija biljaka*. Novi Sad: Dnevnik

Neill S.J., Desikan R., Hancock J.T. 2003. Nitric oxide signalling in plants. *New Phytologist*, **159**: 11-35

Nešković M., Konjević R., Čulafić Lj. 2003. *Fiziologija biljaka*. Beograd: NNK-International

Sarić M. 1979. *Fiziologija biljaka*. Beograd: Naučna knjiga

Yamasaki H. 2005. The NO world for plants: achieving balance in an open system. *Plant, Cell and Environment*, **28**: 78.

Danijela Miloradović and Jelena Mikić

Effect of NO on Concentrations of Chlorophylls a and b in Species *Pisum sativum* L.

The influence of NO on concentrations of chlorophylls a and b of peas – *Pisum sativum* (“Mali provansalac”) was explored. The experiment included three groups of compounds: water as the first control (K₁), K₃[Fe(CN)₆]^C as the second control (K₂), and SNP as an NO donor – where peas plants were cultivated. Concentrations in K₂ and SNP groups were fluctuated from 0.1, 1.0, 10 to 100 μM. For measuring the concentration of chlorophylls a and b two methods were used: extraction of chlorophylls from the aerial part of peas plants and spectrophotometry of extracts.

The biggest concentration of chlorophyll a and b (81.69 μmol/L) was present in plants growing in 10 μM of K₃[Fe(CN)₆], and the analogical concentration of SNP is 100 μM (65.33 μmol/L). K₃[Fe(CN)₆] had an amplifying influence on the concentration of chlorophyll b, the SNP release amplified concentrations of chlorophyll a, and the best result was realized on the 100 μM concentration. NO had a greater effect on the total concentration of chlorophylls a and b in *Pisum sativum* in relevance to water, but K₃[Fe(CN)₆] was better than NO for 17.5%. 