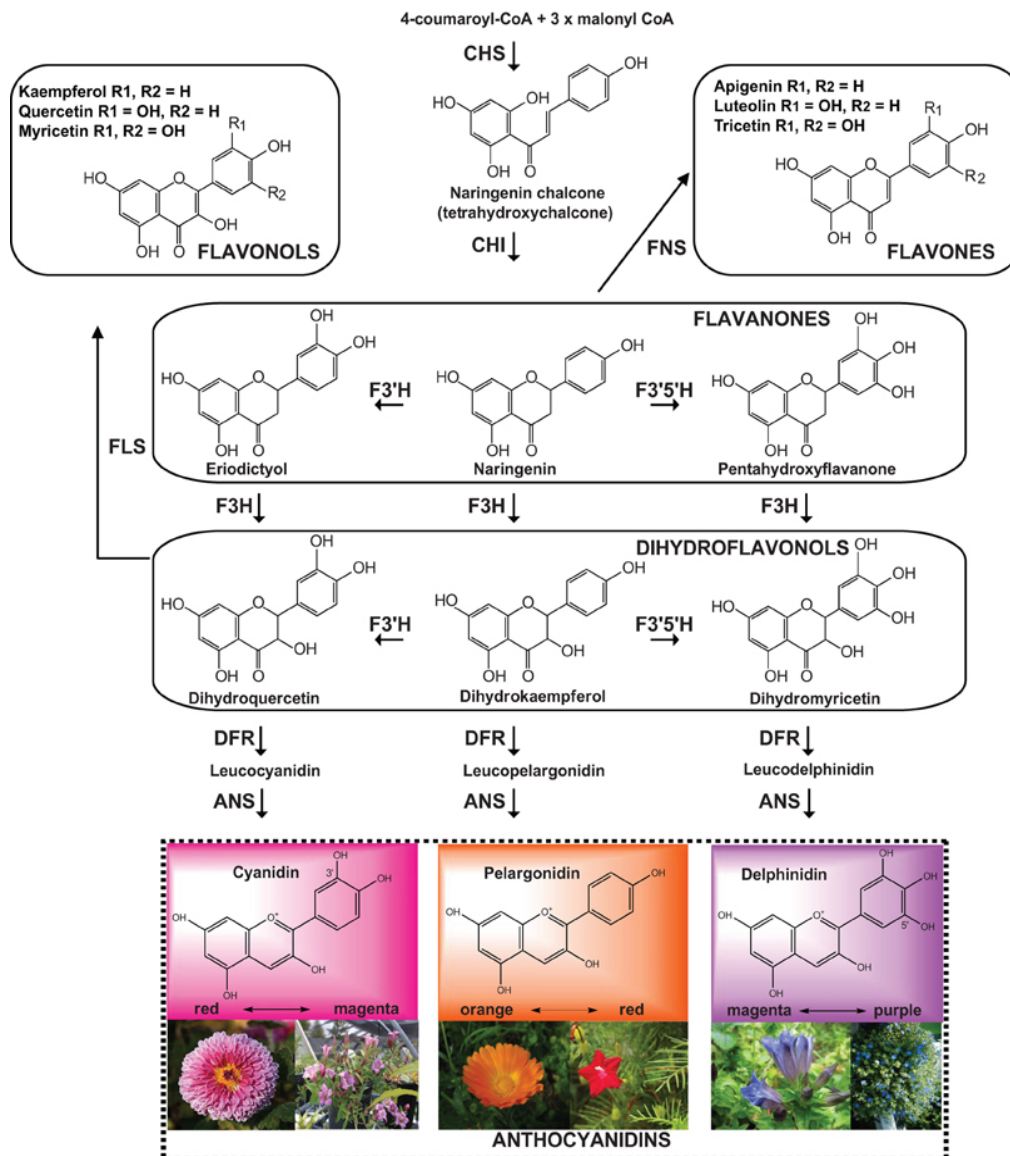


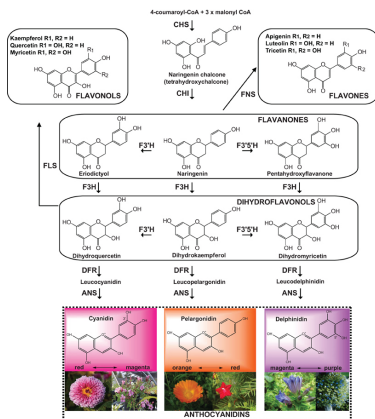
C S P P

COLLECTANEA STUDENTIIUM PHYSIOLOGIAE PLANTARUM



ZGODBA IZ NASLOVNICE

Pomembna odkritja v rastlinski biologiji



Flavonoidi so rastlinska barvila, ki igrajo pomembno vlogo v zaščiti rastline pred stresorji kot tudi v interakcijah rastlin z drugimi organizmi. Njihovo poznavanje in raziskave njihove sinteze lahko tako močno vplivajo na pridelavo hrane in druge veje industrije.

Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications

María L. Falcone Ferreyra, Sebastián P. Rius and Paula Casati*

Front. Plant Sci., 28 September 2012

<https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00222>

Slika vzeta iz citiranege članka.

Collectanea Studentium Physiologiae Plantarum
Zbornik študentov fiziologije rastlin

Izdajata: Katedra za fiziologijo rastlin, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, UL

Glavna in odgovorna urednica: Marjana Regvar, marjana.regvar@bf.uni-lj.si

Tehnični urednik: Matevž Likar

Uredniški odbor:

Marjana Regvar

Matevž Likar

Katarina Vogel-Mikuš

Naslov uredništva:

Collectanea Studentium Physiologiae Plantarum,

Zbornik študentov fiziologije rastlin

Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

Izdano: 2018

ISSN 1854-4193 (online: <http://www.bf.uni-lj.si/oddelek-za-biologijo/oddelek/katedre/botanika-in-fiziologija-rastlin/>)

4 VPLIV LISTNIH EKSTRAKTOV DRESNIKOV NA RAST ENDOFITSKIH GLIV

Kaja Belko Parkel, Lija Fajdiga, Maja Papež,
Evgenija Serafimova, Urška Ušeničnik

8 VPLIV KADMIJA NA PRIVZEM MINERALOV PRI SONČNICI (*HELIANTHUS ANNUUS*) IN JEČMENU (*HORDEUM VULGARE*)

Matea Maruna, Mladen Soldat, Urška Gošnjak
Prah, Matevž Posinek, Ivana Sedej, Špela Cerar

13 VPLIV NANODELCEV PALADIJA NA RAZVOJ KALIC ENOKALIČNIC IN DVOKALIČNIC

Urša Adamič, Andraž Dolar, Larisa Janžič, Iris
Šalamon, Miki Zarič, Valentina Ivanovska Zelič

18 VPLIV NANODELCEV SREBRA NA KALITEV IN RAZVOJ KALIC ENOKALIČNIC IN DVOKALIČNIC

Žana Lovšin, Pia Starič, Manca Volk, Jakob Jeriha,
Maja Ugrin, Ana Vojnović

22 VPLIV SVINCA NA PRIVZEM MINERALOV PRI SONČNICI IN JEČMENU

Hrastar Barbara, Naiaretto Sabrina, Opačak Ena,
Volk Lea, Žalec Nika

27 VPLIV SUŠE NA PRIVZEM MINERALOV PRI SONČNICI (*HELIANTHUS ANNUUS L.*) IN JEČMENU (*HORDEUM VULGARE L.*)

Jure Mravlje, Maja Hostnik, Amela Kujović

Vpliv listnih ekstraktov dresnikov na rast endofitskih gliv

Kaja Belko Parkel, Lija Fajdiga, Maja Papež, Evgenija Serafimova, Urška Ušeničnik

Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

- **Namen:** Želele smo ugotoviti vpliv etanolnih ekstraktov posameznih dresnikov (japonski, češki in sahalinski dresnik) na rast endofitskih gliv *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* in *Alternaria alternata*. Pričakovale smo inhibicijo rasti, saj so rastline rodu *Fallopia* znane kot invazivne vrste. Kot take bi namreč lahko z zaviranjem rasti endofitskih gliv avtohtonih rastlin vplivale na njihovo rast in si tako zagotovile prednost.
- **Metode:** V vsako petrijevko, ki je vsebovala 2,5 % etanolni ekstrakt posameznega dresnika, smo nacepile glivo *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* ali *Alternaria alternata*. Po enem in po dveh tednih inkubacije smo petrijevke fotografirale, izmerile njihovo preraščenost ter rezultate statistično obdelale.
- **Rezultati:** Prisotnost etanolnega ekstrakta vseh treh vrst dresnikov je rast gliv povečala. Največji vpliv je viden pri kombinaciji glive *Alternaria alternata* in japonskega dresnika (*Fallopia japonica*). Pri glivi *Botrytis cinerea* pa vpliva dresnika na rast glive ni bilo.

Ključne besede: *Fallopia*, alelopatija, listni ekstrakti, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*

Uvod

Japonski dresnik (*Fallopia japonica*), sahalinski dresnik (*F. sachaliensis*) ter njun križanec češki dresnik (*F. x bohémica*), danes spadajo med najbolj invazivne in problematične rastlinske vrste sveta. Japonski dresnik je kot hortikulturna rastlina v Evropo prišel leta 1848, nato pa ušel izza načrtovanih meja. Njegovo značilno hitro širjenje predstavlja udarec urbanemu razvoju ter posega v biodiverzitetu, zato je japonski dresnik leta 1999 IUCN (International Union for the Conservation of Nature) uvrstil med sto najhujših rastlinskih oz. živalskih invazivnih vrst (Luque in sod., 2013). Češki dresnik je kot hibrid japonskega in sahalinskega še bolj agresiven in predstavlja hud okoljski problem, saj se kljub siceršnji manjši razširjenosti po ustalitvi ob bregovih rek masovno razraste (Lavoie, 2017). Vzpostavitev kontrole je zahtevna, saj ima rastlina obširen koreninski sistem, ki vztraja kljub navidezno uspešnemu nadzemnemu kemičnemu nadzoru. Najboljše orodje omejevanja dresnikov bi bila klasična biološka kontrola, iskanje potencialnih agensov pa je najučinkovitejše v sami okolici rastline (Kurose in sod., 2012).

Vzrok za povečanja uspešnosti invazivnih tujerodnih vrst je lahko alelopatija. To je mehanizem, pri katerem tujerodna vrsta izloča alelopatske spojine, kot so: alifatski aldehidi, ketoni, nenasičeni laktoni, maščobne kisline, fenoli, tanini, steroidi in terpenoidi (Li in sod., 2010). Vse to so produkti sekundarnega metabolizma, ki posredno ali neposredno vplivajo na rast drugih rastlinskih vrst. Tujerodne vrste imajo močne alelopatske učinke, ker domače rastline v preteklosti niso sobivale z njimi in so zato bolj dovzetne za alelokemikalije. *Fallopia japonica* in *F. sachalinensis* vsebujeta različne bioaktivne sekundarne spojine, ki imajo protiglivne in/ali antibakterijske učinke. Rezultati raziskav kažejo, da imajo lahko ekstrakti obeh vrst zaviralni učinek na druge rastlinske vrste. Preko alelopatije lahko torej inducirajo svojo dominanco oz. uspešnost v okolju (Murell in sod., 2011).

Razširjenost invazivnih vrst poleg vpliva na številčnost in sestavo mikroorganizmov v tleh posega tudi v sestavo in količino arbuskularno-mikoriznih gliv, dresniki namreč niso mikorizne rastline in tako še dodatno izrinjajo avtohtono floro (Zubek in sod., 2016).

Zanimal nas je vpliv alelokemičnih snovi na glivne endofite *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* in *Fusarium oxysporum*, zato smo jih tretirale z etanolnimi ekstrakti treh vrst dresnikov (japonski, sahalinski in češki dresnik). Za etanolne ekstrakte smo se odločile, ker v vodnih ekstraktih ostanejo tudi snovi, kot so sladkorji, aminokisline, ki bi lahko z vplivom na rast gliv, motile našo raziskavo.

Metode

Uporabile smo zamrznjene liste japonskega (*Fallopia japonica*), češkega (*Fallopia bohémica*) in sahalinskega (*Fallopia sachalinensis*) dresnika, ki so bili nabrani na lokaciji Polule, v Celju (Slovenija), kjer vse tri navedene vrste dresnika rastejo skupaj. Pripravile smo 2,5 % etanolni ekstrakt (2,5 g listja v 100 mL etanola), sledilo je 30 min mešanje na magnetnem mešalu. Ekstrakt smo filtrirale skozi 0,44 µm filtrni papir. Za poskus smo na petrijevke (premer 9 cm) z gojiščem iz krompirjevem desktoznim agarjem nanesele po 1 mL ekstrakta in ga razmazale s hokejko. Sledilo je nacepljanje gliv s plutovrtom iz gojišč, preraščenih z micelijem izbranih vrst gliv, ki smo jih

dobile iz zbirke Katedre za botaniko in fiziologijo rastlin na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete. Pripravile smo 13 paralelk.

Negativna kontrola je namesto ekstrakta vsebovala 1 mL etanola, pozitivna kontrola pa ničesar.

Sledila je inkubacija v rastni komori v temi pri temperaturi 21°C. Prvič smo rast gliv spremljale in fotografirale en teden po nacepljanju, nato pa še enkrat teden za tem.

Preraščenost petrijevok smo izmerile s programom ImageJ, statistično obdelavo pa opravile v Microsoft Office Excel z dodatkom XL ToolBox (<https://www.xltoolbox.net>) z enosmerno ANOVA in Holm-Sidak post-hoc testom pri $p < 0,05$, s katerim smo določili statistično značilne razlike med posameznimi tretmaji.

Rezultati

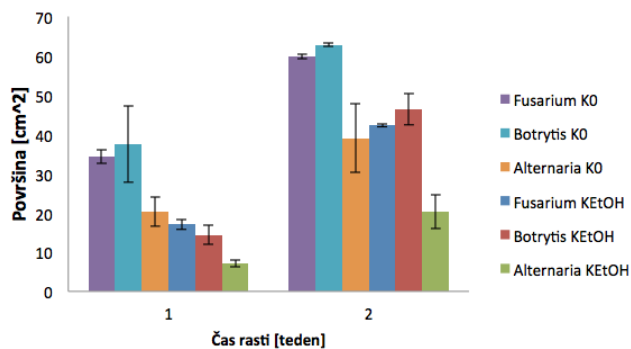
Ob primerjavi meritev dveh različnih kontrol (negativne kontrole brez dodatkov in kontrole z dodanim etanolom), kar je prikazano na **sliki 1**, lahko opazimo, da že sam dodatek etanola negativno vpliva na rast gliv. Vrste gliv se prav tako med seboj razlikujejo po hitrosti rasti. Gliva *A. alternata* je med izbranimi glivami najpočasnejša. Pri glivi *F. oxysporum* prav tako v prvem tednu ni statistično značilnih razlik, pojavijo se v drugem tednu ob dodatku ekstrakta češkega dresnika, kar je vidno na **sliki 2**. Pri glivi *B. cinerea* ni statistično značilnih razlik med kontrolo in posameznimi ekstrakti (**slika 3**), pri ostalih dveh glivnih vrstah pa se v drugem tednu pojavijo razlike. Pri glivi *A. alternata* se razlike pojavijo ob dodatku japonskega dresnika (**slika 4**).

Na **sliki 5**, kjer so prikazani deleži rasti gliv glede na kontrolo z etanolom pri različnih ekstraktih lahko vidimo, da ima najbolj raznovrsten vpliv japonski dresnik, ki najbolj pozitivno vpliva na rast glive *A. alternata*. Pri sahalinskem dresniku ni statistično značilnih razlik med različnimi glivami. Ekstrakti dresnikov tako na rast izbranih gliv vplivajo pozitivno ali pa sploh ne, zaviranja rasti namreč nismo opazile.

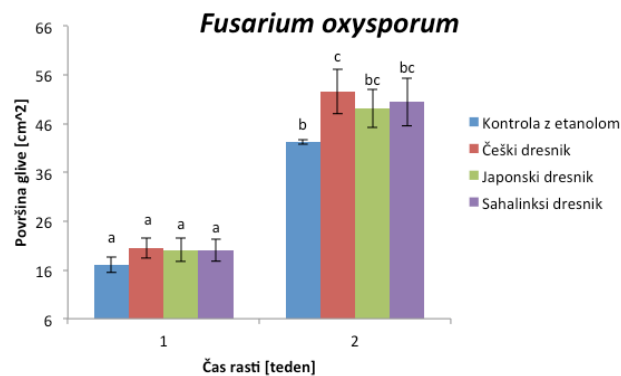
Diskusija

Predvidevali smo, da bodo glive slabše rasle na gojiščih, kjer smo dodali etanolni ekstrakt, a rezultati kažejo ravno obratno. Rast je bila namreč boljša v primerih, ko je bil dodan etanolni ekstrakt v primerjavi z gojišči, kjer je bil dodan le etanol. Možno je, da je do tega prišlo zaradi različnih strukturnih formul oz. vezavnih skupin različnih fenolnih komponent, saj to vpliva na toksičnost spojin. Spojine s hidroksilno skupino v orto poziciji na primer na Phytophthora delujejo bolj zaviralno kot tiste, ki imajo hidroksilno skupino v para poziciji. Prisotnost dodatne hidroksilne skupine pa inhibicijo še dodatno zniža (Christie, 1965).

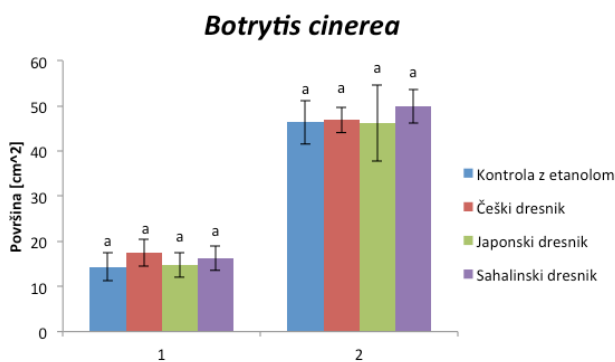
Prav tako je možno, da glive sproščajo snovi, s katerimi se zaščitijo pred škodljivimi učinki, ki bi jih lahko povzročil dresnik (Kurose in sod., 2012). Kljub temu, da smo uporabili etanolne ekstrakte (torej v samem ekstraktu ni bilo ostankov sladkorjev in aminokislin, ki bi jih glive lahko uporabile za vir ogljika ter dušika in bi s tem pospeševale rast), je možno, da na rast gliv pozitivno vpliva tudi prisotnost avksina v alkoholnih listnih ekstraktih dresnikov. Iz literature vemo, da v določenih okoliščinah (predvsem v primernih koncentracijah) avksin stimulira rast mikroorganizmov (tudi gliv) s pospeševanjem elongacije celic, podobno kot je to značilno za višje rastline (Chatterjee in sod., 2007). Chatterjee in sod. (2007), so tako



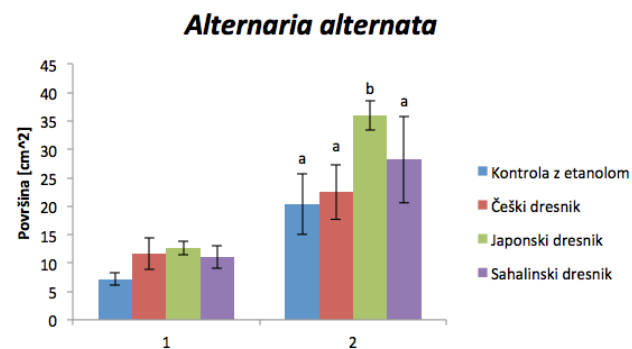
Slika 1: Povprečna izmerjena površina gliv po enem in dveh tednih po inokulaciji, brez tretiranja (K0) in z etanolom (KEtOH)



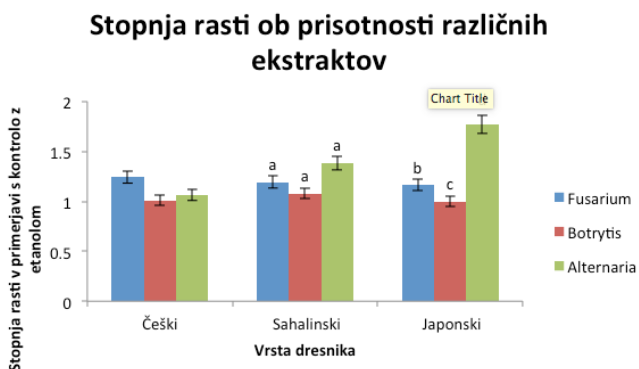
Slika 2: Povprečna izmerjena površina glive *Fusarium oxysporum* po enem in dveh tednih rasti po inokulaciji, tretirana z ekstrakti različnih sort dresnika (s črkami so označene statistično značilne razlike med podatki)



Slika 3: Povprečna izmerjena površina glive *Botrytis cinerea* po enem in dveh tednih rasti po inokulaciji, tretirana z ekstrakti različnih sort dresnika (s črkami so označene statistično značilne razlike med podatki)



Slika 4: Povprečna izmerjena površina glive *Alternaria alternata* po enem in dveh tednih rasti po inokulaciji, tretirana z ekstrakti različnih sort dresnika (s črkami so označene statistično značilne razlike med podatki)



Slika 5: Stopnja rasti različnih gliv v primerjavi s kontrolo z etanolom ob tretiranju z ekstrakti različnih dresnikov (s črkami so označene statistično značilne razlike med podatki)

v raziskavi, kjer so poskušali z rastlinskimi hormoni izboljšati rast glive *Mucor rouxii*, ob dodatku avksina v koncentraciji

1 mg/L, dosegli povečanje produkcije biomase od 14 pa vse do 36 %. Tudi Wang in sod. (2010) so pri raziskovanju rasti gliv, ki so simbioziti v lišajih, s tretiranjem z avksini dosegli stimulirano rast gliv. Za optimalno povečanje rasti pa so določili koncentracijo 2 $\mu\text{mol/L}$.

Na rast glive *Alternaria alternata* je najbolj vplival ekstrakt japonskega dresnika. To ni presenetljivo, saj je gliva *Alternaria* znan endofit japonskega dresnika, njena funkcija pa je zaščita rastline pred infekcijo z rjo *Puccinia polygoni – amphibii* var. *tovariae*, saj hkratna inokulacija *Alternarie* in omenjene rje močno zmanjša kolonizacijo rje (Kurose in sod., 2012). To pojasnjuje izboljšano rast izolata *A. alternata* na gojiščih, ki vsebujejo ekstrakt *F. japonica*.

Zanimivo je, da ekstrakti dresnikov na rast glive *Botrytis cinerea* niso imeli vpliva. Ta pojav bi lahko pojasnili z različnim načinom življenja tretiranih gliv. *Botrytis* je bolj patogen vrsta kot *Alternaria* in *Fusarium*, njena patogenost pa je povezana z lakazno aktivnostjo. Predhodne raziskave so pokazale, da glivni sevi, ki niso uspeli razgraditi fitoaleksinov, niso patogeni, vsi sevi, ki pa so fitoaleksine uspeli razgraditi, so lahko razgradili tudi druge stilbene, kot sta resveratrol in pteristilben (Sbaghi in sod., 1996). Tako lahko sklepamo, da je morda prisotnost

zunajceličnih nespecifičnih encimov tista, ki je vplivala na razgradnjo alelokemikalij in tako izničila učinke dresnika. Na rast glive *Fusarium oxysporum* so statistično značilno vplivali le ekstrakti češkega dresnika, ki so rast glive pospešili. Večina sevov *F. oxysporum* je nepatogenih in jih pogosto najdemo med endofiti različnih rastlin.

Vsi ekstrakti dresnikov so imeli približno enak učinek: vsi so rast pospešili. Noben ekstrakt ni pretirano izstopal, razen že omenjene kombinacije glive *Alternaria alternata* in dresnika *Fallopia japonica*.

V literaturi se je izkazalo, da imajo koreninski ekstrakti dresnika na rast gliv zaviralni učinek (Peng in sod., 2013), kar bi lahko bila posledica odsotnosti avksina ali višja vsebnost fenolov, zato predlagamo, da se v nadaljnjih raziskavah testira še koreninske ekstrakte in primerja njihov učinek z listnimi.

Zaključek

Prisotnost ekstrakta v gojišču rast gliv poveča, kar je ravno obratno od pričakovanj. Zaradi povečane rasti gliv imajo dresniki na tretirane glive pozitiven alelopatski učinek ali pa je v ekstraktih prisotno še kaj, kar rast gliv pospešuje.

Literatura

1. Chatterjee S., Chatterjee S., Chatterjee B., Guha A. 2007. Influence of plant growth hormones on the growth of *Mucor rouxii* and chitosan production. *Microb Res* 164:347-351
2. Christie T. 1965. The effects of some phenolic compounds upon the growth of two species of *Phytophthora*. *New Zealand J Agr Res*, 8:630-635
3. Kurose D., Furuya N., Tsuchiya K., Tsushima S., Evans H. 2012. Endophytic fungi associated with *Fallopia japonica* (Polygonaceae) in Japan and their interactions with *Puccinia polygoni-amphibii* var. *tovariae*, a candidate for classical biological control. *Fun Biol* 116:785-791
4. Lavoie C. 2017. The impact of invasive knotweed species (*Reynoutria* spp.) on the environment: review and research perspectives. *Biol Invasions* 19:2319-2337
5. Li Z., Wang Q., Ruan X., Pan C., Jiang D. 2010. Phenolics and Plant Allelopathy. *Molecules*, 15, 12: 8933-8952
6. Luque G. M., Bellard C., Bertelsmeier C., Bonnaud E., Genovesi P., Simberloff D., Courchamp F. 2013. Monster fern makes IUCN invader list. *Nature*, 498 : 37
7. Murrell C., Gerber E., Krebs C., Parepa M., Schaffner U., Bossdorf O. 2011. Invasive knotweed affects native plants through allelopathy. *Am J Bot* 98:38-43
8. Peng W., Qin R., Li X., Zhou H. 2012. Botany, phytochemistry, pharmacology, and potential application of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.: A review. *J Ethnopharm* 148:729-745
9. Sbaghi M., Jeandet P., Bessis R., Leroux P. 1996. Degradation of stilbene-type phytoalexins in relation to the pathogenicity of *Botrytis cinerea* to grapevines *Plant Pathol* 45:139-144
10. Zubek S., Majewska M.L., Blaszkowski J., Stefanowicz A.M., Nobis M., Kapusta P. 2016. Invasive plants affect arbuscular mycorrhizal fungi abundance and species richness as well as the performance of native plants grown in invaded soils. *Biol Fert Soil* 52:879-893
11. Wang X. Y., Wei X. L., Luo H., Kim J. A., Jeon H. S., Koh Y. J., Hur J. 2010. Plant Hormones Promote Growth in Lichen-Forming Fungi. *Microbiol* 38:176-179

Vpliv kadmija na privzem mineralov pri sončnici (*Helianthus annuus*) in ječmenu (*Hordeum vulgare*)

Matea Maruna, Mladen Soldat, Urška Gošnjak Prah, Matevž Posinek, Ivana Sedej, Špela Cerar

Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

- Namen poskusa je bil določiti učinek kadmija na rast, vsebnost pigmentov in privzem mineralov pri dvokaličniški vrsti *Helianthus annuus* (sončnica), in pri enokaličniški vrsti *Hordeum vulgare* (ječmen, sorta Bingo)
- Rastline z velikostjo poganjka cca. 10 cm smo za dva tedna izpostavili različnim koncentracijam kadmija (5, 10, 30 μM) raztopljenega v Hoaglandovi raztopini. Ob koncu poskusa smo rastline stehali in posušili. Iz posušenega materiala smo spektrofotometrično določili vsebnost pigmentov in z metodo rentgenske fluorescenčne spektrometrije XRF določili koncentracije nekaterih mineralnih hranil.
- Z naraščajočo koncentracijo kadmija, so se masa, vsebnost pigmentov ter koncentracije makroelementov pri obeh rastlinskih vrstah zniževale. Izmerjene koncentracije mikroelementov so v obeh primerih naraščale z višanjem koncentracije kadmija.
- Izpostavljenost sončnice in ječmena raztopini kadmija ima negativen učinek na rast in razvoj sončnice in ječmena.

Ključne besede: *težke kovine, fotosintezna učinkovitost, mikroelementi, makroelementi*

Uvod

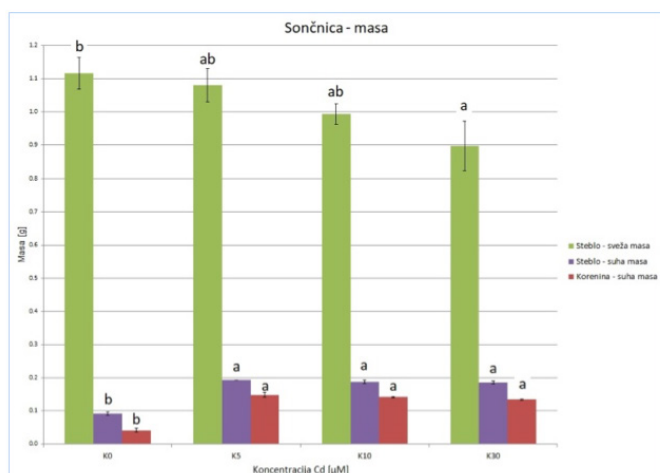
Kadmij (Cd) je kovina, ki predstavlja veliko grožnjo v okolju zaradi svoje strupenosti za živali in ljudi (Kirkham, 2006). Z razvojem industrije in visoke uporabe kemičnih gnojil, pesticidov in herbicidov, je onesnaženje kmetijskih zemljišč s Cd postalo v mnogih predelih sveta velik problem (Liu s sod., 2003). Cd na rastline učinkuje tako, da oteži privzem in translokacijo mineralov ter povzroči oksidativni stres, ki pripomore k spremenjeni fotosintezni aktivnosti in sintezi klorofila v rastlinah. Interakcijo med Cd in mineralnimi hranili zaznamo kot spremembo količine hranil v rastlini, posledica česar so spremenjeni fiziološki procesi in zmanjšana rast (Jiang s sod., 2004; Dinark s sod., 2008). Sončnica ima sposobnost akumulacije velikih koncentracij Cd. Cd oteži translokacijo mikroelementov in sklepa se, da ovira mehanizme transporta mineralnih hranil od korenin do apikalnih delov rastline, kar zavre rast in proizvodnjo biomase (Rivelli s sod., 2014; Vaculik s sod., 2015). Ječmen naj bi bil po nekaterih virih toleranten na Cd (Kherbani s sod., 2015), vendar določene raziskave kažejo, da Cd v visokih koncentracijah vpliva na dolžino in število poganjkov, upočasnjuje organogenezo in vpliva na delitev apikalnih meristemskih celic (Kaznina s sod., 2006; Singha in Myhrb, 1998).

Cilj naše raziskave je preučiti vpliv Cd na privzem mineralnih hranil pri sončnici in ječmenu sorte Bingo.

Sklepali smo, da bo sončnica ob povišani koncentraciji Cd v okolju ta element akumulirala, kar bo otežilo privzem mineralov in negativno vplivalo na rast in razvoj sončnice ter znižalo vsebnost pigmentov v rastlini. Predvidevali smo tudi, da je ječmen toleranten na Cd, tako da bo povišana koncentracija tega elementa v okolju imela v primerjavi s sončnico manjši vpliv na privzem drugih mineralov in posledično tudi manjši vpliv na rast in razvoj ječmena.

Materiali in metode

Uporabili smo semena dveh vrst rastlin, sončnice (*Helianthus annuus*) in ječmena (*Hordeum vulgare*) sorte Bingo. Posadili smo jih v korita z Agra-vermikulitom, ki smo jih postavili v



Slika 1: Grafični prikaz sveže in suhe mase stebela in suhe mase korenin sončnice v odvisnosti od različnih koncentracij Cd (0, 5, 10 in 30 µM) v raztopini; povprečna vrednost ± SN, n=6. Različne črke označujejo statistično značilno razliko (Ducanov test; p<0.05).

rastno komoro s stalno zračno vlago (45%), temperaturo 21°C in fotoperiodo 16 h svetlobe, 8 h teme. Počakali smo, da so rastline zrastle do minimalno 10 cm. Rastline smo prenesli v čaše za hidroponiko, napolnjene s Hoaglandovo hranilno raztopino (Hoagland, 1938) in raztopinami različnih koncentracij Cd (5, 10 in 30 µM) ter kontrolne čaše brez dodanega Cd (0 µM). V vsako čašo z določeno koncentracijo Cd smo namestili po 3 rastline (pri sončnici) oziroma po 5 rastlin (pri ječmenu). Spremljali smo dve vzoredni seriji z istimi koncentracijami Cd za vsako rastlinsko vrsto. Rastline so bile omenjenim pogojem izpostavljene 2 tedna (15 dni). Med poskusom smo rastlinam dolivali Hoaglandovo raztopino. Po 15 dneh smo določili svežo in suho maso korenin in poganjkov rastlin. Iz suhega materiala smo določili vsebnost fotosinteznih pigmentov (klorofila a, klorofila b) in karotenoidov (Monni s sod., 2001) ter izračunali njihovo koncentracijo v vzorcih (Lichtenthaler in Buschmann, 2001). Z metodo XRF smo izvedli kvantitativno analizo mineralov elementov (fosfor (P), žveplo (S), kalij (K), kalcij (Ca), mangan (Mn), železo (Fe), cink (Zn)) v koreninah in v poganjkih, ki so bili izpostavljeni različnim koncentracijam Cd. Podatke smo zbrali in uredili v programu Microsoft Excel 2010, statistično obdelavo podatkov pa smo izvedli s programom Statistica 7.0 (Copyright StatSoft, inc. 1984-2004), v katerem smo naredili Ducanov post hoc test.

Rezultati in diskusija

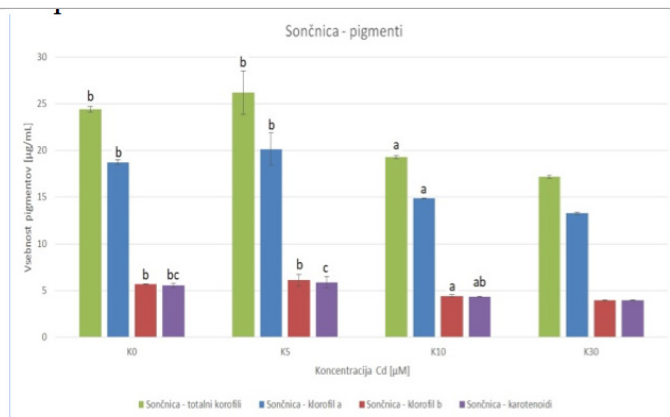
Pri višjih koncentracijah Cd je sveža masa sončnice upadla, medtem ko je suha masa narastla (**slika 1**). To bi lahko razložili s tem, da količina vode upada pri zvišanju koncentracije Cd (Gonzales s sod. 2012). Sončnice, ki so bile izpostavljene Cd, so imele večji delež suhe mase kot pa kontrola (**slika 1**). Na osnovi tega bi lahko sklepali, da je Cd v nizkih koncentracijah nujno potreben za rast rastlin. Dejstvo, da je sveža masa rastlin, ki so rastle v okolju brez Cd, višja, kakor masa rastlin, ki so rastle v prisotnosti Cd, si razlagamo napako pri meritvah. Možen vzrok napake bi lahko bil v neenakosti velikosti rastlin, ki smo jih iz lonca prenesli na hidroponiko ali pa neenaki svetlobni pogoji v rastni komori. Druga možna razlaga je, da rastlina na povišanje



Slika 2: JEČMEN: spodaj - kontrolni rastlini, konc. Cd=0 µM, zgoraj - rastlini tretirani s konc. Cd=30 µM

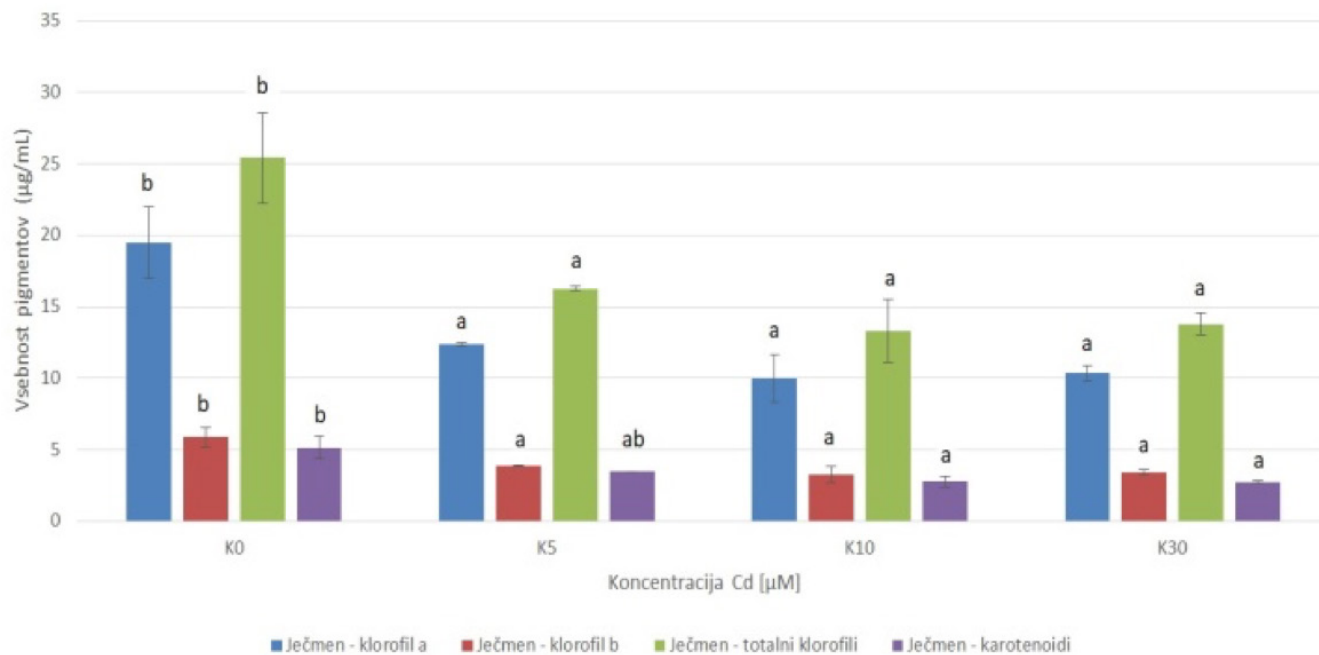


Slika 3: SONČNICA: spodaj - kontrolna rastlina, konc. Cd=0 μM , desno -rastlini tretirani s konc. Cd=30 μM



Slika 4: Vsebnost pigmentov (klorofil a in b, karotenoidi) pri sončnici v odvisnosti od različnih koncentracij Cd (0, 5, 10 in 30 μM) v raztopini; povprečna vrednost \pm SN, n=10. Različne črke označujejo statistično značilno razliko (Ducanov test; $p < 0.05$).

Ječmen - pigmenti



Slika 5: Vsebnost pigmentov (klorofil a in b, karotenoidi) pri ječmenu v odvisnosti od različnih koncentracij Cd (0, 5, 10 in 30 μM) v raztopini; povprečna vrednost \pm SN, n=10. Različne črke označujejo statistično značilno razliko (Ducanov test; $p < 0.05$).

koncentracije Cd odgovori z obrambnim mehanizmom t.i. hormonezo. S tem mehanizmom rastlina z intenzivnejšo rastjo ustvari učinek redčenja koncentracije elementa, s čimer zmanjša verjetnost nastanka poškodb (Stebbing, 1982). V primeru hormoneze naj bi sicer prišlo do 10-15% povečanja biomase, v našem primeru pa se mase razlikujejo za več kot 100%, zato se nam napaka pri meritvah zdi bolj verjetna obrazložitev. Z naraščanjem koncentracije Cd masa ječmena variira manj kot masa sončnice. Sklepamo, da ima Cd manjši vpliv na enokaličnice kot na dvokaličnice, zaradi Cd-vezavnega kompleksa, ki ga imajo enokaličnice (Inouhe s sod., 1994). Na sliki 2 in sliki 3 lahko vidimo učinek, ki ga je imel Cd na rast

Tabela 1: Koncentracija mikroelementov pri sončnici v odvisnosti od različnih koncentracij Cd (0, 5, 10 in 30 μM) v raztopini; Različne črke označujejo statistično značilno razliko (Ducanov test; $p < 0.05$).

MIKROELEMENTI

μM	Mn	Zn
0	227 b	187 a
5	65 a	54 b
10	63 a	133 ab
30	116 ab	147 a

rastlin, ki smo jih za 15 dni izpostavili najvišji koncentraciji Cd, v primerjavi s kontrolno skupino. Pri ječmenu in sončnici je bila dolžina poganjka in korenine pri rastlinah, ki so rastle v prisotnosti Cd manjša kot v kontrolni skupini. Večja razlika v

Tabela 2: Koncentracija makroelementov pri sončnici v odvisnosti od različnih koncentracij Cd (0, 5, 10 in 30 μM) v raztopini; Različne črke označujejo statistično značilno razliko (Ducanov test; $p < 0.05$).

MAKROELEMENTI

Korenine		
μM	P	K
0	10700 b	71150 b
5	8790 ab	59900 ab
10	5505 ab	43000 a
30	2750 a	38600 a

Tabela 3: Koncentracija mikroelementov pri ječmenu v odvisnosti od različnih koncentracij Cd (0, 5, 10 in 30 μM) v raztopini; Različne črke označujejo statistično značilno razliko. (Ducanov test; $p < 0.05$).

MIKROELEMENTI

Korenine	
μM	Zn
0	69 a
5	92 a
10	141 b
30	137 b
Steblo	
0	49 ab
5	37 a
10	52ab
30	69 b

velikosti rastlin je bila pri sončnici, zlasti v dolžini korenin, ki so bile pri testni skupini približno 60% krajše od korenin kontrolne skupine.

Izpostavljenost nizki koncentraciji Cd (5 μM) poviša fotosintezno učinkovitost sončnice, saj naraste koncentracija klorofilov a in b ter karotenoidov (**slika 4**). Pri višjih koncentracijah tega učinka ni in fotosintezna učinkovitost z naraščanjem koncentracije Cd upada. Vsebnost klorofilov a in b ter karotenoidov pri ječmenu upada z naraščajočo koncentracijo Cd v primerjavi s kontrolo, ki ni bila izpostavljena Cd (**slika 5**). Lahko sklepamo, da ima Cd negativen učinek na fotosintezno delovanje sončnice in ječmena, saj se pri večjih koncentracijah Cd znižuje fotosintezna učinkovitost. Vassilev s sod. (1998) navaja, da Cd zavira fotosintezne procese, saj posredno učinkuje na biosintezo klorofila in povzroča motnje v transportu elektronov do fotosistema I in fotosistema II na tilakoidnih membranah.

Koncentracija makroelementov P in K v koreninah sončnice upada z naraščajočo koncentracijo Cd (**tabela 1**). Tudi koncentracija mikroelementa Mn upada z naraščajočo koncentracijo Cd glede na kontrolo (**tabela 2**). Koncentracija mikroelementa Zn pri najmanjši koncentraciji izpostavljenosti

Tabela 4: Koncentracija makroelementov pri ječmenu v odvisnosti od različnih koncentracij Cd (0, 5, 10 in 30 μM) v raztopini; Različne črke označujejo statistično značilno razliko. (Ducanov test; $p < 0.05$).

MAKROELEMENTI

μM	S	K	Ca
0	503 a	19600 b	2065 a
5	569 ab	11855 a	2485 ab
10	645 b	10145 a	3125 bc
30	544 a	7550 a	3290 c
Steblo			
μM	K	Ca	
0	36600 b	4250 b	
5	31200 ab	2860 a	
10	23800 a	3710 ab	
30	29300 ab	2755 a	

Cd (5 μM) upade, pri izpostavljenosti višjim koncentracijam Cd (10 μM , 30 μM) pa se koncentracija Zn poviša v primerjavi s kontrolo (**tabela 2**). Lahko sklepamo, da Cd pri sončnici zavira privzem makroelementov in večine mikroelementov, z izjemo Zn, katerega privzem se je povečal pri večjih koncentracijah Cd. Vsebnost makroelementov in mikroelementov pri ječmenu sicer močno variira, velike razlike so v mineralni sestavi korenine in stebela iste rastline. Pri ječmenu koncentracija K v koreninah in steblih upada, koncentracija S pa narašča z naraščanjem koncentracije izpostavljenosti Cd glede na kontrolo (**tabela 4**). Izpostavljenost 5 μM , 10 μM in 30 μM koncentracijam Cd poveča privzem Ca v koreninah, hkrati pa v steblih upada z naraščajočo koncentracijo Cd (**tabela 4**). V steblih je pri koncentracijah Cd 10 μM in 30 μM povečan privzem Zn, medtem ko je pri koreninah povišan privzem Zn pri koncentraciji Cd 5 μM (**tabela 3**). Lahko sklepamo, da izpostavljenost ječmena Cd oteži privzem K v rastlino, hkrati pa poveča privzem S, Zn ter Ca v koreninah. Povečano koncentracijo Zn pri obeh vrstah rastlin bi lahko razložili s tem, da se Cd veže na fitokelatine in s tem tekmuje za privzem z Zn. V odgovor lahko rastlina poviša ekspresijo Zn transporterjev, da preskrbi rastlino z zadostno količino Zn. Zaradi oksidativnega stresa se poveča privzem S, posledično pa se sintetizirajo fitokelatini. S pri ječmenu je lahko posledica večjega oksidativnega stresa v rastlini zaradi izpostavljenosti Cd, posledično pa se sintetizirajo fitokelatini. Sintetizira se več proteinov, ki vsebujejo cistein. Tiolne skupine, ki vsebujejo S imajo antioksidantni učinek, saj se ob oksidativnem stresu oksidirajo in povežejo v disulfidne mostičke, s čimer preprečijo oksidativno škodo drugih bioloških molekul (Leustek in Saito, 1999). Povišana koncentracija Ca je posledica povišanega privzema Ca v apoplast, zaradi česar se zmanjša privzem Cd in posledično omili toksični učinek Cd (nastajanje superoksidnega radikala in celična smrt) (Tamás s sod., 2017). Velike standardne napake pri vsebnostih mineralov so lahko posledica napake, nehomogenosti vzorca oz. pomanjkanja materiala za izdelavo tabletk za rentgensko fluorescenčne spektrometrijo ali pa tudi premajhen N oziroma število rastlin. Podatki v literaturi so sicer glede privzema in akumulacije hranil pogosto kontradiktorni. Rastline lajšajo toksičen učinek

Cd s privzemom določenih hranil ali njihovim prerazporejanjem za minimalizacijo škode. Zaradi tega pride do pomanjkanja nekaterih hranil potrebnih v določenem delu rastline, zaradi česar je rast rastline omejena (Huang s sod., 2007; Hédiji s sod., 2015).

Zaključki

Pri sončnici in ječmenu lahko potrdimo negativen učinek Cd na rast in na fotosintezno učinkovitost. Pri obeh rastlinskih vrstah je Cd povzročil upočasnjeno rast stebela in korenin. Znižale so se koncentracije fotosinteznih pigmentov, zaradi česar je bila fotosintezna učinkovitost slabša. Poleg tega smo ugotovili, da ima Cd v okolju večji vpliv na sončnico kot na ječmen, pri obeh rastlinah pa vpliva na privzem in prerazporejanje mineralov in s tem na rast in fotosintezno učinkovitost rastline. V nadaljnjih raziskavah bi lahko povečali število rastlin v poskusu (N) ter ugotavljali vpliv Cd na rastline, ki bi bile izpostavljene koncentracijam Cd daljše časovno obdobje (>15 dni). Za boljše razlago vpliva Cd na rastline bi bilo smotno meriti privzem Cd v posamezne dele rastlin.

Literatura

- Kirkham M.B. 2006. Cadmium in plants on polluted soils: Effects of soil factors, hyperaccumulation, and amendments. *Geoderma*, 137(1–2):19–32
- Liu J.G., Liang J.S., Li K. Q., Zhang Z.J., Yu B.Y., Lu X.L., Yang J.C., Zhu Q.S. 2003. Correlations between cadmium and mineral nutrients in absorption and accumulation in various genotypes of rice under cadmium stress. *Chemosphere*, 52(9):1467–1473
- X.J. Jiang, Y.M. Luo, Q. Liu, S.L. Liu, Q.G. Zhao. 2004. Effects of Cadmium on Nutrient Uptake and Translocation by Indian Mustard. *Environmental Geochemistry and Health*, 26(2):319–32
- Dinakar N., Nagajyothi P.C., Suresh S., Udaykiran Y., Damodharam T. 2007. Phytotoxicity of cadmium on protein, proline and antioxidant enzyme activities in growing *Arachis hypogaea* L. seedlings. *J Environ Sci* 20:199–206
- Rivelli A.R., Puschenreiter M., De Maria S. 2014. Assessment of cadmium uptake and nutrient content in sunflower plants grown under Cd stress. *Plant Soil Environment*, 60(2); 80–86
- Vaculík M., Pavlovič A., Lux A. 2015. Silicon alleviates cadmium toxicity by enhanced photosynthetic rate and modified bundle sheath's cell chloroplasts ultrastructure in maize. *Ecotoxicol Environ Safety* 120:66–73
- Kherbani, N., Abdi, N. and Lounici, H. 2015. Effect of Cadmium and Zinc on Growing Barley. *J Environ Protection* 6:160–172
- Kaznina N.M., Laïdinen G.F., Titov A.F. 2006. The effect of cadmium on shoot apical meristems of barley. *Ontogenez* 37(6):444–8
- Singha R.B., Myhrb K. 1998. Cadmium uptake by barley as affected by Cd sources and pH levels. *Geoderma* 84(1–3):185–194
- González Á., Chumillas V., del Carmen Lobo M. 2012. Effect of Zn, Cd and Cr on growth, water status and chlorophyll content of barley plants (*H. vulgare* L.). *Agricult Sci* 3(4):572–581
- Stebbing AR. 1982. Hormesis the stimulation of growth by low levels of inhibitors. *Sci Total Environ* 22(3):213–34.
- Inouhe M., Ninomiya S., Tohoyama H., Joho M., Murayama T. 1994. Different Characteristics of Roots in the Cadmium-Tolerance and Cd-Binding Complex Formation between Mono- and Dicotyledonous Plants. *J Plant Res* 107:201–207
- Vassilev A., Yordanov I., Tsonev T. 1998. Effects of Cd²⁺ on the physiological state and photosynthetic activity of young barley plants. *Photosynthetica* 34(2):293–302
- Leustek T., Saito K. 1999. Sulfate Transport and Assimilation in Plants. *Plant Physiol* 120:637–64
- Tamás L., Bočová B., Huttová J., Mistrík I., Zelinová V. 2017. Depletion of extracellular calcium increases cadmium toxicity in barley root tip via enhanced Cd uptake-mediated superoxide generation and cell death. *Acta Physiologiae Plantarum* 39(50)
- Huang Y., Wei K., Yang J., Dai F., & Zhang G. 2007. Interaction of salinity and cadmium stresses on mineral nutrients, sodium, and cadmium accumulation in four barley genotypes. *J Zhejiang University Sci*, 8(7):476–485
- Hédiji H., Djebali W., Belkadhi A., Chaïbi W., Cabasson C., Moing A., Rolin D., Brouquisse R., Gallusci P., Chaïbi W. 2015. Impact of long-term cadmium exposure on mineral content of *Solanum lycopersicum* plants: Consequences on fruit production. *South Afr J Bot* 97:176–181

Vpliv nanodelcev paladija na razvoj kalic enokaličnic in dvokaličnic

Urša Adamič, Andraž Dolar, Larisa Janžič, Iris Šalamon, Miki Zarić,
Valentina Ivanovska Zelič

Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

- Namen: ugotoviti vpliv dveh koncentracij nanodelcev paladija (nano PdC), na razvoj kalic sončnice (*Helianthus annuus*) in ječmena (*Hordeum vulgare* L.).
- Metode: kalitev semen sončnice in ječmena, spremljanje rasti in razvoja kalic v treh skupinah, meritev rastnih parametrov (dolžina poganjka in najdaljše korenine), določanje sveže in suhe mase rastlin, meritve koncentracij kovin v korenini in poganjku z XRF-analizo, analiza fotosinteznih pigmentov poganjkov in testiranje viabilnosti koreninskih vršičkov. Statistično analizo smo opravili z enosmerno ANOVA, Duncan test s programoma Statistica Statsoft.
- Rezultati: pri ječmenu so poganjki rastlin, izpostavljeni nano PdC, v povprečju daljši od kontrole medtem, ko ni opazne razlike v dolžini korenin. Pri sončnici so rezultati ravno obratni. Korenine izpostavljenih rastlin so krajše medtem, ko med dolžinami poganjkov ni razlik. Test viabilnosti je za ječmen in sončnico pokazal toksične učinke pri koncentraciji $10 \mu\text{g g}^{-1}$ nano PdC. Suha masa korenin sončnic izpostavljenih koncentracijam $1 \mu\text{g g}^{-1}$ in $10 \mu\text{g g}^{-1}$ nano PdC, je statistično značilno nižja od kontrolne skupine.
- Zaključki: nano PdC vpliva na viabilnost in rast poganjkov ter korenin, vendar na podlagi rezultatov ne moremo narediti dokončnih zaključkov, saj je bil poskus izveden zgolj z eno ponovitvijo.

Ključne besede: *Helianthus annuus*, *Hordeum vulgare*, nanodelci PdC, izpostavljene rastline, razvoj kalic

Uvod

Nanodelci so agregati atomov ali molekul, velikosti 1–100 nm. Znano je, da imajo spremenjene fizikalno-kemijske lastnosti v primerjavi z večjimi delci iste snovi. Uvrščamo jih v 3 skupine: prva so nanodelci, ki nastajajo naravno (vulkanski, lunin prah, mineralne zmesi), druga skupina so antropogeni delci; odpadni stranski produkti, ki nastajajo npr. ob izgorevanju (dizla, premoga) in varjenju. V tretjo skupino uvrščamo industrijsko pripravljene nanodelce, ki se uporabljajo v različnih industrijah. Paladij se uporablja v avtomobilskih katalizatorjih. Njegova koncentracija je na nekaterih delih ob cestah prisotna, v do tisočkrat večjih vrednostih kot drugje v naravi. Izmerili so vrednosti nad $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Hoppstock in Sures, 2004). Zaradi večanja trenda uporabe nanodelcev v različnih industrijskih panogah, je vedno več raziskav o njihovih morebitnih vplivih na ekosisteme in na človeka (Ruffini in sod., 2009). Raziskovanje elementov v sledih pri rastlinah, njihovega privzema in akumulacije, je pomembno. Glavni razlog so potencialni negativni vplivi nekaterih toksičnih elementov na človeka. Višanja koncentracij toksičnih snovi, zaradi akumulacije skozi prehranjevalno verigo, lahko predstavlja negativen učinek na zdravje človeka (Hapke, 1996). Po pregledu literature ugotovimo, da je zelo malo člankov o vplivu paladija na rastline (Brenchley in sod., 1946; Sarwar in sod., 1969; Battke in sod., 2008). Namen našega dela je ugotoviti, kakšen vpliv imata koncentraciji $1 \mu\text{g g}^{-1}$ in $10 \mu\text{g g}^{-1}$ nanodelcev paladija na razvoj kalic sončnice (*Helianthus annuus*) in ječmena (*Hordeum vulgare* L.).

Hipoteze:

- i) Dolžina, masa korenin in poganjkov bosta pri rastlinah, izpostavljenih koncentraciji $1 \mu\text{g g}^{-1}$ nano PdC v primerjavi s kontrolno skupino, nespremenjena.
- ii) Dolžina, masa korenin in poganjkov bosta pri rastlinah, izpostavljenih koncentraciji $10 \mu\text{g g}^{-1}$ nano PdC v primerjavi s kontrolno, manjši.
- iii) V koreninah izpostavljenih rastlin nano PdC bo večja koncentracija nano PdC v primerjavi s kontrolno.
- iv) V poganjkih izpostavljenih rastlin nano PdC bo vsebnost klorofilov a, b in karotenoidov zmanjšana.
- v) Viabilnost celic izpostavljenih rastlin nano PdC bo manjša. Membrane celic bodo poškodovane in barvilo propidijev jodid bo vdiral v notranjost celic.

Materiali in metode

Sinhronizacija kalic ječmena in sončnice

V poskusu smo uporabili kalice dveh rastlinskih vrst, ječmena (enokaličnica) in sončnice (dvokaličnica). Za sinhronizacijo kalic smo vsa semena kalili v velikih petrijevkah na filtrirnem papirju, prepojenem z vodovodno vodo. Kalitev je potekala v komori z umetno svetlobo pri sobni T ($21 \text{ }^\circ\text{C}$), dnevno nočnem ciklu 16/8 in vlažnosti med 45–50 %.

Priprava raztopin paladija

Iz založnega materiala nanodelcev velikosti 5 nm, ki vsebuje Pd (10 %) vezan na ogljik (90 %), smo pripravili raztopini s koncentracijo 1 in $10 \mu\text{g g}^{-1}$. Za raztopino $1 \mu\text{g g}^{-1}$ smo natehtali 2,4 mg prahu nano PdC, ter dodali 240 ml dH_2O . Nato smo

razdelili raztopino v 4 lončke po 60 ml ($0,6 \text{ mg nano PdC}$ na 60 ml dH_2O). Za $10 \mu\text{g g}^{-1}$ raztopino smo v 240 ml dH_2O natehtali po 24 mg prahu nano PdC in raztopino ponovno razdelili v 4 lončke po 60 ml ($6,0 \text{ mg nano PdC}$ na 60 ml dH_2O). V posamezni končni raztopini nano PdC, smo pred razdelitvijo v lončke, dodali kapljico detergenta in z uporabo sonikatorja raztopini premešali. Tako smo dobili homogeno razporeditev nanodelcev v raztopini, brez agregatov.

Nastavitev poskusa

Poskus, v rastni komori pri sobni T ($21 \text{ }^\circ\text{C}$), dnevno nočnem ciklu 16/8 in vlažnosti med 45–50 %, je pri ječmenu trajal 7 dni, pri sončnici pa 10. Po kalitvi semen, smo izbrali 16 kalic podobnih velikosti na stekleni lonček, v katerega smo nalili 60 mL primerne raztopine; vodo (dH_2O) za kontrolno, ter $1 \mu\text{g g}^{-1}$ oz. $10 \mu\text{g g}^{-1}$ nano PdC. Lonček smo prekrili s kosom tila tako, da se je dno tila dotikalo gladine raztopine. Nanj smo položili izbrane kalice rastlin, da so bile korenine potopljene v raztopino. Za vsako izpostavitvev in kontrolno (dH_2O) smo pripravili po 2 ponovitvi. Vsak drugi dan smo dolivali dH_2O , v vse lončke do oznake 60mL.

Rastni parametri

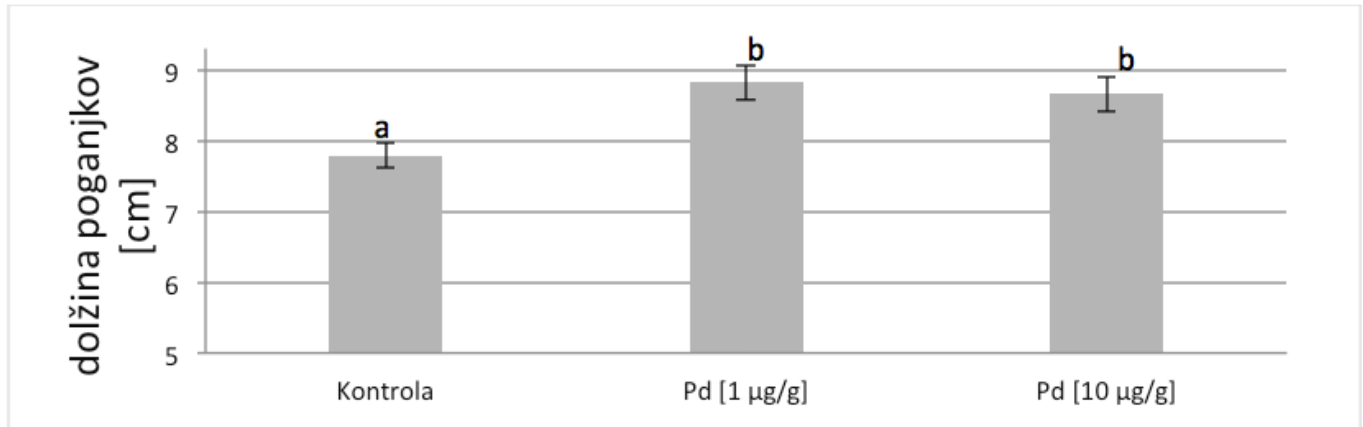
Osredotočili smo se na dolžino, suho in svežo maso korenin in poganjkov. Po sinhronizaciji kalitve semen, smo izmerili dolžino najdaljše korenine kalic in meritev ponovili ob zaključku poskusa. Ob zaključku poskusa smo izmerili še dolžino poganjkov rastlin. Rezultate meritev smo primerjali s kontrolno skupino, ter določili povprečne vrednosti za vsako izpostavitvev pri obeh vrstah rastlin. Ločene poganjke in korenine smo stehtali - sveža masa. Ločeno smo zavili v aluminijasto folijo korenine in poganjke različnih izpostavitvev. Dele rastlin smo 4 dni sušili v liofilizerju. Po sušenju smo določili še suho maso korenin in poganjkov za vsako izpostavitvev 1 in $10 \mu\text{g g}^{-1}$ PdC in kontrolno.

Test viabilnosti celic koreninskih vršičkov

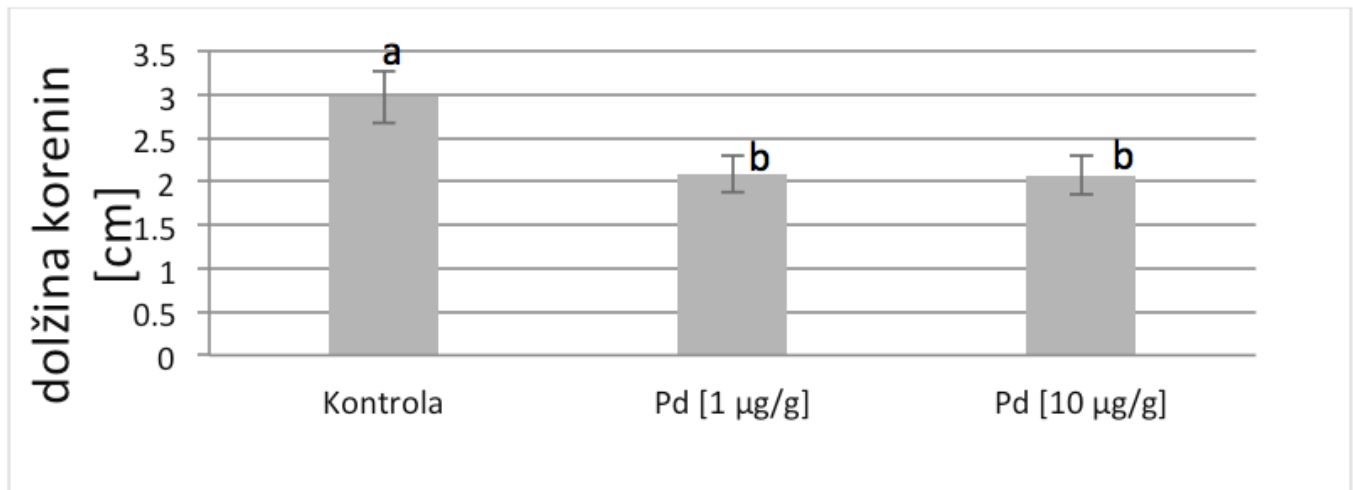
Barvanje viabilnosti koreninskih vršičkov smo izvedli po protokolu, modificiranem po Ricaud in sod. (2007). Uporabili smo drugačne koncentracije barvil. Delovna koncentracija FDA (fluorescein diacetat) je znašala $10,5 \mu\text{g/ml}$, delovna koncentracija PI (propidijev jodid) pa $5 \mu\text{g/ml}$. Barvali smo dva vršička korenin na vsako izpostavitvev – $1 \mu\text{g g}^{-1}$ PdC, $10 \mu\text{g g}^{-1}$ PdC in kotrola.

Rentgenska fluorescentna spektrometrija (XRF)

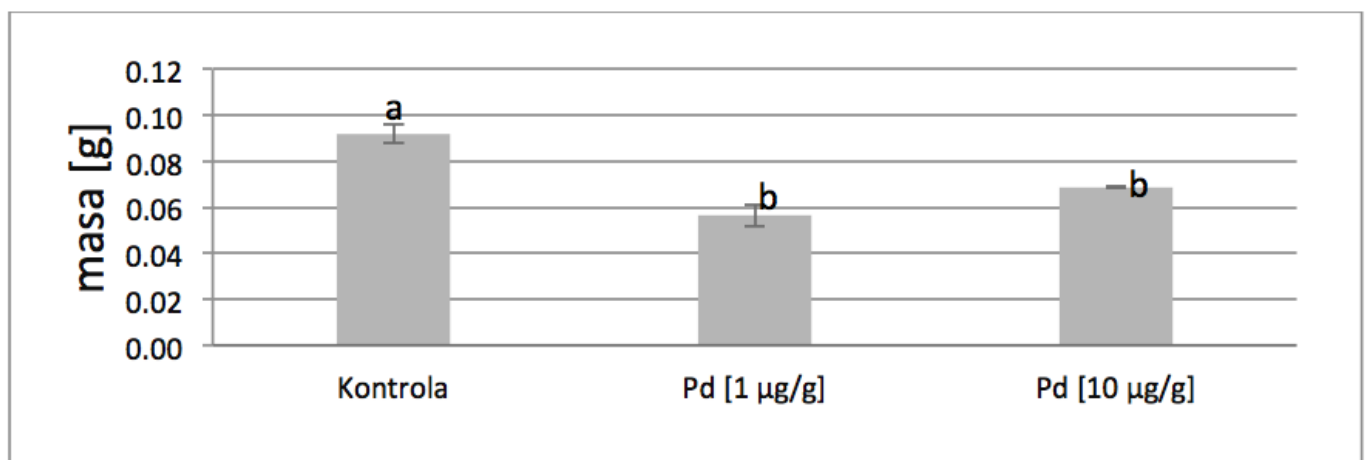
Iz rastlinskega materiala smo pripravili po 2 tableti na posamezno izpostavitvev za obe rastlinski vrsti. Eno tableto smo pripravili iz koreninskega sistema, drugo iz zelenega dela poganjka. Skupno smo pripravili 24 tablet. Posušene korenine in poganjke smo zamrznili v tekočem dušiku in strli v terilnici, v prah. V napravi za oblikovanje tablet smo iz prahu izdelali tablete. Na inštitutu Jožef Štefan smo opravili XRF analizo (Kump in sod., 2007), s čimer smo preverili koncentracijo kovin v poganjkih in koreninah. Meritve smo opravili z izvorom Fe-55, na Pd-L3 črti ($2,84 \text{ keV}$) in polprevodniškimi SD detektorjem (Amptek).



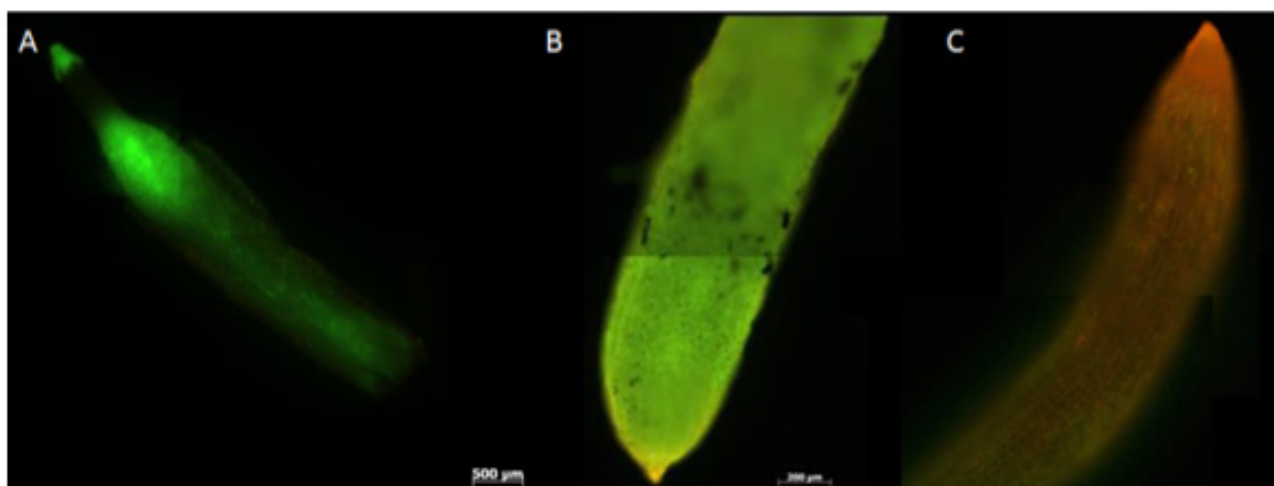
Slika 1: Dolžina poganjkov ječmena. Spremljali smo vpliv različnih koncentracij nanodelcev PdC na rast poganjkov ječmena (povprečje \pm SN, $n=32$; enosmerna ANOVA $p<0,05$). Različne črke nad stolpci označujejo statistično pomembne razlike.



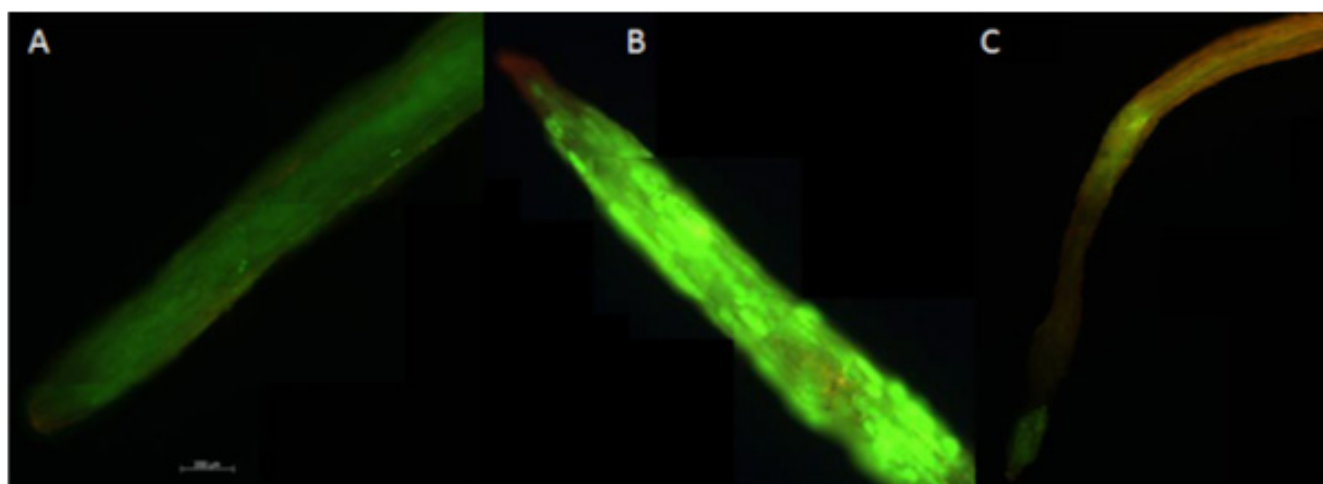
Slika 2: Dolžina korenine sončnice. Spremljali smo vpliv različnih koncentracij nanodelcev PdC na rast korenin sončnice (povprečje \pm SN, $n=32$; enosmerna ANOVA $p<0,05$). Različne črke nad stolpci označujejo statistično pomembne razlike.



Slika 3: Suha masa korenin sončnice. Spremljali smo vpliv različnih koncentracij nanodelcev PdC na spremembo suhe mase korenin sončnice (povprečje \pm SN, $n=32$, enosmerna ANOVA $p<0,05$). Različne črke nad stolpci označujejo statistično pomembne razlike.



Slika 4: Celična viabilnost koreninskih vršičkov ječmena. A: kontrola, B: $1 \mu\text{g g}^{-1}$ nano PdC, C: $10 \mu\text{g g}^{-1}$ nano PdC. Zelena barva so žive celice. Rdeča barva so mrtve celice.



Slika 5: Celična viabilnost koreninskih vršičkov sončnice. A: kontrola, B: $1 \mu\text{g g}^{-1}$ nano PdC, C: $10 \mu\text{g g}^{-1}$ nano PdC. Zelena barva so žive celice. Rdeča barva so mrtve celice.

Določanje fotosinteznih pigmentov

V epruvete, smo natehtali po 30 mg prahu poganjkov in dolili 5 ml 80 % acetona. Označili smo nivo, do koder je segal aceton, ter vse dobro premešali na mešalu. Epruvete smo čez noč pustili na sobni temperaturi ter jih eno uro pred začetkom analize postavili v hladilnik. Izhlapeli aceton smo dolili do označenega nivoja. Vsebinsko epruvete premešali na mešalu in centrifugirali. Meritve fotosinteznih pigmentov smo opravili na spektrofotometru.

Rezultati in diskusija

Rezultati kažejo, da se dolžine poganjkov ječmena izpostavljenim nano PdC, statistično značilno daljše (**Slika 1**). To je v nasprotju z objavo Battke in sod. (2008), kjer so pokazali, da imajo nanodelci Pd na dolžino poganjkov ječmena negativen vpliv. Ob povečevanju koncentracije ($0,1-5 \mu\text{g g}^{-1}$) čistega Pd, premera 1–12 nm, se je dolžina listov ječmena zmanjševala. Neskladje naših rezultatov z Battke in sod. (2008) je najverjetneje, zaradi uporabe različnega vira Pd. V

našem primeru je Pd vezan na ogljikove atome. Kljub uporabi željenih koncentracij Pd pri izpostavitvah, je bilo pri vsaki, posledično več ogljika (10 % Pd in 90 % C). Ogljik bi lahko imel, posledično večji vpliv na rastline kot Pd. Remya in sod. (2012) so pokazali, da ogljikovi nanodelci pozitivno vplivajo na rast poganjkov riža. Z XRF metodo nismo zmerili prisotnosti Pd v poganjkih in koreninah nobene rastline. Pd je bil v vzorcih pod mejo zaznavnosti, zaradi premajhne občutljivosti na Pd-L3 črti. Kar pomeni, da PdC ni vstopal v poganjke. Pri sončnici nismo opazili statistično značilnih razlik v dolžini poganjkov izpostavljenih nano PdC v primerjavi s kontrolo. Pri merjenju suhih mas posameznih delov rastlin, smo statistično značilne razlike opazili le pri koreninah sončnic. Suha masa izpostavljenih rastlin se je zmanjšala v primerjavi s kontrolo (**Slika 3**). Povišana masa pri koncentraciji $10 \mu\text{g g}^{-1}$ v primerjavi z $1 \mu\text{g g}^{-1}$ (**Slika 3**) je najverjetneje, zaradi nezadostnega spiranja korenin pred tehtanjem. Zmanjšana suha masa korenin sončnic izpostavljenih PdC, sovпада z zmanjšano dolžino korenin sončnic izpostavljenih PdC v primerjavi s kontrolo (**Slika 2**). Voda v lončkih izpostavljenih rastlin ni

krožila, to bi lahko ustvarilo hipoksične pogoje. Kisle pogoje pa, zaradi kopičenja CO₂ in prisotnosti velikih količin ogljika pri rastlinah izpostavljenih PdC (Shimoyama in sod., 1994). Hipoksični in kisli pogoji predstavljajo fiziološki stres za rastline, ki se kaže v zmanjšanju dolžine korenin (**Slika 2**) in šopasti razraslosti pri sončnici (Drew in sod., 1979). Pri dolžini korenin ječmena ni bilo statistično značilnih razlik med skupinami. Analiza pigmentov rastlin ni pokazala statistično pomembnih razlik. Viabilnostni test koreninskih vršičkov ječmena in sončnice je pokazal toksični učinek PdC pri koncentraciji 10 µg g⁻¹ (**Slika 4, 5**). Večja zakisanost zaradi več ogljika, bi pri koreninah izpostavljenih 10 µg g⁻¹, lahko povzročila propadanje celic.

Zaključki

Naši rezultati so težko primerljiva z obstoječimi raziskavami, zaradi več razlogov. Ključna pomanjkljivost našega poskusa je neustrezna kontrolna skupina. Rastline v kontrolni skupini, bi morale biti v vodni raztopini z ogljikom, ki je prisoten v enakih koncentracijah kot v raztopinah PdC 1 in 10 µg g⁻¹. Pd je bil v našem primeru vezan na ogljik, drugih raziskovalci so uporabljali čiste nanodelce Pd ali njihove soli (Battke in sod, 2008; Farago in Parsons, 1994; Sarwar in sod, 1970). Pomislek uporabe PdC je, zaradi morebitne slabe dostopnosti Pd za rastline in posledično manjšega učinka njegove strupenosti. Semena obeh rastlin so slabo kalila, kljub uporabi komore z umetno svetlobo. Najverjetneje, zaradi neprimerne letnega časa v času poskusa. Rastline imajo notranje mehanizme in ritme, ki jim omogočajo kalitev v primernem času, te pa težko obidemo (Maguire, 1969; Rawat in Thapliyal, 2003). Na podlagi dobljenih rezultatov ne moremo narediti dokončnih zaključkov, saj je bil poskus izveden z napačno kontrolno skupino in le z eno ponovitvijo.

Literatura

- Battke F. in sod. 2008. Palladium exposure of barley: uptake and effects. *Plant Biol* 10(2):272–6.
- Brenchley E.W., 1946. The role of minor elements in the growth of plants. *Chemical Products* 9:61–68.
- Drew M. C., Jackson M. B., Giffard S. 1979. Ethylene-promoted adventitious rooting and development of cortical air spaces (aerenchyma) in roots may be adaptive responses to flooding in *Zea mays* L. *Planta* 147(1):83-88.
- Farago M.E., Parsons P.J. 1994. The effects of various platinum metal species on the water plant *Eichhornia crassipes* (MART.) Solms. *Chem Speciation Bioavailability* 6:1-12.
- Hapke H.-J. 1996. Heavy metal transfer in the food chain to humans. *Fertilizers and Environment. Develop Plant Soil Sci* 66:431-436.
- Hoppstock K., Sures B. 2004. Platinum group metals.
- Maguire J.D. 1969. Endogenous germination rhythms in seeds. *Proceedings of the Association of Official Seed Analysts*, 59:95-100.
- Merian E., Anke M., Ihnat M., Stoeppeler M. (Eds), *Elements and Their Compounds in the Environment*, 2nd edition. Wiley-VCH, Weinheim:1047–1068.
- Pongrac P. in sod. 2007. Changes in elemental uptake and arbuscular mycorrhizal colonisation during the life cycle of *Thlaspi praecox* Wulfen. *Chemosphere* 69(10):1602–1609.
- Remya N., Sheikh M. M, Wei G., Toru M., Yasuhiko Y., Pulickel M. A., Sakthi K. 2012. Effect of Carbon Nanomaterials on the Germination and Growth of Rice Plants. *J Nanosci Nanotechnol* 12:2212–2220.
- Ricaud L. in sod. 2007. ATM-Mediated Transcriptional and Developmental Responses to γ-rays in Arabidopsis. *PLoS ONE* 2(5):e430.
- Ruffini Castiglione M., Cremonini R. 2009. Nanoparticles and higher plants. *Caryologia* 62(2):161–165.
- Sarwar M., Thibert R. J., Benedict W. G., 1970. Effect of palladium chloride on the growth of *Poa Pratensis*. *Can J Plant Sci* 50(1):91–96.
- Shimoyama A., Ikeda H, Nomoto S., Harada K. 1994. Formation of Carboxylic Acids from Elemental Carbon and Water by Arc-Discharge Experiments. *Bullet Chem Soc Jap* 67(1):257-259.

Vpliv nanodelcev srebra na kalitev in razvoj kalic enokaličnic in dvokaličnic

Žana Lovšin, Pia Starič, Manca Volk, Jakob Jeriha, Maja Ugrin, Ana Vojnović

Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

- Namen raziskave je bil ugotoviti vpliv različnih koncentracij nanodelcev srebra na rast in razvoj ječmena (*Hordeum vulgare*) in sončnice (*Helianthus annuus*).
- Po 13 dneh izpostavitve semenom AgNP smo spremljali njihove morfološke spremembe rastlin, merili vsebnost fotosintetskih pigmentov in analizirali vsebnost mineralov.
- Velikost poganjkov se sorazmerno z naraščajočo koncentracijo AgNP zmanjšuje le pri sončnici. Z višjo koncentracijo nanodelcev se daljšajo korenine pri obeh vrstah. Opazili smo negativni vpliv AgNP na vsebnost pigmentov pri sončnici, pri ječmenu je bil vpliv opazen samo pri najvišji koncentraciji nanodelcev. Pri analizi mineralov je bila vsebnost srebra prenizka, da bi jo zaznali. Korenine sončnice so vsebovale več kalcija in manj kalija, kar kaže na poškodbe koreninskega sistema.
- Ugotovili smo, da prisotnost srebrovih nanodelcev različno vpliva na rast enokaličnic in dvokaličnic, vendar bi bile potrebne večkratne ponovitve poskusov ter dodatne raziskave, da bi lahko z gotovostjo govorili o specifičnem vplivu srebrovih nanodelcev na rast in razvoj rastlin.

Ključne besede: *AgNP, fotosintezni pigmenti, test kaljivosti, Hordeum vulgare, Helianthus annuus*

Uvod

Z napredkom na področju nanotehnologij prihaja do povečane zaskrbljenosti o uporabi in vplivih inženirskih nanodelcev na okolje zaradi njihovega kompleksnega učinka na organizme. Nanodelci srebra so eni izmed najbolj uporabljenih, predvsem zaradi svojega protimikrobnega delovanja. Največji vpliv imajo na privzem mineralnih hranil, kar ima negativne posledice za biokemijo, fiziologijo ter rast in razvoj rastlin (Belava in sod., 2017).

Različne študije kažejo negativne učinke srebrovih nanodelcev na rast (Yin in sod., 2012). Stampoulis in sod., 2009, so dokazali, da srebrovi nanodelci s premerom 100 nm pri koncentraciji 100 in 500 mg/L povzročijo 41 % oz. 57 % zmanjšanje biomase in zmanjšajo stopnjo transpiracije v primerjavi s kontrolnimi rastlinami. Pri izpostavitvi rastlin graha (*Pisum sativum*) s srebrovnimi nanodelci pa ne le pride do zmanjšane rasti, ampak se tudi zniža nivo fotosinteznih pigmentov. Večina negativnih učinkov naj bi bila povezanih z oksidativnim stresom in zvišanim nivojem srebra v tkivih rastlin (Tripathi in sod. 2017).

Namen našega dela je ovrednotiti vpliv različnih koncentracij AgNP na rast in razvoj kalic ječmena (*Hordeum vulgare*) in sončnice (*Helianthus annuus*). Uporabili smo elementarne nanodelce srebra manjše od 100 nm. V sklopu naloge smo poskušali določiti njihov vpliv na kalitev, rast in vsebnost ter mineralov. Predvidevali smo, da bo večja koncentracija AgNP preprečila kalitev semen in zavirala rast kalic. Pri večji koncentraciji AgNP bo več nanodelcev prisotnih v rastlini kakor pri nižjih koncentracijah. Prisotnost AgNP v poganjku pa bo negativno vplivalo na vsebnost fotosinteznih pigmentov.

Materiali in metode

Opazovali smo vpliv AgNP na rast in razvoj ječmena (enokaličnica) in sončnice (dvokaličnica).

Morfološke spremembe rastlin

Na mokrem filtrirnem papirju smo skalili semena. Po 5 dneh smo kalice prestavili v posodice z različnimi koncentracijami AgNP: : kontrolo z 0 $\mu\text{g g}^{-1}$, 5 $\mu\text{g g}^{-1}$, 50 $\mu\text{g g}^{-1}$ in 100 $\mu\text{g g}^{-1}$. V posodice smo dali 15 kalic sončnice oz. 10 kalic ječmena in 60 mL ustrezne raztopine. Rastline so rasle v rastni komori pri 23 °C. Rast in razvoj semen smo spremljali na 13 dni, kjer smo sproti dolivali vodo. Po 13 dneh smo izmerili dolžino poganjkov in korenin ter jih posebej stehtali. Vzorce smo sušili do suhega v liofilizatorju Christ 2-4 Alpha povprečno 5 dni, ter stehtali še suho maso poganjkov in korenin.

Fotosintezni pigmenti

Fotosintezne pigmente smo izmerili tako, da smo poganjke vsake rastline strli v prah s tekočim dušikom. Za vsak vzorec smo natehtali 30 mg suhe snovi, dodali 5 ml 80 % acetona in ga pustili čez noč v hladilniku. Naslednji dan smo vsebino v epruveti dobro premešali ter jo centrifugirali. Sledila je meritev absorpcije pri valovnih dolžinah 664 nm, 647 nm in 470 nm na spektrofotometru. Koncentracijo fotosinteznih pigmentov smo nato izračunali na podlagi absorbance pri različnih valovnih dolžinah svetlobe. Analizo vsebnosti pigmentov smo naredili po protokolu Lichtenthaler in Buschmann (2001).

XRF

Preostanek rastlinskega materiala iz drugega poskusa smo uporabili za izdelavo tablet. Za vsako rastlino pri vsaki koncentraciji smo naredili dve tableti, eno tableto za poganjek in drugo za korenino. Skupaj smo imeli 16 tablet, katere smo uporabili za analizo elementov z rentgensko fluorescenčno spektrometrijo (XRF). Za vzbujanje atomov v vzorcu smo uporabili radioizotopski izvor Fe-55. Rentgensko fluorescenco smo detektirali s SD detektorjem (Amptek). Vsako tableto smo pomerili dvakrat. S tem smo določili koncentracijo elementov P, S, Cl, K in Ca. Ag je bil pod mejo zaznavnosti

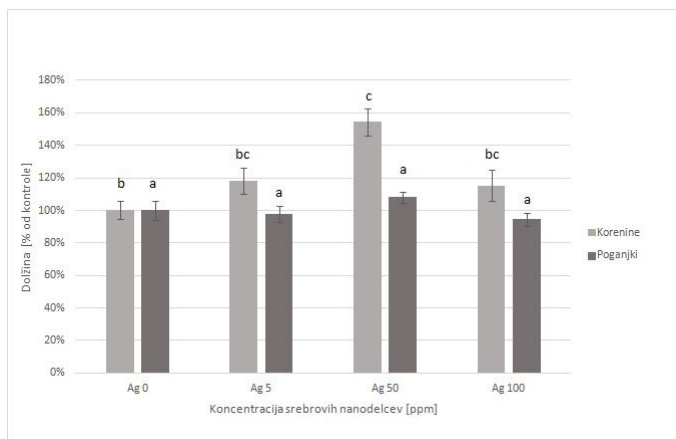
Statistična obdelava podatkov

Podatke, pridobljene v poskusih, smo obdelali z razširitvijo Daniel's XL Toolbox, verzija 7.2.10 (<http://www.xltoolbox.net>), v programu Excel 2016. Naredili smo enosmerne analize ANOVA različnih parametrov (dolžina korenin in poganjkov ter suha in mokra masa korenin in poganjkov) med posameznimi izpostavitvami. Pri nekaterih podatkih smo imeli samo eno meritev (fotosintezni pigmenti in XRF analiza elementov) in zato nismo mogli izračunati statistično značilnih razlik, v grafih so prikazane posamezne meritve. Pri podatkih z več meritvami smo statistično značilne razlike prikazali s črkovnimi oznakami v grafih. Vsi grafi so narejeni v programu Excel. Podatke iz meritev elementov z metodo XRF smo statistično obdelali s programom Statistika 7.0 Statsoft.

Rezultati in diskusija

Morfološke spremembe rastlin

Preverjali smo vpliv koncentracije AgNP na dolžino poganjkov in korenin ter na biomaso ječmena in sončnice. Pri ječmenu smo opazili, da se dolžine poganjkov pri različnih koncentracijah AgNP med seboj statistično značilno ne razlikujejo (**Slika 1**). Pri poganjkih sončnice se je izkazalo, da se dolžina sorazmerno zmanjšuje z naraščajočo koncentracijo AgNP (**Slika 2**). Podoben negativni vpliv nanodelcev na rast poganjkov je bil opažen pri rižu (Thuesombat in sod. 2014). En izmed možnih razlogov je, da so nekatere vrste bolj ali manj občutljive na vpliv nanodelcev (Lee in sod. 2012). Transport nanodelcev v poganjke je slabo raziskano področje. Raziskave s pomočjo transmissijske elektronske mikroskopije so zaznale kopičenje AgNP v listih pri rastlini *Arabidopsis thaliana* ter tudi drugih rastlinah – *Medicago sativa*, *Brassica jencea* in *Cucumis sativus* (Qian in sod., 2013; Wang in sod. 2016). Medtem ko pri drugih raziskavah niso zaznali bioakumulacije AgNP v poganjkih (Lee in sod. 2012). Pri obeh vrstah so opazne statistične razlike pri dolžini korenin. Pri sončnici se je dolžina korenin večala sorazmerno z naraščajočo koncentracijo. Pri koreninah ječmena smo opazili večjo rast pri koncentracijah 5 ppm (ni pa statistično značilno različna od kontrole) in 50 ppm, kjer smo zaznali največjo rast. Pri 100 ppm je bila rast korenin primerljiva z dolžino pri 5 ppm. Daljšanje korenin pri obeh vrstah ob naraščajoči koncentraciji AgNP ni v skladu s pričakovanji in z rezultati ostalih raziskovalcev (Thuesombat in sod. 2014, Lee s sod. 2012 in Zuverza-Mena in sod. 2016). Do pozitivnega trenda je lahko prišlo zaradi daljšanja celic v elongacijski coni korenin (Pokhrel in Dubey, 2013), ali pa zaradi agregacije nanodelcev pri višjih koncentracijah ni prišlo do



Slika 1: Vpliv 0, 5, 50, 100 ppm AgNP na dolžino korenin in poganjkov ječmena. Različne črke označujejo statistično značilne razlike pri $p > 0,05$ (SV \pm SN N=20)

njihovega zadostnega prevzema. Nižje koncentracije lahko pozitivno delujejo na rast rastlin (Mehta in sod. 2016). Analiza suhe in sveže mase rastlin ni pokazala statistično značilnih razlik (podatki niso prikazani).

Na podlagi rezultatov dolžin poganjkov in korenin lahko sklepamo, da je ječmen manj občutljiv na vpliv nanodelcev kot sončnica, kar je pričakovano, saj so dvokaličnice bolj občutljive na zunanje vplive (Siedlecka in sod., 2001).

Fotosintezni pigmenti

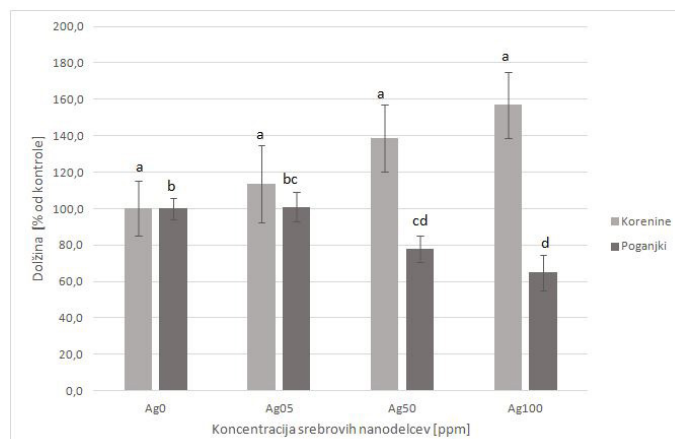
Pričakovali smo, da bo prisotnost nanodelcev negativno vplivala na vsebnost fotosinteznih pigmentov pri obeh vrstah. Zaradi majhne količine materiala smo naredili enkratne meritve pri posameznih tretmajih, zato nismo mogli računati statistično značilnih razlik.

Pri merjenju koncentracije pigmentov je bil vpliv AgNP bolj opazen pri sončnici, kjer vsebnost pigmentov sorazmerno pada z naraščajočo koncentracijo nanodelcev. Velik padec vsebnosti fotosinteznih pigmentov v primerjavi s kontrolo se opazi že pri koncentraciji 50 ppm (klorofil a za 42,7 %, klorofil b za 34,4 % in karotenoidi za 39 %). Pri tretmaju z najvišjo koncentracijo AgNP (100 ppm) je koncentracija klorofila a v primerjavi s kontrolo padla za 64,7 %. Za več kot polovico je padla tudi koncentracija klorofila b (za 51,2 %) in karotenoidov (za 57,5 %). Trend manjšanja koncentracije pigmentov z večanjem koncentracije AgNP je v skladu s pričakovanji (Tripathi in sod. 2017).

Pri ječmenu se pri koncentraciji 100 ppm vsebnost vseh pigmentov najbolj zmanjša (klorofil a za 13 %, klorofil b za 15 % ter karotenoidi za 14 %). Koncentracija klorofila a je rahlo povečana pri 50 ppm (za 9 %), kar velja tudi za klorofil b (za 8 %). Koncentracija karotenoidov v vzorcih ječmena se znižuje sorazmerno z naraščanjem koncentracije AgNP (100 %, 99 %, 93 % in 86 %).

X-Ray Fluorescence (XRF)

Izvedli smo analizo mineralne sestave korenin in poganjkov pri sončnici in ječmenu, kjer je bila koncentracija srebra (Ag) pod mejo detekcije. Opazne so bile spremembe v koncentracijah drugih mineralov. Tudi tu smo zaradi premajhne količine materiala opravili samo eno meritev za posamezen tretma,



Slika 2: Vpliv 0, 5, 50, 100 ppm AgNP na dolžino korenin in poganjkov sončnice. Različne črke označujejo statistično značilne razlike pri $p > 0,05$ (SV \pm SN N=20)

statično značilnih razlik zato nismo mogli računati.

Pri ječmenu se koncentracije mineralov v poganjkih povečini zvišujejo. Izrazito je povečanje količine klora v primerjavi s kontrolo (pri koreninah se pri koncentraciji 100 ppm poveča za 103 %, pri poganjkih za 54 %), z manjšo intenzivnostjo naraščajo tudi koncentracije kalija (pri koreninah se pri koncentraciji 100 ppm poveča za 34 %, pri poganjkih za 27 %), fosforja (pri koreninah se pri koncentraciji 100 ppm poveča za 23 %, pri poganjkih za 22 %), in kalcija (pri koreninah se pri koncentraciji 100 ppm poveča za 39 %, pri poganjkih za 16 %), koncentracije naraščajo vzporedno z naraščajočo koncentracijo AgNP. Koncentracije žvepla v poganjkih ječmena nismo mogli določiti, saj je bila koncentracija v vzorcih pod mejo detekcije. V koreninah ječmena je izrazito povečanje količine klora, pri katerem koncentracija narašča vzporedno z naraščajočo koncentracijo AgNP, malce pa se zniža pri tretmaju z AgNP 50 ppm. Koncentracije fosforja, kalcija in kalija pri tretmaju z AgNP 50 ppm so nižje kakor pri kontroli, sicer pa naraščajo vzporedno s koncentracijo AgNP.

V koreninah sončnice so bile pri višjih koncentracijah AgNP koncentracije fosforja (pri 100 ppm 41 %) in kalija (pri 100 ppm 19 %) izrazito nižje. Koncentracija kalcija je bila izrazito višja (za 111 %) pri koncentraciji AgNP 100 ppm kakor pri kontroli. Večja koncentracija kalcija in manj kalija nakazuje na to, da je bilo v koreninah prisotnih več mrtvih celic, mrtve celice namreč kopičijo kalcij ter prepuščajo kalij. Pri poganjkih sončnice se je koncentracija klora v rastlinah nižala (pri 100 ppm je koncentracija manjša za 49 %) z višanjem koncentracije AgNP v primerjavi s kontrolo, pri čemer se je vsebnost klora v rastlinah pri koncentraciji AgNP 5 ppm rahlo povečala (za 26 %). Koncentracija žvepla v poganjkih je naraščala z višanjem koncentracije AgNP (pri 100 ppm za 15 %). Pri sončnici in ječmenu je večja vsebnosti mineralov pri višjih koncentracijah v skladu z ugotovitvami (Pošćić in sod. 2016).

Zaključki

Pri ječmenu in sončnici smo pri koreninah dobili podobne rezultate zato lahko sklepamo, da višja koncentracija AgNP pozitivno vpliva na rast. Te rezultati so lahko zavajajoči, saj bi rast korenin lahko prepisali negativnemu fototropizmu in težnji po iskanju mineralov in ostalih hranil. Preden bi dokončno potrdili to ugotovitev bi bilo potrebnih več ponovitev in bolj

skrbno načrtovan poskus.

Pri analizi mineralov je bila vsebnost srebra prenizka, da bi jo zaznali. Morali bi preveriti kakšne so velikosti nanodelcev in se prepričati, če ti vstopijo v celice. Za študije kaljivosti bi morali uporabiti precej večje število semen in izvesti več ponovitev. S tem bi odpravili faktor biološke variabilnosti semen na kalitev. Za statistično analizo smo namreč v primeru fotosinteznih pigmentov in XRF imeli premalo materiala za več vzorcev. Povečati bi morali število vzorcev za posamezen tretma, da bi bilo materiala dovolj za več meritev, tako bi lahko ugotovitve in vse rezultate tudi statistično preverili.

Literatura

1. Belava V.N., Panyuta O. O., Yakovleva G. M., Pysmenna Y. M., Volkogon M. V. 2017. The Effect of Silver and Copper Nanoparticles on the Wheat – *Pseudocercospora herpotrichoides* Pathosystem.
2. Lee W., Kwak J., An Y. 2012. Effect of silver nanoparticles in crop plants *Phaseolus radiatus* and *Sorghum bicolor*: Media effect on phytotoxicity. *Chemosphere* 86(5):491-9.
3. Mehta P., Srivastava R., Arora S., Sharma A.K. 2016. Impact assessment of silver nanoparticles on plant growth and soil bacterial diversity. *Biotech* 6:254.
4. Pokhrel L., Dubey B. 2013. Evaluation of developmental responses of two crop plants exposed to silver and zinc oxide nanoparticles. *Sci Tot Environt* 452-453:321-32.
5. Prasad M.N.V. 2001. Metals in Environment: Analysis by Biodiversity. In: Siedlecka et. al., Angiosperms (Asteraceae, Convolvulaceae, Fabaceae and Poaceae; other than Brassicaceae), str. 178.
6. Pošćić F., Marriello A., Fellet G., Miceli F., Marchiol L. 2016. Effect of Cerium and Titanium Oxide Nanoparticles in Soil on the Nutrient Composition of Barley (*Hordeum vulgare* L.) Kernels. *International J Environ Res Public Health* 13(6):577.
7. Qian H., Peng X., Han X., Ren J., Sun L., Fu Z. 2013. Comparison of the toxicity of silver nanoparticles and silver ions on the growth of terrestrial plant model *Arabidopsis thaliana*. *J Environ Sci* 25(9):1947-1955.
8. Stampoulis D., Sinha S. K., White J. C. 2009. Assay-Dependent Phytotoxicity of Nanoparticles to Plants. *Environ Sci Technol* 43:9473-9479.
9. Thuesombat P., Hannongbua S., Akasit S., Chadchawan S. 2014. Effect of silver nanoparticles on rice (*Oryza sativa* L. cv. KDML 105) seed Germination and seedling growth. *Ecotoxicol Environ Safety* 104:302-9.
10. Tripathi D. K., Singh S., Singh S., Srivastava P. K., Singh V. P., Singh S., Prasad S. M., Singh P. K., Dubey N. K., Pandey A. C., Chauhan D. K., 2017. Nitric oxide alleviates silver nanoparticles (AgNps)-induced phytotoxicity in *Pisum sativum* seedlings. *Plant Physiol Biochem* S0931-9428(16):30236-4.
11. Wang P., Lombi E., Sun S., Scheckel K. G., Malysheva A., McKenna B. A., Menzies N. W., Zhao F., Kopittke P. M. 2016. Characterizing the Uptake, Accumulation and Toxicity of Silver Sulfide Nanoparticles in Plants. *Environ Sci: Nano* DOI:10.1039/C6EN00489J
12. Xu W., Ding G., Yokawa K., Baluška F., Li Q., Liu Y., Shi W., Liang J., Zhang J., 2013. An improved agar-plate method for studying root growth and response of *Arabidopsis thaliana*. *Scientific Report* 3, Article number:1273.
13. Yin L., Colman B. Y., McGill B. M., Wright J. P., Bernhardt E. S., 2012. Effect of Silver Nanoparticle Exposure on Germination and Early Growth of Eleven Wetland Plants.
14. Zuverza-Mena N., Armendariz R., Peralta-Videa J., Gardea-Torresdey J., 2016. Effect of Silver Nanoparticles on Radish Sprouts: Root Growth Reduction and Modifications in the Nutritional Value. *Frontiers in Plant Sci* 7:90.

Vpliv svinca na privzem mineralov pri sončnici in ječmenu

Hrastar Barbara, Naiaretto Sabrina, Opačak Ena, Volk Lea, Žalec Nika

Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

- Namen raziskave je bil ugotoviti, kako prisotnost svinca (10-100 μM) vpliva na prevzem mineralov v poganjke in korenine rastlin. Poleg tega pa so nas zanimale še posledice strupenosti svinca, ki se kažejo na biomasi, višini poganjka, dolžini korenine in ostalih rastnih dejavnikih pri sončnici in ječmenu.
- Mlade rastline sončnic in ječmena smo gojili v čašah s hidroponiko, ki so vsebovale Hoaglandovo raztopino in različne koncentracije svinca. Opazovali smo prisotnost kloroz in nekroz. Primerjali smo rastne dejavnike ter svežo in suho maso rastlin izpostavljenih svincu in kontrolo brez svinca. Klorofilni status smo določili z analizo vsebnosti pigmentov: klorofila a in b ter karotenoidov. Za analizo privzema mineralov v korenine in poganjke smo uporabili rentgensko fluorescenčno spektroskopijo (XRF), s katero smo določili koncentracije elementov v poganjkih in koreninah.
- Rezultati so pokazali, da ima Pb večji vpliv na sončnico kot ječmen. Svinec pozitivno vpliva na rast organov večinoma le pri koncentraciji 10 μM , kar je najverjetneje posledica hormeze. Povzroči tudi spremembe vsebnosti klorofilov in karotenoidov. Ob prisotnosti svinca se spremeni vsebnost mineralov v sončnici. Ti minerali so klor, mangan, kalcij in žveplo. Kot posledica delovanja svinca so se na rastlinah pojavile še kloroze in nekroze.
- Svinec vpliva na privzem mineralov v poganjke in korenine. Prav tako vpliva na višino poganjka in vsebnost klorofilov ter karotenoidov. Povzroča nastanek kloroz in nekroz. Vpliv svinca na sončnico je večji, saj ta spada med akumulacijske rastline in bolj intenzivno sprejema kovine. Ječmen je na kovinske elemente bolj odporen, svinec se v njem težje akumulira in zato povzroči manj sprememb.

Ključne besede: *klorofili, kovine, hidroponika, strupenost, rastni dejavniki*

Uvod

Sončnica (*Helianthus annuus* L.) spada v družino nebinovk (Asteraceae). Je enoletnica in dvokaličnica. Ima razvejan koreninski sistem z veliko črpalno močjo za hranila in vodo.

Ječmen (*Hordeum vulgare*) je enoletnica iz družine trav (Poaceae) in spada med enokaličnice. Njegove šopaste korenine imajo v normalnih pogojih zadostno črpalno moč za vodo in minerale, da se rastlina normalno prehrani.

Svinec (Pb) je fitotoksična kovina (Alia s sod., 2015). Za rastline ni esencialen, pa vendar se zaradi različnih fizikalnih dejavnikov nabira v različnih delih. Simptomi zastrupitve rastline s Pb so inhibicija rasti, počrnitev korenin, zavrta rast rastline in pojav kloroz, očem nevidni simptomi, pa so inhibicija encimske aktivnosti, motena mineralna prehrana, nestabilnost preskrbe z vodo zaradi znižanega vodnega potenciala, spremembe v izločanju hormonov, spremenjena permeabilnost membran ter inhibicija fotosinteze - zmanjša se vsebnost klorofilov, saj Pb zmanjša vnos magnezija in železa, ki sta potrebna za razvoj klorofila (Sharama in Dubey, 2005).

Namen naše raziskave je bil ugotoviti, kako prisotnost svınca vpliva na privzem mineralov v korenine in poganjke rastlin. Poleg tega pa so nas zanimala še posledice strupenosti svınca, ki se kažejo na biomasi, višini poganjka, dolžini korenine in ostalih rastnih dejavnikih pri sončnici in ječmenu. Predpostavili smo: [1] da bodo rastline, tretirane z večjo koncentracijo svınca, manjše, [2] da bomo pri rastlinah, izpostavljenim svincu, opazili kloroze, pri kontroli brez svınca pa kloroz ne bo, [3] da bo vsebnost makro- in mikroelementov pri rastlinah,

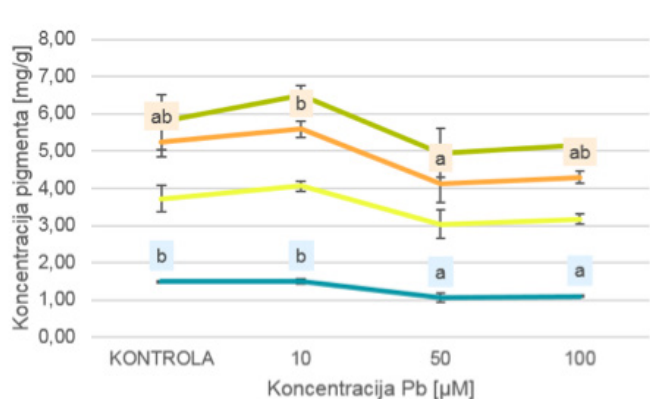
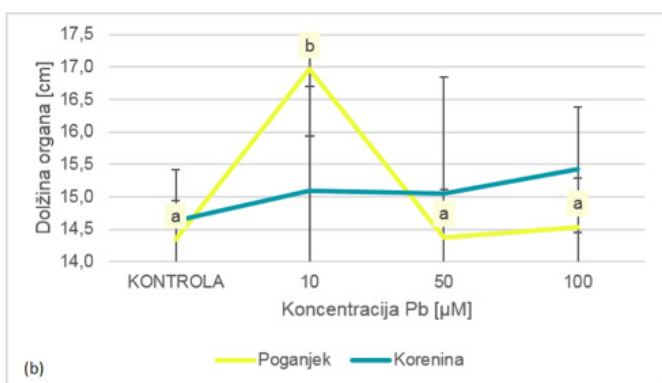
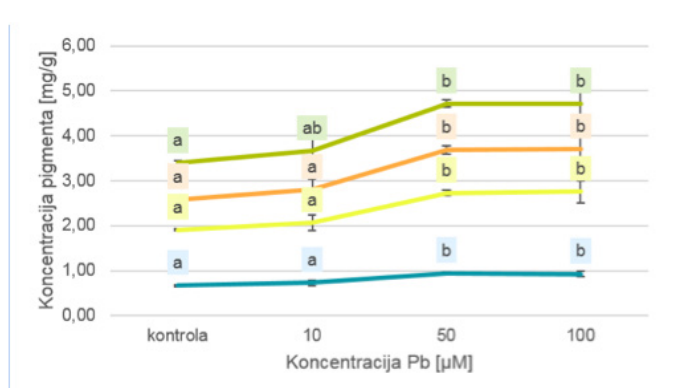
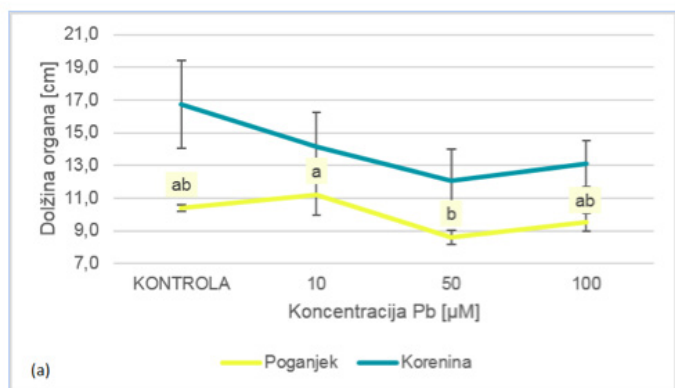
ki bodo izpostavljene svincu, manjša in [4] da bo zaradi večje črpalne moči korenin, hujše simptome zastrupitve kazala sončnica.

Materiali in metode

Semena sončnice in ječmena smo posadili v korita z vermikulitom. Kalitev in rast rastlin je potekala v rastni komori z nastavljenimi 16/8 ur dnevno/nočno ritmiko pri 20°C. Ko so rastline zrasle do 10 cm, smo pripravili hidroponiko. Pripravili smo 16 čaš, ki so vsebovale Hoaglandovo raztopino in različne koncentracije svinčevega klorida PbCl₂ (0 μM - kontrola, 10 μM, 50 μM, 100 μM). Za vsako koncentracijo smo uporabili po 2 čaši in vanje vnesli po 3 kalice sončnice oziroma po 5 kalice ječmena. Rastline smo različnim koncentracijam Pb izpostavili za 14 dni. Po končani izpostavitvi smo preverili prisotnost kloroz in nekroz. Izmerili smo dolžino korenin in poganjkov, ter določili svežo in suho maso (poganjke in korenine smo posušili z liofilizacijo).

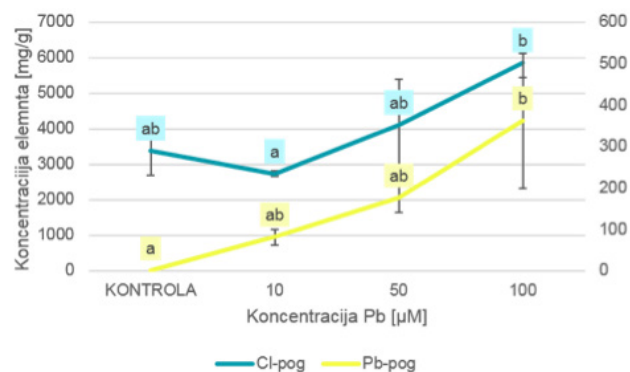
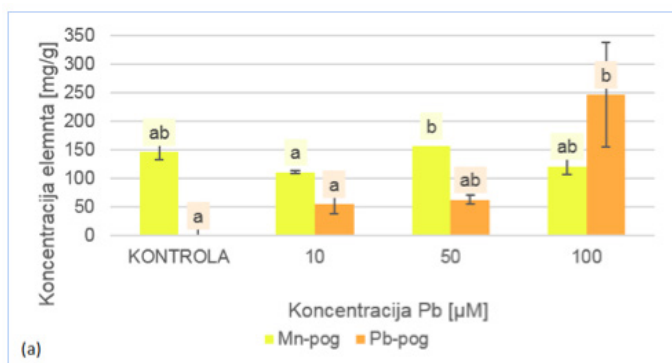
Sledila je analiza vsebnosti fotosinteznih pigmentov (klorofila a in b ter karotenoidov) z metodo po Monni s sod. (2001). Po 30 mg suhe mase korenin in poganjkov smo prenesli v centrifugirke, dodali 5 ml 80 % acetona in vsebino premešali na stresalu. Sledilo je centrifugiranje, da so se delci posedli na dno. S spektrofotometrom smo izmerili absorpcijo pri valovnih dolžinah 470 nm, 647 nm in 664 nm. Iz dobljenih absorpcij smo preračunali koncentracije pigmentov (Lichtenthaler in Buschmann, 2001).

Uporabili smo tudi rentgensko fluorescenčno mikroskopijo (XRF), s katero smo analizirali privzem mineralov v korenine in

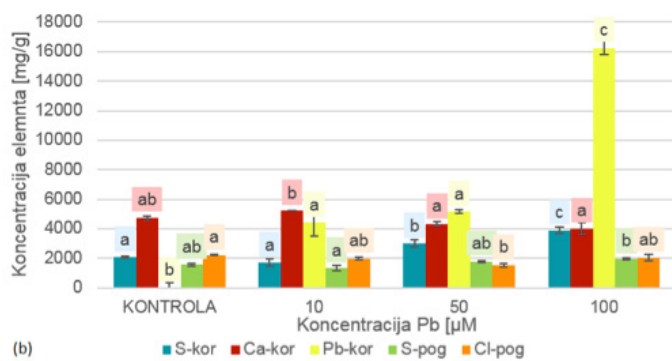


Slika 1: Dolžina korenin in poganjkov pri sončnici (a) in ječmenu (b) v odvisnosti od koncentracije Pb v hranilni raztopini.

Slika 2: Koncentracije klorofilov in karotenoidov pri sončnici (a) in ječmenu (b) v odvisnosti od koncentracije Pb v hranilni raztopini.



Slika 4: Koncentracije mineralov v poganjkih ječmena v odvisnosti od koncentracije Pb v hranilni raztopini.



Slika 3: Koncentracije različnih mineralov v koreninah in poganjkih sončnice v odvisnosti od koncentracije Pb v hranilni raztopini.

poganjke in s tem določili koncentracije različnih elementov v teh delih rastlin. Meritve smo opravili z rentgenskim spektrometrom Peduzo T02 (IJS), pri energiji vzbujanja 20,2 keV. Za statistično analizo podatkov smo uporabili program Statistica 8 (Duncan-ov test) in MS Excel, s katerim smo tudi naredili tabele in grafe.

Rezultati in diskusija

Spremembe dolžine organov pri sončnici in ječmenu

Pri sončnici opazimo statistično pomembne razlike v rasti poganjka, in sicer trend povečanja rasti pri 10 µM koncentraciji, zmanjšane rasti pri 50 µM koncentraciji, 100 µM koncentracija pa nima učinka. Pri velikih koncentracijah se namreč Pb obori v substratu in ne pride v rastlino (PennState Extension, 2017). Do določene mejne koncentracije, ki je pri nas 50 µM, rast organov upada, pri večjih koncentracijah pa vpliv ni več viden.

Tudi pri ječmenu opazimo statistično pomembne razlike le v rasti poganjkov. Le 10 µM koncentracija močno vpliva na rast. Rastlina namreč podaljša svoje poganjke, z namenom, da bi razredčila privzeto koncentracijo Pb. Temu pojavu pravimo hormoneza (Poschenrieder s sod., 2013). Sicer pa Pb na dolžino organov ječmena nima pomembnega vpliva, saj je ječmen enokaličnica. Enokaličnice so bolj odporne na kovine, saj imajo manj pektina. Dvokaličnice pa imajo visok nivo pektinov, ki se med seboj povezujejo s kalcijevi mostički (Sauerbeck, 1991). Zaradi podobnosti med kalcijem in svincem, lahko rastlina



Slika 5: Kloroze na poganjkih sončnice pri 100 µM koncentraciji Pb.

zamenja privzem Ca s Pb (Sharama in Dubey, 2005), kar moti nastanek pektinov v celični steni, posledično pa vpliva na zmanjšano rast organov (**Slika 1**).

S temi rezultati smo našo 1. hipotezo, ki pravi, da bodo rastline, tretirane z večjo koncentracijo manjše, le deloma potrdili. Pri sončnici je namreč prišlo do inhibicije rasti, vendar le do koncentracije 50 µM. Pri ječmenu pa Pb ni vplival na rast organov.

Spremembe vsebnosti klorofilov in karotenoidov pri sončnici in ječmenu

Pri sončnici opazimo statistično značilne razlike v vsebnosti klorofilov in karotenoidov (**Slika 2**). Vsebnost klorofila a, klorofila b, skupnega klorofila in karotenoidov se pri koncentracijah 50 in 100 μM poveča. Povečana vsebnost karotenoidov bi lahko pomenila, da se je v rastlini povečal nivo škodljivih reaktivnih kisikovih zvrsti, saj so karotenoidi zaščitni pigmenti (Havaux, 2013). Vendar pa dvig karotenoidov ni nujno direktno povezan z dvigom ROS.

Pri ječmenu pa opazimo statistično pomembne razlike le pri klorofilu b in skupnem klorofilu. Koncentracija klorofila b se pri koncentraciji 50 μM zmanjša, saj se zaradi zmanjšanja privzema mineralov Mg in Fe zmanjša sinteza klorofila.

Pojav kloroz in nekroz

Pri poganjkih sončnice smo opazili predvsem nekroze, kloroz pa zelo malo - samo pri 3/24 poganjkah. Nekroze smo opazili pri vseh koncentracijah, prav tako tudi pri kontroli brez svinca - tu so se pojavljale samo ob robovih listov. Največ jih je bilo pri koncentraciji 50 μM . Pri ječmenu pa smo opazili obratno situacijo. Pojavljale so se predvsem kloroze, nekroze pa le pri največji koncentraciji 100 μM . Kloroze smo zaznali pri vseh koncentracijah, tudi pri kontroli - tu so se kloroze pojavljale le na konicah listov. Največ kloroz in prav tako nekroz smo opazili pri koncentraciji 100 μM .

Ječmen je enokaličnica in je bolj odporen na kovinske elemente (Sauerbeck, 1991). Zato smo pri ječmenu opazili predvsem kloroze, pri sončnici, ki je dvokaličnica pa predvsem nekroze. Zaradi večje odpornosti se je v organih ječmena Pb slabše akumuliral in povzročal manj škode. Našo 2. hipotezo, ki pravi da bomo pri rastlinah, izpostavljenim svincu, opazili kloroze, pri kontroli brez svinca pa kloroz ne bomo opazili, smo deloma potrdili. Kloroze in nekroze so bile prisotne pri rastlinah, ki so bile izpostavljene Pb, vendar pa so bile prav tako prisotne tudi pri kontroli brez svinca, česar nismo pričakovali.

Sprememba vsebnosti mineralov

Koncentracija Pb v poganjku narašča s koncentracijo Pb v substratu, kar lahko opazimo tako v poganjkah, kot v koreninah. Pričakovano je v koreninah koncentracija Pb najvišja med vsemi elementi (16250 mg/g), medtem ko se v poganjkah slabo akumulira (246,5 mg/g) (Pignata in Salazar, 2013). Pri Ca opazimo trend povečevanja koncentracije pri 10 μM koncentraciji Pb ter trend zmanjšanja koncentracije Ca pri večjih koncentracijah Pb. Temu je tako, ker Pb zamenjuje Ca (Sharama in Dubey, 2005).

Pri sončnici opazimo statistično pomembne razlike v vsebnosti Mn, Pb, S in Cl v poganjkah ter S, Ca in Pb v koreninah (**Slika 3**). V poganjkah lahko opazimo trend zmanjševanja koncentracije Mn pri manjših koncentracijah Pb, pri večjih koncentracijah Pb trend povečanja, 100 μM koncentracija pa nima več učinka. Povečana koncentracija Mn v rastlini je znak stresa (večje koncentracije Pb), saj je del encima superoksid dismutaza, ki znižuje nivo reaktivnih kisikovih zvrsti (The Mosaic Company, 2018). Za Cl, bi bilo pričakovano, da bi se njegova koncentracija povečevala, saj smo rastline tretirali s spojino PbCl_2 . Opazili pa smo, da 10 in 100 μM koncentracija Pb zmanjša privzem Cl v poganjek, 50 μM koncentracija Pb pa ima najslabši vpliv. Cl

se kopiči predvsem v kloroplastih in je bistven za fotosintezne reakcije. Ob njegovem pomanjkanju pa se lahko pojavijo kloroze in nekroze (Wenrong s sod., 2010). Koncentracija S v poganjku s trendom pada pri manjših koncentracijah Pb in s trendom narašča pri največjih koncentracijah, 50 μM pa na privzem S v poganjku nima vpliva. Nasprotno pa koncentracija S v koreninah narašča z naraščajočo koncentracijo Pb. S je sestavni del vitaminov, proteinov in encimov. S povečanjem stresa, ki ga povzroča Pb, se poveča količina reaktivnih kisikovih zvrsti. Posledica je povečana transkripcija genov encimskih antioksidantov, ki so po osnovni zgradbi proteini. Poveča pa se tudi transkripcija genov fitohelatinov. To so peptidi, ki se v rastlinah encimsko sintetizirajo iz glutationov v prisotnosti stresa, ki ga povzročijo kovine. Fitohelatini namreč vežejo kovine v komplekse in jih ločijo od drugih molekul znotraj celice (Farooq s sod., 2016). S povečanjem količine proteinov pa se direktno poveča tudi količina S. Ker je Pb v koreninah največ, je tudi tvorba antioksidantov in fitohelatinov (proteinov) tam večja, kot v poganjkah (EL Dorado Chemical Company, 2011).

Pri ječmenu pa opazimo statistično pomembne razlike le v vsebnosti Pb in Cl v poganjkah (**Slika 4**). Koncentracija Pb v poganjkah narašča s koncentracijo Pb v substratu. Pri Cl opazimo trend upadanja koncentracije pri 10 μM koncentraciji Pb, 50 μM koncentracija nima vpliva na privzem Cl, pri 100 μM koncentraciji Pb pa opazimo trend privzema Cl v poganjke. Predvidevamo, da k povečanemu privzemu Cl prispeva tudi spojina PbCl_2 v substratu. Cl sodeluje pri uravnavanju osmolarnosti, potreba po uravnavanju osmolarnosti pa se s stresom poveča (Wenrong s sod., 2010).

S temi rezultati smo našo 3. hipotezo, ki pravi, da bo vsebnost makro- in mikroelementov manjša pri rastlinah, ki bodo izpostavljene svincu, zavrnili. Večinoma se je koncentracija makro- in mikroelementov povečala, saj ti sodelujejo pri varovanju rastline pred učinki kovin. Makro- in mikroelementi so namreč lahko sestavine antioksidantov in drugih proteinov, ali pa samostojno sodelujejo pri obrambi rastline pred negativnimi vplivi (EL Dorado Chemical Company, 2011). Ječmen je v primerjavi s sončnico veliko bolj odporen na kovinske elemente, saj je enokaličnica, medtem ko je sončnica dvokaličnica. Že sama zgradba enokaličnic preprečuje prenos kovinskih elementov v tkiva, zato večinoma ne preidejo v rastlino. Sončnica pa spada med akumulacijske vrste, pri katerih korenine bolj intenzivno sprejemajo kovine v rastlino (Sauerbeck, 1991). Zato rezultati kažejo veliko razliko v občutljivosti na Pb med rastlinama. Potrdili smo torej našo 4. hipotezo, ki pravi, da bo zaradi večje črpalne moči korenin, hujše simptome zastrupitve kazala sončnica.

Zaključki

Z rezultati smo potrdili, da ima Pb vpliv na privzem mineralov v poganjke in korenine pri sončnici in ječmenu. Prav tako vpliva na višino poganjka in vsebnost klorofilov ter karotenoidov. Povzroča tudi nastanek kloroz in nekroz. Vpliv svinca na sončnico je večji, saj ta spada med akumulacijske rastline in bolj intenzivno sprejema kovine - v našem primeru Pb. Ječmen, ki je enokaličnica, pa je na kovinske elemente bolj odporen, svinec se v njem težje akumulira in zato povzroči manj sprememb.

Literatura

1. Alia N., Sardar K., Said M., Salma K., Sadia A., Sadaf S., Toqeer A. and Miklas S. 2015. Toxicity and bioaccumulation of heavy metals in spinach (*Spinacia oleracea*) grown in a controlled environment. *Int J Environ Res Public Health* 12:7400-7416.
2. EL Dorado Chemical Company. 2011. <http://eldoradochemical.com/fertiliz1.htm> (12.4.2018)
3. Farooq M. A., Ali B., Gill R. A., Islam F., Cui P., Zhou W. 2016. *Breeding Oilseed Crops for Sustainable Production*. Academic Press, Elsevier: 19- 31.
4. Havaux M. 2013. Carotenoid oxidation products as stress signals in plants. *Plant J* 79:597-606.
5. Lichtenthaler H. K. in Buschmann C. 2001. Extraction of photosynthetic tissues: chlorophylls and carotenoids. *Current protocols in food analytical chemistry*. John Wiley New York, F4.2.1-F.4.2.6.
6. Pignata M. L. and Salazar M. J. 2013. Lead accumulation in plants grown in polluted soil. Screening of native species for phytoremediation. *J Geochem Exploration* 137:29-36.
7. PennState Extension. 2017. Lead in Residential Soils: Sources, Testing, and Reducing Exposure. <https://extension.psu.edu/lead-in-residential-soils-sources-testing-and-reducing-exposure> (17.4.2018)
8. Poschenrieder C., Cabot C., Martos S., Gallego B. and Barcelo J. 2013. Do toxic ions induce hormesis in plants? *Plant Sci* 212:15– 25.
9. Sauerbeck D.R. 1991. Plant element and soil properties governing uptake and availability of heavy metals derived from sewage sludge. *Water Air Soil Pol* 57(1):227-237.
10. Sharma P. in Dubey R. S. 2005. Lead toxicity in plants. *Plant Physiol* 17(1):35-52.
11. The Mosaic Company. 2018. <http://www.croplnutrition.com/manganese-in-crop-production> (16.4.2018)
12. Wenrong Chen, Zhenli L. He, Xiao E. Yang, Suren Mishra & Peter J. Stoffella. 2010. Chlorine nutrition of higher plants: Progress and perspectives. *J Plant Nut* 33:943-952.

Vpliv suše na privzem mineralov pri sončnici (*Helianthus annuus* L.) in ječmenu (*Hordeum vulgare* L.)

Jure Mravlje, Maja Hostnik, Amela Kujović

Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

- V naši raziskovalni nalogi smo proučevali vpliv suše na rast in razvoj pri sončnici (*Helianthus annuus* L.) in ječmenu (*Hordeum vulgare* L.), s poudarkom na privzemu mineralov. Zanimalo nas je, kako različne stopnje suše vplivajo na izbrani rastlinski vrsti in ali obstajajo med njima razlike v občutljivosti oz. toleranci na sušo.
- Rastline smo gojili pri različnih koncentracijah polietilen glikola in tako simulirali sušni stres. Merili smo razlike v sveži in suhi biomasi poganjkov in korenin, fotokemični učinkovitosti fotosistema II, transpiraciji, vsebnosti fotosinteznih pigmentov in z metodo XRF določili vsebnost nekaterih mineralov.
- Rezultati našega dela potrjujejo našo domnevo, da je ječmen, kot predstavnik trav, na sušo bolj odporen kot sončnica, saj je imela nanj suša manj negativnih učinkov kot na sončnico.
- Potrdili smo, da rastline ob sušnih razmerah aktivno kopičijo nekatere ione (K⁺, Cl⁻), ki jim omogočajo osmoregulacijo in s tem preživetje v sušnih pogojih. Opazili smo tudi nekaj značilnih razlik v vsebnosti drugih mineralnih snovi, vendar pa bi bilo za zanesljivo potrditev potrebno narediti še dodatne analize oziroma poskus zastaviti na daljše časovno obdobje.

Ključne besede: Suša, stres, sončnica, ječmen, polietilen glikol (PEG), minerali

Uvod

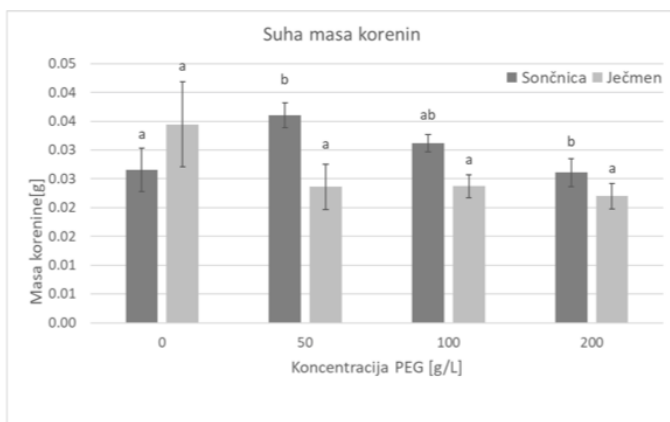
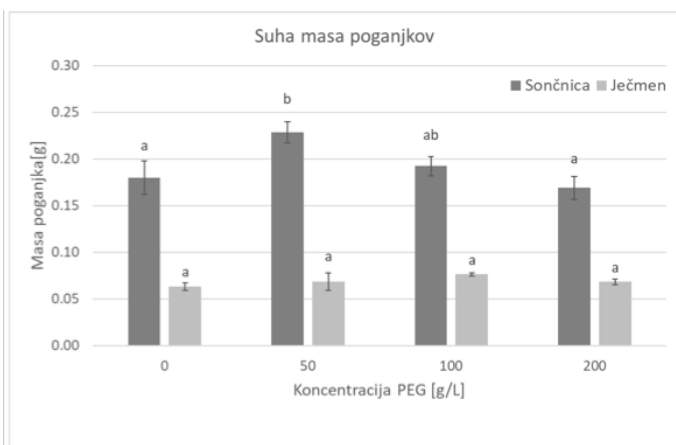
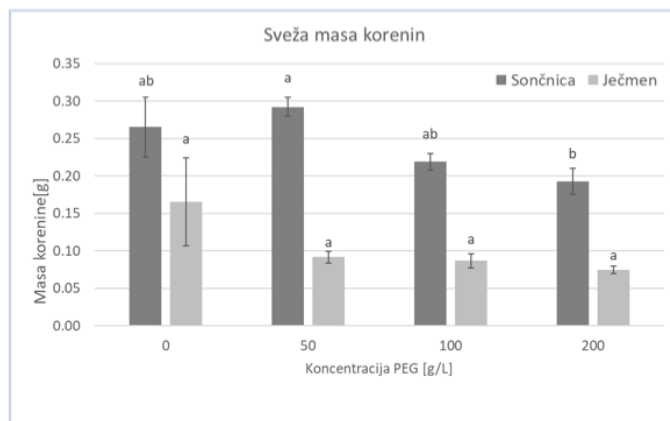
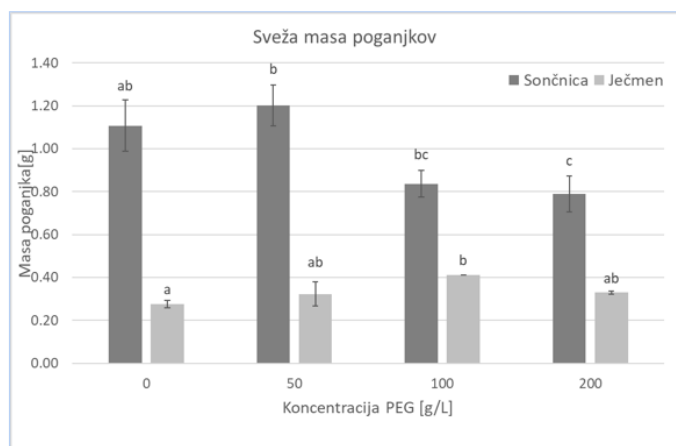
Suša je eden izmed ključnih abiotičnih dejavnikov, ki omejuje rastlinsko rast in produkcijo rastlin. Gre za klimatski fenomen, ki se lahko pojavlja občasno v vseh klimatskih conah, najpogostejša pa je v subtropskih in tropskih območjih (Ciriaco da Silva s sod., 2011). V zadnjem času, ko so klimatske spremembe naša stalnica, suša postaja vedno večji problem, saj se ta pojavlja vse pogosteje in običajno traja vse daljša obdobja, s tem pa ogroža mnoga območja po svetu (Ciriaco da Silva s sod., 2011). Predstavlja namreč eno največjih groženj v svetovni preskrbi s hrano, saj človeška populacija strmo narašča, zaloge vode pa so omejene (Farooq s sod., 2009). Zaloge vode namreč neposredno ali pa posredno vplivajo praktično na vse procese v rastlini (Akinci in Lösel, 2012). Ocenjuje se, da je izguba pridelka zaradi suše v kmetijstvu verjetno večja kot izguba zaradi vseh ostalih vzrokov skupaj, zato suša predstavlja največji problem za svetovno oskrbo s hrano (Farooq s sod., 2009).

Suša moti transport vode po rastlini in zmanjšuje njeno učinkovitost izrabe vode. Zmanjša se tudi fotosintezna aktivnost rastline, kot posledica zaprtja listnih rež, poškodb membran in motenega delovanja encimov (Farooq s sod., 2012). Vse to močno vpliva na rast in fiziološke procese v rastlini (Ciriaco da Silva s sod., 2011), posledice sušnega stresa so različni fiziološki in biokemijski odzivi, opazni tako na celičnem kot na organizemskem nivoju (Farooq s sod., 2009).

Poleg samega primanjkljaja vode, pa je sekundarni učinek suše običajno tudi motena preskrba z minerali, saj je ta v glavnem odvisna od vlažnosti tal, transport mineralov od korenin do poganjka pa je moten tudi zaradi zmanjšane transpiracije ter neravnovesja med aktivnim transportom in prepustnostjo membrane (Ciriaco da Silva s sod., 2011). Dušik (N) in fosfor (P) pogosto veljata za omejujoča dejavnika za rastlinsko rast, vendar pa vpliv suše na vsebnost N in P v rastlinah še vedno ni povsem jasn, čeprav večina raziskav kaže, da se s sušo zmanjšuje tudi privzem in vsebnost N in P v rastlinah (He in Dijkstra, 2014). Kljub različnim poročilom, pa velja, da ob hudi suši povečana vsebnost mineralov v tleh ne bo bistveno izboljšala rasti rastlin (Rouphael s sod., 2012).

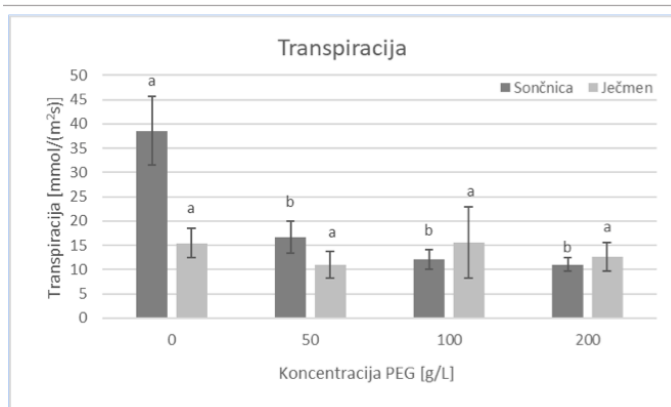
Boljše razumevanje vloge mineralov pri odzivu oz. odpornosti rastlin na sušo bo v prihodnje ključno za uspešno in trajnostno produkcijo hrane na številnih območjih, ki bodo vse bolj prizadeta zaradi suše. Danes je prav to področje razvoja rastlin z visokim potencialom preživetja v pogojih z malo vode in hkrati velikim donosom, eno od osrednjih področij raziskav v agrobiotehnologiji (Jarzyniak in Jasinski, 2014).

Namen naše raziskave je bil ugotoviti: (1) Ali suša vpliva na rast in razvoj ter privzem mineralov pri sončnici in ječmenu?; (2) Kako intenziteta suše vpliva na posamezno rastlinsko vrsto?; (3) Ali obstajajo značilne razlike v privzemu posameznih mineralov v odvisnosti od suše?



Slika 1: Sveža (a) in suha (b) masa poganjkov sončnice in ječmena pri različnih koncentracijah PEG (povprečje \pm SD; $n=6$ pri sončnici; $n=10$ pri ječmenu). Različne črke nad podatki označujejo statistično pomembne razlike (Duncanov test, $p<0,05$).

Slika 2: Sveža (a) in suha (b) masa korenin sončnice in ječmena pri različnih koncentracijah PEG (povprečje \pm SD; $n=6$ pri sončnici; $n=10$ pri ječmenu). Različne črke nad podatki označujejo statistično pomembne razlike (Duncanov test, $p<0,05$).



Slika 3: Transpiracija pri sončnici in ječmenu pri različnih koncentracijah PEG (povprečje \pm SD; $n=6$). Različne črke nad podatki označujejo statistično pomembne razlike (Duncanov test, $p<0,05$).

Material in metode

Poskus smo izvedli na sončnicah (*Helianthus annuus* L.) in ječmenu (*Hordeum vulgare* L.). V lončke smo posejali po 6 semen sončnice oziroma po 10 semen ječmena in počakali, da so rastline vzkile in razvile prve prave liste. Nato smo rastline začeli zalivati na 3 dni s 50 mL različnih koncentracij polietilen glikola (PEG), in sicer 50 g/L, 100 g/L in 200 g/L, ki v tleh znižata osmotski potencial in tako vzpostavi sušne razmere (Lagerwerff s sod., 1961). Rastline kontrolne skupine smo zalivali s 50 mL destilirane vode. Za vsak tretma (0, 50, 100 in 200 g/L PEG) smo imeli po 3 paralelke (3 lončke s po 6 rastlinami sončnice oziroma 10 rastlinami ječmena). Gojili smo jih v rastni komori pri temperaturi 20°C, 40 % vlažnosti in fotoperiodi 16/8 dan/noč. Po 14. dneh smo poskus končali, sledilo je merjenje in analiza različnih parametrov in statistična analiza pridobljenih podatkov.

Morfološke spremembe rastlin

Opazovali smo morfološke spremembe rastlin pred, med in po koncu poskusa. Zabeležili smo si razlike v dolžini poganjkov in korenin. Najprej smo stehali rastline posamezne skupine in določili svežo maso. Na koncu poskusa smo ločili korenine od poganjkov in jih na aluminijasti foliji stehali. Vzorce na aluminijasti foliji smo zmrznili v tekočem dušiku, liofilizirali in nato ponovno stehali ter tako dobili podatke o suhi masi korenin in poganjkov.

Fotokemična učinkovitost fotosistema II

Pri vseh skupinah smo pri 5 rastlinah na 10 listih izmerili dejansko in potencialno fotokemično učinkovitost fotosistema II (PE) z napravo OS5-FL modulated fluorometer (Opti-Sciences).

Določitev fotosinteznih pigmentov

Izmerili smo absorbanco pri 470, 644, 662 nm ter po formuli, navedeni v protokolu, preračunali vsebnost klorofila a, klorofila b in skupnih karotenoidov (Monni s sod., 2001).

Meritev intenzivnosti transpiracije

Meritve transpiracije smo izvedli pri sobnih pogojih na 5 poganjkih iz vsake skupine s porometrom Leaf porometer,

model SC-1 steady state diffusion porometer (Decagon devices, Inc).

Analiza mineralov

Koncentracijo mineralov smo določili z rentgensko fluorescenčno spektrometrijo (XFR). Najprej smo ločili korenine in poganjke, jih liofilizirali in iz posamezne skupine rastlin (po 5 rastlin) pripravili po 2 tableti: eno iz poganjkov in eno iz korenin. Nato smo analizirali tablete z XFR (prenosni spektrometer Peduzo T02, IJS, z Rh anodo in SDD, Amptek) za določitev vsebnosti mineralov (Nečemer in Kump, 2007).

Statistične analize

Statistične analize smo opravili s programom Statistica Statsoft. Uporabili smo test ANOVA s post-hoc Duncanovim testom ($p<0,05$).

Rezultati in diskusija

Sveža in suha biomasa rastlin

Pri sončnici (**Slika 1a**) smo opazili padec biomase z naraščajočo koncentracijo PEG. Vodni stres namreč zmanjša rast korenin in listov. Na liste ima običajno večji vpliv kot na korenine. Pri preučevanju nekaterih vrst pšenice in njihovih prilagoditev na sušo so ugotovili, da so cone podaljševanja listov na sušni stres prilagojene tako, da akumulirajo sladkorje. Poleg tega osmoregulacija in vzdrževanje turgorja omogočata rast korenin in učinkovit privzem vode. Kljub osmoregulaciji pa lahko sušni stres vseeno prizadene rast poganjkov, in sicer zaradi prepočasne kompenzacije oziroma zaradi padca turgorja (Akinci in Lösel, 2012).

Pri koncentracijah 50 g/L PEG oz. blagih stresnih pogojih smo opazili boljši odziv rastlin, saj je bila pri sončnicah opazna večja produkcija biomase korenin (**Slika 2**) in poganjkov (**Slika 1**) kot pri kontroli. To lahko pojasnimo s pojavom imenovanim hormoneza. Gre za pozitivni odziv rastline na blagi stres (Cedergreen s sod., 2007), kar se lahko kaže kot povečanje biomase pri določeni koncentraciji neke kemikalije. Če je porast biomase do 20% glede na kontrolo, govorimo o hormonezi (Brito s sod., 2017).

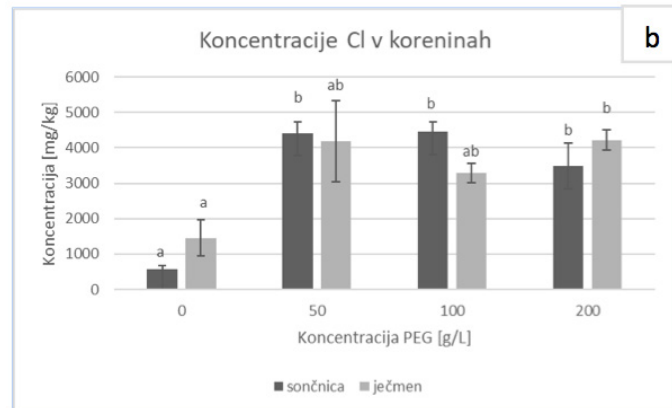
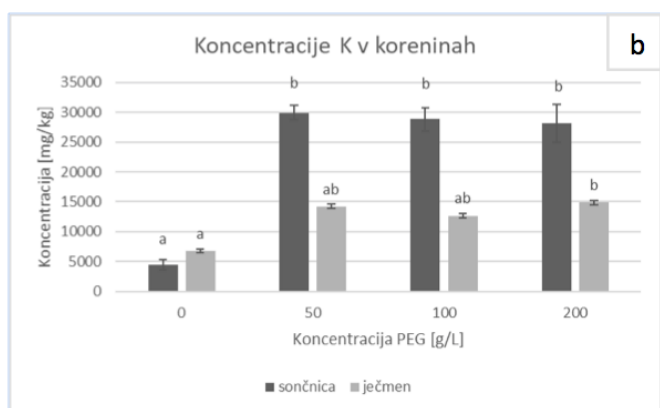
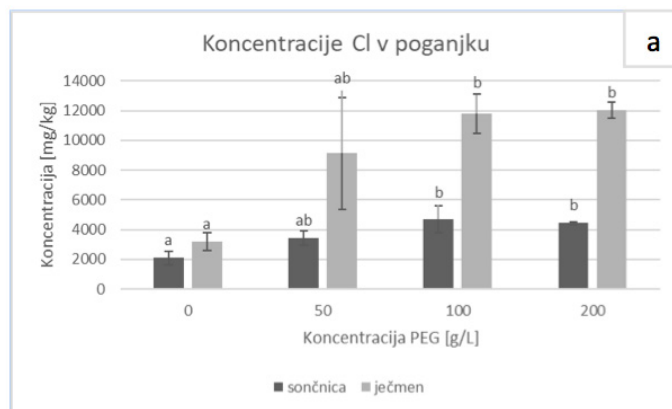
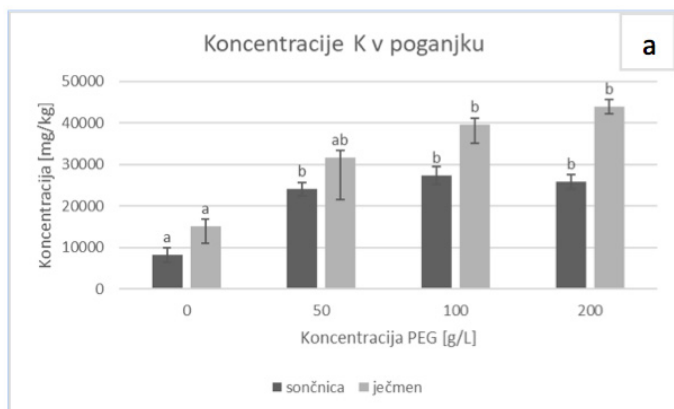
Sveža masa poganjkov pri ječmenu se je povečala pri koncentraciji 100 g/L PEG (**Slika 1a**). Trave so v splošnem bolj odporne na sušni stres, saj razvijejo obsežen, šopast koreninski sistem, poleg tega so na sušo prilagojene tudi z obliko listov. Rezultati našega poskusa potrjujejo našo domnevo, da je ječmen kot predstavnik trav bolj prilagojen na sušo in ima zato suša na njegovo rast manj negativen vpliv kot pa na rast sončnice. Zaradi dolgega življenjskega cikla ječmena (približno 10 mesecev), ki v tem času naredi globok koreninski sistem, bi bilo za natančno opazovanje spremembe rasti korenin potrebno poskus zastaviti na daljši časovni rok in v večjih poskusnih loncih.

Transpiracija in fotokemična učinkovitost fotosistema II

V našem poskusu je pri sončnici pri koncentraciji PEG 50 g/L prišlo do 43% padca transpiracije glede na kontrolno skupino (**Slika 3**). Manjša dostopnost vode v tleh vodi v zmanjšanje količine vode, ki jo rastlina lahko absorbira skozi korenine, glede na količino vode, ki se s transpiracijo stalno izloča

Tabela 1: Vsebnost fotosinteznih pigmentov (v mg/g) pri ječmenu pri različnih koncentracijah PEG (povprečje ± SD; n=6). Različne črke označujejo statistično pomembne razlike (Duncanov test, p<0,05).

	Kontrola (0 g/L PEG)	50 g/L PEG	100 g/L PEG	200 g/L PEG
Klorofil a	1,97 ± 0,35 a	2,33 ± 0,46 a	3,39 ± 0,15 b	2,75 ± 0,15 a,b
Klorofil b	0,73 ± 0,13 a	0,85 ± 0,16 a	1,29 ± 0,08 b	1,02 ± 0,06 a,b
Karotenoidi	0,94 ± 0,13 a	1,05 ± 0,17 a	1,36 ± 0,05 b	1,63 ± 0,07 a,b

**Slika 4:** Koncentracije kalija v poganjku (a) in v koreninah (b) pri sončnici in ječmenu pri različnih koncentracijah PEG (povprečje ± SD; n=3). Različne črke nad podatki označujejo statistično pomembne razlike (Duncanov test, p<0,05).**Slika 5:** Koncentracije klora v poganjku (a) in v koreninah (b) pri sončnici in ječmenu pri različnih koncentracijah PEG (povprečje ± SD; n=3). Različne črke nad podatki označujejo statistično pomembne razlike (Duncanov test, p<0,05).

skozi listne reže. To rastlino izpostavi sušnemu stresu, pride do znižanja vodnega potenciala, padca turgorja v celicah, zapiranja listnih rež in zmanjšanja transpiracije (Tezara s sod., 1999). Suša inducira sintezo abscizinske kisline (ABA) v koreninah in tako vpliva na zmanjšanje transpiracije. Višje koncentracije ABA povzročijo zapiranje listnih rež in inhibirajo njihovo odpiranje (Finkelstein, 2013). Pri ječmenu zmanjšanje transpiracije ni bilo statistično značilno, kar lahko pripisemo višji toleranci na sušo ali pa težavam pri merjenju, saj je bilo potrebno prekriti celo merilno površino, zato je bila transpiracija ponekod merjena tudi na treh listih ječmena hkrati.

Z naraščanjem koncentracije PEG v našem poskusu ni prišlo do statistično značilnih sprememb v dejanski in potencialni učinkovitosti fotosistema II, kar bi lahko ponovno pripisali težavam pri merjenju. Pri rastlinah pod sušnim stresom pride tudi do sprememb v metabolizmu: aktivira se fotorespiracija in tvorba reaktivnih kisikovih spojin – ROS (Mafakheri s sod., 2010). Vzrok za zmanjšanje fotosinteze je lahko tudi zmanjšana

rast ali pa pospešena senescenca listov (Akinci in Lösel, 2012).

Fotosintezni pigmenti

Z naraščanjem koncentracije PEG je prišlo do naraščanja vsebnosti karotenoidov, klorofila a in b pri ječmenu (**Tabela 1**), pri sončnici pa te razlike niso bile statistično značilne. Karotenoidi so ena izmed ključnih obrambnih molekul proti reaktivnim kisikovim spojinam. Nahajajo se v reakcijskem centru fotosistema I in II ter v antenskih kompleksih. Služijo za odvajanje odvečne energije iz sistema, da ne pride do poškodb klorofilov (Šircelj, 2008). Sklepamo lahko, da ječmen ob oksidativnem stresu s sintezo karotenoidov zavaruje molekule pred foto-oksidacijo in s tem izboljša svojo toleranco na sušo. V primeru hudega stresa lahko pride do preobremenitve karotenoidnih sistemov, oksidacijskih poškodb tilakoidne membrane in razgradnje klorofilov (Šircelj, 2008).

Vsebnost mineralnih elementov

V naši raziskavi smo opazili kopičenje kalija ob suši, saj je tako pri sončnici kot pri ječmenu prišlo do kopičenja kalija v poganjku (**Slika 4a**) in v koreninah (**Slika 4b**). Kalij namreč rastline privzemajo v velikih količinah, saj ima pomembno vlogo pri uravnavanju vodnega stanja rastlin in sodeluje pri odpiranju listnih rež (Ciriaco da Silva s sod., 2011). Kalij naj bi bil primarni anorganski ion, ki se akumulira ob suši, najbolj predvsem v listih. Njegova vsebnost v rastlinah se ob suši poveča, saj je ključen za osmotsko uravnavanje in tako pripomore k boljšemu preživetju rastlin ob sušnem stresu (Akinci in Lösel, 2012).

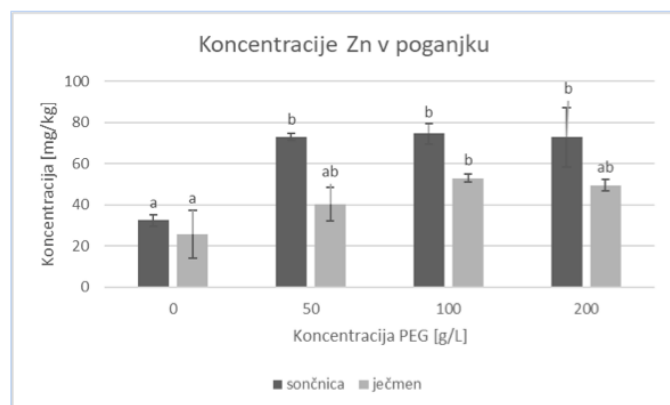
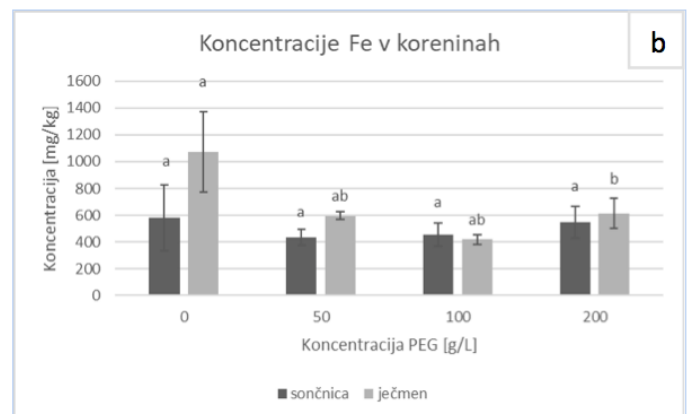
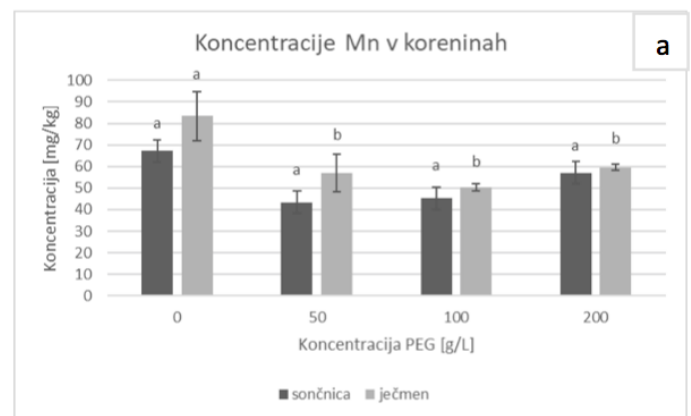
Podoben učinek smo opazili tudi pri vsebnosti klora, ki se je povečala pri obeh rastlinah tako v poganjku (**Slika 5a**) kot v koreninah (**Slika 5b**). Klor ima v rastlinah pomembno vlogo pri fotosintezi, delitvi celic, osmoregulaciji in uravnavanju stomatalne prevodnosti. Rastline običajno vsebujejo več klora kot je potrebno za optimalno rast, saj ga je načeloma v tleh dovolj (Ciriaco da Silva s sod., 2011). Študije dokazujejo, da se vsebnost klora v rastlinah v sušnih razmerah poveča, saj ima vlogo pri osmotskem uravnavanju in posledično toleranci na sušo (Ciriaco da Silva s sod., 2011; Akinci in Lösel, 2012). Vpliv sušnega stresa na privzem in akumulacijo mineralov v rastlinah je precej težko definirati, saj različne študije opisujejo različne učinke suše na vsebnost mineralov v različnih rastlinskih vrstah. A večina študij potrjuje, da se privzem mineralov z večjo stopnjo sušnega stresa zmanjšuje (Akinci in Lösel, 2012). Nekatere študije kažejo, da naj bi suša pri rastlinah povzročila povečanje vsebnosti dušika (Farooq s sod., 2009), medtem ko druge opažajo, da se vsebnost dušika ob suši bistveno zmanjša, kar vodi v zavrtost rast in nastanek kloroz (Ciriaco da Silva s sod., 2011; He in Dijkstra, 2014). Vsebnost fosforja, ki ima pomembno vlogo v prenosu energije v celičnem metabolizmu, se običajno značilno zmanjša (Farooq s sod., 2009; Ciriaco da Silva s sod., 2011). Praviloma se zniža tudi vsebnost železa, medtem ko naj bi se količine nekaterih drugih elementov (kot na primer K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ in Cl^-) ob suši povečale (Akinci in Lösel, 2012).

V našem poskusu smo opazili značilno povečanje vsebnosti cinka v poganjku tako pri sončnici kot pri ječmenu (**Slika 6**). Cink je namreč pomemben funkcionalni, strukturni

in regulatorni kofaktor številnih encimov, poleg tega ima pomembno vlogo pri metabolizmu mnogih snovi (Ciriaco da Silva s sod., 2011). Kot kofaktor je vezan tudi v nekaterih encimih (kot na primer superoksidna dizmutaza), ki sodelujejo pri razstrupljanju reaktivnih kisikovih spojin. Študije na različnih sortah lucerne (*Medicago sativa* L.) so pokazale, da ima cink verjetno vlogo pri toleranci rastlin na vodni stres (Ciriaco da Silva s sod., 2011). Podobno dokazujejo tudi študije na turški detelji (*Onobrychis viciifolia* Scop.), kjer so opazili povišane količine cinka ob pomanjkanju vode v tleh (Akinci in Lösel, 2012). Torej lahko rečemo, da naša raziskava potrjuje dognanja nekaterih drugih raziskovalcev.

V koreninah ječmena smo opazili statistično značilne spremembe v vsebnosti mangana (**Slika 7a**) in železa (**Slika 7b**), medtem ko pri sončnici razlike v vsebnosti teh dveh elementov niso bile statistično značilne. Rezultati našega poskusa kažejo zmanjšanje vsebnosti mangana ob sušnem stresu v koreninah ječmena, medtem ko za sončnico tega ne moremo trditi. Mangan ima v rastlinah pomembno vlogo pri transportu elektronov in v antioksidativnem metabolizmu. Sušni stres naj bi povzročil pomanjkanje mangana v rastlinah, medtem ko bolj vlažna tla pripomorejo k pretvorbi mangana v bolj topno obliko, ki jo rastline lažje privzemajo (Ciriaco da Silva s sod., 2011).

Podoben pojav smo opazili tudi pri vsebnosti železa (**Slika 7b**). Rezultati našega poskusa potrjujejo, da naj bi ob sušnem stresu prišlo do zmanjšanja vsebnosti železa, saj smo opazili negativen trend vsebnosti železa v koreninah ječmena z



Slika 6: Koncentracije cinka (Zn) v poganjku sončnice in ječmena pri različnih koncentracijah PEG (povprečje \pm SD; $n=6$). Različne črke nad podatki označujejo statistično pomembne razlike (Duncanov test, $p<0,05$).

Slika 7: Koncentracije mangana (a) in železa (b) v koreninah sončnice in ječmena pri različnih koncentracijah PEG (povprečje \pm SD; $n=3$). Različne črke nad podatki označujejo statistično pomembne razlike (Duncanov test, $p<0,05$).

naraščajočo koncentracijo PEG. Pri sončnici razlike v vsebnosti železa v koreninah niso bile statistično značilno različne. Železo je za rastline esencialen mikro-nutrient, saj je sestavni del številnih proteinov (citokromi, katalaza, feredoksin) in encimov. V tleh ga je malo, saj je slabo topen, v sušnih pogojih pa povečana prisotnost kisika v tleh povzroči zmanjšanje razmerja Fe^{2+}/Fe^{3+} , kar pomeni, da je v tleh še manj rastlinam dostopnega železa (Ciriaco da Silva s sod., 2011). Torej je učinek suše lahko tudi pomanjkanje železa pri rastlinah. Okoljski dejavniki kot je suša lahko povzročijo pomanjkanje mineralov, ki so esencialni za rast in razmnoževanje rastlin. Višje rastline mineralne snovi večinoma absorbirajo iz tal, preko koreninskega sistema. Privzem večine elementov iz tal je odvisen od vlažnosti tal, zato je ob pomanjkanju vode v tleh oskrba rastlin z minerali motena (Ciriaco da Silva s sod., 2011). Ob sušnem stresu pride tudi do zaprtja listnih rež, kar zmanjša stopnjo transpiracije (Farooq s sod., 2009; Ciriaco da Silva s sod., 2011). Sušni stres torej zmanjša dostopnost, privzem, translokacijo in metabolizem mineralnih hranil, poleg tega pa zmanjšana transpiracija pomeni manjši privzem in učinkovitost izrabe teh hranil (Farooq s sod., 2009). Pri mnogih rastlinah pride do tako imenovanega »osmotskega uravnavanja«, kjer rastline ob sušnem stresu akumulirajo anorganske ione, organske kisline, ogljikove hidrate in proste aminokisline. Študije na pšenici (Munns s sod., 1979) so pokazale, da imajo na sušo bolj odporne sorte pšenice večjo sposobnost osmotskega uravnavanja kot na sušo občutljive sorte. Kljub temu pa osmotsko uravnavanje v meristemskih regijah in območjih ekspanzije celic ob hudem in dolgem sušnem stresu povzroči zavrtje rasti poganjka (Akinci in Lösel, 2012).

Zaključki

Rezultati našega dela potrjujejo, da ima suša negativni vpliv na rast in razvoj rastlin. Pričakovano je imela suša bolj negativni vpliv na sončnico kot pa na ječmen. Ob suši pride tudi do sprememb v vsebnosti mineralov tako v koreninah, kakor tudi v poganjku. Vse rastline so v svojih tkivih aktivno kopičile K^+ in Cl^- ione, ki jim omogočajo osmotsko uravnavanje in tako preživetje suše. Raziskav o vplivu suše na privzem in vsebnost mineralov v rastlinah je še relativno malo, zato bi bilo za zanesljiv učinek suše na vsebnost določenih makro- in mikro-nutrientov v rastlinah potrebno še več raziskav na tem področju. Suša namreč danes predstavlja eno največjih groženj za svetovno oskrbo s hrano, z nadaljnjimi klimatskimi spremembami pa bodo njeni vplivi in posledice vse bolj izrazite. Zato bo poznavanje odziva rastlin na sušo in njihovih mehanizmov tolerance ter gojenje na sušo odpornejših rastlin, v prihodnosti ključno za trajnostno oskrbo s hrano vse hitreje naraščajoče svetovne populacije.

Literatura

1. Akinci, Š., Lösel, D. M. (2012). Plant water-stress response mechanisms. *Water Stress*, InTech:15-42.
2. Brito, I. P., Tropaldi, L., Carbonari, C. A., Velini, E. D. (2017). Hormetic effects of glyphosate on plants. *Pest management Science*. doi: 10.1002/ps.4523.
3. Cedergreen, N., Streibig, J. C., Kudsk, P., Mathiassen, S. K., Duke, S. O. (2007). The occurrence of hormesis in plants and algae. *Dose-Response* 5 (2):150–162.
4. Ciriaco da Silva, E., Jurema Mansur Custódio Nogueira, R., Almeida da Silva, M., Albuquerque, M. (2011). Drought Stress and Plant

5. Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., Basra, S. M. A. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development*, Springer Verlag, 29 (1):185-212.
6. Farooq, M., Hussain, M., Wahid, A., Siddique, K. H. M. (2012). Drought Stress in Plants: An Overview. *Plant Responses to Drought Stress*, Springer-Verlag. 1-6.
7. He, M., Dijkstra, F. A. (2014). Drought effect on plant nitrogen and phosphorus: a metaanalysis. *New Phytologist*, 204: 924–931.
8. Finkelstein, R. (2013). Abscisic acid synthesis and response. *The Arabidopsis Book*. Nov 1 (11): e0166. doi: 10.1199/tab.0166.
9. Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F., Prange, R.K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207: 604–611.
10. Jarzyniak, K. M., Jasinski, M. (2014). Membrane transporters and drought resistance – a complex issue. *Frontiers in Plant Science*, 5:687.
11. Lagerwerff, J.V., Ogata, G., Eagle, H.E. (1961). Control of osmotic pressure of culture solutions with polyethylene glycol. *Science* 133: 1486-1487.
12. Mafakheri, A., Siosemardeh, A., Bahramnejad, B., Struik, P.C., Sohrabi, Y. (2010). Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars. *Austral J Crop Sci* 4 (8):580-585.
13. Monni, S., Uhlig, C., Hansen, E., Magel, E. (2001). Ecophysiological responses of *Empetrum nigrum* to heavy metal pollution. *Environ Pol* 112 (2):121-129.
14. Nečemer, M., Kump, P. (2007). Analiza vzorcev s tehnikami rentgensko fluorescenčne spektrometrije (XRF in TXRF). *Collectanea Studentium Physiologiae Plantarum*, 2:21-24
15. Roupael, Y., Cardarelli, M., Schwarz, D., Franken, P., Colla, G. (2012). Effects of Drought on Nutrient Uptake and Assimilation in Vegetable Crops. *Plant Responses to Drought Stress*, Springer-Verlag. 171-198.
16. Šircelj, H. (2008). Karotenoidi v fotosinteznem aparatu in odziv na stres. *Acta Agriculturae Slovenica*, 91(1):271-282.
17. Tezara, W., Mitchell, V.J., Driscoll, S.D., Lawlor, D.W. (1999). Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature*, 401:914-917.