

Ispitivanje uticaja olova i soli (NaCl) u podlozi na klijanje, koncentraciju prolina i koncentraciju proteina u pšenici (*Triticum aestivum* L.)

*Ispitivan je efekat povišenih koncentracija olova i natrijum-hlorida na klijanje, koncentraciju prolina i ukupan sadržaj proteina u klijancima pšenice (*Triticum aestivum* L.). Biljke su tretirane rastvorima različitih koncentracija olovo(II)-nitrata (20, 50, 200 i 500 ppm) i natrijum-hlorid (50 i 100 mM). Kontrolna grupa je tretirana destilovanom vodom. Povišene koncentracije olova u medijumu uticale su inhibitorno na rast nadzemnog i podzemnog dela biljke. Takođe, povećanjem koncentracije olova dolazi do povećanja koncentracije proteina u analiziranom biljnom materijalu. Koncentracije NaCl od 50 mM uzrokuju rast koncentracije prolina u nadzemnim i podzemnim delovima biljke. Povišene koncentracije olova i NaCl imaju sinergističko dejstvo na akumulaciju prolina pri koncentracijama NaCl od 50 mM.*

Uvod

Najčešći oblici stresa kojem su biljke izložene su suša, oksidativni stres, disbalans nutrijenata i povećana koncentracija soli u zemljištu (Goudarzi i Pakniyat 2009). So koja je u najvećim koncentracijama zastupljena u slanim zemljištima je natrijum-hlorid (Azizpour *et al.* 2010). Takođe, veliki globalni problem danas predstavlja zagađenost zemljišta teškim metalima, koje je posledica dejstva različitih antropogenih faktora.

Jedan od teških metala u zemljištu je i olovo (Pb), koje se prirodno nalazi u zemljištu u opsegu od 20 do 50 mg/kg. Nezagađeno zemljište sadrži manje od 100 mg/kg, dok se zemljišta sa koncentracijama olova od 400 do 800 mg/kg smatraju zagađenim, i postoji mogućnost da će koncentracija Pb u biljkama gajenim na tim područjima preći zakonski određene granice (Akinci *et al.* 2010). Izvori zagađenja olovom su pesticidi, dim iz fabrika koje prerađuju olovo, topljenje ruda, izduvni gasovi automobila, i mnogi drugi. Značajne količine olova putem vazduha dospevaju na poljoprivredne površine. One se dalje spiraju kišnicom i putem podzemnih voda prenose na

*Milica Aleksić
(1995), Sombor, Nine
Maksimovića B/6,
učenica 3. razreda
Gimnazije „Veljko
Petrović” u Somboru*

*MENTORI:
Tomica Mišljenović,
ISP
dr Vladimir
Jovanović, Institut za
biološka istraživanja
„Siniša Stanković”*

veće razdaljine (Sharma i Dubey 2005). Iako Pb nije element koji se u normalnim uslovima nalazi u sastavu biljaka, biljka će ga apsorbovati i ugraditi u svoja tkiva ukoliko je prisutan u zemljištu (Sharma i Dubey 2005).

Uticaj slanog stresa na rast i razvoj biljke zavisi od koncentracije soli u zemljištu i stadijuma razvoja u kome je biljka bila izložena stresu. Štetnost povećane koncentracije soli u zemljištu ogleda se u toksičnosti Na^+ i Cl^- jona, kompeticiji za usvajanje drugih jona i izazivanju osmotskog stresa. Joni natrijum-hlorida deluju toksično na mnoge enzime i ćelijske procese, inhibiraju rast i negativno utiču na masu i rast korena (Grewal 2010). Stres izazvan povišenim koncentracijama soli indukuje akumulaciju prolina, α -aminokiseline čija uloga nije u potpunosti jasna, a pretpostavlja se da učestvuje u osmoregulaciji, štiti strukturu proteina i reguliše broj slobodnih radikala u ćeliji (Song *et al.* 2005). Povišena koncentracija soli u zemljištu utiče na sintezu određenih proteina. Proteini koji se sintetišu u biljkama izloženim slanom stresu klasifikuju se u dve grupe – proteini koji se sintetišu samo pod uticajem soli i proteini koji se sintetišu i pod uticajem drugih oblika stresa. Proteini koji pripadaju prvoj grupi mogu imati ulogu u osmotskoj regulaciji (Asharaf i Harris 2004) i transportu određenih nutrijenata (Jbir *et al.* 2002). Povećana koncentracija olova u biljkama može izazvati zakržljalost u rastu, hlorozu i nekroze korena. Olovo u povišenim koncentracijama remeti mineralnu ishranu, menja hormonalni status i utiče na strukturu i permeabilnost membrane (Sharma i Dubey 2005). Stres izazvan povišenom koncentracijom olova takođe je jedan od uzročnika povišene koncentracije prolina (Yang *et al.* 2011). Određeni efekti slanog stresa i teških metala u zemljištu na biljke već su ispitivani. Utvrđeno je da povećane koncentracije kadmijuma i natrijum-hlorida zajedno deluju inhibitorno na rast nadzemnog dela pšenice (Muhling i Lauchli 2003).

Cilj istraživanja bio je ispitivanje uticaja olova u kombinaciji sa slanim stresom na pšenicu (*Triticum aestivum*). Analizirani su efekti na klijanje pšenice, odnosno dužine podzemnog i nadzemnog dela biljke, koncentraciju prolina i ukupnu koncentraciju proteina u nadzemnom delu biljke.

Materijal i metode

Semena pšenice su tretirana sa rastvorima 15 različitih koncentracija soli i olova. Korišćeni su rastvori natrijum-hlorida u koncentracijama od 50 i 100 mM (Akinci *et al.* 2010), i olovo(II)-nitrata u koncentracijama od 20, 50, 200 i 500 ppm (Moosavi *et al.* 2012). Kao rastvarač i kontrola korišćena je destilovana voda. Ispitivan je pojedinačni uticaj ova dva faktora, kao i njihovo uzajamno dejstvo pri različitim koncentracijama. Eksperiment je rađen u duplikatu.

Gajenje biljaka i merenje dužine podzemnih i nadzemnih delova.

Dvesta grama pšenice (*Triticum aestivum*) „K-plus” temeljno je oprano vodom, 4% varikinom, ponovo vodom i potom destilovanom vodom. Po trideset zrna pšenice postavljeno je u trideset Petrijevih šolja sa dva sloja filter hartije. U svaku Petrijevu šolju sipano je ukupno 5 mL rastvora, a biljke

su zalivane na 24 sata. Nakon četiri dana od prvog zalivanja, određen je broj korenova, masa i dužina podzemnog i nadzemnog dela biljke.

Određivanje koncentracije prolina. Koncentracija prolina u korenu i nadzemnom delu biljke određena je spektrofotometrijski za svaku grupu. Prolin je iz biljke ekstahovan maceriranjem 0.5 g uzorka sa 10 mL 3% sulfosalicilne kiseline. Ekstrakt je proceđen kroz Whatman br. 2 filter papir u staklenu epruvetu iz koje je odmereno 2 mL ekstrakta u plastičnu epruvetu. Dodato je 2 mL ninhidrin reagensa i 2 mL glacijalne sirćetne kiseline i ekstrakti su inkubirani sat vremena na 95°C, a potom prebačeni na led. Kada se temperatura u epruvetama spustila do sobne temperature, dodato je 5 mL toluena i vorteksovano 20 sekundi. Koncentracija prolina je merena spektrofotometrijski na 520 nm iz gornjeg sloja toluena koji se izdvojio nakon vorteksovanja. Slepa proba bio je čist toluen, a standardnu seriju činili su rastvori prolina različite koncentracije sa kojima je postupano paralelno sa uzorcima (Azizouor *et al.* 2010).

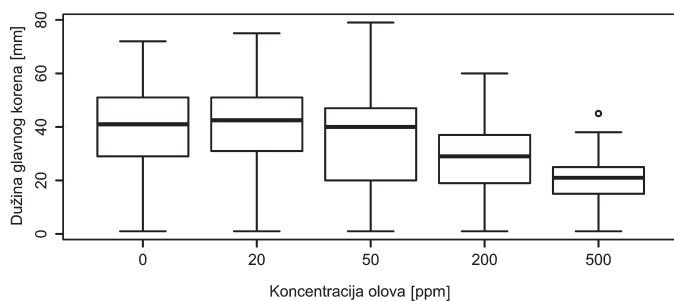
Određivanje ukupne koncentracije prolina. Ukupna koncentracija proteina određivana je u nadzemnom delu biljke Bradfordovom metodom. Uzorci su macerirani sa puferom i stavljeni na led. Pufer se sastojao od 20 mM TrisHCl, 1 mM EDTA, 1% Tween, 0.01% β-merkaptioetanolu i destilovane vode. Uzorci su čuvani u zamrzivaču na -80°C preko noći, a potom je u 100 μL rastvora dodato 5 mL Bradfordovog reagensa. Ukupna koncentracija proteina merena je spektrofotometrijski na 595 nm (Vujičić 2002).

Za sve merene veličine određeni su medijana i kvantili. Efekat koncentracije olova i natrijum-hlorida, kao i efekat njihove interakcije, ispitivan je ANOVA-om u softverskom paketu Statistica 5.1 (StatSoft 1996).

Rezultati i diskusija

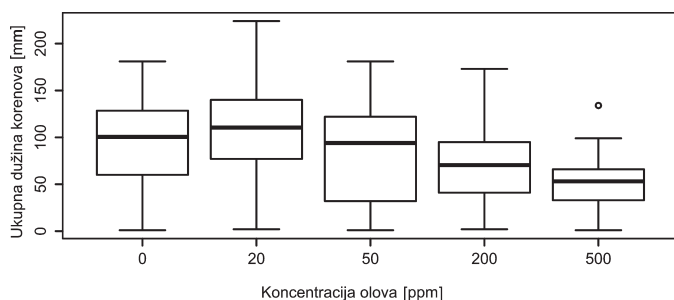
Podaci dobijeni merenjem dužine korenova klijanaca pšenice ukazuju na negativni efekat olova na rast biljke. Uočena je inhibicija rasta kako glavnog korena (slika 1), tako i svih korenova (slika 2). Takođe, povišene koncentracije olova inhibiraju rast nadzemnog dela biljke, koleoptila (slika 3). Ovi efekti najizraženiji su pri koncentracijama olova od 500 ppm. Inhibicija rasta može biti posledica smanjene deobe ćelija (Sharma i Dubey 2010). Uticaj povišene koncentracije soli kao ni zajedničko dejstvo soli i olova nije prikazano, kako nije došlo do značajnih promena dužine korena i koleoptila u odnosu na kontrolnu grupu.

Na slici 4 prikazana je zavisnost koncentracije proteina u nadzemnom delu klijanaca pšenice od koncentracije olova u supstratu. Uočava se izražen trend povećanja ukupnog sadržaja proteina sa povećanjem koncentracije olova u supstratu. Ranijim istraživanjima je utvrđeno da se koncentracija proteina kod biljaka tretiranih olovom povećava, uglavnom kao rezultat povećane sinteze antioksidativnih enzima, među kojima su superoksid dismutaza, guakol peroksidaza, askorbat peroksidaza i druge (Sharma i Dubey 2010). Uloga ovih enzima je kontrola nivoa slobodnih radikala



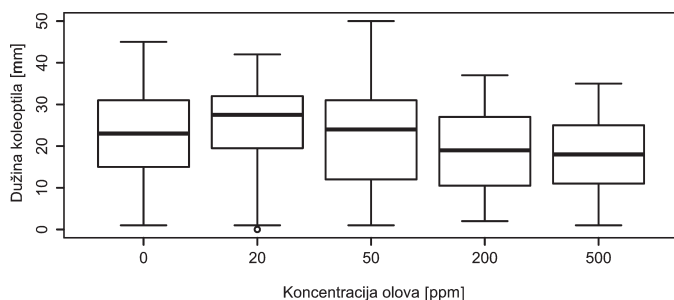
Slika 1. Uticaj koncentracije olova na dužinu glavnog korena. Horizontalnom linijom označena je medijana, pravougaonicima su obuhvaćeni donji i gornji kvartili, a vertikalne linije označavaju raspon (od minimuma do maksimuma)

Figure 1. Effects of lead on main roots' length. Median is marked with a horizontal line, upper and lower quartiles are covered with a rectangle, and the range is marked with vertical lines.



Slika 2. Uticaj koncentracije olova na ukupnu dužinu korenova

Figure 2. Effects of lead on side roots' length

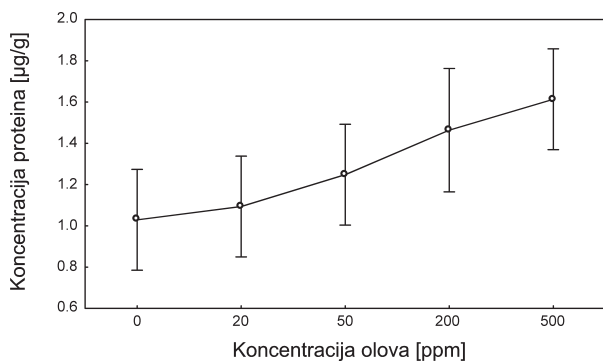


Slika 3. Uticaj koncentracije olova na dužinu koleoptila

Figure 3. Effects of lead on coleoptile length

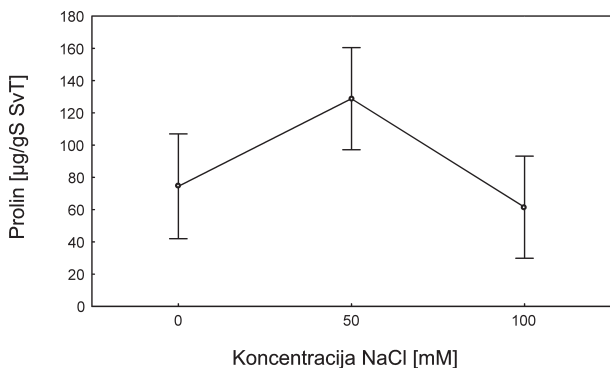
kiseonika koji se akumuliraju kao posledica izloženosti stresu izazvanom olovom. Povišene koncentracije NaCl, kao ni povišene koncentracije olova u kombinaciji sa NaCl ne dovode do statistički značajnih razlika u koncentraciji proteina u odnosu na kontrolnu grupu (rezultati nisu prikazani).

Najviši sadržaj prolina izmeren je u tkivima klijanaca pšenice tretirane rastvorom natrijum hlorida koncentracije 50 mM (slika 5). Dobijeni rezultati u skladu su sa rezultatima ranijih istraživanja (Goudqarzi i Pakyant 2009; Azizpour *et al.* 2010; Jbir *et al.* 2002). Pokazano je da olovo i natrijum hlorid imaju sinergističko dejstvo na akumulaciju prolina pri koncentraciji soli od 50 mM, i koncentraciji olova 20 i 50 ppm. Pri koncentracijama višim od 50 ppm, koncentracija prolina opada (slika 6). Različita istraživanja daju različita obrazloženja za povišene koncentracije prolina pod dejstvom olova. Uzrok povećane akumulacije prolina može biti posledica vodnog deficita izazvanog stresom teškim metalima ili samog usvajanja teških metala (Yang *et al.* 2011). Usvajanje teških metala



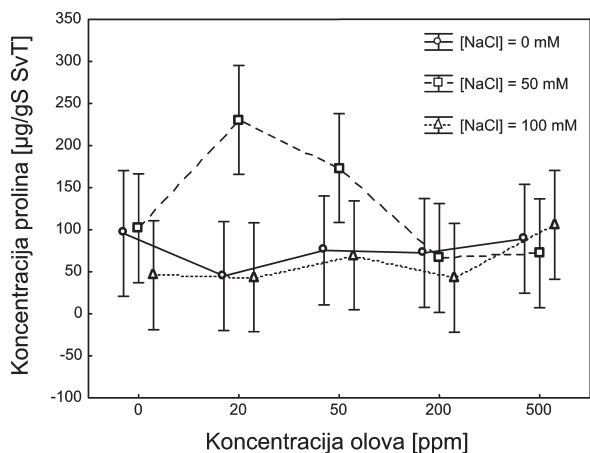
Slika 4. Uticaj koncentracije olova (ppm) na ukupnu koncentraciju proteina u biljnom materijalu (µg/gSSvT)

Figure 4. Effects of lead (ppm) on soluble protein concentration (µg/gSSvT)



Slika 5. Uticaj koncentracije natrijum-hlorida (mM) na koncentraciju prolina u biljnom materijalu (µg/gSSvT)

Figure 5. Effects of sodium chloride (mM) on proline concentrations (µg/gSSvT)



Slika 6. Kombinovani uticaj olova (ppm) i NaCl (mM) na koncentraciju prolina u biljnom materijalu (µg/gSSvT)

Figure 6. Effects of NaCl (mM) and lead (ppm) on proline concentrations (µg/gSSvT)

pospešuje formiranje štetnih slobodnih radikala kiseonika čiju koncentraciju reguliše prolin (Yang *et al.* 2011). Poznato je da povišene koncentracije soli izazivaju osmotski stres, a kao posledica toga akumulira se prolin. Prolin takođe utiče na ćelijsku membranu sprečavajući poremećaje koje NaCl izaziva (Asharaf i Harris 2004). Nije uočena statistički značajna razlika u sadržaju prolina pri tretiranju semena pšenice različitim koncentracijama olova u odnosu na kontrolnu grupu.

Zaključak

Izlaganje semena pšenice povišenoj koncentraciji olova tokom klijanja izaziva inhibiciju rasta biljke. Povišena koncentracija olova dovodi do povećane sinteze proteina u biljnim tkivima, verovatno kao odgovor na oksidativni stres usled sinteze antioksidativnih enzima. Izlaganje semena pšenice tokom klijanja povišenim koncentracijama natrijum hlorida, rezultiralo je akumuliranjem prolina u biljnim tkivima. Uočeno je i sinergističko dejstvo olova i natrijum hlorida pri određenim koncentracijama na povećanje koncentracije prolina.

Literatura

- Akinci I. E., Akinci S., Yilmaz K. 2010. Response of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) to lead. *African Journal of Agricultural Research*, **5**: 416.
- Asharaf M., Harris P. J. C. 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science*, **166**: 3.
- Azizpour K., Shakiba M. R., Khosh N. A. Kholg Sima, Alyari H. 2010. Physiological response of spring durum wheat genotypes to salinity. *Journal of Plant Nutrition*, **33**: 59.
- Delaurney A. J., Verma D. P. S. 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The plant journal*, **4** (2): 215.
- Goudarzi M. H. Pakniyat 2009. Salinity Causes Increase in Proline and Protein Contents and Peroxidase Activity in Wheat Cultivars. *Journal of Applied Sciences*, **9**: 348.
- Grewal 2010. Response of wheat to subsoil salinity and temporary water. *Plant Soil*, **330**: 103.
- Jbir N., Ayadi A., Amar S. 2002. Seed germination of two wheat species. *Journal of trace and microbe techniques*, **20** (4): 625.
- Khan M. S. A., Hamid A., Karim M. A. 1997. Effect of Sodium Chloride on Germination and Seedling Characters of Different types of Rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Agronomy & Crop Science*, **79**: 163.
- Moosavi S. A., Gharineh M. H., Afshari R. T., Ebrahimi A. 2012, Effects of Some Heavy Metals on Seed Germination. *Journal of Agricultural Science*, **4** (9): 11.
- Muhling K. H., Lauchli A. 2003. Interaction of NaCl and Cd stress on compartmentation pattern of cations, antioxidant enzymes and proteins in leaves of two wheat genotypes differing in salt tolerance. *Plant and Soil*, **253**: 219.
- Sharma P., Dubey P. R. 2005. Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of plant psychology*, **17** (1): 35.

- Song S. Q., Lei Y. B., Tian X. R. 2005, Proline Metabolism and Cross-Tolerance to Salinity. *Russian Journal of Plant Physiology*, **52** (6): 793.
- StatSoft 1996. Statistica (data analysis software system), version 5.1. StatSoft Inc, Tulsa, OK, USA.
- Vujičić Z. 2002. *Eksperimentalna biohemija – praktikum*. Beograd: Rantec
- Yang Y., Zhang Y., Wei X., You J., Wang W. 2011. Comparative antioxidative responses and proline metabolism in two wheat cultivars under short term lead stress. *Ecotoxicology and environmental Safety*, **74**: 733.

Milica Aleksić

Effects of Lead and Salt (NaCl)-Induced Stress on Germination, Proline Accumulation and Soluble Protein Concentration in Wheat (*Triticum aestivum* L.)

The influence of lead and salt-induced stress on germination, proline accumulation and soluble protein concentration was investigated in wheat (*Triticum aestivum*). The deleterious effects of salinity on plant growth are associated with low osmotic potential of soil pollution (water stress), nutrition imbalance, specific ion effect (salt stress), or a combination of these factors. Heavy metal toxicity induces secondary oxidative stress by promoting the formation of harmful reactive oxygen species. Under conditions of salt stress, proline accumulation serves as a defense against osmotic challenge by acting as a compatible solute. Proline has also been demonstrated to scavenge hydroxyl radicals and singlet oxygen, thus providing protection against reactive oxygen species induced cell damage. Wheat seedling were exposed to 50 and 100 mM NaCl, and 20, 50, 200 and 500 ppm Pb(NO₃)₂ for four days. Root and coleoptile length was measured, as well as proline and soluble protein concentration. High lead concentrations inhibited apical dominance, as the length of primary roots was greater and the length of lateral roots was shorter in lead treated seedlings. The inhibition of root growth under Pb toxicity might be a result of Pb-induced inhibition of cell division in root tips. Proline accumulation under salt-induced stress was stimulated, due to osmotic stress caused by high NaCl concentrations. Increase in NaCl and Pb concentrations in growth media also resulted with an increase in proline accumulation in plants. The level of soluble proteins increased upon exposure to high lead concentrations, as a result to oxidative stress induced by Pb uptake.

