

---

Milica Aleksić

## Fiziološki odgovor pšenice (*Triticum aestivum* L.) na povišenu koncentraciju kadmijuma i NaCl u podlozi

---

*Ispitivan je uticaj kadmijuma i natrijum-hlorida na koncentraciju prolina, ukupnu koncentraciju proteina i aktivnost peroksidaze, kao i usvajanje Cd u prisustvu NaCl u pšenici (Triticum aestivum L.). Biljke su tretirane rastvorima NaCl (koncentracija 2000 i 4000 ppm), i CdSO<sub>4</sub> (koncentracija 0.4, 0.6, 0.8 i 1.6 ppm). Koncentracije usvojenog kadmijuma bile su više u korenu nego u listovima pšenice. Sa porastom koncentracije Cd u medijumu rasle su i koncentracije usvojenog Cd i u korenu i u listovima pšenice. Uočena je razlika u koncentraciji usvojenog Cd kod biljaka tretiranih natrijum-hloridom u poređenju sa eksperimentalnim grupama bez dodatog NaCl, i to onim grupama sa višim koncentracijama Cd u medijumu. Pretpostavlja se da je ovo posledica građenja kadmijumovih kompleksa sa hlorom koje biljka lakše usvaja. Pri koncentracijama soli od 2000 ppm u medijumu, sa porastom koncentracije kadmijuma raste i koncentracija prolina. Takođe je pokazano da povećanje koncentracije NaCl u medijumu povećava aktivnost peroksidaze, što verovatno predstavlja odgovor biljke na stres izazvan povišenim koncentracijama NaCl. Različite koncentracije kadmijuma, kao ni interakcija kadmijuma i natrijum-hlorida nije uticala na aktivnost peroksidaze. Efekat kadmijuma i natrijum-hlorida na promenu koncentracije ukupnih proteina u biljnom materijalu uočen je samo pri srednjim koncentracijama soli.*

---

### Uvod

Biljke na preko 90% obradivih površina na svetu su izložene nekom obliku stresa. Povišene koncentracije soli u zemljištu su među najznačajnijim problemima u poljoprivredi. So koja se najčešće pojavljuje u slanim zemljištima je natrijum-hlorid (Goudrazi i Pakniyat 2009). Kadmijum, veoma toksičan teški metal, može biti prisutan u zemljištu i predstavlja sve veću pretnju po životnu sredinu (Milone *et al.* 2003).

Kadmijum je redak element koji se retko nalazi u čistom stanju. U obliku različitih jedinjenja oko 25 hiljada tona kadmijuma dospeva u

---

Milica Aleksić (1995),  
Sombor, Nike  
Maksimovića bb,  
učenica 4. razreda  
Gimnazije „Veljko  
Petrović” u Somboru

MENOTOR: Bojana  
Mičić, Biološki  
fakultet Univerziteta u  
Beogradu

životnu sredinu na globalnom nivou, delom kao posledica prirodnih procesa, dok je ostalo rezultat različitih antropogenih aktivnosti, kao što su neadekvatno odlaganje industrijskog otpada pri proizvodnji đubriva, nekih vrsta baterija, obradi plastike i slično (Tuan i Popova 2013).

U nezagađenom zemljištu nalazi se 0.04 do 0.32 mM Cd, dok se zemljišta sa koncentracijama do 1 mM Cd mogu smatrati umereno zagađenim. Povišene koncentracije Cd u zemljištu inhibiraju rast, remete mineralnu ishranu i fotosintezu. Takođe, indirektno reagujući sa antioksidativnim odbrambenim sistemom ili remeteći elektron transportni lanac u okviru fotosinteze i izazivajući poremećaje u hloroplastima, kadmijum dovodi do oksidativnog stresa. Kako bi neutralisale negativne efekte kadmijuma, biljke akumuliraju osmolite, među kojima je prolin, ili sintetišu antioksidante koji štite ćeliju od oksidativnog stresa. Još jedan od načina na koji biljke reaguju na toksične efekte teških metala je hiperakumulacija. Metal se transportuje iz korena u listove i vezuje za aminokiseline, peptide i proteine ili smešta u vakuole, pa su posledice po biljku mnogo manje (Tuan i Popova 2013).

Povišene koncentracije soli u zemljištu posledica su prirodnih procesa ili melioracije slanom vodom (Meloni *et al.* 2004). Uticaj soli na biljku zavisi od starosti biljke (Lutts *et al.* 1996), životnog doba u kome je biljka izložena stresu i intenziteta stresa (Grewal 2010). Osmotski stres izazvan povišenim koncentracijama soli u biljci stvara fiziološku sušu. Takođe, povišene koncentracije NaCl imaju negativan uticaj na rast i razvoj biljke, što je posledica disbalansa nutrijenata ili štetnog efekta određenih jona. Akumulacijom prolina pri povišenim koncentracijama NaCl biljke regulišu osmozu i stabilizuju membranu, a pri tome ne remete enzimsku aktivnost (Ashraf i Harris 2004). Povećanjem aktivnosti antioksidativnih enzima, kao što su peroksidaze, biljke ublažuju negativne efekte reaktivnih oblika kiseonika nastalih kao posledica slanog stresa (Goudrazi i Pakniyat 2009).

Uzajamni uticaj stresa izazvan povišenim koncentracijama teških metala i soli već je ispitivan. Pokazano je da prisustvo NaCl u podlozi pospesuje usvajanje Cd (Usman *et al.* 2005).

Cilj istraživanja bio je ispitivanje uzajamnog uticaja soli i kadmijuma na koncentraciju prolina, aktivnost peroksidaze i usvajanje kadmijuma u pšenici (*Triticum aestivum* L.).

## Materijal i metode

**Priprema biljnog materijala.** Aproksimativno 200 g pšenice je oprano vodom, sterilisano 3% varikinom, potom isprano vodom i destilovanom vodom, i ostavljeno da klija u mraku. Nakon četiri dana, semena su podeljena u 12 eksperimentalnih grupa, sa po 3 ponavljanja. Biljke su tretirane rastovrima natrijum-hlorida koncentracije 0, 2000 i 4000 ppm i kadmijum(II)-sulfata koncentracija od 0, 0.4, 0.8 i 1.6 ppm. Ispitivan je pojedinačni, kao i kombinovani uticaj ovih stresora. Hranljivi medijum u kome su semena rasla bio je Hoglandov rastvor (Hoagland i Arnon 1950).

U svakom sudu bilo je 12 biljaka, a zapremina suda bila je oko 160 mL. Biljke su rasle u komori za rast, pri fotoperiodu od 12 sati, temperaturi 26-28°C, i vlažnosti 60-80%.

**Merenje koncentracije prolina.** Nakon 6 dana u komori za rast, 0.5 g biljnog materijala odmereno je za određivanje koncentracije prolina. Uzorci su macerirani sa 10 mL 3% sulfosalicilne kiseline, a zatim filtrirani. U 2 mL filtrata dodato je 2 mL ninhidrin reagensa i 2 mL glacijalne sirćetne kiseline. Ekstrakcija je rađena prema Azizpour *et al.* (2010). Ekstrakti su inkubirani sat vremena na 95° C, nakon čega su prebačeni na led. Dodato je 4 mL toluena, a apsorbancija je merena spektrofotometrijski na 520 nm. Standardna serija bila je u koncentracije od 2, 4, 6 i 8 µg/mL sulfosalicilne kiseline, a kao slepa proba korišćen je toluen.

**Određivanje aktivnosti enzima peroksidaze.** Proteini su ekstrahovani iz 1 g nadzemnog dela biljke. Ekstrakcija je rađena prema Yang *et al.* (2011). Biljni materijal je maceriran sa 1 mL hladnog PBS (50 mM, pH 7.8) sa 0.1 mM EDTA i 1% PVP. Uzorci su centrifugirani na 12000 rpm 30 minuta na temperaturi od 4°C. Ukupna koncentracija proteina određena je prema Bradfordovoj metodi. Bradfordov reagens je napravljen rastvaranjem 100 mg CBB G-250 u 50 mL 95% etanola, čemu je dodato 100 mL H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Voda je dodata do 200 mL. 100 mL koncentrovanog rastovra razblaženo je u 400 mL vode. U 100 µL enzimske ekstrakcije dodato je 5 mL Bradfordovog reagensa. Nakon 5 minuta inkubacije uzorci su vorteksovani i merena je apsorbancija u plastičnim kivetama na 595 nm.

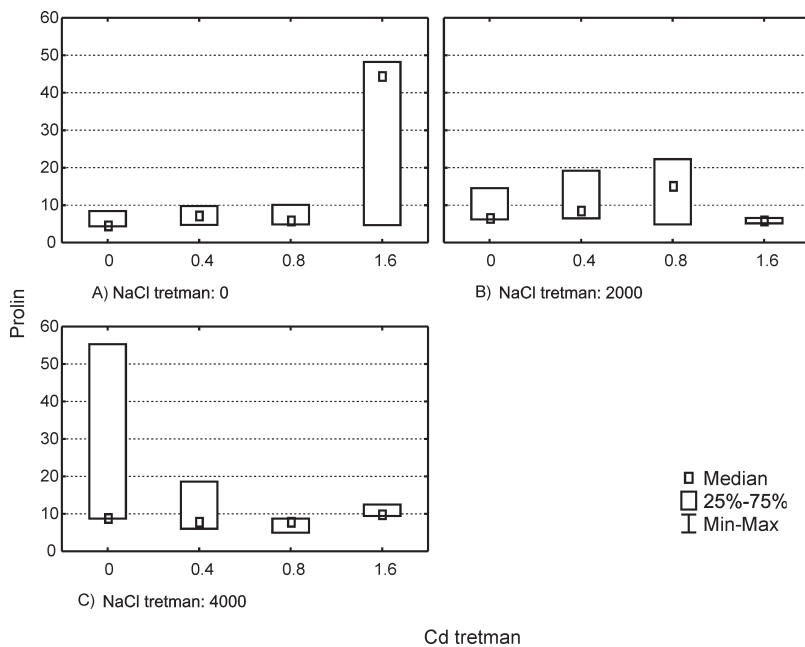
Napravljen je 50 mM acetatni pufer (pH 5.5, 1 × PBS), 30% vodonik peroksid i ABTS. Za vreme merenja, uzorci, ABTS i pufer su držani na ledu. Reakciona smeša sastojala se od 795 µL pufera, 100 µL ABTS-a, 5 µL enzimske ekstrakcije i 100 µL vodonik peroksida. Promena apsorbance merena je na 414 nm u periodu od 3 minuta na svakih 20 sekundi (Serrano-Martínez *et al.* 2008).

**Određivanje koncentracije usvojenog kadmijuma.** Po 0.5 g nadzemnog i podzemnog dela (u tri ponavljanja) uzeto je za merenje koncentracije usvojenog kadmijuma. Uzorci su sušeni na 80° C 36 sati, a potom usitnjeni nakon čega je izmerena njihova masa. Usitnjen biljni materijal žaren je na 400°C 5 sati, a potom rastvoren u 2 mL koncentrovane azotne kiseline. Rastvor je filtriran i razblažen destilovanom vodom do 10 mL.

## Rezultati i diskusija

### Koncentracija prolina

Merenjem koncentracije prolina u nadzemnom delu pšenice pokazano je da je različite koncentracije soli i Cd različito utiču na odgovor biljke na stres (slika 1). Najviše koncentracije prolina izmerene su u grupama tretiranim samo rastvorom Cd od 1.6 ppm (slika 1A). Ovo može biti rezultat akumulacije prolina u cilju smanjenja broja reaktivnih oblika kiseonika nastalih dejstvom kadmijuma (Szabados i Savouré 2010). Porast koncentracije prolina može se zapaziti u grupama tretiranim samo kadmijumom, kao i



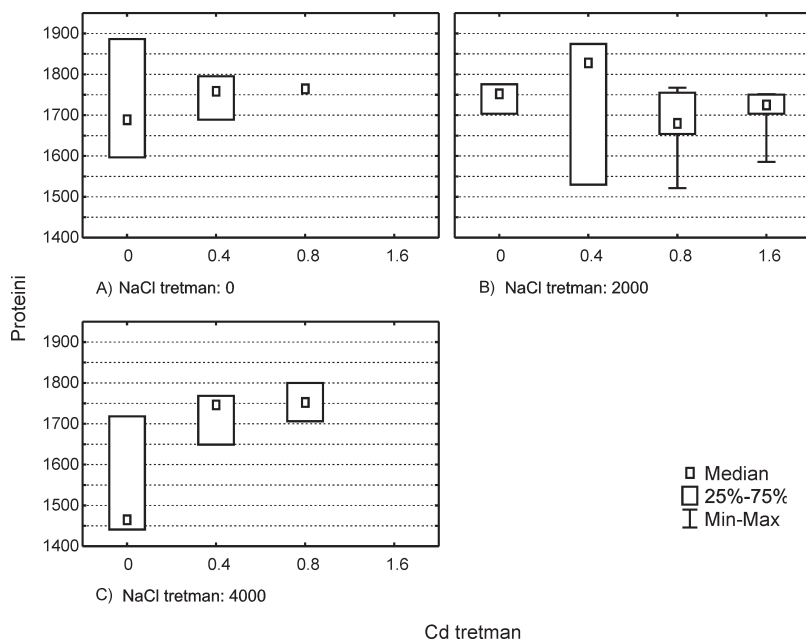
Slika 1. Uticaj povišene koncentracije kadmijuma (ppm) na koncentraciju prolina u listovima mg/kg pri koncentracijama NaCl od (A) 0 ppm, (B) 2000 ppm i (C) 4000 ppm

Figure 1. Effects of increased cadmium concentration (ppm) on proline concentration in leaves (mg/kg) with different NaCl concentration (A) 0 ppm, (B) 2000 ppm, and (C) 4000 ppm

kadmijumom sa rastvorom NaCl srednje koncentracije, i to pri porastu koncentracije kadmijuma (slika 1A i 1B). Pretpostavlja se da je to posledica interakcije ova dva stresora. Izuzetak je grupa tretirana najvišom koncentracijom Cd i rastvorom NaCl od 2000 ppm. Takođe se vidi i trend opadanja koncentracije prolina pri porastu koncentracije Cd u grupama tretiranim rastvorima sa najvišom koncentracijom NaCl (slika 1C). U grupama tretiranim samo rastvorima NaCl najviše koncentracija prolina izmerena je u grupama sa najvišim koncentracijama soli (4000 ppm), gde se pretpostavlja da akumulirani prolin ima ulogu u osmotskoj regulaciji (Asharaf i Harris 2004).

## Ukupna koncentracija proteina

U grupama tretiranim različitim koncentracijama kadmijuma i to pri koncentracijama NaCl od 0 i 2000 ppm nije konstatovana zavisnost koncentracije ukupnih proteina od koncentracije soli ili kadmijuma (slike 2A i 2B). Pri najvišoj koncentraciji soli, vidi se trend povećanja ukupne koncentracije proteina (slika 2C). To može biti posledica akumulacije proteina u cilju čuvanja azota koji se troši nakon dejstva stresa, osmoregulacije ili smanjenju broja reaktivnih oblika kiseonika, i to pod uticajem osmotskog i oksidativnog stresa (Asharaf i Harris 2004). Takođe, može biti uzrokovano povišenom sintezom antioksidativnih enzima, na primer peroksidaze (Sharma i Dietz 2009). Iako je uočena povišena aktivnost peroksidaze u određenim eksperimentalnim grupama, povećanje koncentracije ukupnih protina nije zapaženo u svim grupama, što može biti posledica smanjenja ekspresije drugih proteina u ćeliji.



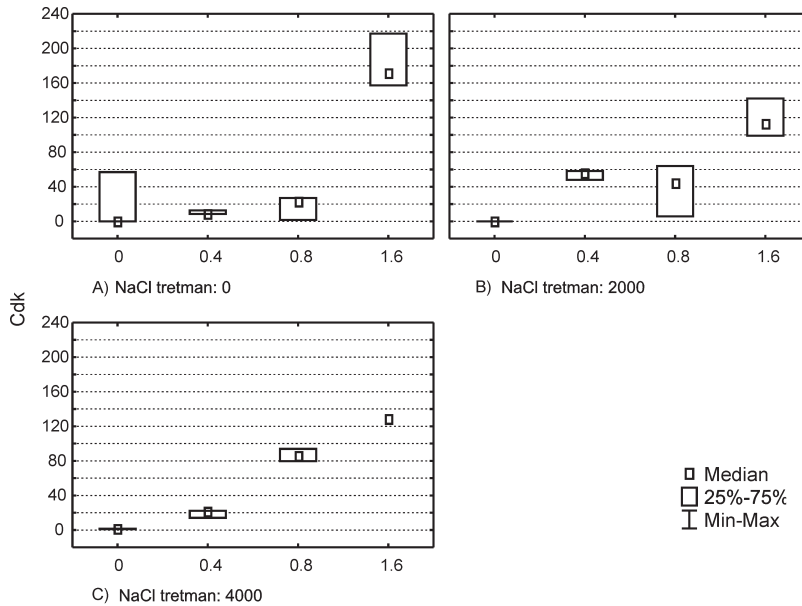
Slika 2. Uticaj različitih koncentracija Cd (ppm) na ukupnu koncentraciju proteina (mg/kg) pri koncentracijama NaCl od (A) 0 ppm, (B) 2000 ppm i (C) 4000 ppm

Figure 2. Effects of different Cd concentration (ppm) on total protein content (mg/kg) with NaCl concentration of (A) 0 ppm, (B) 2000 ppm, and (C) 4000 ppm

## Koncentracija usvojenog kadmijuma u korenu i listovima

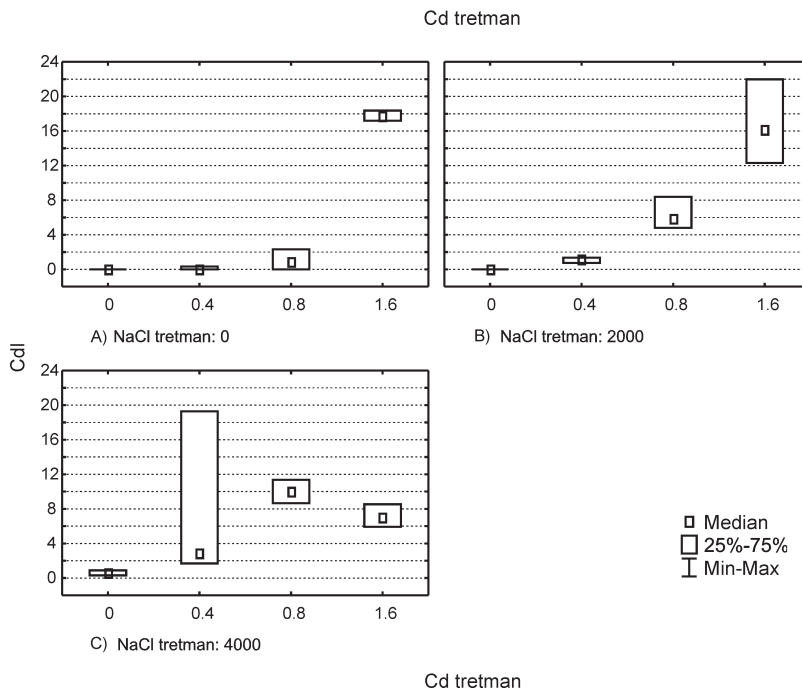
Koncentracije usvojenog kadmijuma u korenu i listovima prikazane su na slikama 3 i 4. Koncentracije u listovima su oko deset puta manje nego u korenu. Količina kadmijuma koja će se iz korena transportovati u listove ili semena zavisi od vrste biljke (Tuan i Popova 2012). Raspored usvojenog Cd zabeležen u našem eksperimentu pokazuje da nije došlo do hiperakumulacije, odnosno, vezivanja Cd za aminokiseline, proteine i peptide i smeštanja u nadzemne organe, što je posebno značajno za čoveka i poljoprivredu.

Trend porasta koncentracije usvojenog Cd merenog iz korena sa povećanjem koncentracije Cd u medijumu vidljiv je pri svim ispitivanim koncentracijama soli, dok je u nadzemnom delu trend povećanja vidljiv samo pri koncentracijama soli od 0 i 2000 ppm. Ovakvi rezultati u skladu su sa ranijim istraživanjima (Usman *et al.* 2005; Yilmaz i Parlak 2011). Povećanjem koncentracije NaCl pri koncentracijama Cd u medijumu od 0.8 ppm raste koncentracija usvojenog kadmijuma, dok pri koncentracijama Cd u medijumu od 1.6 ppm opada. Pospešeno usvajanje Cd u prisustvu NaCl potvrđeno je ranijim istraživanjima (Usman *et al.* 2005), ali mehanizam po kome se odvija još nije tačno definisan. Pretpostavlja se da je posledica građenja kadmijumovih kompleksa sa hlorom koji se lakše usvajaju od strane korena. Najveća koncentracija usvojenog kadmijuma izmerena je u eksperimentalnim grupama tretiranim najvišom koncentracijom Cd (1.6 ppm), bez prisustva soli, kako u nadzemnom, tako i u podzemnom delu biljke.



Slika 3. Uticaj različitih koncentracija Cd (ppm) i NaCl (ppm) u medijumu na koncentraciju usvojenog kadmijuma u korenu (ppm)

Figure 3. Effects of different Cd (ppm) and NaCl (ppm) concentration in medium on Cd uptake in roots (ppm)

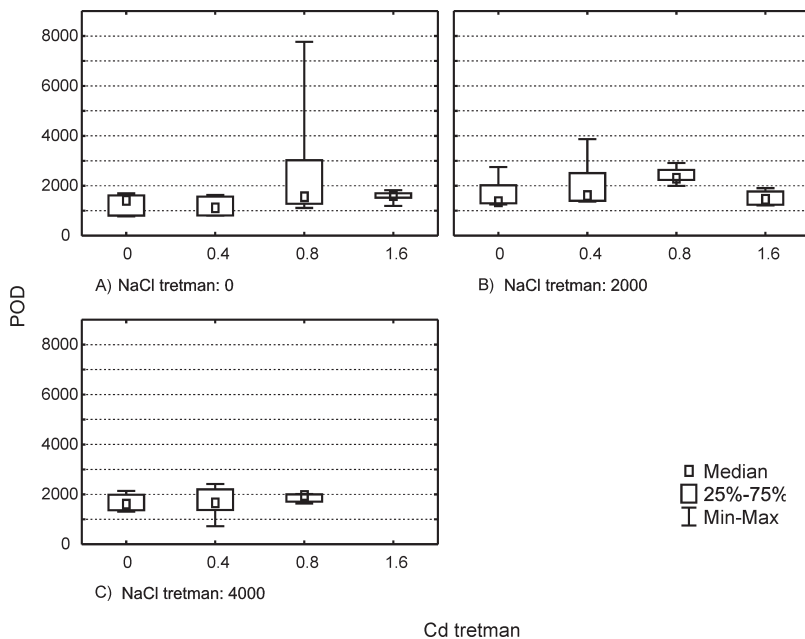


Slika 4. Uticaj različitih koncentracija Cd (ppm) i NaCl (ppm) u medijumu na koncentraciju usvojenog kadmijuma u nadzemnom delu biljke (ppm)

Figure 4. Effectsof different Cd (ppm) and NaCl (ppm) concentration in medium on Cd uptake in leaves (ppm)

## Aktivnost peroksidaze

Pri povećanju koncentracije NaCl u grupama koje nisu tretirane kadmijumom, uočen je trend porasta aktivnosti peroksidaze (slika 5). Ovakvi rezultati dobijeni su i u ranijim istraživanjima (Goudrazi i Pakniyat 2009). U biljkama tretiranim visokim koncentracijama soli, kao posledica osmot-



Slika 5. Uticaj povišenih koncentracija Cd (ppm) i NaCl (ppm) na aktivnost peroksidaze

Figure 5. Effects of different Cd (ppm) and NaCl (ppm) concentration on POD activity

skog stresa i štetnih efekata nekih jona, dolazi do remećenja fotosintetičkog elektron-transportnog lanca i stvaranja slobodnih radikala kiseonika. U cilju regulacije nivoa reaktivnih oblika kiseonika, povećava se aktivnost antioksidativnih enzima, kao što je peroksidaza (Goudrazi i Pakniyat 2009). Nije uočena povišena aktivnost POD pri povišenim koncentracijama kadmijuma, kao ni pri zajedničkom tretmanu kadmijumom i natrijum-hloridom, što može biti posledica eksperimentalne greške.

## Zaključak

Merenjem koncentracije usvojenog kadmijuma pokazano je da prisustvo NaCl u podlozi utiče na usvajanje Cd. Trend povećanja usvojenog Cd, sa povećanjem koncentracije Cd u medijumu vidljiv je kako u nadzemnom, tako i u podzemnom delu, osim u grupama tretiranim najvišim koncentracijama soli. Pretpostavlja se da je pospešeno usvajanje posledica stvaranja kadmijumovim kompleksa sa hlorom, koje biljka lakše usvaja. Usvojeni Cd je iz korena slabo transportovan u nadzemne delove, što je od velikog značaja za poljoprivredu. Pri srednjoj koncentraciji NaCl uočen je zajednički efekat Cd i NaCl na povećanje koncentracije prolina i to pri koncentracijama Cd do 0.8 ppm. Pretpostavlja se da je to odgovor biljke na osmotski i oksidativni stres. Pri najvišoj koncentraciji NaCl uočeno je smanjenje koncentracije prolina i povećanje koncentracije Cd, što nije u skladu sa očekivanim rezultatima. Pokazano je da biljke koje nisu tretirane kadmijumom, pri povećanju koncentracije NaCl imaju povišenu aktivnost enzima preoksidaze, verovatno kao odgovor na visok nivo reaktivnih oblika kiseonika, izazvanih slanim stresom. Iako je uočena povišena aktivnost anti-

oksidativnih enzima, nije zabeležena razlika u koncentraciji ukupnih proteina, osim u grupama tretiranim najvišim koncentracijama soli, što može biti posledica smanjenja ekspresije nekih drugih proteina.

---

## Literatura

- Ashraf M. P. J. C., Harris P. J. C. 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science*, **166** (1): 3.
- Azizpour K., Shakiba M. R., Sima N. K. K., Alyari H., Mogaddam M., Esfandiari E., Pessarakli M. 2010. Physiological response of spring durum wheat genotypes to salinity. *Journal of Plant Nutrition*, **33** (6): 859.
- Goudrazi M., Pakniyat H. 2009. Salinity Causes Increase in Proline and Protein Contents and Peroxidase Activity in Wheat Cultivars. *Journal of Applied Sciences*, **9**: 348.
- Grewal H. S. 2010. Response of wheat to subsoil salinity and temporary water stress at different stages of the reproductive phase. *Plant and soil*, **330** (1-2): 103.
- Hoagland D. R., Arnon D. I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *Circular. California Agricultural Experiment Station*, **347** (2)
- Lutts S., Kinet J. M., Bouharmont J. 1996. NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Annals of Botany*, **78** (3): 389.
- Meloni D. A., Gulotta M. R., Martínez C. A., Oliva M. A. 2004. The effects of salt stress on growth, nitrate reduction and proline and glycinebetaine accumulation in *Prosopis alba*. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, **16** (1): 39.
- Milone M. T., Sgherri C., Clijsters H., Navari-Izzo F. 2003. Antioxidative responses of wheat treated with realistic concentration of cadmium. *Environmental and Experimental Botany*, **50** (3): 265.
- Serrano-Martínez A., Fortea M. I., Del Amor F. M., Núñez-Delgado E. 2008. Kinetic characterisation and thermal inactivation study of partially purified red pepper (*Capsicum annuum* L.) peroxidase. *Food Chemistry*, **107** (1): 193.
- Sharma S. S., Dietz K. J. 2009. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends in plant science*, **14** (1): 43.
- Szabados L., Savouré A. 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in plant science*, **15** (2): 89.
- Tuan Anh T. R. A. N., Popova L. P. (2013). Functions and toxicity of cadmium in plants: recent advances and future prospects. *Turkish Journal of Botany*, **37**: 1.



- Usman A. R. A., Kuzyakov Y., Stahr K. 2005. Effect of immobilizing substances and salinity on heavy metals availability to wheat grown on sewage sludge-contaminated soil. *Soil & Sediment Contamination*, **14** (4): 329.
- Yang Y., Zhang Y., Wei X., You J., Wang W., Lu J., Shi R. 2011. Comparative antioxidative responses and proline metabolism in two wheat cultivars under short term lead stress. *Ecotoxicology and environmental safety*, **74** (4): 733.
- Yilmaz D. D., Parlak K. U. 2011. Changes in proline accumulation and antioxidative enzyme activities in *Groenlandia densa* under cadmium stress. *Ecological Indicators*, **11** (2): 417.

---

*Milica Aleksić*

## Physiological Response of Wheat (*Triticum aestivum* L.) to Elevated Concentrations of Cadmium and NaCl in the Growth Medium

Effects of cadmium and sodium chloride were tested on wheat (*Triticum aestivum* L.). Concentrations of proline, soluble proteins and cadmium uptake were measured. Plants were treated with different concentrations of NaCl (2000 i 4000 ppm), and CdSO<sub>4</sub> (0.4, 0.6, 0.8 and 1.6 ppm). The level of proline increased in plants treated with medium salt concentration (2000 ppm) with increasing Cd concentrations in the medium. Cadmium uptake was about ten times higher in roots in comparison to shoots concentrations. Higher concentrations of Cd in the medium lead to higher Cd uptake by both roots and shoots. NaCl in the medium increased Cd uptake by plants, probably as a result of the creation of chlorocomplexes of Cd which are easier to absorb. The activity of peroxidase (POD) was increased in plants that were treated with different concentrations of NaCl. The plant increased POD activity, probably to alleviate the oxidative damage induced by salt. Different concentrations of Cd in the medium and a combination of Cd and NaCl had no effect on POD activity. The effects of cadmium, sodium chloride, or the interaction of these factors, on the total protein content were observed only in groups treated with medium salt concentrations.

