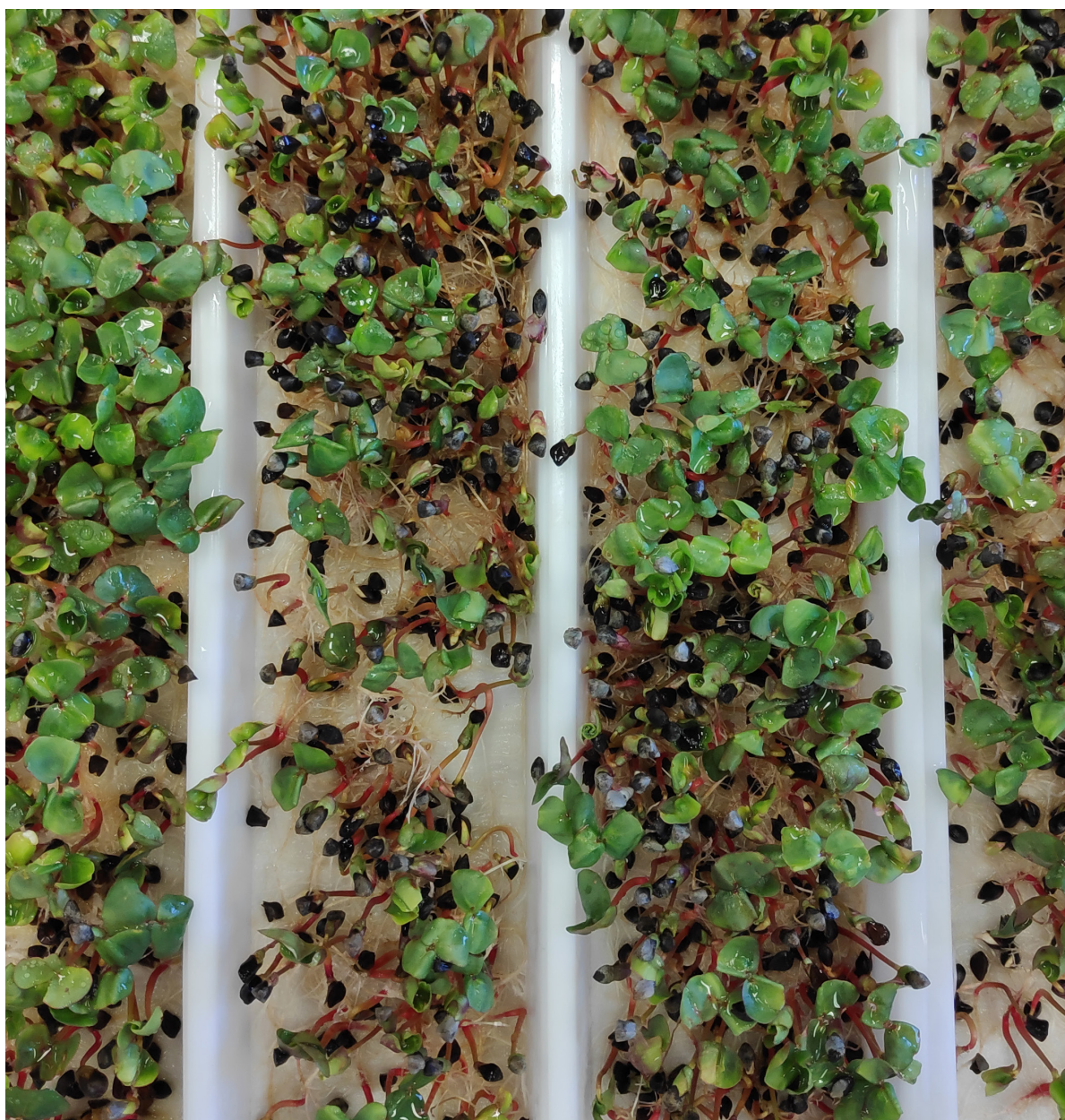


2021 Vol. 12 Št. 2

CSPP

Collectanea Studentium Physiologiae Plantarum



Zgodba iz naslovnice



Prikaz kalitvenega poskusa biofortifikacije semen ajde s cinkovim kloridom.

Slika: Nejc Urh

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

Paula Pongrac

Jure Mravlje

Naslov uredništva:

Collectanea Studentium Physiologiae Plantarum,

Zbornik študentov fiziologije rastlin

Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

Izdano: 2021

ISSN 1854-4193 (online: <https://www.bf.uni-lj.si/sl/o-fakulteti/knjiznice-bf/publikacije/2021011412353830/collectanea-studentium-physiologiae-plantarum>)

4 VPLIV PLAZEMSKÉ OBDELAVE ZRN NAVADNE AJDE NA UČINKOVITOST BIOFORTIFIKACIJE KALČKOV S CINKOM

Tihomir Anžur, Neja Bizjak , Nikita Matović, Nejc Urh

9 VPLIV BIOFORTIFIKACIJE SEMEN VRTNE KREŠE S CINKOM NA KALJIVOST IN MINERALNO SESTAVO KALČKOV

Tjaša Čukajne, Živa Dimnik, Primož Fabjan,
Matija Hrovatin, Eva Müller

14 VPLIV BIOFORTIFIKACIJE ZRN PŠENICE S CINKOM NA KALJIVOST IN MINERALNO SESTAVO KALIC

Eva Koplan, Aldijana Mašinović, Alenka Novak,
Nika Zabret

18 VPLIV BIOFORTIFIKACIJE SEMEN FIŽOLA MUNGO S CINKOM NA KALJIVOST IN MINERALNO SESTAVO KALČKOV

Mila Dinkovska, Eva Smrekar, Rebeka Udvarc,
Mojca Zafran

23 VPLIV ACETILSALICILNE KISLINE NA RAST FIŽOLA ČEŠNJEVCA

Miha Bajc, Tim Godec, Tim Medved, Lana Žura

Vpliv plazemske obdelave zrn navadne ajde (*Fagopyrum esculentum*) na učinkovitost biofortifikacije kalčkov s cinkom

Tihomir Anžur, Neja Bizjak, Nikita Matovič, Nejc Urh

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

- Namen raziskave je bil preveriti vpliv plazemske obdelave zrn navadne ajde (*Fagopyrum esculentum*) na kaljivost, učinkovitost biofortifikacije kalčkov s cinkom (Zn) ter prisotnost gliv na zrnih.
- Zrna navadne ajde, od katerih je bilo nekaj obdelanih s hladno plazmo in nekaj neobdelanih, smo namakali v različnih koncentracijah cinkovega klorida ($ZnCl_2$), jim določili CFU gliv in jih nato gojili v kalilnikih v rastni komori sedem dni. Del zrn smo uporabili za preverjanje kaljivosti, iz ostalih zrn smo pridobili kalice, iz katerih smo po sušenju in tehtanju oblikovali tabletko za analizo mineralne sestave v kalicah z metodo rentgenske fluorescence (XRF).
- Obdelava zrn s hladno plazmo je imela negativen vpliv na kalitev in na koncentracije izmerjenih elementov, ni pa imela vpliva na suho biomaso kalic. Biofortifikacija s $ZnCl_2$ ni imela vpliva na kalitev in suho biomaso kalic, je pa vplivala na koncentracije izmerjenih elementov, razen na koncentraciji železa (Fe). Obdelava s hladno plazmo je vplivala na rast kvasovk, medtem ko na rast filamentoznih gliv ni imela vpliva.

Ključne besede: kaljivost, kalilniki, elementna sestava, pomanjkanje hranil, rentgenska fluorescenca, hladna plazma

Uvod

Navadna ajda (NA; *Fagopyrum esculentum* Moench) je tujeprašna rastlina in jo uvrščamo v družino dresnovk (Polygonaceae). Njena prednica izvira iz vzhodne Azije, od koder so jo preko Tibeta in centralne Azije s časoma prinesli v Evropo in je tako postala tradicionalna poljščina obeh celin. Gojenje ajde ima več sto-letno tradicijo tudi v Sloveniji. Če je ajda nekdanje veljala zgolj kot hrana za reveže, pa z njeno visoko hranilno vrednostjo, uravnoteženo aminokislinsko sestavo, visoko vsebnostjo vlaknin in fenolov, zlasti rutina, danes pridobiva na priljubljenosti (Bonafaccia in Fabjan, 2003; Bonafaccia in sod., 2003; Kreft in sod., 2006). Ajda ne vsebuje glutena, zato je primerna za paciente s celiakijo (Skerritt, 1986). Mineralne snovi v zrnju NA so prisotne v sorazmerno visokih količinah, v primerjavi s pšenico pa ima NA do štirikrat višje vsebnosti dostopnega Zn, bakra (Cu) in mangana (Mn) (Ikeda in Yamashita, 1994; Kreft in sod., 2006).

Zn je eden od najpomembnejših esencialnih mineralov za organizme. Je kofaktor za več kot 1000 encimskih reakcij in več kot 2000 transkripcijskih faktorjev (Chasapis in sod., 2012).

Zn ima ključno vlogo pri pravilnem celičnem delovanju v vseh stopnjah in je pomemben element za normalno delovanje endokrinega in imunskega sistema. V visokih koncentracijah je prisoten v sinaptičnih veziklih in je esencialen za normalen razvoj in delovanje možganov (Ackland in Michalczyk, 2016). Po nekaterih ocenah pomanjkanje Zn prizadene skoraj 17 % svetovnega prebivalstva (White in sod., 2012), hkrati pa je zaradi podhranjenosti s tem elementom razlog za 4 % otroških bolezni in smrti (Penny, 2013).

S postopki biofortifikacije želimo vzgojiti in pridelati osnovna živila z zadostno koncentracijo esencialnih elementov za priporočen dnevni vnos. Številni poročajo o boljšem privzemu in boljši akumulaciji elementov v rastlinah z namakanjem semen v raztopinah elementov pred kalitvijo (Diaz-Gomez in sod., 2017; Qaswarin in sod., 2017).

Težavo v zagotavljanju zadostnih količin hrane pa predstavlja tudi skladiščenje in obstojnost semenskega materiala. Današnji trendi so usmerjeni k zmanjšanju uporabe umetnih gnojil, pesticidov ter fungicidov in so usmerjeni k uporabi okolju prijaznih metod. Med novejšie metode spada obdelava semen s hladno plazmo (HP), ki omogoča sterilizacijo semen in zrn. V naši raziskavi smo preizkusili kako biofortifikacija s $ZnCl_2$ in obdelava s HP vplivata na elementarno sestavo, kaljivost, suho biomaso kaliv ter kako obdelava s HP vpliva na številčnost gliv na površini zrn NA. Določili smo količino CFU gliv iz zrn in s pomočjo rentgenske fluorescenčne spektrometrije (XRF) izmerili koncentracije fosforja (P), žvepla (S), kalija (K), klora (Cl), kalcija (Ca), Fe, Mn in Zn v sedem dni starih kalicah NA. Pričakujemo, da bo obdelava zrn s HP negativno vplivala na kaljivost in prisotnost gliv in pozitivno na privzem preiskovanih elementov. Za biofortifikacijo s $ZnCl_2$ pričakujemo, da bodo kalice z višanjem koncentracije $ZnCl_2$ vsebovale večjo koncentracijo Zn in Cl.

Materiali in metode

Zrna NA, od katerih je bila ena polovica obdelana s HP (200 W, 30 s), smo namočili v destilirano vodo (kontrola) ali pa v raztopino treh različnih koncentracij $ZnCl_2$ (0,25; 0,05; 0,075 M) za 24 ur pri sobni temperaturi (21°C). Naslednji dan smo za test kaljivosti vzeli po 100 namočenih zrn za vsako obdelavo

in obravnavo ter jih razdelili v pet petrijevok (premer 70 mm), v katere smo predhodno namestili filter papir. Filter papir smo namočili z destilirano vodo in petrijevke z zrn postavili v temen prostor v rastno komoro s stalnimi pogoji (22 °C, 60 % vlažnostjo in 16/8 urno fotoperiodo). Zrna smo spremljali in po potrebi dolili destilirano vodo. Po sedmih dnevih smo prešteli število vzkaljenih semen. Preostanek namočenih zrn smo prenesli v kalilnike (EasyGreen, Biovie, Francija) in jih prav tako postavili v rastno komoro komoro s stalnimi pogoji. Po sedmih dnevih smo vzkaljena zrna vzeli iz kalilnika in ločili korenine od poganjkov. Slednje smo stehali in jih nato tri dni (oziroma do suhega) sušili v sušilniku pri 60°C. Posušene rastline smo stehali (suha biomasa kalic) in material strli v terilnici s tekočim dušikom. Iz strtega materiala smo s pomočjo hidravlične stiskalnice izoblikovali tabletko (masa vsake tabletko je bila 100-200 mg) in z rentgensko fluorescenco izmerili koncentracije P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe in Zn (Nečemer in sod., 2008).

Za določanje prisotnosti gliv smo 1 g zrn preko noči namakali v 9 ml destilirane vode in jih rahlo stresali na stresalniku 24 ur. Namakalno vodo smo redčili do končne koncentracije 10^{-6} ter nato po 0,1 ml iz vsake redčitve nanесли na petrijevke (premer 70 mm) napolnjene z 2% PDA gojiščem (izvorno: potato dextrose agar) proizvajalca Merck. Raztopino smo sterilno razmazali po celi površini gojišča s stekleno spatulo Drigalski. Gojišča smo gojili v temnem prostoru pri 22°C sedem dni (Mravlje in sod., 2021). Po končani inkubaciji smo prešteli kvasovke in filamentozne glive na ploščah.

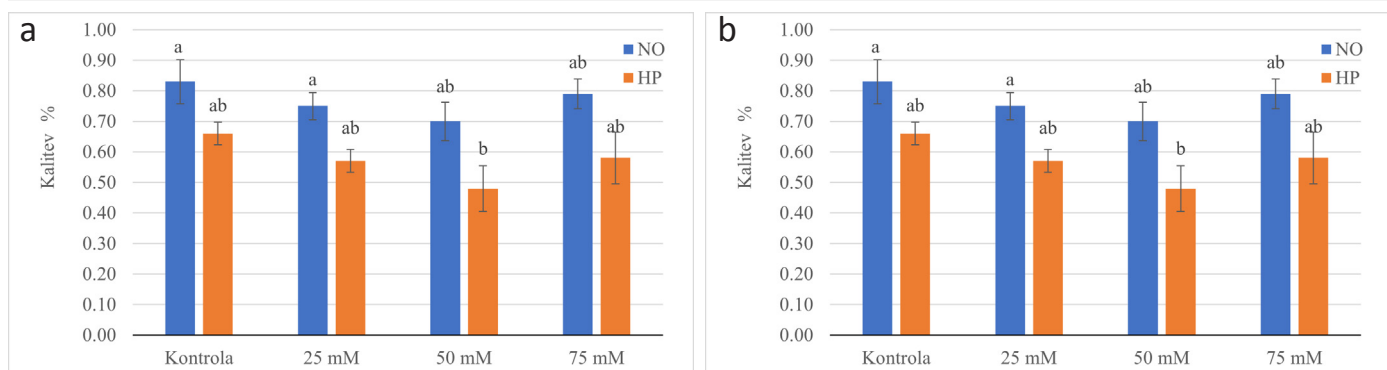
Rezultate smo statistično obdelali v programu Statistica (StatSoft, TIBCO Software), kjer smo uporabili orodja za dvosmerno in enosmerno analizo variance (ANOVA), in Tukey post hoc test pri $p < 0,05$.

Rezultati

Dvosmerna ANOVA (Tabela 1) je potrdila statistično značilen vpliv ($p < 0,05$) biofortifikacije (namakanje semen v različne koncentracije $ZnCl_2$) in obdelave zrn s HP na koncentracije

Tabela 1: Vrednosti p iz dvosmerne ANOVA za odvisne spremenljivke (kalitev, suha masa kalic in koncentracije elementov v kalicah), pri čemer smo uporabili dve neodvisni spremenljivki (biofortifikacija semen s $ZnCl_2$ in obdelava semen s hladno plazmo).

	biofortifikacija s $ZnCl_2$	obdelava s hladno plazmo	interakcija
kalitev	0.249	<0.001	0.450
suha masa kalic	0.017	0.077	0.139
P	<0.001	<0.001	<0.001
S	0.002	<0.001	0.002
Cl	<0.001	<0.001	<0.001
K	<0.001	<0.001	<0.001
Ca	0.033	<0.001	<0.001
Mn	0.033	<0.001	0.009
Fe	0.095	<0.001	<0.001
Zn	<0.001	<0.001	<0.001



Slika 1: Kalitev (a) in suha biomasa kalic (b) navadne ajde, katerih zrna smo obdelali s hladno plazmo (HP) ali neobdelana (NO) in jih namakali v različnih koncentracijah $ZnCl_2$ 24 ur pri sobni temperaturi ($21^{\circ}C$). Prikazane so povprečne vrednosti \pm standardna napaka ($n=4$). Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike med vsemi obravnavami (dvosmerna ANOVA, Tukey post hoc test pri $p<0,05$).

izmerjenih elementov, razen za koncentracijo Fe. Za kalitev se je izkazalo, da način obdelave zrn s HP vpliva na kalitev, medtem ko biofortifikacija nima tega vpliva. Ravno obratno pa velja za suho maso kalic.

S HP obdelana zrna NA so kalila slabše kot neobdelana zrna (Slika 1a). Biofortifikacija z namakanjem v $ZnCl_2$ je zelo blago negativno vplivala na biomaso suhih kalic (Slika 1b). Pri večini obravnav biofortifikacije je obdelava zrn s HP negativno vplivala na koncentracije izmerjenih elementov (Slika 2). Biofortifikacija s $ZnCl_2$ je povečala koncentracije Zn v kalicah, vendar manj pri kalicah, katerih zrna so bila obdelana s HP, ko pri tistih, katerih zrna niso bila obdelana s HP (Slika 2a). Koncentracije Zn v kalicah so bile najvišje pri obravnavi biofortifikacije s 75 mM $ZnCl_2$ pri neobdelanih zrnih (Slika 2). Biofortifikacija s $ZnCl_2$ je negativno vplivala na koncentracijo Cl v kalicah, katerih zrna niso bila obdelana s HP (najvišja koncentracija Cl pri kontroli), medtem ko je vplivala pozitivno na koncentracijo Cl v kalicah, katerih zrna so bila obdelana s HP (najvišja koncentracija pri obravnavi biofortifikacije s 75mM $ZnCl_2$) (Slika 2).

Enosmerna ANOVA (Tabela 2) je potrdila statistično značilen vpliv ($p<0,05$) obdelave zrn s HP na število zraslih kolonij kvasovk, obdelava pa ni imela vpliva na rast filamentoznih gliv.

Diskusija

Zaradi slabše kaljivosti semen obdelanih s HP sklepamo, da obdelava s hladno plazmo poškoduje kalček in zaradi tega zrna slabše kalijo. Naši rezultati se ne skladajo z ugotovitvami že izvedenih študij, kjer so ugotovili, da obdelava s HP in s tem odstranitev mikrobnih plasti, izboljša stopnjo kaljivosti zrn, saj bakterije in glive, ki živijo pod lusko negativno vplivajo na kalitev. Prav tako obdelava s plazmo povzroči tako hidrofobne kot hidrofilne tanke plasti, ki vplivajo na absorpcijo vode. Podobno lahko pri semenih z debelim ovojem in nizko prepustnostjo obdelava s plazmo izboljša hidrofilnost površine in s tem sprejem vode, kar spodbudi kalitev (Randeniya in Groot, 2015). Razlog za neskladanje bi lahko bil v načinu (moč) in trajanje obdelave s HP. HP tudi negativno vpliva na privzem izbranih elementov. Menimo, da obdelava s HP spremeni površinske lastnosti zrn in posledično pride do sprememb v privzemu vode in s tem tudi določenih elementov. Biofortifikacija je rahlo negativno vplivala na maso suhih kalic, kar bi lahko pomenilo, da privzem določenih elementov

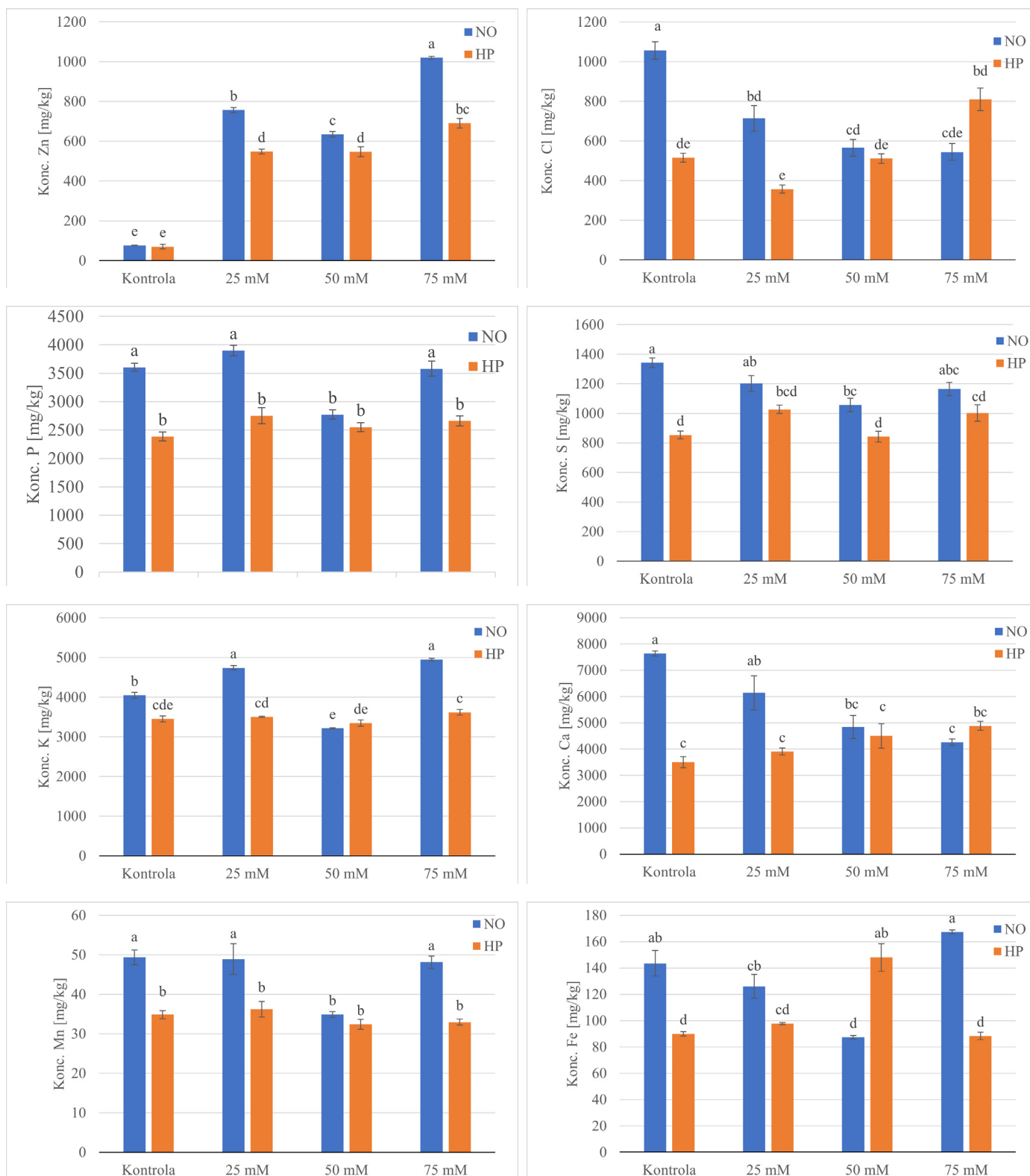
negativno vpliva na razvoj kalčka in rast rastlin. Rezultati biofortifikacije za koncentracije elementov v zrnih pa so variabilni, zato lahko z gotovostjo samo to, da različne koncentracije biofortifikacije s $ZnCl_2$ vplivajo na elementarno sestavo kalic in povečajo koncentracijo Zn v kalicah. V raziskavi Selcuk in sod. 2008 navajajo, da obdelava zrn s hladno plazmo različno vpliva na mikrobo sestavo zrn. To je odvisno od vrste mikroorganizma, vrste medija, kjer se mikroorganizem nahaja, metoda izpostavitve HP, vrste plina in čas obdelave. Njihovi rezultati podpirajo teorijo, da obdelava zrn s HP zniža glivno sestavo na zrnih, in sicer pod 1% glede na začetno mikrobo sestavo (Seluck in sod., 2008). Naši rezultati ne kažejo podobnih zaključkov, saj se je v obdelanih semenih povečalo število kvasovk, obdelava s HP pa ni imela vpliva na filamentozne glive. Sklepamo, da HP povzroči poškodbe in razpoke zrna, kar omogoči prehod mikroorganizmov izpod luske na površino in tako v namakalno vodo. Tako je detekcija gliv lahko večja, kot če bi jih izolirali samo iz površine.

Zaključki

Rezultati se delno ujemajo z našimi pričakovanji. Obdelava zrn s HP je negativno vplivala na kaljivost, ni pa imela vpliva na suho biomaso kalic, torej lahko delno potrdimo to hipotezo. Hipotezo, da bo obravnava s HP pozitivno vplivala na mineralno sestavo kalic, lahko zavržemo, saj se koncentracija ni

Tabela 2: Število tvorjenih kolonij na ml (CFU/ml) in rezultati enosmerne ANOVA za odvisni spremenljivki (število kvasovk in filamentoznih gliv), pri čemer je neodvisna spremenljivka obdelava semen (NO – neobdelana semena, HP – semena obdelana s hladno plazmo). Število CFU smo določili s štetjem gliv in filamentoznih gliv na ploščah, na katere smo nanесли različne redčitve namakalne vode (zrna smo 24 ur namakali v destilirani vodi, nato pa to vodo redčili in po 0,1 ml nanесли na PDA gojišče ter gojili sedem dni pri $22^{\circ}C$ v temnem prostoru).

	NO [CFU/ml]	HP [CFU/ml]	p vrednosti obdelave
kvasovke	1.55*108	3.60*108	0.010
filamentozne glive	1.04*103	1.42*103	0.174



Slika 2: Koncentracija cinka (Zn), klora (Cl), fosforja (P), žvepla (S), kalija (K), kalcija (Ca), mangana (Mn) in železa (Fe) v kalicah navadne ajde, katerih zrna smo obdelali s hladno plazmo (HP) ali jih nismo obdelali (NO) in jih namakali v različnih koncentracijah ZnCl₂ 24 ur pri sobni temperaturi (21°C). Prikazane so povprečne vrednosti ± standardna napaka (n=4). Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike med vsemi obravnavami (dvosmerna ANOVA, Tukey post hoc test pri p<0,05).

povečala pri skoraj nobeni obdelavi s HP. Delno lahko potrdimo hipotezo, da bo obdelava zrn s HP vplivala na prisotnost gliv, saj je imela obravnava s HP statistično značilen vpliv na število zraslih kolonij kvasovk, ni pa imela vpliva na rast filamentoznih gliv.

Hipotezo za biofortifikacijo s ZnCl₂ lahko delno potrdimo, saj je višanje obravnave s ZnCl₂ povečala koncentracije Zn v obdelanih in neobdelanih semenih. Za koncentracije Cl pa hipotezo podprejo le rezultati za semena obdelana s HP. V prihodnje bi lahko poskus ponovili še z drugimi

koncentracijami ZnCl₂ in drugačnemu načinu obdelave s HP.

Literatura

- Ackland M. L., Michalczyk A. A. 2016. Zinc and infant nutrition. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 611, 51–57
- Bonafaccia G., Fabjan N. 2003. Nutritional comparison of tartary buckwheat with common buckwheat and minor cereals. *Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Kmet*, 81–83
- Bonafaccia G., Marocchini M., Kreft I. 2003. Composition and technological properties of the flour and bran from common and tartary buckwheat. *Food Chemistry*, 80, 1: 9–15
- Chasapis C. T., Loutsidou A. C., Spiliopoulou C. A., Stefanidou M. E. 2011. Zinc and human health: an update. *Archives of Toxicology*, 86, 4: 521–534
- Diaz-Gomez J., Twyman R.M., Zhu C., Farre G., Serrano C.J., Portero-Otin M., Munoz P., Sandmann G., Capell T., Christou P. 2017. Biofortification of crops with nutrients : factors affecting utilization and storage. *Current Opinion in Biotechnology*, 44: 115-123
- Ikeda S., Yamashita Y. 1994. Buckwheat as a dietary source of zinc, copper, and manganese. *Fagopyrum*, 14: 29-34
- Kreft I., Fabjan N., Yasumoto K. 2006. Rutin content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) food materials and products. *Food Chemistry*, 98, 3: 508–512
- Mravlje J., Regvar M., Starič P., Mozetič M., Vogel-Mikuš K. 2021. Cold plasma affects germination and fungal community structure of buckwheat seeds. *Plants*, 10, 5: 851
- Nečemer M., Kump P., Ščančar J., Jačimović R., Simčič J., Pelicon P., Budnar M., Jeran Z., Pongrac P., Regvar M., Vogel-Mikuš K. 2008. Application of X-ray fluorescence analytical techniques in phytoremediation and plant biology studies. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 63, 11: 1240-1247
- Penny M.E. 2013. Zinc supplementation in public health. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 62, s1: 31–42
- Randeniya L. K., de Groot G. J. J. B. 2015. Non-thermal plasma treatment of agricultural seeds for stimulation of germination, removal of surface contamination and other benefits: a review. *Plasma Processes and Polymers*, 12, 7: 608–623
- Qaswar M., Hussain S., Rengel Z. 2017. Zinc fertilisation increases grain zinc and reduces grain lead and cadmium concentrations more in zinc-biofortified than standard wheat cultivar. *Science of The Total Environment*, 605–606: 454–460
- Selcuk M., Oksuz L., Basaran P. 2008. Decontamination of grains and legumes infected with *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. by cold plasma treatment. *Bioresource Technology*, 99,11: 5104–5109
- Skerritt J.H. 1986. Molecular comparison of alcohol-soluble wheat and buckwheat Proteins. *Cereal Chemistry*, 63, 4: 365-369
- White J. V., Guenter P., Jensen G., Malone A., Schofield M. 2012. Consensus statement: Academy of nutrition and dietetics and American society for parenteral and enteral nutrition. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 36, 3: 275-283

Vpliv biofortifikacije semen vrtne kreše (*Lepidium sativum* L.) s cinkom na kaljivost in mineralno sestavo kalčkov

Tjaša Čukajne, Živa Dimnik, Primož Fabjan, Matija Hrovatin, Eva Müller

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

- Cink je eden izmed esencialnih elementov. Blago do zmerno pomanjkanje cinka je zelo razširjeno tudi v visoko razvitih državah. Ena izmed strategij, s katero bi lahko enostavno povečali vnos cinka v telo s pomočjo prehrane je biofortifikacija, s katero lahko izboljšamo prehransko kakovost rastlin, predvsem vsebnost esencialnih elementov. V raziskavi smo želeli preveriti vpliv biofortifikacije s cinkom na kaljivost in mineralno sestavo kalčkov vrtne kreše (*Lepidium sativum*).
- Semena smo za 24 h namakali v različnih koncentracijah $ZnCl_2$ (0, 25, 50, 75 in 100 mM) in preverili vpliv na kaljivost in suho maso kalic. V 7-dni starih kalčkih smo s pomočjo rentgenske fluorescence določili koncentracijo naslednjih esencialnih elementov: fosfor (P), žveplo (S), klor (Cl), kalcij (Ca), mangan (Mn), železo (Fe) in cink (Zn).
- Biofortifikacija s cinkom ni imela vpliva na kaljivost in suho maso kalic. Po biofortifikaciji se je spremenila mineralna sestava kalčkov vrtne kreše: koncentracija cinka je narasla, koncentracije P, S, Cl, K, Ca in Fe pa so se zmanjšale v primerjavi s kontrolo. Koncentracija Mn se ni spremenila.
- Namakanje semen v $ZnCl_2$ se je izkazala kot uspešna metoda biofortifikacije kalčkov vrtne kreše s Zn, saj smo dosegli 10-kratno povečanje vsebnosti pri 75 mM Zn v primerjavi s kontrolo.

Ključne besede: Kalilnik, namakanje semen, cinkov klorid, prehranjenost, rentgenska fluorescenca

Uvod

Biofortifikacija je postopek s katerim poskušamo rastlinam izboljšati prehransko kakovost (koncentracijo in/ali dostopnost vitaminov in drugih esencialnih elementov), pri čemer so z vidika elementne sestave v ospredju za človeka esencialni elementi: Ca, jod, Fe, Mg, selen, Zn in baker (Cu; FAO 2001). V okviru trenutnega svetovnega agronomskega izziva, kjer prehrana več kot polovice svetovnega prebivalstva ne pokriva osnovnih potreb po esencialnih elementih (Uvin 1994), predstavlja biofortifikacija enostavno orodje, s katerim bi izboljšali vnos slednjih v prehrano. Predvsem koristna je lahko za osebe, ki imajo težave pri spreminjanju prehranskih navad zaradi finančnih, kulturnih ali regionalnih omejitev, v primerjavi s prehranskimi dopolnili pa je cenejša in trajnostna. Poznamo tri glavne metode biofortifikacije: klasično žlahtnenje rastlin, genski inženiring in agronomsko biofortifikacijo (Naveed s sod. 2020). Slednjo smo uporabili v naši raziskavi pri kateri smo semena vrtno kreše namakali v raztopini $ZnCl_2$.

Cink je eden izmed esencialnih elementov v prehrani ljudi. Igra ključno vlogo v več kot 300 encimskih sistemih, med drugim predstavlja del DNA polimeraze, reverzne transkriptaze, RNA polimeraze in tRNA sintetaze, s čimer lahko pomembno vpliva na izražanje genov (Tipton in Cook 1963). Znan je kot ključna komponenta DNA-vezavnih proteinov kot so Zn prsti, je del Cu/Zn superoksid dizmutaze in različnih proteinov, ki so odgovorni za popraviljanje napak na DNK. Posledično ima znižanje koncentracije Zn v celicah močan vpliv na nastanek enojnih in dvojnih prelomov ter oksidativnih sprememb na DNA in popraviljanje le-teh, kar zvišuje tveganje za razvoj rakavih obolenj (Ho in Ames 2002). Je ključen za rast in razvoj tkiv, delovanje imunskega sistema, mineralizacijo kosti, delovanje ščitnice in strjevanje krvi. Pomanjkanje Zn tako povzroča upočasnen razvoj, nizek krvni pritisk, izgubo apetita, diarejo, izpadanje las in imunsko pomanjkljivost (Deshpande s sod. 2012). Čeprav je hudo pomanjkanje redko, je blago do zmerno pomanjkanje Zn zelo razširjeno tudi v visoko razvitih državah. Svetovna zdravstvena organizacija ocenjuje, da na dnevni ravni okoli 2 milijardi ljudi po svetu ne zaužije zadostne količine tega esencialnega elementa. Odstotek je višji v državah v razvoju in dosega tudi do 73 % prebivalstva (Caulfield in Black 2004). V tovrstnih državah prebivalstvo uživa malo živil živalskega izvora, ki so bogata z visoko dostopnim Zn, npr. rdeče meso in morska hrana (Pennington in Spungen 2005). Poleg tega je za revno prebivalstvo značilno uživanje zelo visokega deleža žit in stročnic, ki so bogata s fitinsko kislino. Fitinska kislina v semenih in zrnih v prebavilih veže Zn in nastane kompleks imenovan fitat. Fitat je slabo prebavljiv, saj nimamo encima fitaze. Posledično je absorpcijo Zn zavrta (Hambidge s sod. 2010). Zaradi pomanjkanja Zn so najbolj ogrožene nosečnice, rast človeškega zarodka ter dojenčki in otroci, ki imajo visoke potrebe po tem elementu (Sanusi s sod. 2021). V skupino najbolj ogroženih spadajo tudi starejši, ki imajo zaradi oslabiljenega delovanja prebavil lahko poslabšano absorpcijo Zn (Bales s sod. 1986).

Vrtna kreša (*Lepidium sativum* L.) je zel iz družine Brassicaceae. Izvira iz Egipta, goji pa se jo po celem svetu. Letna rastlina zraste do 45 cm višine, je razvejana, z majhnimi eliptičnimi listi in belimi cvetovi. V kulinariki se večinoma uporablja kot dodatek k juham, solatam in drugim jedem, lahko pa se jo uživa tudi v obliki kalčkov (Singh s sod. 2015). V preteklosti se je kreša uporabljala kot domače zdravilo za različna obolenja

kot so slabost, vnetje, bronhitis in astma, krešine pozitivne učinke na slednjo pa so potrdili tudi v kliničnih študijah (Paranjape in Mehta 2006).

Namen naše raziskave je bil preučiti vpliv biofortifikacije semen vrtno kreše s Zn na kaljivost in mineralno sestavo kalčkov. Postavili smo naslednje hipoteze: Predvidevamo, da se bo povečal odstotek kalitve po biofortifikaciji, ob tem pa bo masa kalic, katerih semena smo namakali v $ZnCl_2$ višja v primerjavi s kontrolo. Pričakujemo statistično značilne spremembe v koncentraciji izmerjenih esencialnih elementov, predvsem Zn. Na podlagi predhodnih raziskav (Saha s sod. 2015) predvidevamo, da se bo po biofortifikaciji v kalicah zvišala vsebnost Zn in znižala vsebnost ostalih elementov, katerih koncentracije merimo.

Materiali in metode

Semena vrtno kreše smo namočili v raztopine različnih koncentracij $ZnCl_2$ (25 mM; 50 mM; 75 mM in 100 mM) oz. v destilirano vodo (kontrolna skupina) pri sobni temperaturi. Po 24 urah smo del semen prenesli v petrijevke (5 x 20 semen) za oceno kaljivosti, preostanek pa razporedili v kalilnike, ter postavili v rastno komoro s 16-urno fotoperiodo, kjer je bila temperatura 19 °C ponoči in 22 °C podnevi.

Po 7 dneh smo prešteli število skaljenih semen v petrijevkah. Rastline smo vzeli iz kalilnikov in ločili poganjke od korenin. Poganjke smo razporedili po 4 pakete za sušenje (za vsako od koncentracij $ZnCl_2$) s približno 2 g sveže mase kalčkov. Vse pakete smo stehali za podatek sveže mase in nato sušili v sušilniku na 60 °C 4 dni. Posušene rastline smo ponovno stehali ter s pomočjo tekočega dušika strli. Iz uprašenega rastlinskega materiala smo pripravili tabletko (pakete smo zaradi premalo biomase združili v 2 vzorca na obravnavo) s pomočjo hidravlične stiskalnice. V tabletkah (4 meritve za vsako obravnavo) smo izmerili koncentracijo posameznih elementov (P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe in Zn) s pomočjo rentgenske fluorescence (Nečemer s sod. 2008).

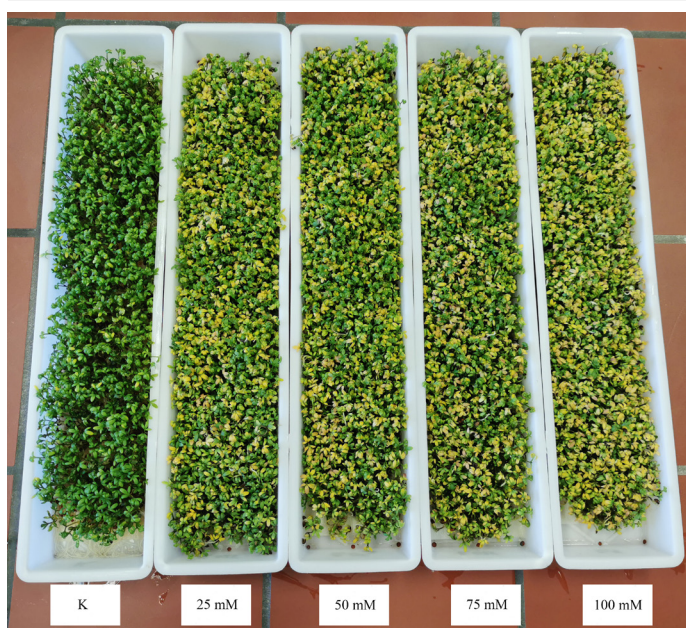
Rezultate smo statistično obdelali s pomočjo enosmerne ANOVE in ob statistično značilnih vplivih obravnav na merjene parametre izvedli Tukeyev post hoc test pri $p < 0,05$ v programu Statistica.

Rezultati

Učinki biofortifikacije semen na njihovo kaljivost Biofortifikacija semen vrtno kreše s Zn ni imela statistično značilnega vpliva na kaljivost semen. Povprečen odstotek kalitve je znašal 69 %. Opazili smo, da so bili kalčki pri vseh koncentracijah Zn bolj klorotični v primerjavi s kontrolnimi kalčki (Slika 1).

Učinki biofortifikacije semen na suho maso kalic Biofortifikacija semen vrtno kreše s Zn ni imela statistično značilnega vpliva na suho maso kalčkov. Povprečna suha masa kalic je znašala 1,2 mg.

Učinki biofortifikacije semen na mineralno sestavo kalčkov Biofortifikacija semen vrtno kreše s Zn je imela statistično značilen vpliv na mineralno sestavo kalčkov. Največji vpliv je bil izmerjen pri koncentraciji Zn v kalčkih in sicer je bila pri vseh obravnavah statistično značilno višja v primerjavi s kontrolnimi kalčki. Največje zvišanje je bilo pri 75 mM raztopini $ZnCl_2$ (Slika 2). Koncentracija P, S, Cl, K, Ca in Fe je bila pri vseh obravnavah biofortifikacije statistično značilno nižja v



Slika 1: Sedem dni stari kalčki vrtne kreše (*Lepidium sativum*). Od leve proti desni si sledijo kontrolni kalčki (K) in obravnave 25 mM, 50 mM, 75 mM in 100 mM raztopine $ZnCl_2$, uporabljene za biofortifikacijo (namakanje semen, 24 ur pri sobni temperaturi).

primerjavi s kontrolnimi kalčki (Slika 2B-G). Obravnava semen s $ZnCl_2$ pa ni imela statistično značilnega vpliva na koncentracijo Mn. Povprečna koncentracija Mn v kalčkih je znašala 31 mg Mn kg^{-1} suhe snovi.

Diskusija

Gnojila z anorganskim cinkom (Zn^{2+}) se lahko uporabljajo na s Zn revnih tleh tako za izboljšanje rasti rastlin kot njihove prehranske vrednosti (Martens and Westermann, 1991; Mortvedt in Gilkes, 1993), vendar pa lahko povišane koncentracije povzročijo strupenost, katere simptomi so zastajanje rasti poganjkov, zvijanje mladih listov in kloroze (Daviscarter in Shuman, 1993). Kar nekaj raziskav je pokazalo tudi uspešno biofortifikacijo različnih vrst kalčkov s Zn (Zhao s sod. 2020; Lingyun s sod. 2016). V naši raziskavi smo pokazali, da lahko z namakanjem semen v $ZnCl_2$ uspešno povečamo vsebnost Zn v kalčkih vrtne kreše.

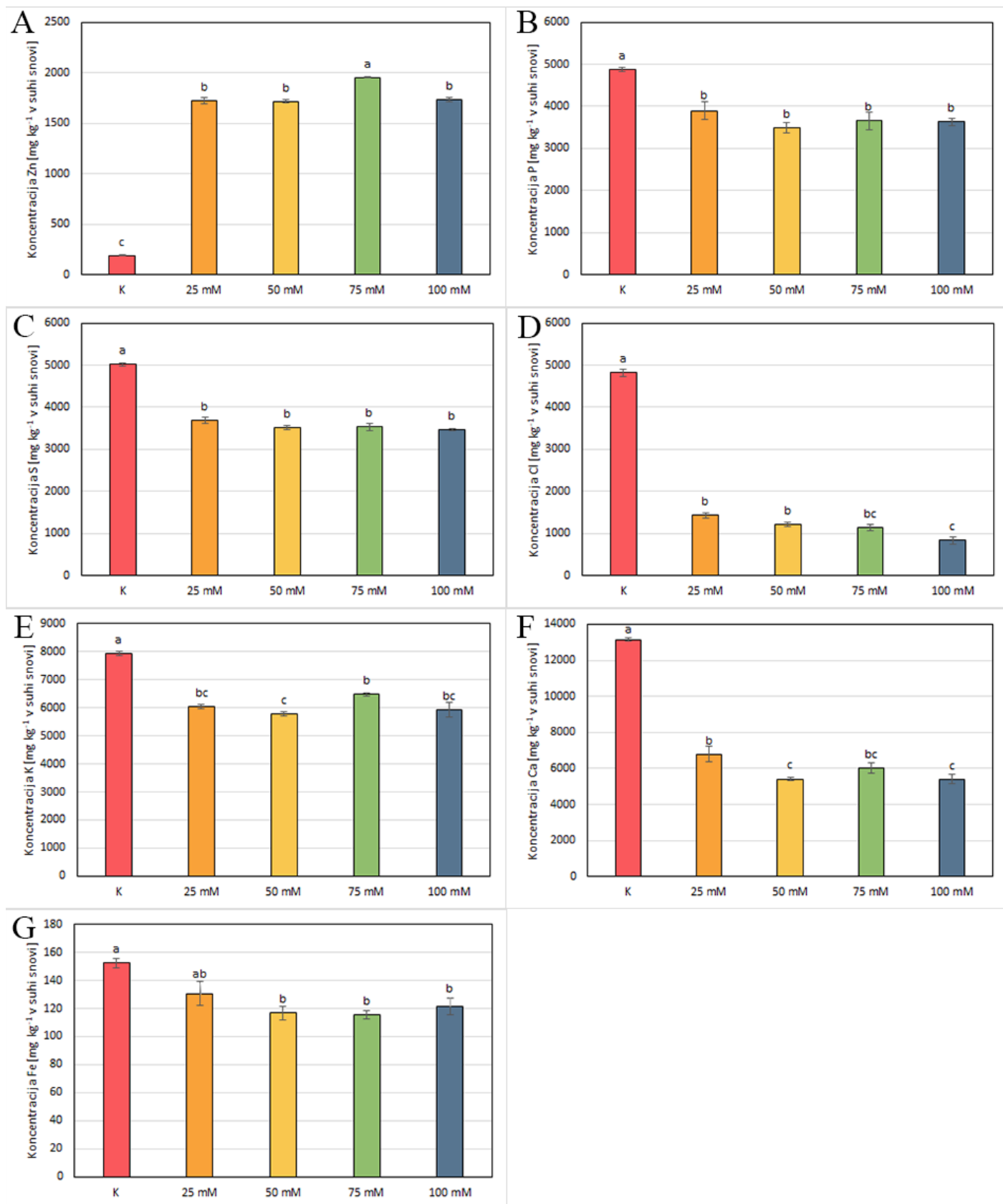
Kaljivost in suha masa

Kontrolni kalčki so bili zdravi in zelene barve (Slika 1). Pri vseh biofortificiranih kalčkih (t.j. tistih, ki so zrastle iz semen, ki so bila namočena v 25 mM, 50 mM, 75 mM ali 100 mM $ZnCl_2$) pa smo opazili rahlo zavrto rast s prisotnimi klorozami. Kalčki v obravnavi 100 mM $ZnCl_2$ so bili le malenkost bolj klorotični, kar nakazuje, da že 25 mM koncentracija vpliva stupeno na vrtno krešo, a da z višanjem koncentracije do 100 mM ne dosežemo bistveno večje strupenosti. Kljub opazni klorozi pa obravnava s Zn ni imela vpliva na suho maso kalčkov, kar nakazuje na to, da tudi najvišja koncentracija Zn še ni bila preveč strupena. Podobne rezultate (blaga kloroza) pri sorodni vrsti *Brassica juncea* so opazili pri gnojenju s koncentracijo $100 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ substrata (pesek/perlit) (Ebbs in Kochian, 1997). Načeloma zelo nizke koncentracije Zn spodbujajo rast, višje pa delujejo strupeno, vendar obstajajo zelo velike razlike med vrstami (Zou

s sod. 2014, Lingyun s sod. 2016; Di Gioia s sod. 2019). Biofortifikacija s Zn ni imela vpliva na kaljivost semen, kar je v skladu z literaturo, kjer navajajo, da visoka koncentracija Zn ne vpliva na kaljivost semen, pomaga pa pri razvoju plumul in radikul (Rout in Das, 2003; Zou s sod. 2014). Prisotnost Zn lahko celo izboljša kaljivost semen Baker (1978).

Vsebnost elementov

Biofortifikacija semen s $ZnCl_2$ je vplivala na povečanje koncentracije Zn. Pri koncentraciji 75 mM smo izmerili največje, celo 10,4-kratno povečanje, že pri 25 mM pa 9,2-kratno povečanje (Slika 2). Rezultate težko neposredno primerjamo z literaturo, saj so v večini poskusov uporabljali drugačne protokole (večinoma so uporabljali $ZnSO_4$ in ne $ZnCl_2$ in filogenetsko zelo oddaljene vrste). Z biofortifikacijo so uspešno povečali vsebnost Zn v kalčkih različnih vrst. S pomočjo namakanja in 5-dnevnega kaljenja v $20 \text{ mg L}^{-1} ZnSO_4$ so v kalčkih soje dosegli 12-kratno povečanje koncentracije Zn (Zou in sod., 2014). S pomočjo namakanja in kaljenja v $20 \text{ mg L}^{-1} ZnSO_4$, dokler ni radikula dosegla 1 cm, so v kalčkih arašidov dosegli 5-kratno povečanje koncentracije Zn (Zhao s sod. 2020). S pomočjo namakanja in škropljenja (fertigacija) v $60 \text{ mg L}^{-1} ZnCl_2$ so dosegli kar 448-kratno povečanje koncentracije Zn v kalčkih graha (tako visoko povečanje je bilo zaradi ekstremno nizke začetne koncentracije Zn v grahu) (Lingyun s sod. 2016). Pri edini podobni raziskavi, ki je bila opravljena na različnih predstavnicah križnic (*Brassicaceae*), kamor spada tudi vrtna kreša, so uspešno povečali koncentracijo Zn v kalčkih navadne rukvice (*Eruca sativa* Mill.), rdečega zelja (*Brassica oleracea* L. var. capitata) in rjave gorčice (*Brassica juncea* L.). Pri navadni rukvici so dosegli 2,3-kratno, pri rdečem zelju 2,5-kratno, pri rjavi gorčici pa 4,3-kratno povečanje koncentracije Zn. Vrednosti Zn ne moremo neposredno primerjati, saj so uporabili fertigacijo s polovično Hoaglandovo raztopino (11 dni stari kalčki), koncentracijo Zn pa so podali v sveži masi. Lahko pa ocenimo, da so bile koncentracije Zn v suhi masi približno 10-krat večje, saj približno 90 % mase kalčkov predstavlja voda. Dosegli so bistveno nižje koncentracije Zn kot mi, in sicer (preračunano) 70 mg Zn kg^{-1} pri navadni rukvici in rdečem zelju ter 90 mg Zn kg^{-1} pri rjavi gorčici (Di Gioia s sod. 2019). Opazili smo tudi zmanjšanje koncentracij vseh drugih opazovanih elementov v kalčkih (Slika 2), razen Mn (obrnave s $ZnCl_2$ niso imele vpliva na koncentracijo Mn). Višanje koncentracij $ZnCl_2$ večinoma ni imelo vpliva na dodatno nižanje koncentracij, saj je večina elementov dosegla minimum že pri 25 mM. Zou s sod. (2013) niso zaznali vpliva Zn na koncentracijo Fe, Mn in Cu. Di Gioia s sod. (2019) vpliva na K in P niso opazili, v nasprotju z našimi rezultati pa so opazili rahlo povečanje Ca, Mg in Cu, vendar je potrebno opozoriti, da so uporabljali bistveno nižje koncentracije Zn. V skladu z našimi rezultati so opazili znižanje koncentracije Fe. V literaturi je pogosto zaznan antagonističen učinek med kovinskimi ioni, saj si delijo iste trans-membranske transporterje (P3A-tip H-ATPaza za Zn^{2+} , Ca^{2+} , K^+ in Na^+ , P1B-Zn-ATPaza za Zn^{2+} , Co^{2+} in Cu^+ ter ZIP za Zn^{2+} , Cu^{2+} in Fe^{2+} (Rietra s sod. 2017; Stoyanova in Doncheva, 2002), kar je možna razlaga za opaženo znižanje koncentracij ostalih elementov ob obravnavah s $ZnCl_2$. Zelo nas je presenetilo občutno znižanje koncentracije klora (pri 25 mM je prišlo do 3-kratnega, pri 100 mM pa do skoraj 6-kratnega znižanja), saj smo Zn dodali v obliki $ZnCl_2$ in je bila uporabljena koncentracija kloridnih ionov visoka.



Slika 2: Koncentracije cinka (Zn), fosforja (P), žvepla (S), klora (Cl), kalija (K), kalcija (Ca) in železa (Fe) v kalčkih vrtno kreše (*Lepidium sativum*), ki je bila biofortificirana s Zn. Na posameznem grafu je prikazana povprečna koncentracija elementa ± standardna napaka (N=4) za kontrolo (K; koncentracija ZnCl₂ je 0 mM) in obravnave (namakanje semen v različnih koncentracijah ZnCl₂): 25 mM, 50 mM, 75 mM in 100 mM. Različne črke nad stolpci prikazujejo statistično značilne razlike za vsak element posebej določene z enosmerno ANOVA in Tukey post-hoc testom (p<0,05).

Glede na to, da smo pri 75mM dosegli 10,4-kratno, že pri 25 mM pa 9,2-kratno povečanje vsebnosti Zn, bi bilo za praktično uporabo zaradi cene in čim manjšega vpliva smiselno uporabljati 25 mM ZnCl₂ in preveriti tudi vpliv še nižjih koncentracij, saj lahko nižje koncentracije Zn celo izboljšajo prehrambno vrednost kalčkov (Zhao s sod. 2020; Lingyun s sod. 2016).

Zaključki

V raziskavi smo pokazali, da je namakanje semen v raztopini ZnCl₂ uspešna metoda biofortifikacije, s katero lahko povečamo vsebnost Zn v kalčkih vrtno kreše, saj smo koncentracijo Zn uspeli 10-krat povečati v primerjavi s kontrolo (75 mM), 9-kratno povečanje pa smo dosegli že pri 25 mM. Biofortifikacija s Zn je imela negativen vpliv na koncentracije vseh ostalih merjenih elementov (P, S, Cl, K, Ca in Fe) razen Mn. Biofortifikacija ni imela vpliva na kaljivost in suho mase kalic, vendar so bile tretirane kalice klorotične, zato bi bilo v prihodnjih raziskavah pomembno preveriti vpliv nižjih koncentracij ZnCl₂ na vsebnost elementov, fiziologijo in prehransko vrednost kalčkov, saj bi v primeru prodaje kalčkov njihov izgled bistveno vplival na povpraševanje.

Literatura

- Baker AJM, 1978. Ecophysiological aspects of zinc tolerance in *Silene maritima* With., *New Phytologist* 80: 635-642.
- Bales CW, Steinman LC, Freeland-Graves JH, Stone JM, Young RK, 1986. The effect of age on plasma zinc uptake and taste acuity. *The American Journal of Clinical Nutrition* 44, 5:664-669.
- Caulfield LE, Black RE, 2004. Zinc deficiency. Comparative quantification of health risks: sexual and reproductive health. *World Health Organization* 287-279.
- Daviscarter JG, Shuman LM, 1993. Influence of testure and pH of baolinitic soils on zinc fractions and zinc uptake by peanuts. *Soil Science* 155:376–384.
- Deshpande J, Joshi M, Giri P, 2013. Zinc: The trace element of major importance in human nutrition and health. *International Journal of Medical Science and Public Health* 2, 1:1.
- Di Gioia F, Petropoulos SA, Ozores-Hampton M, Morgan K, Roskopf EN, 2019. Zinc and iron agronomic biofortification of Brassicaceae microgreens. *Agronomy* 9, 11:677.
- Ebbs SD, Kochian LV, 1997. Toxicity of zinc and copper to Brassica species: Implications for phytoremediation. *Journal of Environmental Quality* 26:776-781.
- FAO, 2001. <http://www.fao.org/3/y2809e/y2809e.pdf> (dostopno 19. 5. 2021)
- Hambidge KM, Miller LV, Westcott JE, Sheng X, Krebs NF, 2010. Zinc bioavailability and homeostasis. *The American Journal of Clinical Nutrition* 91, 5:1478–1483.
- Ho E, Ames BN, 2002. Low intracellular zinc induces oxidative DNA damage, disrupts p53, NF B, and AP1 DNA binding, and affects DNA repair in a rat glioma cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 26:16770–16775.
- Lingyun Y, Jian W, Chenggang W, Shan L, Shidong Z. 2016. Effect of zinc enrichment on growth and nutritional quality in pea sprouts. *Journal of Food and Nutrition Research* 4, 2:100-107.
- Martens DC, Westermann DT, 1991. Fertilizer applications for correcting micronutrient deficiencies. In: Mortvedt JJ, Cox FR, Shuman LM, Welch RM, (ur) *Micronutrients in Agriculture*. SSSA Book Series No. 4. Madison, WI.
- Mortvedt JJ, Gilkes RJ, 1993. Zinc fertilizers. In: Robson AD, (ur) *Zinc in soils and plants*. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
- Naveed M, Khalid H, Ashar MA, Rehman MZ, Rizwan M, Rasul A, Haq MA, 2020. Biofortification of cereals with zinc and iron: Recent advances and future perspectives. *Resources Use Efficiency in Agriculture* 615-646.
- Nečemer M, Kump P, Ščančar J, Jačimović R, Simčič J, Pelicon P, Budnar M, Jeran Z, Pongrac P, Regvar M, Vogel-Mikuš K, 2008. Application of X-ray fluorescence analytical techniques in phytoremediation and plant biology studies. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 63 11:1240-1247.
- Paranjape AN, Mehta A, 2006. A Study of clinical efficacy of *Lepidum sativum* seeds in treatment of bronchial asthma. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics* 5:1.
- Pennington JAT, Spungen J, 2005. Bowes & Church's food values of portions commonly used. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, United States.
- Rietra RPJJ, Heinen M, Dimkpa CO, Bindraban, PS, 2017. Effects of nutrient antagonism and synergism on yield and fertilizer use efficiency. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 48:1895–1920.
- Rout G, Das P, 2003. Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. Zinc. *Agronomie* 23,1: 3–11.
- Saha S, Mandal B, Hazra GC, Dey A, Chakraborty M, Adhikari B, Sadhukhan R, 2015. Can agronomic biofortification of zinc be benign for iron in cereals? *Journal of Cereal Science* 65:186–191.
- Sanusi KO, Kasimu GI, Abubakar B, Malami I, Bello MB, Imam MU, Abubakar MB, 2021. Effect of maternal zinc deficiency on offspring health: The epigenetic impact. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 65, 126731, doi: 10.1016/j.jtemb.2021.126731: 9.
- Singh C, Paswan CK, Naik B, 2015. Exploring potential of fortification by garden cress (*Lepidum sativum* L.) seeds for development of functional foods. *Indian Journal of Natural Product and Resources* 6, 3:167-175.
- Stoyanova S, Doncheva S, 2002. The effect of zinc supply and succinate treatment on plant growth and mineral uptake in pea plant. *Braz. J. Plant Physiol.* 14: 111–116.
- Tipton IH, Cook MJ, 1963. Trace elements in human tissue part II. Adult subjects from the United States. *Health Physics* 9, 2:103–145.
- Uvin P, 2009. The state of world hunger. *Nutrition Reviews* 52, 5:151–161.
- Zhao K, Zhao C, Yang M, Yin D, 2020. ZnCl₂ treatment improves nutrient quality and Zn accumulation in peanut seeds and sprouts. *Scientific Reports* 10:2364.
- Zou T, Xu N, Hu G, Pang J, Xu H, 2014. Biofortification of soybean sprouts with zinc and bioaccessibility of zinc in the sprouts. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94: 3053-3060.

Vpliv biofortifikacije zrn pšenice s cinkom na kaljivost in mineralno sestavo kalic

Eva Koplan, Aldijana Mašinović, Alenka Novak, Nika Zabret

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

- Namen dela je bil preveriti vpliv biofortifikacije zrn pšenice (*Triticum aestivum* L.) s cinkovim kloridom ($ZnCl_2$) na kaljivost zrn in suho maso in mineralno sestavo kalic. Pričakujemo, da obravnavanje zrn s $ZnCl_2$ ne bo vplivalo na kaljivost, ampak bo povišalo koncentracijo cinka (Zn) in drugih preiskovanih mineralov.
- Zrna pšenice smo namakali v različnih koncentracijah $ZnCl_2$ in jih nato gojili v rastni komori 7 dni. Del zrn smo uporabili za preverjanje kaljivosti, iz ostalih zrn smo pridobili kalice. Po sušenju in tehtanju smo oblikovali tabletko za analizo elementne sestave kalicah z metodo rentgenske fluorescence.
- Obravnavanje zrn s $ZnCl_2$ ni imelo značilnega vpliva na kaljivost in suho maso kalic, povišala se je zgolj koncentracija Zn in klora (Cl), na koncentracijo ostalih izmerjenih mineralov ni bilo učinka.
- V naši raziskavi smo dokazali, da je namakanje zrn pšenice v $ZnCl_2$ uspešna metoda za povišanje koncentracije Zn v pšenici.

Ključne besede: *Triticum aestivum* L, namakanje semen, cinkov klorid ($ZnCl_2$), rentgenska fluorescenca, kalilniki, pomanjkanje cinka

Uvod

Cink (Zn) je eden izmed esencialnih mineralov tako za rastline kot ljudi, kjer ima ključno vlogo v encimskih reakcijah, metabolnih procesih in oksidacijsko redukcijskih reakcijah (Cakmak in sod., 2010; Chattha in sod., 2017; Hafeez in sod., 2013). Pomanjkanje Zn v tleh, rastlinah in posledično v prehrani ljudi je torej resna težava, s katero se sooča približno tretjina svetovnega prebivalstva, zlasti otroci mlajši od petih let, ki za pravilen razvoj potrebujejo večje količine tega esencialnega minerala (Wessells in Brown, 2012). Klinična in subklinična pomanjkanja povzročijo številna bolezenska stanja, kot so zastoj rasti, okvarjen razvoj možganov, boleznijeter in ledvic, povečana dovzetnost za nalezljive bolezni, slabša telesna zmogljivost in kognitivne okvare (Gibson, 2012a). Podhranjenost s Zn je globalni zdravstveni problem, katere glavni dejavnik je prehrana, osnovana na žitih, ki so bila zadnjih 100 let usmerjeno žlahtnjena v smer večjega pridelka, posledično je prišlo do vedno manjših koncentracij esencialnih mineralov (Cakmak in Kutman, 2018). Na splošno so koncentracije Zn v kultivarjih pšenice zelo nizke, povprečno med 20 in 35 mg kg⁻¹ v suhi snovi (Graham in sod., 2007; Cakmak in sod., 2010). Dodatni problem predstavlja gojenje pšenice na tleh, ki jim primanjkuje biodostopnega Zn, takih je okoli 50% vseh obdelovalnih površin. V pšenici, gojeni na tleh, revnih s Zn, koncentracija pade močno pod 20 mg kg⁻¹, s čimer preprosto ni več mogoče zadostiti potrebnim dnevnim vnosom Zn (Cakmak, 2008).

Cilj biofortifikacije osnovnih poljščin je zagotoviti užitne dele rastlin, ki bi vsebovale zadostne količine Zn in tako pokrile zahtevane dnevne vnose. Gre za pomembno področje raziskav, saj zagotavlja idealno platformo, na podlagi katere bi lahko na enostaven in stroškovno učinkovit način izboljšali hranilne vrednosti osnovnih poljščin ter rešili prehranska pomanjkanja prebivalstva na globalni ravni (Cakmak in Kutman, 2018). Rešitev za povišanje vsebnosti Zn bi lahko bilo klasično žlahtnjenje ali gensko spreminjanje pšenice, vendar na tem področju zaenkrat še ni veliko napredka. Do sedaj pa je bilo uspešno povečanje vsebnosti Zn v pšenici z biofortifikacijo s foliarnim gnojenjem zelenih delov rastlin oziroma tal po kalitvi (Cakmak, 2008).

V naši raziskavi smo preizkusili biofortifikacijo pšenice z namakanjem zrn v različnih koncentracijah ZnCl₂ in odkrivali vplive na rast, razvoj in mineralno sestavo kalic. S pomočjo rentgenske fluorescenčne spektrometrije (XRF) smo izmerili koncentracije fosforja (P), žvepla (S), kalija (K), Cl, kalcija (Ca), mangana (Mn), železa (Fe) in Zn v 7 dni starih kalicah pšenice (*Triticum aestivum* L.). Predpostavili smo naslednji hipotezi: (i) namakanje pšeničnih zrn v raztopini ZnCl₂ ne bo imelo vpliva na kaljivost zrn in na suho maso kalic in (ii) pšenične kalice iz zrn namočenih v raztopini ZnCl₂ bodo imele z višanjem koncentracije ZnCl₂ povišano koncentracijo preiskovanih mineralov.

Materiali in metode

Zrna pšenice (*Triticum aestivum* L.) smo namočili v destilirano vodo (kontrola) in raztopine ZnCl₂ naraščajočih koncentracij (25 mM, 50 mM, 75 mM in 100 mM). Inkubacija je potekala 24 ur pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo 100

pšeničnih zrn razdelili po 20 na vsako petrijevko z omočenim filter papirjem, z namenom preverjanja kaljivosti. Ostala zrna smo enakomerno porazdelili po vlažnem filter papirju v ločenih predelkih kalilnika (EasyGreen, Biovie, Francija). Petrijevke in kalilnike z zrna smo prenesli v rastno komoro s stalnimi pogoji 22 °C, 60 % vlago, pri čemer smo imeli petrijevke v temi, kalilnike pa pri 16/8 urni fotoperiodi. Po petih dneh smo prešteli število skaljenih zrn v petrijevkah in tako ocenili kaljivost pšenice. Po sedmih dneh smo zaključili kalitev zrn iz kalilnika in ločili poganjke kalic od korenin ter korenine zavrgli. Sklope stehtanih poganjkov smo zavili v aluminijasto folijo ter jih sušili v sušilniku pri 60 °C vsaj 3 dni, oziroma dokler niso bili popolnoma posušeni. Dobro posušene pšenične kalice smo stehali, jih na drobno narezali in jih s pomočjo tekočega dušika strli v terilnici. Iz prahu rastlinskega materiala smo s pomočjo hidravlične stiskalnice naredili tablete z maso med 100 in 200 mg. Nastalim tabletam smo nato z metodo XRF izmerili koncentracije posameznih mineralov P, S, K, Cl, Ca, Mn, Fe in Zn ter pridobljene rezultate statistično obdelali v programu R. Primerjali smo povprečja parametrov med različnimi obravnavami zrn pšenice s ZnCl₂ z analizo variance (ANOVA). Parametre, ki so imeli statistično različna povprečja med različnimi obravnavami, smo dodatno analizirali s Tukeyevim post hoc testom pri p < 0,05. Ta nam je pokazal katere obravnave zrn se statistično razlikujejo od ostalih.

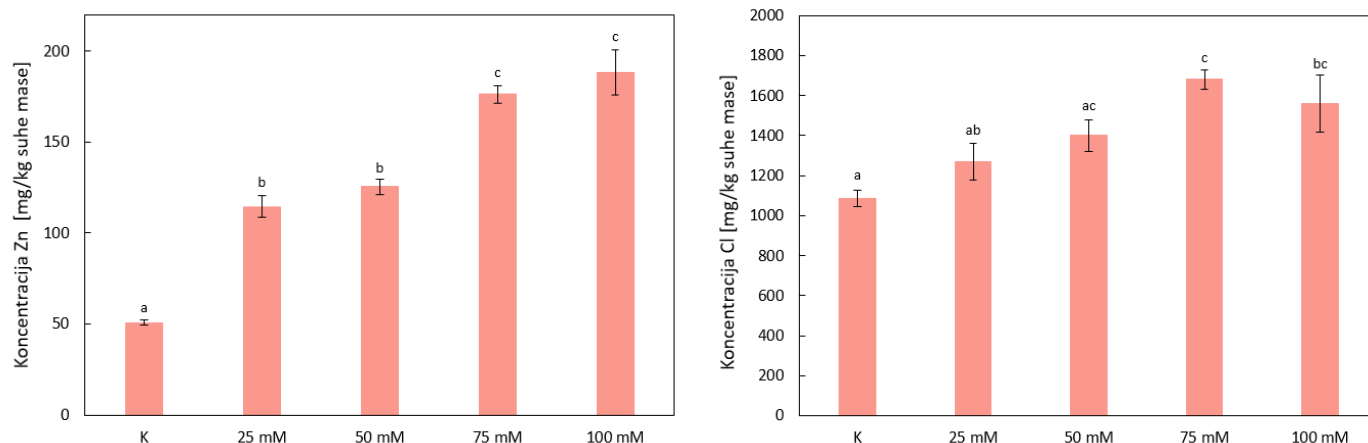
Rezultati

Statistična analiza je pokazala, da med testiranimi obravnavami zrn pšenice z različnimi koncentracijami ZnCl₂ obstaja statistično značilna razlika pri koncentraciji Zn v suhi masi kalic (Slika 1). Najnižjo koncentracijo Zn smo izmerili pri kontrolnih kalicah, z višanjem koncentracije ZnCl₂ se koncentracija Zn statistično značilno povečuje, pri čemer ni statistično značilnih razlik med obravnavama s 25 mM in 50 mM ZnCl₂ ter med obravnavama s 75 mM in 100 mM ZnCl₂. Tudi v koncentraciji Cl obstajajo statistično značilne razlike med obravnavami pri čemer opazimo povečevanje koncentracija Cl v kalicah s povečevanjem koncentracije ZnCl₂ (Slika 1). Analizirali smo tudi koncentracijo P, S, K, Ca, Mn in Fe v suhi masi kalic pšenice. Pri kalicah kontrole ali kalicah, kjer smo predhodno obravnavali zrna z različnimi koncentracijami ZnCl₂, ni bilo zaznane statistično značilne razlike v koncentraciji teh elementov. Podatki za povprečne koncentracije teh elementov so zbrani v Preglednici 1.

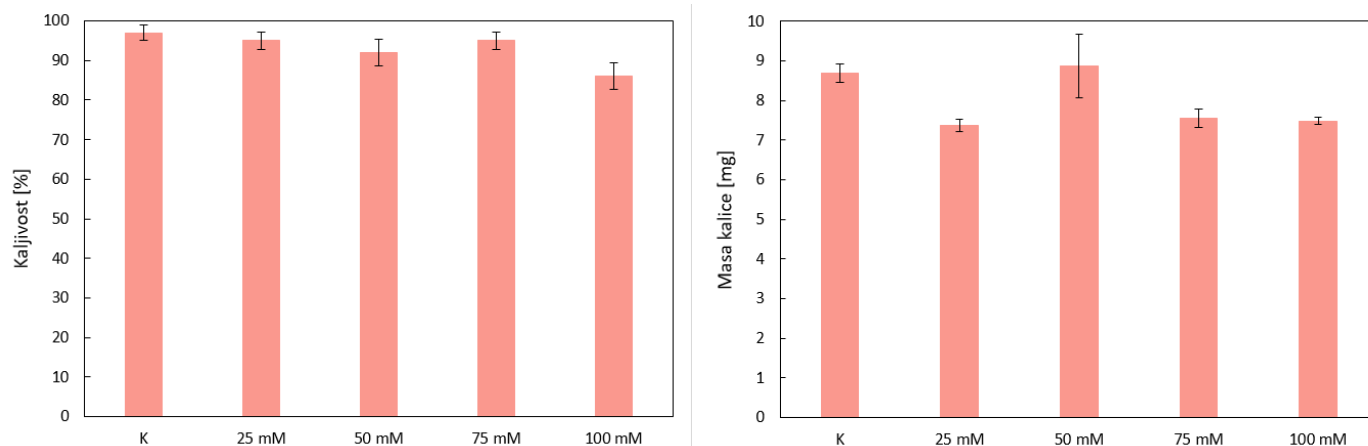
Rezultati so pokazali, da kljub sicer opaznem blagem znižanju kaljivosti (Slika 2) pri visokih koncentracijah ZnCl₂, obravnava zrn pšenice z različnimi koncentracijami ZnCl₂ ni imela statistično značilnega vpliva na kaljivost zrn pšenice. Prav tako ni statistično značilne razlike pri suhi masi kalic (Slika 3).

Tabela 1: Povprečne koncentracije elementov v suhi masi ± standardna napaka (n=20) v kalicah pšenice, podatki so združeni za kontrolo in različne koncentracije ZnCl₂.

	P	S	K	Ca	Mn	Fe
SV [mg kg ⁻¹ suhe mase]	1916	899	5905	1195	36	123



Slika 1: Koncentracija cinka (Zn, levo) in klorida (Cl, desno) v kalih pšenice katerih zrna smo namakali v destilirani vodi (K) ali v različnih koncentracijah ZnCl₂ za 24 ur pri sobni temperaturi. Prikazane so povprečne vrednosti ± standardna napaka (n=4). Med podatki označenimi z enako črko ni statistično značilne razlike na podlagi analize s Tukeyevim post hoc testom pri p<0,05.



Slika 2: Kaljivost zrn pšenice, ki smo jih namakali v destilirani vodi (K) ali v različnih koncentracijah ZnCl₂ za 24 ur pri sobni temperaturi. Prikazane so povprečne vrednosti ± standardna napaka (n=100).

Slika 3: Suha masa kalic pšenice, katerih zrna smo namakali v destilirani vodi (K) ali v različnih koncentracijah ZnCl₂ za 24 ur pri sobni temperaturi. Prikazane so povprečne vrednosti ± standardna napaka (n=4).

Diskusija

Z analizo mineralne sestave smo ob povišanju koncentracije ZnCl₂ v katerih smo namakali zrna, opazili povišanje koncentracije tako Zn kot Cl v kalih pšenice. Zrna pred kalitvijo v procesu imbibicije preko mikropile privzemajo vodo in mineralne snovi iz okolja, zato se zaradi namakanja zrn v raztopini ZnCl₂ minerala akumulirata v zrnih in ob kalitvi preneseta v poganjke (Bouaziz in sod., 1989; Rathjen in sod., 2009). V številnih dosedanjih raziskavah biofortifikacije rastlinah pšenice po kalitvi, so prav tako dokazali povišanje Zn v zrnih oziroma zelenih delih rastlin (Cakmak in sod., 2007, 2010; Chattha in sod., 2017). V teh raziskavah nihče ni dodatno preveril koncentracije Cl, ki se je v našem primeru prav tako povišala.

Za Zn je znano, da na nekatere minerale vpliva sinergistično (Fe, bor (B)), na nekatere pa antagonistično (P, baker (Cu), kadmij (Cd)) (Chattha in sod., 2017). Hkrati si različne raziskave nasprotujejo ali se z biofortifikacijo s Zn koncentracija teh mineralov zniža ali zviša. Liu in sodelavci (2017) so pokazali, da pri biofortifikaciji s Zn ne pride do signifikantnih razlik pri koncentracijah Fe, Mn in Cu. To so potrdili tudi rezultati našega

poskusa, kjer po obravnavi s ZnCl₂ nismo zaznali vpliva na koncentracije P, S, K, Ca, Mn in Fe v kalih pšenice. Rezultati naše raziskave so pokazali, da obravnava zrn pšenice z različnimi koncentracijami ZnCl₂ nima značilnega vpliva na kaljivost zrn in suho maso kalic pšenice, saj se ne razlikujeta od kontrole. Z našimi rezultati sovpadata raziskava Rasafi in sod. (2014), ki so pokazali, da namakanje zrn s ZnSO₄ (koncentracije od 10 do 1000 mg L⁻¹) ni imela vpliva na kaljivost, čeprav niso preverjali suhe mase kalic, se je pri njihovem poizkusu zmanjšala rast poganjkov iz obravnavanih zrn pšenice. Stankovič in sod. (2010) so dobili nasprotno rezultate, saj se je kaljivost njihovih zrn z višanjem koncentracije Zn znatno znižala.

Zaključki

Po primerjavi kaljivosti kontrolnih zrn in zrn pšenice, ki smo jih predhodno namakali v različnih koncentracijah ZnCl₂, lahko potrdimo hipotezo, da izpostavitve raztopini ZnCl₂ nima značilnega vpliva na kaljivost pšenice. Prišlo je sicer do manjših razlik v masi kalic, vendar te niso bile statistično značilne. Hipotezo, da bo namakanju pšeničnih zrn sledila

povišana koncentracija preiskovanih mineralov, smo potrdili za Zn in Cl. Po namakanju zrn v raztopini $ZnCl_2$ se je namreč značilno povečala koncentracija mineralov Zn in Cl, pri ostalih preiskovanih mineralih, P, S, K, Ca, Mn in Fe, pa ni statistično značilnega vpliva obravnav. Na podlagi pridobljenih rezultatov lahko torej zaključimo, da je namakanje pšeničnih zrn v raztopini Zn potencialna rešitev za obogatitev pšeničnih kalic s Zn brez negativnega vpliva na kaljivost in suho maso.

Literatura

1. Bouaziz A, Bruckler L, 1989. Modeling of wheat imbibition and germination as influenced by soil physical properties. *Soil Science Society of America Journal* 53, 1:219–227.
2. Cakmak I, 2008. Enrichment of cereal grains with zinc: Agronomic or genetic biofortification? *Plant and Soil* 302, 1–2:1–17.
3. Cakmak I, Kalayci M, Kaya Y, Torun A.A, Aydin N, Wang Y, Arisoy Z, Erdem H, Yazici A, Gokmen O, Ozturk L, Horst WJ, 2010. Biofortification and localization of zinc in wheat grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 16: 9092–9102.
4. Cakmak I, Kutman UB, 2018. Agronomic biofortification of cereals with zinc: a review. *European Journal of Soil Science* 69, 1: 172–180.
5. Chattha M.U, Hassan M.U, Khan I, Chattha M.B, Mahmood A, Nawaz M, Subhani M.N, Kharal M, Khan S, 2017. Biofortification of wheat cultivars to combat zinc deficiency. *Frontiers in Plant Science* 8, 281: 1–8.
6. Das S, Chaki AK, Hossain A, 2019. Breeding and agronomic approaches for the biofortification of zinc in wheat (*Triticum aestivum* L.) to combat zinc deficiency in millions of a population: A Bangladesh perspective. *Acta Agrobotanica* 72, 2: 1–13.
7. El Rasafi T, Nouri M, Bouda S, Haddioui A, 2016. The effect of Cd, Zn and Fe on seed germination and early seedling growth of wheat and bean. *Ekologia Bratislava* 35, 3: 213–223.
8. Gibson RS, 2012. Zinc deficiency and human health: Etiology, health consequences, and future solutions. *Plant and Soil* 361, 1–2: 291–299.
9. Graham RD, Welch RM, Saunders D.A, Ortiz-Monasterio I, Bouis H.E, Bonierbale M, de Haan S., Burgos G, Thiele G, Liria R, Meisner CA, Beebe SE, Potts MJ, Kadian M, Hobbs PR, Gupta RK, Twomlow S, 2007. Nutritious Subsistence Food Systems. *Advances in Agronomy* 92, 4: 1–74.
10. Hafeez B, Khanif YM, Saleem M, 2013. Role of zinc in plant nutrition - A review. *American Journal of Experimental Agriculture* 3, 2: 374–391.
11. Rathjen .R, Strounina EV, Mares DJ, 2009. Water movement into dormant and non-dormant wheat (*Triticum aestivum* L.) grains. *Journal of Experimental Botany* 60, 6: 1619–1631.
12. Stanković M, Topuzović M, Marković A, Pavlović D, Đelić G, Bojović B, Branković S, 2010. Influence of zinc (Zn) on germination of wheat (*Triticum Aestivum* L.). *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 24, 1: 236–239.
13. Wessells KR, Brown KH, 2012. Estimating the global prevalence of zinc deficiency: Results based on zinc availability in national food supplies and the prevalence of stunting. *PLoS ONE*, 7, 11: 1–11.
14. Zou CQ, Zhang YQ, Rashid A, Ram H, Savasli E, Arisoy RZ, 2012. Biofortification of wheat with zinc through zinc fertilization in seven countries. *Plant and Soil* 361, 1–2: 119–130.

Vpliv biofortifikacije semen fižola mungo s cinkom na kaljivost in mineralno sestavo kalčkov

Mila Dinkovska, Eva Smrekar, Rebeka Udvinc, Mojca Zafran

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

- Namen raziskave je bil testirati vpliv biofortifikacije semen fižola mungo s cinkom (Zn) na kaljivost in mineralno sestavo kalčkov.
- Semena smo 24 ur pri 23°C namakali v raztopinah z različnimi koncentracijah cinkovega klorida (ZnCl_2): 0,5 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM in v destilirani vodi za kontrolo in kalčke vzgojili v kalilnikih v rastni komori. Po sedmih dneh smo odstranili korenine, nadzemne dele ločili na klične liste in poganjke (prve prave liste) in jim določili svežo in suho maso. Z rentgensko fluorescenco smo izmerili koncentracijo različnih elementov.
- Suha masa kličnih listov je narastla, suha masa prvih pravih listov pa upadla pri obravnavi 5mM ZnCl_2 in višje. V kličnih listih se je koncentracija fosforja (P) povečevala, koncentracija kalcija (Ca) pa zmanjševala povečevanjem koncentracije ZnCl_2 . Koncentracija železa (Fe) je bila največja pri obravnavi 0,5 mM ZnCl_2 . Koncentracija Zn je tako v kličnih listih kot v poganjkih naraščala s povečevanjem koncentracije ZnCl_2 . Koncentracije ostalih elementov po različnih obravnavah v poganjkih niso bile statistično značilno različne.
- Biofortifikacija semen fižola mungo s preko namakanja semen v naraščajočih koncentracijah ZnCl_2 pozitivno vpliva na rast in razvoj kalic, previsoke koncentracije pa so strupene. Opazili smo vpliv na mineralno sestavo kalčkov.

Ključne besede: kalilnik, cinkov klorid, prehranjenost, namakanje semen, rentgenska fluorescenca

Uvod

Fižol mungo (*Vigna radiata* (L.) R.Wilczek) je stročnica, ki izvira iz Indije. Je odličen vir rastlinskih beljakovin in bogat tudi z esencialnimi aminokislinami, vitamini in minerali, kot so mangan (Mn), magnezij (Mg), cink, fosfor, železo, baker (Cu) in kalij (K; Akpapunam, 1996).

Fižol je eden od pomembnih virov Zn v prehrani. Cink je v telesu vključen v številne biokemijske funkcije, sodeluje pri aktivaciji več kot 300 encimov, pri izražanju genov in imunosti. Ocene kažejo, da približno 25% svetovnega prebivalstva tvega pomanjkanje cinka (Maret in Sandstead, 2006). S povečanjem koncentracije Zn in drugih elementov v hrani lahko izboljšamo kakovost hrane in pripomoremo k zmanjšanju pomanjkanja mikrohranil. Ena od učinkovitih metod za to je biofortifikacija. To je postopek, s katerim z različnimi konvencionalnimi metodami ali genskim inženiringom izboljšamo hranilno vrednost živil.

Z raziskavo smo želeli ugotoviti, kako kot potencialna učinkovita metoda biofortifikacije na rast in razvoj kalic ter na njihovo mineralno sestavo vpliva namakanje semen fižola mungo v raztopini z različnimi koncentracijami $ZnCl_2$.

V okviru raziskave smo testirali naslednje hipoteze: i) rast in razvoj kalčkov po obravnavi z $ZnCl_2$ bosta do neke mere boljša (Kanwal in sod., 2020), ii) ob previsokih koncentracijah Zn bomo opazili kvarne učinke, ki se bodo kazali kot zavrti rast poganjkov (Zou s sod. 2014), iii) koncentracija Zn v kalčkih bo odvisna od uporabljene koncentracije $ZnCl_2$ za namakanje, iv) biofortifikacija z Zn bo imela vpliv tudi na koncentracij drugih elementov (Haider in sod., 2020; Zou in sod, 2014).

Materiali in metode

Za biofortifikacijo fižola mungo smo semena namakali 24 ur pri 23 °C v naslednjih raztopinah $ZnCl_2$: 0 M (kontrola, semena namočena v destilirani vodi), 0,025 M, 0,05 M, 0,075 M in 0,1 M. Naslednji dan smo semena prenesli v kalilnike (EasyGreen®, Biovie, Francija) oziroma na omočen filter papir v petrijevkah (po 20 semen v pet petrijevk posamezne obravnave). Kalilnike in petrijevke smo dali v rastno komoro pri pogojih 20 °C; kalilniki so bili izpostavljeni 16/8 h dnevno/nočni ritmiki, petrijevke pa so bile v temi. Po petih dneh smo v petrijevkah

prešteli semena, ki so kalila in ugotovili upad v kaljivosti v odvisnosti od namakanja v raztopinah $ZnCl_2$. Na podlagi teh opažanj, smo za namakanje semen uporabili naslednje, nižje, koncentracije $ZnCl_2$: 0,5 mM, 1 mM, 5 mM in 10 mM in poskus ponovili.

Po sedmih dneh rasti smo iz kalilnikov odstranili kalčke, ločili nadzemne dele rastlin od korenin, jih razdelili na klične liste in poganjke (prvi pravi listi) ter nadzemnim delom določili svežo maso. Rastlinski material smo sušili v sušilniku na 60°C 3 dni. Suh material smo stehtali, zmleli in pripravili tablete s pomočjo hidravlične stiskalnice. Z rentgensko fluorescenco smo izmerili koncentracijo naslednjih elementov: P, žvepla (S), Cl, K, Ca, Mn, Fe in Zn (Nečemer in sod., 2009).

Izmerjene podatke o kaljivosti, suhi masi in koncentraciji elementov smo statistično obdelali s programom TIBCO Statistica (TIBCO Software Inc., Palo Alto, USA). Izračunali smo povprečne vrednosti, standardne napake ter opravili dvosmerno in enosmerno analizo variance (ANOVA) in post-hoc s Tukeyevim testom pri $p < 0,05$.

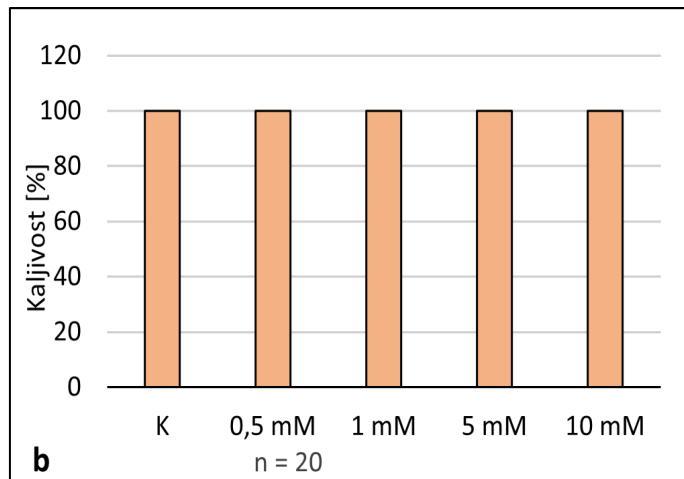
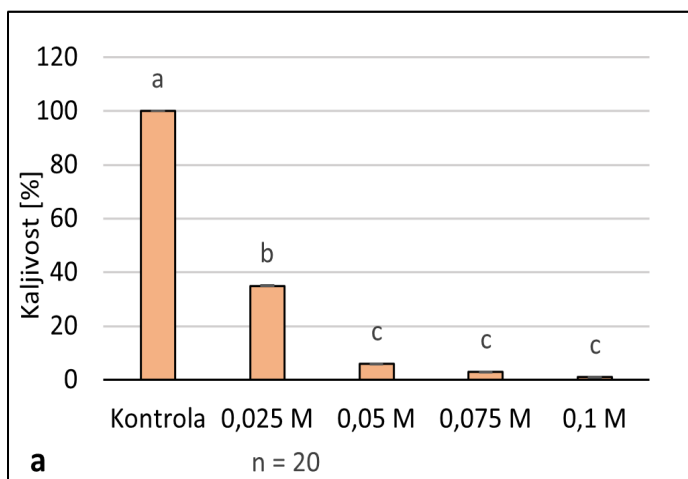
Rezultati

Kaljivost semen po biofortifikaciji z $ZnCl_2$

V preliminarnem poskusu smo za namakanje semen uporabili koncentracije $ZnCl_2$ 0,025 M, 0,05 M, 0,075 M in 0,1 M. Ugotovili smo, da je bila kaljivost že pri koncentracijah 0,025 M in 0,05 M močno zmanjšana v primerjavi s kontrolo (Slika 1a). Pri koncentracijah 0,075 M in 0,1 M pa skoraj nobeno seme ni kalilo. Na podlagi te ugotovitve smo poskus ponovili pri čemer smo uporabili nižje koncentracije $ZnCl_2$ in sicer 0,5 mM, 1 mM, 5 mM in 10 mM. V tem poskusu, je bila kaljivost semen pri kontroli in vseh štirih koncentracijah 100 % (Slika 1b).

Dvosmerna ANOVA

Dvosmerna ANOVA za suho maso je pokazala vpliv dela rastline (klični listi in poganjki), obravnave z $ZnCl_2$ in interakcije dela rastline in obravnave (Tabela 1). Dvosmerna ANOVA za koncentracije elementov je pokazala vpliv obravnave na koncentracijo elementov Cl, Fe in Zn, vpliv dela rastline na vse elemente razen Mn in interakcijo dela rastline in obravnave



Slika 1: Kaljivost semen fižola mungo po biofortifikaciji (namakanju semen za 24 ur pri sobni temperaturi) z različnimi koncentracijami $ZnCl_2$ pri prvem poskusu (a) in drugem poskusu (b) (n= 20 semen).

Tabela 1: p-vrednosti dvosmernega ANOVA testa za suho maso in izmerjene koncentracije elementov v 7 dni starih kalicah (klični listi in poganjki; del rastline kot neodvisna spremenljivka), ki so zrasle iz semen, ki smo jih namakali v različnih koncentracijah $ZnCl_2$ pri sobni temperaturi 24 ur (obravnave kot neodvisna spremenljivka) glede na del rastline, obravnavo in interakcijo.

	Del rastline	Obravnava	Interakcija
Suha masa	0,0000	0,0040	0,0000
P	0,0000	0,2992	0,0072
S	0,0076	0,7805	0,0635
Cl	0,0000	0,0077	0,1680
K	0,0000	0,0852	0,9166
Ca	0,0000	0,6203	0,0003
Mn	0,1471	0,3072	0,5891
Fe	0,0030	0,0008	0,0625
Zn	0,0000	0,0000	0,0000

na koncentracijo elementov Zn, P in Ca (Tabela 1, Slika 4). Zaradi pogostega vpliva dela rastline tako pri suhi masi kot pri koncentraciji poganjkov, smo v nadaljevanju opravili enosmerno analizo variance (ANOVA).

Suhe mase kličnih listov in poganjkov

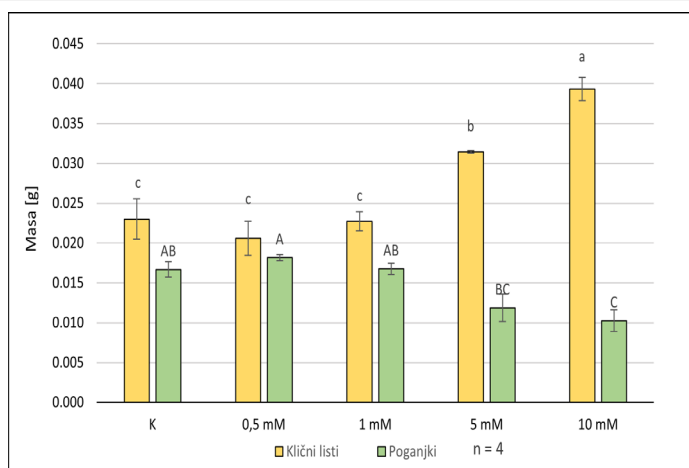
Mase kličnih listov so s povečevanjem koncentracije $ZnCl_2$ začele naraščati pri obravnavah nad 5 mM, kar je sovpadalo z upadom suhe mase poganjkov (Slika 2). Da so poganjki pri obravnavah nad 5 mM manjši, je vidno tudi na Sliki 3.

Koncentracija Zn v kličnih listih in poganjkih

Koncentracija Zn je z naraščanjem koncentracije $ZnCl_2$ naraščala tako pri kličnih listih, kot pri poganjkih, pri čemer je naraščanje bolj izrazito pri kličnih listih. V kličnih listih je bila največja koncentracija izmerjena pri obravnavi z 10 mM (480 mg kg^{-1} suhe snovi oz. 302 mg kg^{-1}), najmanjša pa pri kontroli ($30,0 \text{ mg kg}^{-1}$). Koncentracija Zn je naraščala tudi pri poganjkih, vendar razlike med obravnavami niso bile tako izrazite. Največja koncentracija je bila pri obravnavah s 5 in 10 mM

Tabela 2: Povprečne koncentracije elementov po vseh obravnavah z $ZnCl_2$ pri katerih med posameznimi obravnavami ni prišlo do statistično značilnih razlik. Zapisana so povprečja \pm standardna napaka ($n=20$).

	Klični listi (mg/kg)	Poganjki (mg/kg)
S	994 \pm 30,1	1141 \pm 255
Cl	217 \pm 15,7	
K	8218 \pm 290	15645 \pm 3498
Mn	24,8 \pm 1,18	22,5 \pm 5,02
P		2368 \pm 529
Ca		2143 \pm 479
Fe		83,3 \pm 18,6



Slika 2: Suhe mase kličnih listov (rumeni stolpci) in poganjkov (zeleni stolpci) fižola mungo, katerih semena smo namakali v različnih koncentracijah $ZnCl_2$ pri sobni temperaturi 24 ur. Prikazane so povprečne vrednosti \pm standardna napaka ($n=4$) pri sedem dni starih rastlinah. Z različnimi črkami so prikazane statistično značilne razlike, določene z enosmerno ANOVA, Tukey post-hoc testom pri $p<0,05$ za vsak tip poganjka posebej.

$ZnCl_2$, med katerima ni bilo statistično značilnih razlik, nekoliko manjša pri obravnavi z 1 mM, pri obravnavi z 0,5 mM $ZnCl_2$, pa se koncentracija Zn ni statistično razlikovala od kontrole (Slika 4).

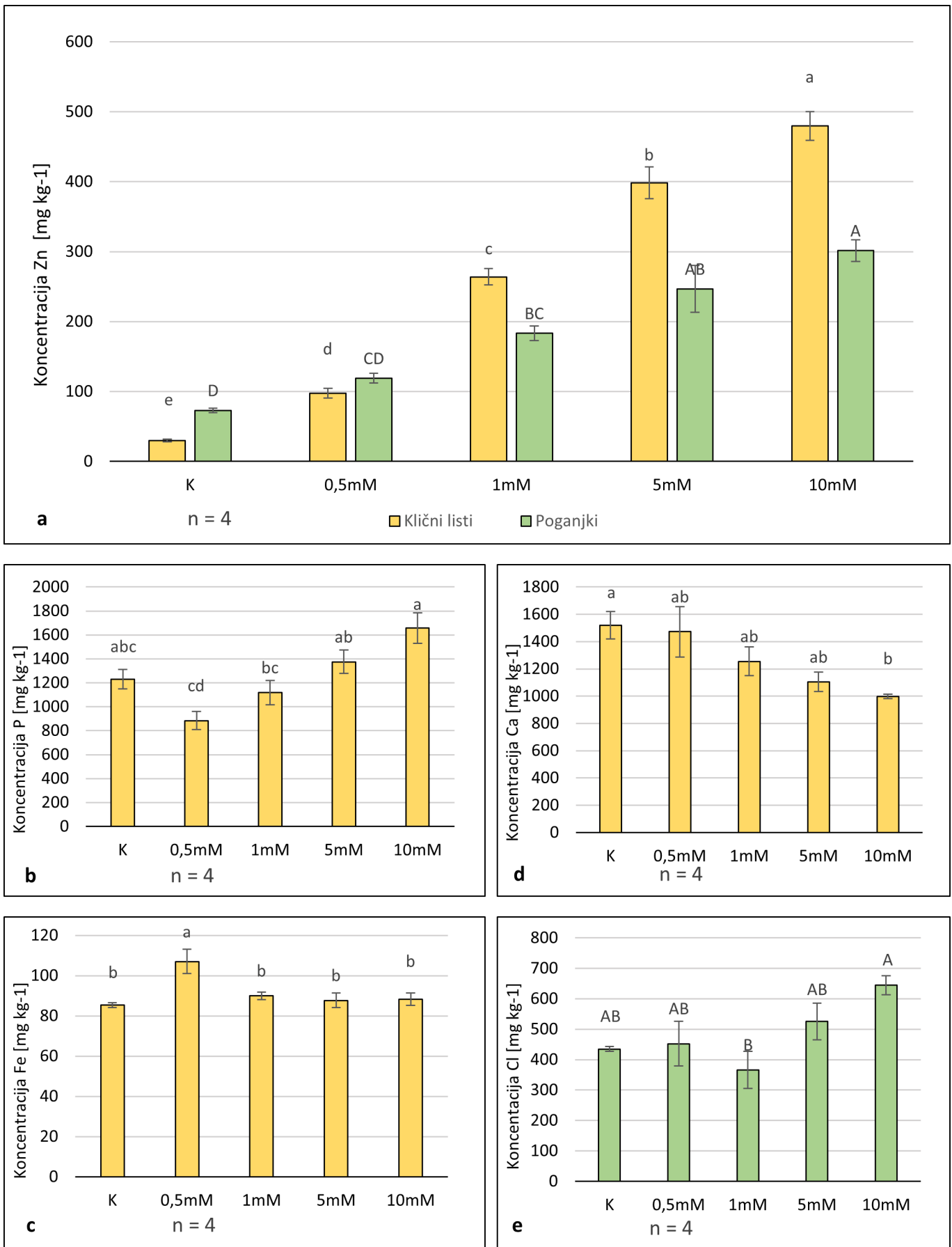
Koncentracija elementov v kličnih listih in poganjkih

Enosmerna ANOVA za poganjke in klične liste posebej, je pokazala statistično značilne razlike med obravnavami pri P, Fe in Ca v kličnih listih in Cl v poganjkih.

V kličnih listih smo opazili trend naraščanja koncentracije P (Slika 4) in upadanje koncentracije Ca (Slika 4) s povečevanjem koncentracije $ZnCl_2$. Koncentracija Fe je bila največja pri obravnavi z 0,5 mM $ZnCl_2$ (Slika 2) Pri koncentraciji ostalih elementov (S, Cl, K, Mn) v kličnih listih po obravnavi z različnimi koncentracijami $ZnCl_2$ ni prišlo do statistično značilnih razlik. Povprečne koncentracije teh elementov so prikazane v Tabela 2.



Slika 3: Rast in razvoj kalice fižola mungo, katerih semena smo namakali v destilirani vodi (K) in pri različnih koncentracijah $ZnCl_2$ (0,5 mM, 1 mM, 5 mM in 10 mM) pri sobni temperaturi 24 ur. Na sliki so sedem dni stare rastline.



Slika 4: Koncentracija cinka (Zn), fosforja (P), kalcija (Ca), železa (Fe), in klora (Cl) v kličnih listih (rumeni stolpci) in poganjkih (zeleni stolpci) fižola mungo, semena katerega smo namakali v 0 mM (kontrola, K), 0,5 mM, 1 mM, 5 mM in 10 mM raztopini ZnCl₂ pri sobni temperaturi 24 ur. Prikazana so povprečja ± standardna napaka (n=4) tistih elementov, pri katerih so bile razlike v njihovih koncentracijah statistično značilne (enosmerna ANOVA, Tukey post-hoc test pri p<0,05 za vsak tip poganjka posebej), kar je označeno z različni črkami nad stolpci.

Koncentracija Cl se je po biofortifikaciji z statistično značilno razlikovala le med obravnavami z 1 mM in 10 mM $ZnCl_2$, vendar pa se nobena izmed obravnav ni statistično značilno razlikovala od kontrole (Slika 4). Koncentracije ostalih elementov (P, S, K, Ca, Mn, Fe) po različnih obravnavah v poganjkih niso bile statistično značilno različne. Povprečne koncentracije teh elementov so prikazane v Preglednici 2.

Diskusija

Naši rezultati so pokazali, da koncentracija raztopine $ZnCl_2$ pomembno vpliva na kalitev in rast kalic fižola mungo. Pri 0,05 mM raztopini $ZnCl_2$ so bile kalice vidno močnejše in masa poganjkov največja, čeprav statistična analiza pri tej obravnavi ni pokazala statistično značilnih razlik v primerjavi s kontrolo. Naraščanje mase kličnih listov pri koncentracijah $ZnCl_2$ 1 mM, 5 mM in 10 mM lahko pripišemo inhibitornemu delovanju Zn na rast poganjkov fižola in s tem tudi počasnejše porabljanje kličnih listov za rast poganjka v primerjavi s kontrolo. Podobno so Haider in sod., 2020 v študiji opazili boljšo rast fižola mungo po obravnavi semen z 0,01 M raztopino $ZnSO_4$, v primerjavi s kontrolo in slabšo rast pri koncentraciji 0,05 M. Glede na to, da smo mi pri 0,01M koncentraciji $ZnCl_2$ opazili precej slabšo rast poganjkov v primerjavi s kontrolo smo sklepali, da bi lahko na to vplival tudi Cl v raztopini. Da je $ZnSO_4$ manj strupen kot $ZnCl_2$ in zato potencialno bolj primeren so pokazali tudi Rehman in sod., 2015 pri biofortifikaciji semen pšenice.

Koncentracija Zn se je z višanjem koncentracije $ZnCl_2$ povečevala tako v kličnih listih kot poganjkih, vendar bolj intenzivno v poganjkih. Predvidevamo, da se je Zn v kličnih listih povečeval hitreje kot v poganjkih, ker so se ti razvili kasneje in niso bili v neposrednem stiku z raztopino $ZnCl_2$. Pri 10 mM koncentraciji $ZnCl_2$ smo opazili približno 16-kratno povečanje koncentracije Zn v kličnih listih v primerjavi s kličnimi listi kontrole in približno 4-kratno povečanje v poganjkih v primerjavi s poganjki kontrole. Čeprav manjše, je bilo pomembno povečanje Zn opaženo tudi pri 1 mM koncentraciji $ZnCl_2$, kjer smo izmerili približno 9-kratno povečanje Zn v kličnih listih in 2,5-kratno povečanje koncentracije Zn v poganjkih.

Poleg Zn je imela biofortifikacija z $ZnCl_2$ vpliv tudi na koncentracijo P, Ca in Fe v kličnih listih ter na koncentracijo Cl v poganjkih. Glede vpliva biofortifikacije z Zn na koncentracijo ostalih elementov se podatki v literaturi razlikujejo. Zou in sod., 2014 so poročali o statistično pomembnem vplivu biofortifikacije soje z $ZnSO_4$ na koncentracijo Fe in Ca v poganjkih. Ugotovili so tudi, da na Mn, Cu in Mg biofortifikacija ni imela vpliva.

Koncentracija Cl v primerjavi s kontrolo v kličnih listih in poganjkih ni statistično značilno naraščala, kar je v nasprotju

z našimi pričakovanji, glede na to, da je Cl prisoten v raztopini $ZnCl_2$, kjer smo namakali semena fižola. Razlog za padec Cl pri koncentraciji 1 mM pripisujemo napaki v meritvah, zaradi prenizke občutljivosti naprave za rentgensko fluorescenco za ta element.

Zaključki

Z raziskavo smo pokazali, da lahko biofortifikacija fižola mungo z namakanjem semen v raztopini $ZnCl_2$ pomembno poviša koncentracijo Zn in nam tako lahko pomaga pri pridelavi rastlin z izboljšano prehransko vrednostjo. Raztopina $ZnCl_2$ s koncentracijo 1 mM, pri kateri smo dosegli 2,5-kratno povečanje koncentracije Zn v poganjkih v primerjavi s kontrolo, brez inhibitornih učinkov na rast, se je od vseh štirih koncentracij izkazala za najbolj ustrezno za biofortifikacijo fižola mungo. Pri višjih koncentracijah je raztopina $ZnCl_2$ delovala strupeno. Videli smo, da je uporabljen postopek biofortifikacije vplival na koncentracijo P, Ca in Fe v kličnih listih ter Cl v poganjkih. S tem smo ugotovili, da je metoda biofortifikacije z namakanjem semen primerna za povečanje koncentracije Zn v užitnih kalčkih fižola mungo.

Literatura

- Akpanunam M, 1996. Mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). Food and feed from legumes and oilseeds Springer US: 209–215
- Haider MU, Hussain M, Farooq M, Nawaz A, 2020. Optimizing zinc seed priming for improving the growth, yield and grain biofortification of mungbean (*Vigna radiata* (L.) wilczek). Journal of Plant Nutrition 43, 10: 1438–1446
- Kanwal A, Khan MB, Hussain M, Naeem M, Rizwan MS, Zafar-Ul-Hye M, 2020. Basal application of zinc to improve mung bean yield and zinc-grains-biofortification. Phyton 89, 1: 87–96
- Maret W, Sandstead HH 2006. Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 20, 1: 3–18
- Nečemer M, Kump P, Ščančar J, Jačimović R, Simčič J, Pelicon P, Budnar M, Jeran Z, Pongrac P, Regvar M, Vogel-Mikuš K, 2008. Application of X-ray fluorescence analytical techniques in phytoremediation and plant biology studies. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy 63, 11:1240-1247.
- Rehman A. Farooq M, Ahmad R, Basra SMA, 2015. Seed priming with zinc improves the germination and early seedling growth of wheat. Seed Science and Technology 43, 2: 262–268
- Sarwar M, 2011. Effects of zinc fertilizer application on the incidence of rice stem borers (*Scirpophaga* species) (Lepidoptera: Pyralidae) in rice (*Oryza sativa* L.) crop. Journal of Clinical Oncology 2, 1: 61–65
- Zou T, Xu N, Hu G, Pang J, Xu H, 2014. Biofortification of soybean sprouts with zinc and bioaccessibility of zinc in the sprouts. Journal of the Science of Food and Agriculture 94, 14: 3053–3060

Vpliv acetilsalicilne kisline na rast fižola češnjevca (*Phaseolus vulgaris* L.)

Miha Bajc, Tim Godec, Tim Medved, Lana Žura

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

- Namen raziskave je bil ugotoviti, ali dodatek acetilsalicilne kisline v različnih koncentracijah vpliva na rast fižola češnjevca (*Phaseolus vulgaris*).
- Vsak dan izpostavitve smo rastlinam izmerili višino ter prešteli število listov, po 10 dneh pa vsako rastlino še stehtali, izmerili dolžine korenin ter prešteli število stranskih korenin.
- Opazili smo, da bi ASA v koncentracijah 10⁻⁵ g/L in 10⁻⁶ g/L lahko vzpodbudila ter v koncentraciji 10⁻⁴ g/L lahko zavirala rast in razvoj rastlin fižola češnjevca, vendar zaradi širokih standardnih odklonov tega ne moremo z gotovostjo trditi.
- Glede na potencialno uporabnost (kot domače gnojilo oz. pospeševalec rasti za domačo vrtno uporabo) bi bilo poskus vredno ponoviti v bolj kontroliranih razmerah in poskušati zmanjšati standardne napake ter hkrati preučiti vpliv na okolje (npr. vpliv na mikrobo, prisotne v tleh).

Ključne besede: *Phaseolus vulgaris*, aspirin, acetilsalicilna kislina, gnojenje

Uvod

Rastlinski hormoni so naravne spojine, ki vplivajo na fiziološke procese rastlin. Acetilsalicilna kislina (v nadaljevanju ASA) ali drugi analogi salicilne kisline (v nadaljevanju SA) lahko delujejo kot rastlinski hormoni (Pallag in sod. 2014). ASA/SA sta fenolna derivata, ki ju najdemo v širokem spektru rastlinskih vrst. Sta naravna produkta fenilpropanoidnega metabolizma. Vplivata na rast, termogenezo, indukcijo cvetenja, prevzem ionov, sintezo etilena in učinke abscizinske kisline.

Vloge ASA/SA so povečanje ravni klorofila, karotenoidov, ravni fotosinteze in spreminjanje aktivnosti nekaterih pomembnih encimov. Sta regulatorja rasti, ki povečata bioproduktivnost rastlin. Povečanje bioproduktivnosti je predvsem posledica pozitivnega učinka ASA/SA na dolžino in gostoto korenin, saj tako lahko privzamejo več vode in mineralnih hranil.

Pomemben vidik je tudi povečanje gostote korenin, ki nastane kot posledica povečane iniciacije sekundarnih korenin.

Poskuse smo izvajali na navadnem fižolu (*Phaseolus vulgaris*). Je enoletna stročnica, ki lahko v višino zraste 20-60 cm. Ima zelene ali vijolične liste ter cvetove, ki merijo približno 1 cm. Plodovi so ledvičaste oblike in se razlikujejo po barvi. Že od leta 1978 je bilo predlagano, da izpostavitve rastlin SA vpliva tudi na hidratiranost same rastline, kar je bilo potrjeno v specifičnih bioloških testih na epidermisu vrste *Commelina communis* (Larqu é-Saavedra 1978,1979). Nadaljnje študije so preučevale predvsem odnos salicilatov do bioproduktivnosti. Podatki so pokazali, da so vrednosti za premer stebela, število in površino listov višje, če rastlino tretiramo s SA. Uporaba salicilatov na rastlinah je tudi povečala rast poganjkov pri različnih rastlinskih vrstah. Za doseg željenih učinkov so se v raziskavah večinoma najbolje izkazale koncentracije 10^{-6} - 10^{-8} mol/L, kar ustreza cca. $1,8 \times 10^{-1}$ g/L – $1,8 \times 10^{-3}$ g/L.

V poskusu smo torej želeli oceniti učinek različnih koncentracij ASA, v obliki tablete aspirina na rast fižola, pri čemer smo zanemarili vpliv ostalih sestavin tablete aspirina. Pri tem smo postavili naslednje hipoteze:

- Ob dodatku ASA pričakujemo, da bodo poganjki zrasli več, kot pri kontroli, korenine pa bodo večje in bolj razvejane.
- Pričakujemo, da bodo fižoli, izpostavljeni ASA, na koncu poskusa težji.
- Pričakujemo, da bo najvišja koncentracija ASA zavirala rast rastlin.

Materiali in metode

Pred poskusom smo postavili semena fižola na papirnato brisačko in ves čas skrbeli, da je bila brisačka do vzklitja dovolj vlažna. Hranili smo jih v predalu omare v temi.

Po vzklitju smo semena prestavili v lončke za jogurt, napolnjene z zemljo iz vrta. Vsak posameznik je imel 8 lončkov z oznakami: K1 in K2 (kontrola; c(ASA)K = 0 g/L), A1 in A2 (c(ASA)A = 0,1 g/L), B1 in B2 (c(ASA)B = 0,01 g/L), C1 in C2 (c(ASA)C = 0,001 g/L), vse skupaj 32 lončkov oz. 4 serije ponovitev (4 poskusi).

Pripravili smo si razredčitve raztopine acetilsalicilne kisline tako, da smo 500 mg tableto aspirina raztopili v 0,5 L vode in tako dobili začetno koncentracijo 1 g/L. Nato smo raztopino trikrat zaporedno redčili za faktor 10 in tako pripravili trikrat po 0,5 L raztopine za zalivanje s koncentracijami 0,1 g/L, 0,01 g/L in 0,001 g/L. Raztopine smo hranili v hladilniku z namenom podaljšanja razpolovnega časa acetilsalicilne kisline, 1 h pred

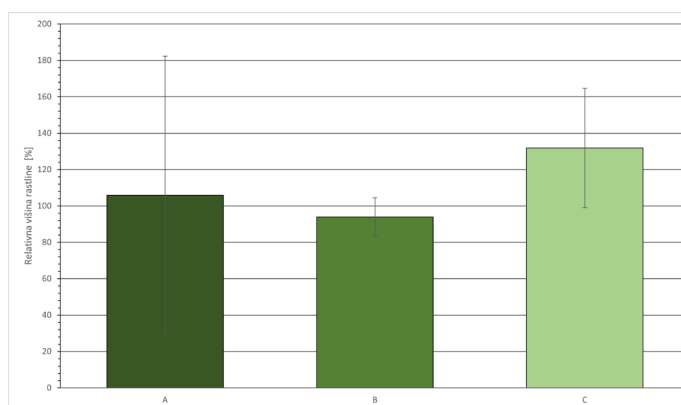
zalivanjem pa raztopino vzeli iz hladilnika ven, da se je ogrela na sobno temperaturo. Po 7 dnevih smo raztopine, s katerimi smo zalivali, zavrgli in pripravili nove po istem postopku, da smo fižol izpostavljali enakim koncentracijam ASA in s tem zmanjšali eksperimentalno napako.

Lončki so bili postavljeni na okensko polico in bili izpostavljeni 17/7 dnevno/nočni ritmiki pri sobni temperaturi (cca. 20°C). Dnevno smo rastline v istem časovnem intervalu zalivali z eno veliko žlico vsake posamezne raztopine in dvema žlicama vode, v primeru negativne kontrole pa s 3 velikimi žlicami vode. Vsak dan tretiranja (ob istem času) smo rastlinam izmerili višino ter prešteli število listov, po 10 dneh pa vsako rastlino previdno izkopal iz lončkov, jo stehali, izmerili dolžine korenin ter prešteli število stranskih korenin.

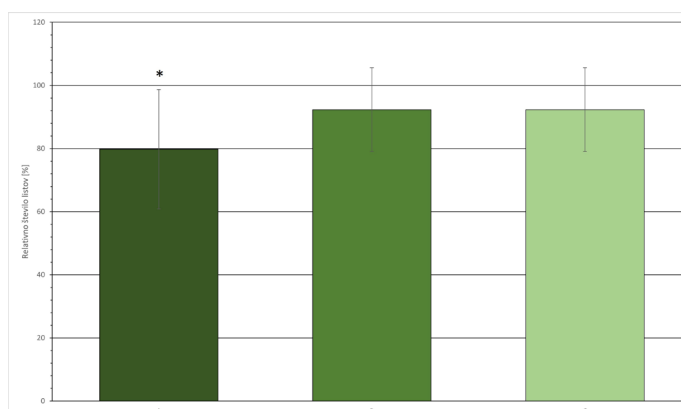
Podatke smo shranjevali v excelovo datoteko in jih statistično obdelali s pomočjo dodatka Daniel's XL Toolbox ter Holm-Šidák post-hoc testom.

Rezultati

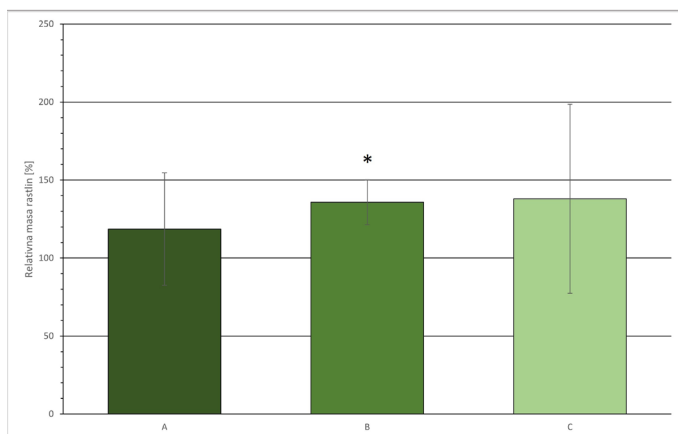
Prvi graf prikazuje relativno višino rastlin glede na kontrolo (kontrola predstavlja 100%). Opazili smo manjši relativni prirast



Slika 1: Relativna višina rastlin fižola češnjevca po 10 dneh izpostavljenosti raztopinam A (0,1 g ASA/L), B (0,01 g ASA/L) in C (0,001 g ASA/L) glede na kontrolo (K = 100%) s pripadajočimi standardnimi napakami. Oznaka z * označuje statistično značilno razliko Holm-Sidak post hoc testa pri $p < 0,05$.



Slika 2: Relativno število listov rastlin fižola češnjevca po 10 dneh izpostavljenosti raztopinam A (0,1 g ASA/L), B (0,01 g ASA/L) in C (0,001 g ASA/L) glede na kontrolo (K = 100%) s pripadajočimi standardnimi napakami. Oznaka z * označuje statistično značilno razliko Holm-Sidak post hoc testa pri $p < 0,05$.



Slika 3: Relativna masa rastlin fižola češnjevca po 10 dneh izpostavljenosti raztopinam A (0,1 g ASA/L), B (0,01 g ASA/L) in C (0,001 g ASA/L) glede na kontrolo (K = 100%) s pripadajočimi standardnimi napakami. Oznaka z * označuje statistično značilno razliko Holm-Sidak post hoc testa pri $p < 0,05$.

v primerjavi s kontrolo pri izpostavitvi srednji koncentraciji ASA (vzorci B), medtem ko je bil povprečni relativni prirast pri izpostavitvi z najnižjo in najvišjo koncentracijo (vzorci A in C) nekoliko višji od kontrolnega. Razlike so majhne in glede na standardni odklon niso statistično značilne.

Naslednji graf prikazuje relativno število listov rastlin ob koncu 10 – dnevne izpostavitve z ASA glede na kontrolo. Relativno število listov je bilo v povprečju pri vseh vzorcih nižje od kontrole, vendar je statistično značilna razlika opazna le pri vzorcu A (povprečno število listov je manjše za 20,2 % od kontrole). Površine listov nismo merili.

Tretji graf prikazuje relativno maso rastlin ob koncu izpostavitve. Opazili smo trend naraščanja povprečne mase z nižanjem koncentracije ASA (najvišjo povprečno maso so imeli vzorci, izpostavljeni raztopini C, drugo najvišjo vzorci B, tretjo najvišjo vzorci A in najnižjo povprečno maso kontrolni vzorci). Zaradi širokih standardnih odklonov pri ostalih vzorcih pa je statistično značilna razlika glede na kontrolo opazna le pri vzorcih B (povprečna masa je bila od kontrole večja za 35,7 %). Tretirane rastline so v povprečju sicer razvile daljše korenine od kontrole, vendar se statistično od kontrole razlikuje samo vzorec B (od kontrole je večji za 27,4 %). Pri razlikah v številu stranskih korenin so rezultati ravno obratni. Povprečno več stranskih korenin, glede na kontrolo, so razvile rastline, izpostavljene najvišji in najnižji koncentraciji ASA (vzorci A

in C). Vzorci, tretirani z raztopino B, so v povprečju razvili nekoliko nižje število stranskih korenin, vendar je razlika, glede na kontrolo, pri vseh treh vzorcih zelo majhna. O statistično značilnih razlikah v številu stranskih korenin ne moremo govoriti.

Diskusija

Sprememba v povprečni višini izmerjenih rastlin nakazuje, da bi dodatek ASA v koncentraciji 0,001 g/L (če zalivamo fižol v razmerju raztopina : voda = 1 : 2) lahko pospešila rast fižola, dodatek ASA v koncentraciji 0,1 g/L in 0,001 g/L (zalivanje v razmerju raztopina : voda = 1 : 2) pa na rast fižola ni vplivala. Ker pa gre za zelo majhne razlike, ki hkrati niso statistično značilne, pa rezultate težko primerjamo z literaturo, po kateri naj bi zalivanje z višjo koncentracijo ASA zaviralo rast rastlin, zalivanje z nižjo koncentracijo ASA pa pospešilo rast (Pallag in sod. 2014).

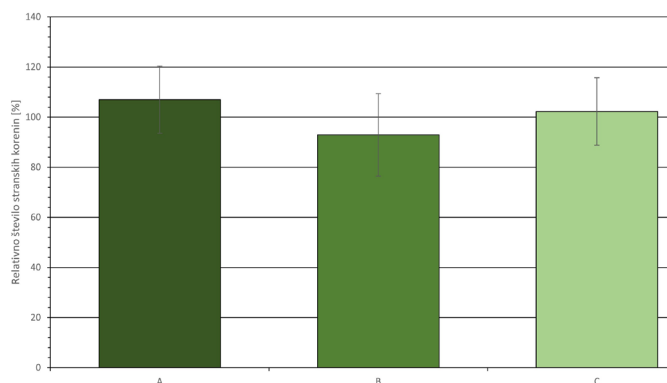
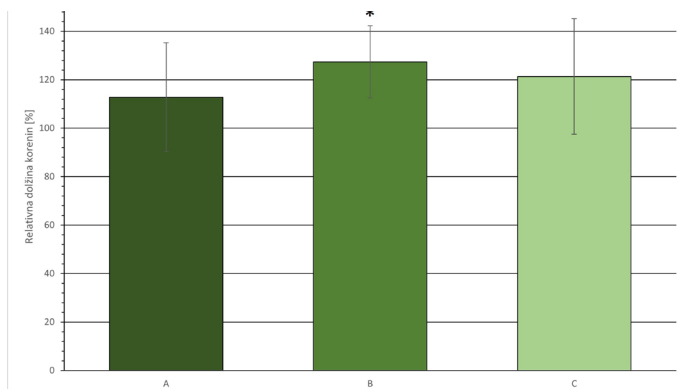
Pri številu listov, ki so jih rastline razvile, se je od kontrole statistično razlikovala skupina, katero smo zalivali z 0,1 g/L ASA, in sicer je razvila manj število listov, kot kontrolo. Povprečno število listov rastlin drugih dveh skupin je bilo sicer manjše od kontrole, vendar razlike niso statistično značilne. Naše ugotovitve tako nasprotujejo ugotovitvam Larqu é-Saavedra, kjer se je izkazalo, da rastline, izpostavljene ASA povprečno razvijejo več število listov.

Povprečna masa vseh rastlin, izpostavljenih ASA, je bila višja od kontrolne skupine, statistično pa se je edina razlikovala skupina rastlin, katere smo zalivali s koncentracijo 0,1 g/L ASA.

Pri povprečni dolžini korenin so bile razlike v povprečnih vrednostih zelo majhne in niso bile statistično značilne, zaradi česar ne moremo trditi, da obstaja povezava med koncentracijo ASA, kateri je rastlina izpostavljena in dolžino njenih korenin (Larqu é-Saavedra 1978,1979). Pri številu stranskih korenin pa se statistično značilne razlike niso pokazale pri nobeni skupini rastlin.

Zaključki

Glede na pridobljene rezultate predvidevamo, da ASA lahko potencialno različno vpliva na rast in razvoj rastline (višina, število listov, masa, dolžina korenine in število stranskih korenin), vendar bi za gotove trditve poskus morali ponoviti z večjim številom rastlin in pa predvsem v bolj kontroliranih razmerah (ista lokacija in pripadajoči okoljski parametri, oprema za natančnejše tehtanje, merjenje in zalivanje ...),



Slika 4: levo: dolžino korenin ob koncu izpostavitve in desno: število stranskih korenin ob koncu izpostavitve.

ter poskušali znižati standardne odklone, kjer so povprečne vrednosti nakazovale morebitno odstopanje od kontrole, vendar razlike niso bile statistično značilne.

Literatura

1. Hayat S, Ali B, Ahmed A, 2007. Salicylic acid: Biosynthesis, metabolism and physiological role in plants. V S. Hayat, A. Ahmad (ur.), Salicylic acid: A Plant Hormone (str. 1-14). Department of Botany, Aligarh Muslim University, Aligarh, India.
2. Larqué-Saavedra A., Hayat S, Ali B, Martin-Mex R. Effects of salicylic acid on the bioproductivity of plants. V S. Hayat, A. Ahmad (ur.), SALICYLIC ACID: A Plant Hormone (str. 15-24). Department of Botany, Aligarh Muslim University, Aligarh, India.
3. Pallag A, Paşca B, Gîtea D, Țiț M, 2014. The effects of acetylsalicylic acid in physiological processes of *Triticum aestivum* L. Analele Universității din Oradea, Fascicula: Protecția Mediului, vol. 23, str. 119-124.
4. Ng T., Wong J.H., Cheung R.C.F., Lam S.K., Wang H., Ye X., Ngai P.H.K., Fang E.F., Chan Y. Antifungal and Antiproliferative Activity of Spotted Bean (*Phaseolus vulgaris* cv.). V Preedy V.R., Watson R.R., Patel V. B. (ur.), Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention (str. 1073-1077), School of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong, China.