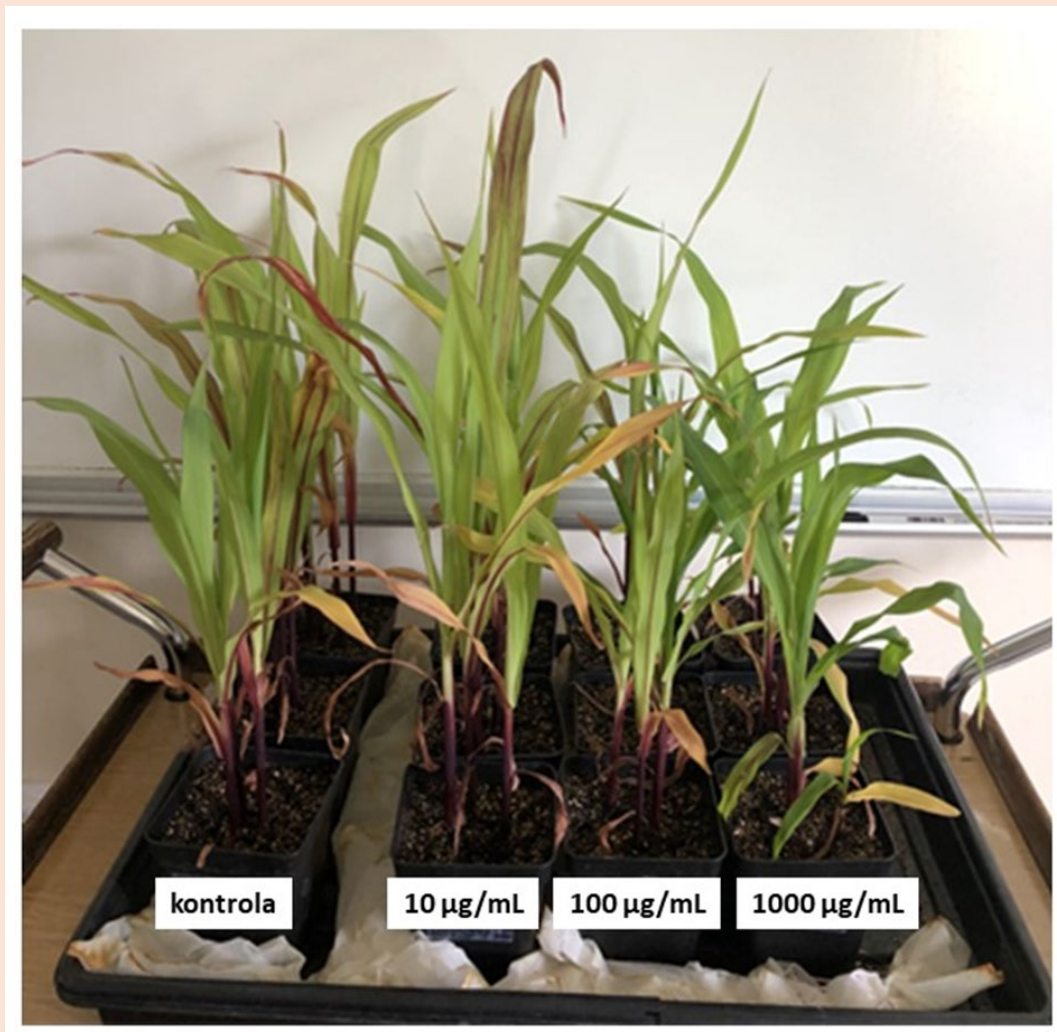


**ZBORNİK RAZISKOVALNIH PRISPEVKOV  
ŠTUDENTOV BIOTEHNOLOGIJE  
PRI PREDMETU  
OKOLJSKA BIOTEHNOLOGIJA (2022/23)**



**ZBORNİK RAZİSKOVALNIH PRISPEVKOV  
ŠTUDENTOV BIOTEHNOLOGIJE  
PRI PREDMETU  
OKOLJSKA BIOTEHNOLOGIJA  
(2022/23)**

Urednik: Jure Mravlje

**ZBORNIK RAZISKOVALNIH PRISPEVKOV ŠTUDENTOV  
BIOTEHNOLOGIJE PRI PREDMETU OKOLJSKA  
BIOTEHNOLOGIJA (2022/23)**

V zborniku so zbrani znanstveno–raziskovalni prispevki študentov pri predmetu »Okoljska biotehnologija – rastlinski del« na študiju II. stopnje Biotehnologija. Napisani so na osnovi rezultatov lastnega raziskovalnega dela, ki so ga študenti opravili v študijskem letu 2022/23. Ukvarjali so se s problematiko strupenih kovin ter ugotavljali, kako različne kovine vplivajo na rast in razvoj, fotokemično učinkovitost ter transpiracijo pri koruzi oziroma kumari.

Izdajatelj: Katedra za botaniko in fiziologijo rastlin, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta Univerza v Ljubljani

Recenzentki: prof. dr. Katarina Vogel-Mikuš in prof. dr. Marjana Regvar

Zbral in uredil: asist. Jure Mravlje, [jure.mravlje@bf.uni-lj.si](mailto:jure.mravlje@bf.uni-lj.si)

Naslov uredništva: Katedra za botaniko in fiziologijo rastlin, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta UL, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

Fotografija z naslovnice: Rastline koruze izpostavljene različnim koncentracijam raztopine kroma (od leve proti desni: kontrola (0 µg/mL), 10 µg/mL, 100 µg/mL in 100 µg/mL) po približno enem mesecu poskusa (fotografirano na 35. dan). Avtorji: Ana Gabrovšek, Monika Gregorič Tasić, Urša Grohar, Domen Hočevnar, Zala Vraničar

Leto izida: september 2023

Kraj izida: Ljubljana

Elektronska izdaja

Kataložni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani

COBISS.SI-ID 164386307

ISBN 978-961-6822-99-2 (PDF)

(dostopno: <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?id=150068>)

## KAZALO VSEBINE

1. <b>VPLIV BAKRA NA RAST IN RAZVOJ KORUZE</b> (Nuša Avguštinčič, Nuša Balen, Nastja Blagovič, Sašo Brudar, Anđela Pejić) .....	2
2. <b>VPLIV BAKRA NA RAST IN RAZVOJ KUMARE</b> (Miha Kitek, Maša Starman, Matic Kink, Maj Zupančič).....	9
3. <b>VPLIV CINKA NA RAST IN RAZVOJ KORUZE</b> (Urška Jerič, Pia Kokelj, Tanita Kranjc, Jure Ličen, Nuša Likar) .....	14
4. <b>VPLIV CINKA NA RAST IN RAZVOJ KUMARE</b> (Sara Stopar, Neža Škoda, Lara Šušmelj, Eva Žejn, Sara Žitko) .....	24
5. <b>VPLIV KADMIJA NA RAST IN RAZVOJ KORUZE</b> (Ciril Cerovšek, Anja Javornik, Teja Knafelj, Barbara Knez, Lucija Štih) .....	31
6. <b>VPLIV KADMIJA NA RAST IN RAZVOJ KUMAR</b> (Aljaž Kravanja, Hana Kovač, Tara Mesarič, Luka Mravlje) .....	39
7. <b>VPLIV KROMA NA RAST IN RAZVOJ KORUZE</b> (Ana Gabrovšek, Monika Gregorič Tasič, Urša Grohar, Domen Hočevar, Zala Vraničar) .....	45
8. <b>VPLIV KROMA RAST IN RAZVOJ KUMARE</b> (Aneja Hvalič, Viktorija Primc, Anja Verbanec, Tina Živič) .....	52
9. <b>VPLIV SVINCA NA RAST IN RAZVOJ KORUZE</b> (Agata Kokalj Malovrh, Juš Miklavčič, Katja Palovšnik, Pia Eva Pogač).....	57
10. <b>VPLIV SVINCA NA RAST IN RAZVOJ KUMARE</b> (Žiga Oven, Sergej Praček, Matija Šavli, Jakob Trebše, Ana Velikonja) .....	63

# VPLIV BAKRA NA RAST IN RAZVOJ KORUZE

Nuša Avguštinčič, Nuša Balen, Nastja Blagovič, Sašo Brudar, Andela Pejić

## Izvleček

Namen dela je bil ugotoviti, kako različne koncentracije bakra vplivajo na rast koruze (*Zea mays*). Pripravili smo različne koncentracije raztopin bakra (0/10/100/1000  $\mu\text{g/mL}$ ) in preverjali kakšen je njihov vpliv na dolžine poganjkov in korenin, njihovo svežo in suho biomaso ter vsebnost klorofila a pri koruzi. Statistično značilne rezultate smo dobili samo pri meritvi potencialne fotokemične učinkovitosti fotosistema II, kjer smo zaznali statistično značilne razlike med meritvijo kontrolne skupine in skupine, ki smo jo zalivali z raztopino 10  $\mu\text{g/mL}$  bakra. Pri drugih meritvah nismo dobili statistično značilnih rezultatov..

**Ključne besede:** baker, rast koruze, fotosinteza

## Uvod

Baker je esencialno mikrohranilo, ki ima pomembno vlogo pri rastlinah. Predstavlja ključno sestavino številnih encimov in ima pomembno vlogo pri fotosintezi. Prav tako je neposredno vpleten v procese, kot so sinteza beljakovin, tvorba lignina, tvorba vitamina A, odpornost na stres in tvorba cvetnega prahu (Zainul et al. 2023). Pomanjkanje bakra se lahko pojavi v primerih nizke razpoložljivosti v tleh ali zaradi zmanjšanja oksidacijskega potenciala in povečanja pH vrednosti tal, ter prisotnosti raztopljenega organskega ogljika (Zainul et al. 2023). Vendar pa lahko onesnaženje s težkimi kovinami, kot je baker, povzroči škodo naravnih ekosistemih in kmetijskih zemljiščih. Povečana kontaminacija z bakrom iz industrijskih virov ali kot del bakrovih fungicidov je v zadnjih desetletjih bistveno narasla (Xin et al. 2022). Prekomerna raven bakra lahko zmanjša absorpcijo vode in mineralnih hranil v rastlinah, spodbuja oksidativni stres in vpliva na fotosintezo, kar povzroča zmanjšano proizvodnjo biomase in pridelka. Poleg tega, prevelika prisotnost bakra lahko vodi v zmanjšano sposobnost prevzema ionov in zmanjšanje koncentracije esencialnih hranil, kot so fosfor, kalij, kalcij, mangan in železo v nadzemnem delu rastlin (Zainul et al. 2023). Cilj našega poskusa je bil pripraviti različne koncentracije raztopine bakra (10/ 100/ 1000  $\mu\text{g/ mL}$ ) in preveriti, kakšen je njegov vpliv na dolžine poganjkov in korenin, njihovo svežo in suho biomaso ter vsebnost klorofila a.

Hipoteze:

H1: Dolžina poganjkov in korenin rastlin, zalivanih s 10, 100 in 1000  $\mu\text{g/ mL}$  Cu (II)  $\text{SO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , bo nižja od dolžine poganjkov in korenin kontrolnih rastlin.

H2: Sveža in suha biomasa poganjkov in korenin rastlin, zalivanih s 10, 100 in 1000  $\mu\text{g/ mL}$  Cu (II)  $\text{SO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , bo nižja od sveže in suhe biomase poganjkov in korenin kontrolnih rastlin.

H3: Fotokemična učinkovitost FS II rastlin, zalivanih s 10, 100 in 1000  $\mu\text{g/ mL}$  Cu (II)  $\text{SO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , bo nižja od fotokemične učinkovitosti kontrolnih rastlin.

## Metode in materiali

Za namen izvedbe poskusa smo pripravili raztopino Cu (II)  $\text{SO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  s koncentracijo 1000  $\mu\text{g/ mL}$ , tako da smo zatehtali ustrezno količino bakrovega sulfata in dodali destilirano vodo. Kot kontrolo (0

µg/ mL) smo uporabili destilirano vodo. Poganjke koruze smo zalivali 2x tedensko z 100 mL raztopine z ustrežno koncentracijo in jih gojili v rastni komori pri 20/ 23°C in s fotoperiodo 16/ 8h.

Po 35 dneh zalivanja smo s fluorometrom (PAM-2500) pomerili dejansko in potencialno fotokemično učinkovitost fotosistema II. Sponko, preko katere smo opravljali meritve, smo namestili na sredino lista in najprej pomerili absolutno fotokemično učinkovitost, nato pa zaprli okenca in po 15 minutah pomerili še relativno fotokemično učinkovitost.

Rastline smo vzeli iz lončkov, odstranili odvečno zemljo iz korenin in ločili korenine od poganjkov. Tako korenine kot poganjke smo pomerili, stehali in jih pripravili na sušenje. Sušili smo jih 3 dni na temperaturi 60° C. Po enem tednu smo stehali suho maso korenin in poganjkov. Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili program Excel XL toolbox NG. Razlike med obdelavami smo določili z enosmerno analizo variance (ANOVA) in Holm-Sidak post-hoc testom za  $p < 0,05$ .

## Rezultati

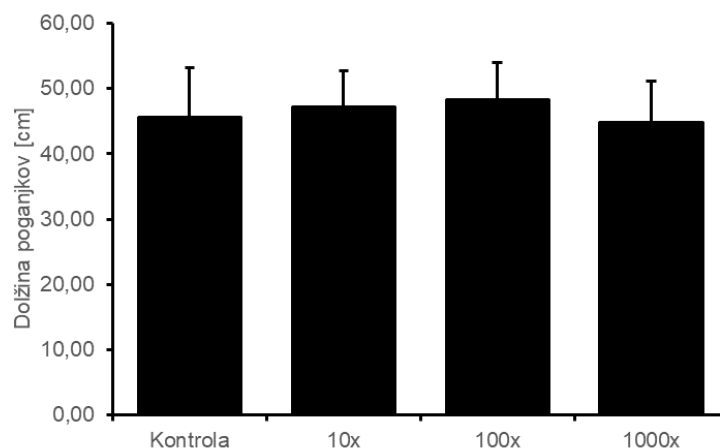
Za statistično obdelavo vzorcev smo morali predpostaviti, da so rezultati normalno porazdeljeni in da so variance homogene. Da bi ugotovili, ali so rezultati statistično značilni, uporabljamo p-vrednost. P-vrednost je verjetnost, da bi se zabeležena razlika med skupinami pojavila, če ne bi bilo dejanske razlike med njima. Običajno se uporablja prag vrednosti alfa (najpogosteje 0,05), kar pomeni, da če je p-vrednost manjša od 0,05, je razlika med skupinami statistično značilna. Tudi v našem primeru smo uporabili alfa vrednost 0,05. Postavili smo si tudi ničelno hipotezo ( $H_0$ ), ki trdi, da med obravnavami ni razlik, oz. da ni nobene statistično značilne razlike ali povezave med spremenljivkami. Ničelno hipotezo smo primerjali z hipotezami predstavljenimi v uvodu

### Dolžina poganjkov

Pri dolžini poganjkov koruze ni bilo statistično značilnih razlik med kontrolo in koruzo obravnavano z 10, 100 in 1000 µg/ mL bakra. P vrednost je višja od 0,05, zato ne moremo ovreči ničelne hipoteze.

**Tabela 1.** Dolžina poganjkov koruze po koncu obravnave z 10, 100 in 1000 µg/ mL bakra. Prikazana so števila vzorcev, srednje vrednosti, standardne deviacije in standardne napake za vsako obravnavo, dodana je še P vrednost analize.

Obravnava	Št. Vzorcev	Srednja vrednost	Standardna deviacija	Standardna napaka	P vrednost
Kontrola	14,00	45,58	7,69	2,05	0,53
10x	13,00	47,23	5,50	1,53	
100x	12,00	48,31	5,64	1,63	
1000x	12,00	44,87	6,20	1,79	



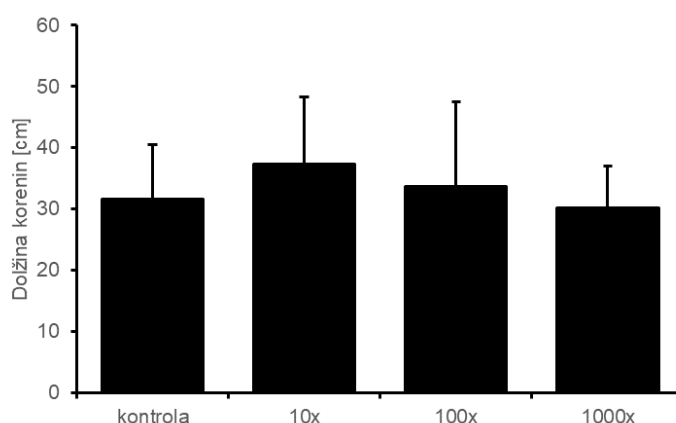
**Slika 1.** Dolžina poganjkov koruze po koncu obravnave z 10, 100 in 1000  $\mu\text{g/ mL}$  bakra. Prikazana so povprečja in standardne deviacije.

### Dolžina korenin

Pri dolžini korenin koruze ni bilo statistično značilnih razlik med kontrolo in koruso obravnavano z 10, 100 in 1000  $\mu\text{g/ mL}$  bakra. P vrednost je višja od 0,05, zato ne moremo ovreči ničelne hipoteze. Opazimo lahko da 10  $\mu\text{g/ mL}$  bakra pozitivno vpliva na dolžino korenin, s ponovnim višanjem koncentracije bakra pa dolžine korenin padajo.

**Tabela 2.** Dolžina korenin koruze po koncu obravnave z 10, 100 in 1000  $\mu\text{g/ mL}$  bakra. Prikazana so števila vzorcev, srednje vrednosti, standardne deviacije in standardne napake za vsako obravnavo, dodana je še P vrednost analize.

Obdelava	Št. Vzorcev	Srednja vrednost	Standardna deviacija	Standardna napaka	P vrednost
kontrola	14,00	31,64	8,88	2,37	0,34
10x	13,00	37,35	10,92	3,03	
100x	12,00	33,71	13,74	3,97	
1000x	12,00	30,17	6,79	1,96	



**Slika 2.** Dolžina korenin koruze po koncu obravnave z 10, 100 in 1000  $\mu\text{g/ mL}$  bakra. Prikazana so povprečja in standardne deviacije.

### Teža poganjkov sveže in suhe rastline

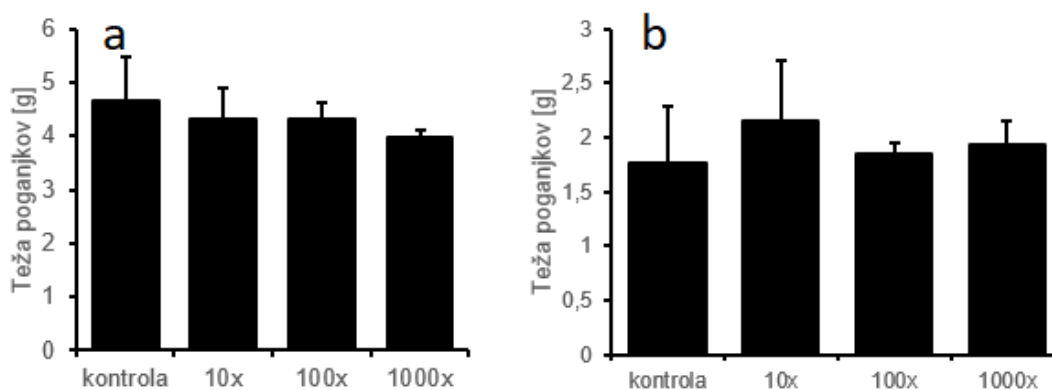
Pri teži poganjkov sveže in suhe koruze nismo opazili statistično značilnih razlik med kontrolami in koruzo obravnavano z 10, 100 in 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  bakra. P vrednost je višja od 0,05, zato ne moremo ovreči ničelne hipoteze. Le pri sveže tehtanih poganjkih lahko opazimo trend padanja teže poganjkov z zvišanjem koncentracije bakra, vendar podatki niso statistično značilni.

**Tabela 3.** Teža poganjkov sveže koruze po koncu obravnave z 10, 100 in 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  bakra. Prikazana so števila vzorcev, srednje vrednosti, standardne deviacije in standardne napake za vsak tretma, dodana je še P vrednost analize.

Tretma	Št. Vzorcev	Srednja vrednost	Standardna deviacija	Standardna napaka	P vrednost
kontrola	3	4,65	0,84	0,49	0,54
10x	3	4,34	0,57	0,33	
100x	3	4,30	0,32	0,18	
1000x	3	3,98	0,12	0,07	

**Tabela 4.** Teža poganjkov suhe koruze po koncu obravnave z 10, 100 in 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  bakra. Prikazana so števila vzorcev, srednje vrednosti, standardne deviacije in standardne napake za vsak tretma, dodana je še P vrednost analize.

Obravnavava	Št. Vzorcev	Srednja vrednost	Standardna deviacija	Standardna napaka	P vrednost
kontrola	3	1,767	0,52	0,30	0,66
10x	3	2,159	0,56	0,32	
100x	3	1,841	0,10	0,06	
1000x	3	1,941	0,21	0,12	



**Slika 3.** Teža poganjkov sveže koruze (a) in suhe koruze (b) po koncu obravnave z 10, 100 in 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  bakra. Prikazana so povprečja in standardne deviacije.

#### Teža korenin svežih in suhih rastlin

Pri teži korenin sveže in suhe koruze nismo opazili statistično značilnih razlik med kontrolami in koruzo obravnavano z 10, 100 in 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  bakra. P vrednost je višja od 0,05, zato ne moremo ovreči ničelne hipoteze.

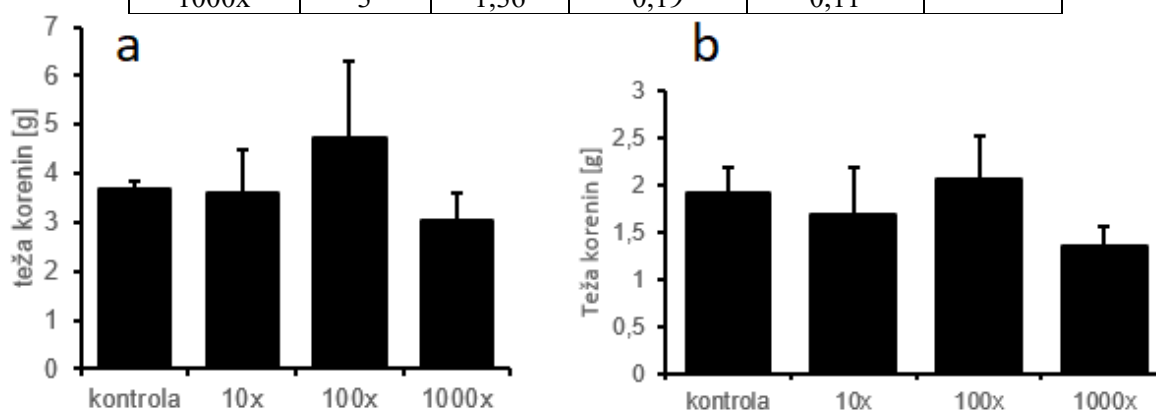
**Tabela 5.** Teža korenin sveže koruze po koncu obravnave z 10, 100 in 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  bakra. Prikazana so števila vzorcev, srednje vrednosti, standardne deviacije in standardne napake za vsak tretma, dodana je še P vrednost analize.



Obravnava	Št. Vzorcev	Srednja vrednost	Standardna deviacija	Standardna napaka	P vrednost
kontrola	3	3,67	0,19	0,11	0,28
10x	3	3,58	0,92	0,53	
100x	3	4,71	1,60	0,93	
1000x	3	3,06	0,55	0,32	

**Tabela 6.** Teža korenin suhe koruze po koncu obravnave z 10, 100 in 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  bakra. Prikazana so števila vzorcev, srednje vrednosti, standardne deviacije in standardne napake za vsako obravnavo, dodana je še P vrednost analize.

Obravnava	Št. Vzorcev	Srednja vrednost	Standardna deviacija	Standardna napaka	P vrednost
kontrola	3	1,92	0,26	0,15	0,20
10x	3	1,67	0,51	0,29	
100x	3	2,05	0,47	0,27	
1000x	3	1,36	0,19	0,11	



**Slika 4.** Teža korenin sveže koruze (a) in suhe koruze (b) po koncu obravnave z 10, 100 in 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  bakra. Prikazana so povprečja in standardne deviacije.

### Potencialna in dejanska fotokemična učinkovitost fotosistema II

Pri merjenju dejanske fotokemične učinkovitosti fotosistema II rezultati ne kažejo statistično značilnih razlik med kontrolami in koruzo obravnavano z 10, 100 in 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  bakra. P vrednost je višja od 0,05, zato ne moremo ovreči ničelne hipoteze. Rezultati potencialne fotokemične učinkovitosti fotosistema II pa kažejo na statistično značilne razlike med kontrolo in obravnavo koruze z 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  bakra. Potencialna fotokemične učinkovitosti fotosistema II se je po obravnavi zvišala.

**Tabela 6.** Potencialna fotokemične učinkovitosti fotosistema II koruze po koncu obravnave z 10, 100 in 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  bakra. Prikazana so števila vzorcev, srednje vrednosti, standardne deviacije in standardne napake za vsak tretma, dodana je še P vrednost analize.

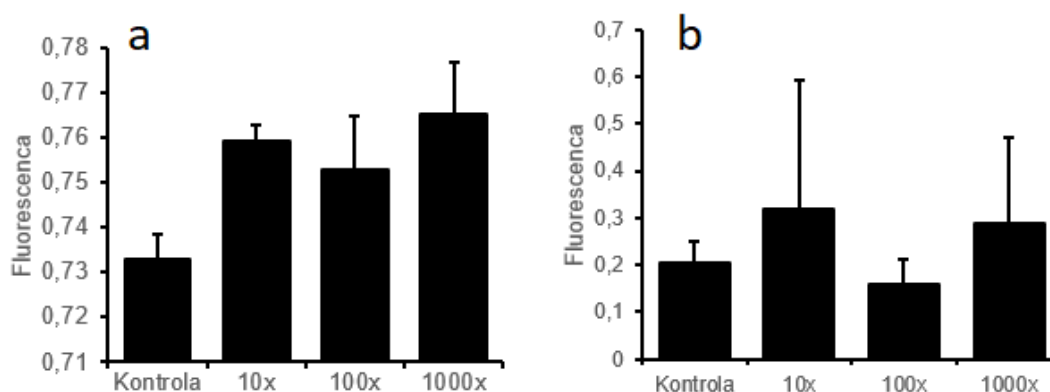
Obravnava	Št. Vzorcev	Srednja vrednost	Standardna deviacija	Standardna napaka	P vrednost
Kontrola	3	0,733	0,006	0,003	<b>0,01</b>
10x	3	0,759	0,004	0,002	
100x	3	0,753	0,012	0,007	
1000x	3	0,765	0,012	0,007	

**Tabela 7.** Potencialna fotosinteza koruze po koncu obravnave z 10 µg/mL bakra. Prikazani so podatki za post hoc test med kontrolo in 10 ug/ml bakra za koruzo.

Obravnava 1.	Obravnava	Kritična vrednost	P vrednost	Signifikantno
Kontrola	10x	0,008333333	0,002478	Da

**Tabela 8.** Dejanska fotokemične učinkovitosti fotosistema II koruze po koncu obravnave z 10, 100 in 1000 µg/ mL bakra. Prikazana so števila vzorcev, srednje vrednosti, standardne deviacije in standardne napake za vsako obravnavo, dodana je še P vrednost analize.

Obravnava	Št. Vzorcev	Srednja vrednost	Standardna deviacija	Standardna napaka	P vrednost
Kontrola	3	0,21	0,04	0,03	0,64
10x	3	0,32	0,27	0,16	
100x	3	0,16	0,05	0,03	
1000x	3	0,23	0,18	0,11	



**Slika 5.** Potencialna fotosinteza koruze (a) in dejanske fotosinteze koruze (b) po koncu tretiranja z 10, 100 in 1000 µg/mL bakra. Prikazana so povprečja in standardne deviacije.

## Razprava

Kljub uporabi različnih koncentracij raztopin bakra, naša raziskava ni pokazala statistično značilnih razlik v dolžini korenin in poganjkov med obravnavanimi skupinami koruze. To nakazuje, da izpostavljenost bakru v analiziranih koncentracijah ni imela opaznega vpliva na rast nadzemnih in podzemnih delov koruznih rastlin.

Presenetljivo naši rezultati niso pokazali statistično značilnih razlik v suhi masi korenin in poganjkov med skupinami koruze, ki so bile izpostavljene različnim koncentracijam bakra. Podobno kot pri suhi masi, tudi pri merjenju sveže mase korenin in poganjkov nismo opazili statistično značilnih razlik med obravnavanimi skupinami koruze. To pomanjkanje razlik kaže, da izpostavljenost bakru v preučevanih koncentracijah ni povzročila opaznih sprememb v količini vode ali vsebnosti hranil v merjenih rastlinskih tkivih ter spremembi v količini pridobljene biomase.

Tudi pri meritvi dejanske fotosinteze ni prišlo do statistično značilnih razlik, nasprotno pa se je zgodilo pri meritvi potencialne fotosinteze, kjer smo zaznali statistično značilne razlike med meritvijo kontrolne skupine in skupine, ki smo jo zalivali z raztopino 10 µg/mL bakra. Odsotnost statistično značilnih razlik

med skupinami koruze, ki so bile izpostavljene različnim koncentracijam bakra, lahko kaže na več dejavnikov. Prvič, morda je na pladnju prišlo do mešanja raztopin, s katerimi smo zalivali rastline in je tako prišlo do kontaminacije kontrolne skupine, saj so Mocquot et al. (1996) dokazali razliko v rasti poganjkov in sveži masi že pri koncentraciji 10 $\mu$ M. Po drugi strani Liu et al. (2014) navajajo, da so negativne učinke na rast koruze zaznali pri koncentraciji 100  $\mu$ M.

Kljub pomanjkanju statistično značilnih razlik bi bile potrebne nadaljnje raziskave tematike, saj menimo, da naša raziskava ni bila dovolj natančno in kvalitetno izvedena, da bi iz nje lahko z gotovostjo trdili, da baker pri uporabljenih koncentracijah nima vpliva na rast koruze. Namreč opazili smo več napak v metodologiji, ki bi jih bilo mogoče relativno preprosto izboljšati. Npr. lončke s koruzami bi morali ločiti na posamezne pladnje, saj je ob zalivanju koruz voda pogosto zastajala na pladnjih in tako ne moremo z gotovostjo trditi, da ni prišlo do mešanja vzorcev, tako da je bila verjetno tudi kontrolna skupina obravnavana z manjšim deležem raztopljenega bakra. Poleg tega tehtanje korenin ni dovolj zanesljiva metoda, saj so bile korenine rastlin med seboj močno prepletene, zato je bilo neizogibno, da smo pri čiščenju korenin pred tehtanjem določene korenine ponesreči tudi strgali, zato rezultati mase in dolžine korenin niso verodostojen podatek. Poleg tega bi v raziskavo za vsako koncentracijo morali vključiti večje število rastlin, saj bi s tem povečali možnost, da bi bili rezultati statistično značilni. Rastline bi za bolj prepričljive rezultate o vplivu bakra lahko pustili rasti tudi dlje časa, do odraslih rastlin, saj bi se morda razlike v rasti pokazale kasneje.

## Zaključki

Naša študija ni pokazala statistično značilnih razlik, niti v dolžini korenin in poganjkov, niti v suhi in sveži biomasi korenin in poganjkov, med skupinami koruze, ki so bile izpostavljene različnim koncentracijam bakra. Statistično značilne podatke smo dobili samo pri meritvi potencialne fotosinteze, kjer je prišlo do statistično značilnih razlik med kontrolnimi rastlinami in rastlinami, ki smo jih zalivali z raztopino 10  $\mu$ g/mL bakra. Izpostavljenost bakru v preučevanih koncentracijah torej ni povzročila opaznih sprememb v rasti koruze, zato naših hipotez ne moremo potrditi. Kljub temu na podlagi naših rezultatov ne moremo sklepati, da baker na rast koruze ne vpliva. Potrebne bi bile nadaljnje študije z večjim številom rastlin, daljšim obdobjem rasti in boljšimi metodami, da bi dobili zanesljivejše rezultate.

## Literatura

Liu JJ, Wei Z, Li JH (2014) Effects of copper on leaf membrane structure and root activity of maize seedling. *Bot Stud* 55(1):47. doi: 10.1186/s40529-014-0047-5

Mocquot B, Vangronsveld J, Clijsters H, Mench M (1996) Copper Toxicity in Young Maize (*Zea mays* L.) Plants: Effects on Growth, Mineral and Chlorophyll Contents, and Enzyme Activities. *Plant and Soil* 182: 287–300. doi:https://doi.org/10.1007/BF00029060

Zainul A, Hans-Werner K, Faisal Z, et al (2023) Impact of biochar amendments on copper mobility, phytotoxicity, photosynthesis and mineral fluxes on (*Zea mays* L.) in contaminated soils. *South African Journal of Botany* 158: 469-478. doi:https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.05.036

Xin X, Zhao F, Judy JD, He Z (2022) Copper stress alleviation in corn (*Zea mays* L.): Comparative efficiency of carbon nanotubes and carbon nanoparticles. *NanoImpact* 25: 100381. doi: https://doi.org/10.1016/j.impact.2022.100381

# VPLIV BAKRA NA RAST IN RAZVOJ KUMARE

Miha Kitek, Maša Starman, Matic Kink, Maj Zupančič

## Izvleček

V okviru raziskave smo ugotavljali vpliv različnih koncentracij bakra na rast in razvoj kumare. V substrat rastlin smo baker dodajali v vodni raztopini bakrovega (II) sulfata  $\times 5H_2O$ , v koncentracijah 0 ug/mL, 10 ug/mL, 100 ug/mL in 1000 ug/mL. Po šestih tednih smo izmerili fotokemično učinkovitost fotosistema II, višino, suho in svežo maso poganjkov ter korenin. Na podlagi naših rezultatov nismo uspeli narediti nobenih dokončnih zaključkov, saj ni bilo večjih statističnih razlik.

**Ključne besede:** Cu, Kumara, fotokemična učinkovitost, onesnaženost tal

## Uvod

Baker je kemijski element s simbolom Cu in atomskim številom 29. Gre za mehko, upogljivo kovino z visoko električno prevodnostjo. Zaradi svoje električne prevodnosti se uporablja v elektroniki, predvsem v obliki žic, kot dober električni prevodnik se uporablja v ogrevalnih sistemih (Zhong in sod., 2016) in za izdelavo vodovodnih cevi (Merkel in sod., 2006). Bakrovi pripravki se na široko uporabljajo tudi kot pesticidi v poljedelstvu, kar lahko vodi v visoke koncentracije bakra v podtalnici in zemlji v okolici škropljenja (Gallagher in sod., 2001).

Kovine kot so baker, mangan, nikelj in cink so dobro poznani esencialni mikroelementi v rastlinah (Lane in Morel, 2000). Po drugi strani pa visoke koncentracije teh kovin lahko povzročijo inhibicijo različnih procesov v rastlinskem metabolizmu (Prasad in Hagemeyer, 1999). Za fotosistem II v tilakoidah je bilo ugotovljeno, da ga inhibira baker (Cedeno-Maldonado in sod., 1972), kjer naj bi prišlo do nepravilnega delovanja antene za sprejemanje svetlobe, kar je posledica substitucije magnezija z bakrom v klorofilnih molekulah (Küpper in sod., 1996). Presežek bakra pa je lahko toksičen zaradi Fentonove reakcije, saj povzroči oksidativni stres.

Da bi minimalizirale presežek in tudi pomanjkanje bakra, so rastline razvile različne mehanizme, kot so regulacija privzema bakra v koreninah (Sancenon in sod., 2003), natančno potovanje bakra preko P-tipa ATPaz in bakrovih šaperonov (Shikanai in sod., 2003; Che in sod., 2005) in regulacijo bakrovih proteinov glede na spremembo dostopnosti kovine (Yamasaki in sod., 2007). V primeru pomanjkanja bakra pa rastline proizvajajo citokrome, ki imajo komplementarno funkcijo bakrovim ionom (Merchant in sod., 1991). Nekatere rastline pa aktivno akumulirajo baker in ga shranjujejo v določenih rastlinskih tkivih v neškodljivi obliki. Takim rastlinam rečem hiperakumulatorji (Brooks in sod., 1997) in se lahko uporabljajo za namene bioremediacije tal ali pa celo pridobivanje kovine (Baker in sod., 1994; McGrath in Zhao, 2003).

## Metode in materiali

V okviru projektne dela smo izvedli lončni poskus, kjer smo substrat zalivali z različnimi koncentracijami bakra. V poskusu smo na organski prsti vzgojili poganjke kumare (*Cucumis sativus*) in jih razdelili v štiri poskusne skupine ter vsako izmed njih zalivali z različno koncentracijo bakra. Za vsako poskusno skupino smo imeli po 3 lončne ponovitve in v vsakem lončku smo posadili po 5 rastlin. Po saditvi semen smo 2 tedna poganjke zalivali z destilirano vodo, nato pa smo pričeli z zalivanjem z različnimi koncentracijami bakrovega (II) sulfata  $\times 5H_2O$ .

V poskusu smo imeli kontrolno skupino, ki smo jo zalivali z destilirano vodo. Prvo poskusno skupino smo imenovali S1 (10) in zalivali smo jo z 10 ug/mL raztopine bakrovega (II) sulfata. Drugo poskusno skupino smo imenovali S2 (100) in zalivali smo jo z 100 ug/mL raztopine bakrovega (II) sulfata. Tretjo poskusno skupino smo imenovali S3 (1000) in zalivali smo jo z 1000 ug/mL raztopine bakrovega (II) sulfata. Rastline smo zalivali z 100 ml raztopine dvakrat tedensko.

Vse rastline smo gojili v lončkih v rastni komori s stalno zračno vlago (45 %), temperaturo 21°C in fotoperiodo 16 h svetlobe, 8 h teme. Rastline smo v komori gojili 6 tednov in jih med tem dvakrat tedensko zalivali z različnimi koncentracijami bakrovega (II) sulfata. Po preteklem poskusu smo rastlinam izmerili fotokemično učinkovitost, v okviru katere smo pomerili potencialno in dejansko fotokemično učinkovitost. V naslednjem koraku smo rastline poželi, jih ločili na zelene liste ter korenine in jim ločeno izmerili dolžino. Vsakemu vzorcu posebej smo tudi določili svežo maso. V naslednjem koraku smo rastline zavili v ALU folijo, zamrznili ter jih pustili sušiti v liofilizatorju za 72 ur. Naslednji dan smo vzorcem določili še suho maso in jih strli v terilnicah, katerim smo za lažje trenje dodali tekoči dušik.

Ničelna hipoteza našega poskusa je bila, da večja kot bo koncentracija bakra, nižja bo fotokemična učinkovitost fotosistema II in slabša bo rast rastlin.

## Rezultati

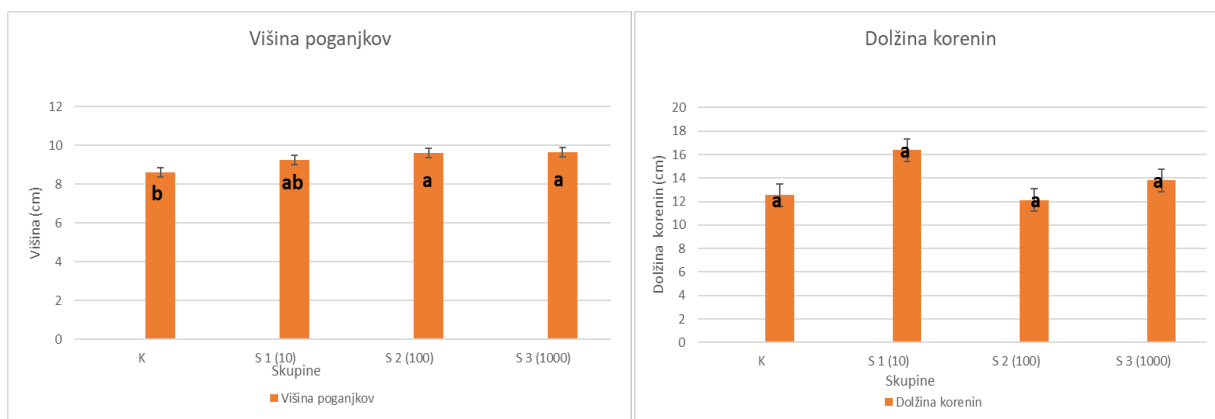
Pri analizi fotokemične učinkovitosti fotosistema II (FS) smo izmerili potencialno in dejansko fotokemično učinkovitost. Pri potencialni FS izmerimo maksimalno fotokemično učinkovitost rastline, medtem ko pri dejanski FS liste obsevamo z zunanjo svetlobo nato izmerimo dejansko vrednost FS. Rastline v času okoljskega stresa zmanjšajo FS učinkovitost, zato nas je zanimalo ali povišane koncentracije bakra v tleh zmanjšajo FS učinkovitost. Rezultati meritev so podani v tabeli 1.

**Tabela 1:** Izmerjena fotokemična aktivnost vseh 4. poskusnih skupin.

SKUPINA	DEJANSKA FS AKTIVNOST	ANOVA	POTENCIALNA FS AKTIVNOST	ANOVA
K	0.68	a	0.75	a
S 1 (10)	0.75	a	0.78	a
S 2 (100)	0.68	a	0.77	a
S 3 (1000)	0.71	a	0.74	a

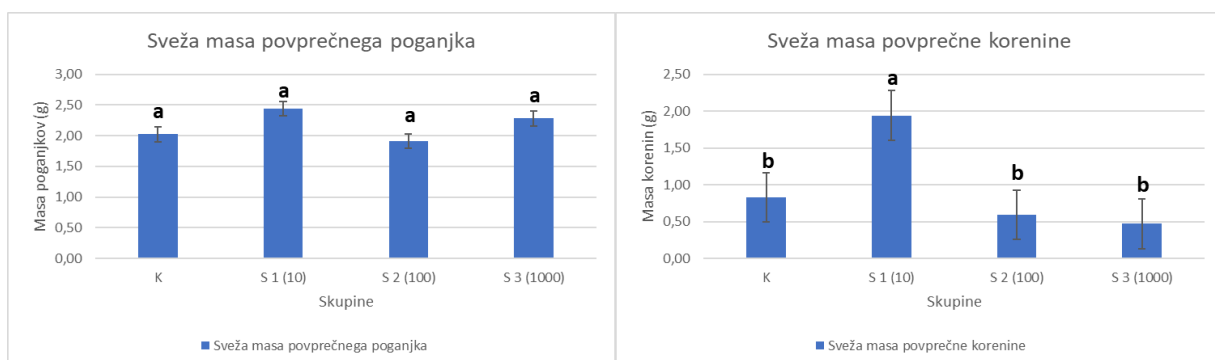
V rezultatih izmerjenih potencialnih in dejanskih FS ni bilo statistično značilnih razlik. Posamezne črke (a, b) prikazujejo statistične razlike med posameznimi skupinami (enosmerna ANOVA, Tukeyev post hoc test,  $p < 0,05$ ). Tudi iz podatkov tabele je razvidno, da se izmerjene vrednosti opazno ne razlikujejo.

Na sliki 1 lahko opazimo, da se kontrolna skupina statistično signifikantno razlikuje v višini poganjkov v primerjavi z ostalimi skupinami. Zanimivo je da, najslabše raste kontrolna skupina kumar (8,6 cm) in najboljše skupini S2 (100) in S3 (1000), katerih povprečna rast je bila 9,6 cm. Pri dolžini korenin ni bilo statistično značilnih razlik.



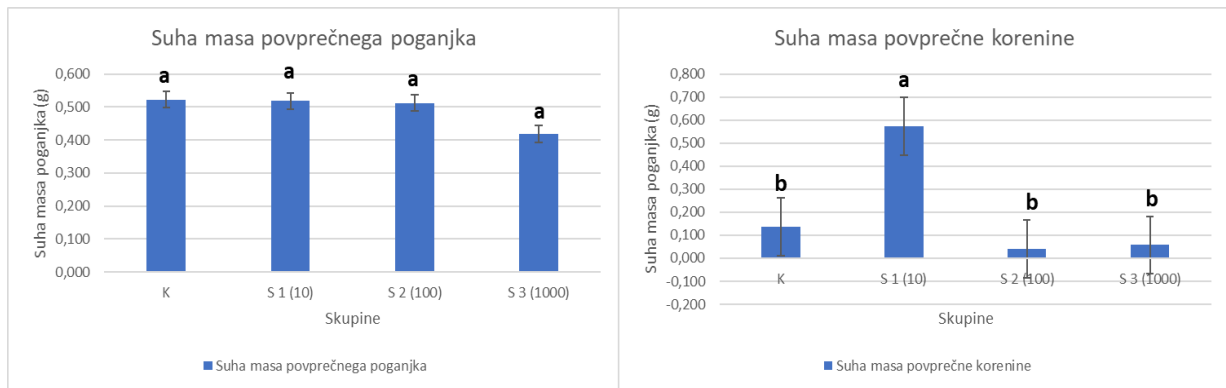
**Slika 1:** Višina poganjkov in korenin. Posamezne črke (a, b, ab) prikazujejo statistične razlike med posameznimi skupinami,  $n=3$  (enosmerna ANOVA, Tukeyev post hoc test,  $p < 0,05$ ).

Pri analizi razlike povprečnih svežih mas poganjkov ni bilo statistično značilnih razlik. Povprečna masa vseh predstavnikov skupin je okoli 2g. Pri analizi povprečne sveže mase korenin pa smo zaznali statistično značilno razliko. Skupina 1 (10) je imela največjo povprečno maso 1,94 g medtem ko so se sveže mase ostalih skupin nahajale v intervalu od 0,5-0,8g.



**Slika 2:** Sveža masa poganjkov in korenin. Posamezne črke (a, b, ab) prikazujejo statistične razlike med posameznimi skupinami,  $n=3$  (enosmerna ANOVA, Tukeyev post hoc test,  $p < 0,05$ ).

Pri analizi razlike suhih mas povprečnih poganjkov ni bilo statistično značilnih razlik. Povprečna masa vseh predstavnikov skupin je bila okoli 0,5g. Pri analizi sveže mase povprečne korenine pa smo zaznali statistično značilno razliko. Skupina 1 (10) je imela največjo povprečno suho maso 0,573g medtem ko so se suhe mase ostalih skupin nahajale v intervalu od 0,137-0,035g .



**Slika 3:** Suha masa poganjkov in korenin. Posamezne črke (a, b, ab) prikazujejo statistične razlike med posameznimi skupinami,  $n=3$  (enosmerna ANOVA, Tukeyev post hoc test,  $p < 0,05$ ).

## Razprava

V rezultatih analize našega poskusa smo dobili nepričakovane rezultate. Statistično značilen rezultat iz katerega bi lahko nekaj sklepali je višina poganjkov rastline. Najbolje rasteta S2 (100) in S3 (1000), najslabše pa raste kontrolna skupina. Eden od možnih razlag, ki bi lahko povzročile slabšo rast, je pomanjkanje bakra v substratu. Po pregledu literature smo ugotovili, da so bile kumare izpostavljene bakru prekrajno časovno obdobje, hkrati pa nismo uspeli zagotoviti stalne koncentracije bakra v substratu, zaradi odtekanja bakrove raztopine (Zheng in sod., 2010). Zheng in sodelavci so znake zastrupitve opazili šele po desetih tednih obravnavanja s bakrom (zmanjšanje površine listov, suhe teže stebela in listov), po treh tednih obravnavanja značilnih razlik s kontrolo ni bilo. Menjali so tudi hranilno raztopino z bakrom dvakrat na teden, tako da so zagotavljali čim bolj stalno koncentracijo bakra.

Verjetno je, da je k rezultatom naše raziskave pripomogla tudi človeška napaka, kot so napake pri zalivanju. Prav tako vse možne napake pri meritvah, kot so napake pri tehtanju svežih ter suhih mas poganjkov in korenin (odbirali in merili smo štirje študenti - razlike).

## Zaključki

Rezultati naše raziskave so bili večinoma statistično neznačilni in smo tako težko prišli do zaključkov. Našo hipotezo, da večja kot bo koncentracija bakra, nižja bo fotokemična učinkovitost fotosistema II in slabša rast rastline smo zavrgli na podlagi statistično neznačilnih rezultatov oz. po samih standardnih odklonih naših meritev.

Če bi poskus delali še enkrat, bi rastline izpostavili za dlje časa, prav tako bi uvajali baker v manjših koncentracijah ter tako dosegli kronično zastrupitev rastlin. Prav tako bi po nekem časovnem obdobju rastline prenesli v večje posode za večjo rast korenin rastlin. Tudi možno je, da so v našem poskusu raztopine bakra s katerimi smo zalivali odtekale in se na skupnem podstavku tudi mešale. To bi lahko preprečili, z prostorsko bolj ločenimi gojitvenimi pogoji ali pa z izbiro drugačnih medijev (hidroponika).

## Literatura

- Baker AJM, McGrath SP, Sidoli CMD, Reeves RD (1994) The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plants. *Resour Conserv Recycling* 11: 41–49
- Brooks RR, Lee J, Reeves RD, Jaffre T (1977) Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium species of indicator plants. *J Geochem Explor* 7: 49–57
- Cedeno-Maldonado A, Swader JA, Heath RL (1972) The cupric ion as an inhibitor of photosynthetic electron transport in isolated chloroplasts. *Plant Physiol* 50: 698–701
- Chu CC, Lee WC, Guo WY, Pan SM, Chen LJ, Li HM, Jinn TL (2005) A copper chaperone for superoxide dismutase that confers three types of copper/zinc superoxide dismutase activity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 2005;139:425–436.
- Gallagher DL, Johnston KM, Dietrich AM (2001) Fate and transport of copper-based crop protectants in plasticulture runoff and the impact of sedimentation as a best management practice. *Water Res* 35: 2984–2994
- Küpper H, Küpper F, Spiller M (1996) Environmental relevance of heavy metal substituted chlorophylls using the example of water plants. *J Exp Bot* 47: 259–266
- Lane TW, Morel FMM (2000) A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4627–4631
- McGrath SP, Zhao FJ (2003) Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Curr Opin Biotechnol* 14: 277–282
- Merchant S, Hill K, Howe G. Dynamic interplay between two copper-titrating components in the transcriptional regulation of *cyt c6*. *EMBO J*. 1991;10:1383–1389.
- Merkel T.H., Pehkonen S.O. General corrosion of copper in domestic drinking water installations: Scientific background and mechanistic understanding. *Corros. Eng. Sci. Technol*. 2006;41:21–37. doi: 10.1179/174327806X94009.
- Prasad MNV, Hagemeyer J, editors (1999) *Heavy Metal Stress in Plants: From Molecules to Ecosystems*. Springer, Berlin
- Sancenon V, Puig S, Mira H, Thiele DJ, Penarrubia L. Identification of a copper transporter family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*. 2003;51:577–587.
- Shikanai T, Müller-Moulé P, Munekage Y, Niyogi KK, Pilon M. PAA1, a P-type ATPase of *Arabidopsis*, functions in copper transport in chloroplasts. *Plant Cell*. 2003;15:1333–1346.
- Yamasaki H, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Kobayashi Y, Shikanai T, Pilon M. Regulation of copper homeostasis by micro-RNA in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*. 2007;282:16369–16378.
- Zhong, Z.; Lee, H.; Kang, D.; Kwon, S.; Choi, Y. M.; Kim, I.; Kim, K. Y.; Lee, Y.; Woo, K.; Moon, J. Continuous Patterning of Copper Nanowire-Based Transparent Conducting Electrodes for Use in Flexible Electronic Applications. *ACS Nano* 2016, 10, 7847– 7854, DOI: 10.1021/acsnano.6b03626



# VPLIV CINKA NA RAST IN RAZVOJ KORUZE

Urška Jerič, Pia Kokelj, Tanita Kranjc, Jure Ličen, Nuša Likar

## Izvelek

Namen raziskovalnega dela je bil ugotoviti in izmeriti fiziološki odziv koruze na povišano koncentracijo cinka, prisotnega v različnih koncentracijah v deionizirani vodi, s katero smo zalivali testirano rastlino, tj. koruzo, pod stalnimi ravnimi pogoji v rastni komori. Za preverjanje fiziološkega odziva koruze smo uporabili naslednje metode: zalivanje, merjenje fotokemične učinkovitosti fotosistema II, merjenje dolžine mladih poganjkov in korenin in določanje sveže in suhe biomase mladih poganjkov in korenin. Ugotovili smo, da uporabljene koncentracije cinka niso imele statistično značilnega vpliva na fotokemično učinkovitost fotosistema II in morfologijo rastlin, saj se obravnavane rastline niso razlikovale od kontrolnih.

**Ključne besede:** kovine, cink, koruza, fotokemična učinkovitost, poganjki, korenine

## Uvod

Kovine so naravno prisotni kemijski elementi, ki jih najdemo v atmosferi in po vsej zemeljski površini. Kovine so naravno prisotni kemijski elementi, ki jih najdemo v atmosferi in po vsej zemeljski površini (Sharma et al. 2022). V zadnjih nekaj letih pa se povečuje globalna skrb za javno zdravje, povezana z onesnaževanjem okolja s kovinami v presežnih oz. prekomernih koncentracijah. Poleg tega se je izpostavljenost ne samo ljudi, temveč tudi živali in rastlin tem kovinam drastično povečala zaradi eksponentnega povečanja njihove uporabe v več industrijskih, kmetijskih, tehnoloških in domačih aplikacijah (Tchounwou et al. 2014).

Veliko študij sicer dokazuje, da so kovine, kot so kobalt, baker, železo, magnezij, mangan, molibden, nikelj in cink, poglavita mikrohranila, ki so potrebna za različne biokemične in fiziološke funkcije rastlin. So pomembni kofaktorji več ključnih encimov in igrajo pomembno vlogo pri različnih oksidacijsko-redukcijskih reakcijah. Neustrezna oskrba s temi mikrohranili pa lahko povzroči različna bolezenska stanja rastlin ob povišani koncentraciji ali sindrome pomanjkanja ob prenizki koncentraciji (Tchounwou et al. 2014).

Zaradi toksičnega obnašanja nekaterih kovin lahko te bistveno vplivajo na fotosintezo, antioksidativne sisteme, stanje mineralne prehranske vrednosti in endogeni status signalnih molekul, kot so fitohormoni, kar vodi do škodljivih učinkov na rast, razvoj in skupni pridelek rastlin, zaradi kopičenja tekom prehranjevalne verige v procesu biomagnifikacije pa neposredno vodi v izrazite negativne vplive na zdravje živali in ljudi (Sharma et al. 2022). V bioloških sistemih kovine v presežku vplivajo na celične organele in komponente, kot so celična membrana, mitohondriji, lizosomi, endoplazmatski retikulum, jedra in nekateri encimi, ki sodelujejo pri presnovi, razstrupljanju in popravljanju znotrajceličnih poškodb. Ugotovljeno je bilo, da kovinski ioni medsebojno delujejo s celičnimi komponentami, kot so DNA in jedrni proteini, kar povzroča poškodbe DNA in konformacijske spremembe, ki lahko vodijo do modulacije celičnega cikla, karcinogeneze ali apoptoze (Tchounwou et al. 2014).

Rastline so tekom evolucije razvile kompleksne mehanizme za premagovanje biotskega in abiotskega stresa. Na stres zaradi prisotnosti presežka kovin se odzovejo z ustreznimi stresnimi odgovori; to so mehanizmi privzema (akumulacije), transporta, signalizacije, kelacije z drugimi organskimi molekulami in razvoj tolerance. Po rastlinskem privzemu kovin se medcelično signaliziranje posreduje prek različnih signalnih poti, ki vključujejo regulacijo različnih hormonov, spremembo ravni kalcija in aktivacijo z mitogenom aktiviranih proteinskih kinaz. Stresni signali, ki so posledica presežka kovin, z

različnimi vmesnimi molekulami aktivirajo različne transkripcijske faktorje, kar sproži izražanje različnih antioksidativnih encimov, ki nato lovijo različne reaktivne kisikove spojine, kar sčasoma privede do odpornosti rastlin na stres (Kaur et al. 2021).

Medtem ko so nekatere kovine strupene že v zelo nizkih koncentracijah, so druge v majhnih količinah potrebne in imajo pomembne fiziološke funkcije (AbdElgawad et al. 2020). Cink (Zn) je esencialen mineral tako za rastline kot živali in ljudi, saj je vključen v precejšnji del celičnega metabolizma in sodeluje pri uravnavanju različnih biokemičnih in fizioloških procesov. Pri ljudeh je potreben za katalitično aktivnost več sto encimov in ima pomembno vlogo pri krepitvi imunskega sistema, sintezi proteinov in DNA, celjenju ran ter celični signalizaciji in delitvi. Podpira tudi rast in razvoj med nosečnostjo, pri novorojenčkih, v otroštvu in v adolescenci (National Institutes of Health, Office of Dietary Supplements 2022).

Koruza (*Zea mays* L.) je druga najpogosteje pridelovana rastlina na svetu in je zelo odzivna na vsebnost cinka, tako na njegovo pomanjkanje kot tudi na presežek (Liu et al. 2020). Cink je v koruzi esencialen pri proizvodnji avksinov, kot je indolocetna kislina (IAA), ima ključno vlogo pri proizvodnji klorofila, presnovi ogljikovih hidratov in raztezanju celic, kar vpliva na velikost listov in zgodnji razvoj klasov. Ravno zaradi navedenih razlogov je za optimalno rast in velik pridelek potrebna stalna in optimalna oskrba s cinkom. Njegovo pomanjkanje pomembno vpliva na pridelek koruze, saj je cink mikrohranilo, ki je pri koruzi najpogosteje v pomanjkanju (BRANDT 2019).

Tako kot pomanjkanje, je tudi prekomerno kopičenje cinka v rastlinskem citosolu škodljivo za rastline, zato se ta takoj ob privzemu prenese v celične vakuole, iz katerih se lahko nato sprošča ob njegovem pomanjkanju (Clemens in Ma 2016). Prekomerne ravni cinka povzročajo zaviranje rasti in razvoja rastlin, zvijanje listov, kloroze in nekroze konic listov (Reichman 2002). Poleg tega lahko povišane koncentracije cinka in posledična toksičnost povzročijo blokado elementov ksilema, zavirajo fotosintezo zaradi spremembe v transportu elektronov in hkrati sposobnosti encima RuBisCO za fiksiranje ogljikovega dioksida. V nekaterih študijah opažajo tudi vidne poškodbe koreninskih kortikalnih celic, zmanjšano hitrost rasti in nižjo biomaso rastlin zaradi zaviranja celičnih delitev. Poleg omenjenega povišane koncentracije cinka povzročijo večje kopičenje le-tega v zrnih, kar je v agrokulturi in kmetijstvu problematično predvsem za končne porabnike, tako živali kot tudi ljudi (Abedi et al. 2022).

## Cilji

Naš osrednji cilj je bil s pomočjo fiziološkega stanja koruze ugotoviti in izmeriti vpliv povišane koncentracije cinka, prisotnega v različnih koncentracijah v deionizirani vodi za zalivanje testiranih rastlin, na fiziološki odziv oz. rast in razvoj koruze. Želeli smo določiti, pri kateri koncentraciji cinka prične povišana vsebnost te kovine negativno vplivati na rast in razvoj koruze ter kvantitativno in kvalitativno s pomočjo morfoloških parametrov določiti fiziološki odziv testiranih rastlin.

## Hipoteze

H1: Z višanjem koncentracije cinka v deionizirani vodi za zalivanje (10 mg/L, 100 mg/L in 1000 mg/L) se bosta nižali tako potencialna kot dejanska fotokemična učinkovitost.

H2: Z višanjem koncentracije cinka v deionizirani vodi za zalivanje (10 mg/L, 100 mg/L in 1000 mg/L) se bosta dolžini poganjkov in korenin krajšali.

H3: Z višanjem koncentracije cinka v deionizirani vodi za zalivanje (10 mg/L, 100 mg/L in 1000 mg/L) se bosta sveža in suha biomasa poganjkov in korenin manjšali. (al. 2014).

## Metode in materiali

### Zasnova poskusa

Semena koruze smo posejali v substrat, ki smo ga predhodno pripravili iz zemlje za rože in vermikulita. Poskus smo izvedli v dvanajstih lončkih, v vsakega smo posejali pet semen koruze na globino 1 cm. Koruzo smo zalivali z različnimi koncentracijami cinka v obliki raztopine cinkovega klorida, za katerega smo predhodno pripravili založno raztopino s koncentracijo 1000 mg/L. Založno raztopino smo tekom raziskave redčili z deionizirano vodo na ustrezne koncentracije, in sicer 10 mg/L, 100 mg/L ter 1000 mg/L cinkovega klorida, uporabili pa smo tudi kontrolo, ki smo jo zalivali le z deionizirano vodo. Vsaka izmed naštetih obravnjav je vsebovala tri ponovitve. Lončke s semeni smo postavili v rastno komoro za pet tednov s 16/8-urnim ciklom svetlobe in teme in temperaturo 23/20 °C. Intenzivnost svetlobe je bila približno 250  $\mu\text{mol fotonov m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , relativna vlažnost pa 60 %.

### Zalivanje

Po sejanju smo vse obravnave rastlin enakomerno zalili z destilirano vodo, tako da se je substrat močno navlažil. Tekom pet-tedenske raziskave smo koruzo zalivali dvakrat tedensko s po 100 mL raztopine z ustreznimi koncentracijami cinka za vsako obravnavo.

### Merjenje fotokemične učinkovitosti

Po petih tednih smo izmerili fotokemično učinkovitost s fluorometrom (PAM-2500). Najprej smo izmerili dejansko fotokemično učinkovitost (Y), po 15-ih minutah aklimatizacije lista v temi (zatamnitev lista s sponko) pa smo izmerili še potencialno fotokemično učinkovitost (Fv/Fm). Meritve smo opravili na enem listu ene od rastlin vsakega lončka.

### Merjenje morfoloških parametrov – morfološka analiza

Po merjenju fotokemične učinkovitosti smo koruzo vzeli iz substrata. Poganjke smo ločili od koreninskega dela ter vsakemu posebej s pomočjo ravnila določili dolžino. Določili smo tudi njihovo svežo in suho biomaso. Svežo biomaso smo določili s tehtanjem poganjkov in korenin na dan podiranja poskusov, suho biomaso pa smo določili tako, da smo poganjke in korenine ločeno sušili v sušilniku na 60 °C za 3 dni, nato pa jih ponovno tehtali in dobili suho biomaso.

### Statistična analiza

Statistično analizo pridobljenih podatkov smo izvedli z uporabo programa Microsoft Excel (XL Toolbox). Izvedli smo enosmerno analizo variance ANOVA, pri čemer smo privzeli normalno porazdelitev podatkov, ter Bonferroni-Holm post hoc test. Uporabljena je bila stopnja značilnosti (p-vrednost) 0,05. Rezultate smo prikazali na grafih z uporabo programa Microsoft Excel (Microsoft Corporation, 2018).

Slika 1 prikazuje shematski prikaz izvedbe poskusa, izdelan v programu Biorender.



**Slika 1:** Shematski prikaz izvedbe poskusa (Biorender). Zasnova poskusa, kjer smo seme posejali, pripravili založno raztopino cinkovega klorida in postavili lončke s semeni v rastno komoro. Sledilo je pet-tedensko zalivanje z deionizirano vodo z dodatkom cinkovega klorida v koncentracijah 0 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL ter 1000 µg/mL. Po petih tednih smo izmerili fotokemično učinkovitost, podrli poskuse in z ravnilom izmerili dolžino poganjkov in korenin ter stehali njihovo svežo maso. Poganjke in korenine smo nato sušili na 60 °C za 3 dni in nato stehali še suho maso.

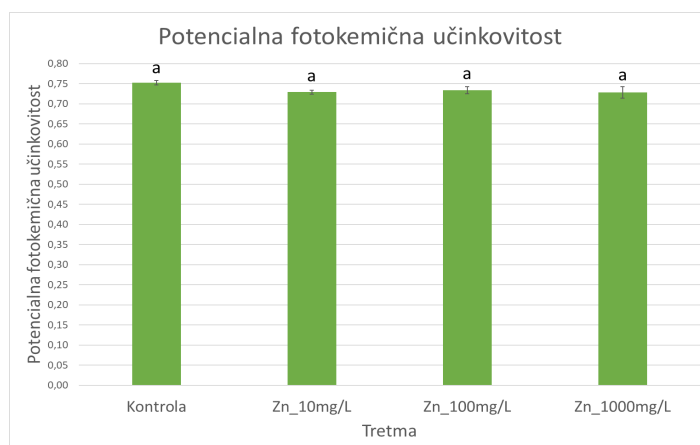
## Rezultati

### Fotokemična učinkovitost

Slika 2 in Slika 3 prikazujeta rezultate merjenja dejanske in potencialne fotokemične učinkovitosti fotosistema II pri kontrolnih rastlinah in rastlinah, zalivanih z različnimi koncentracijami cinka. Tako pri dejanski kot pri potencialni fotokemični učinkovitosti nismo zaznali statistično značilnih razlik med različnimi obravnavami.



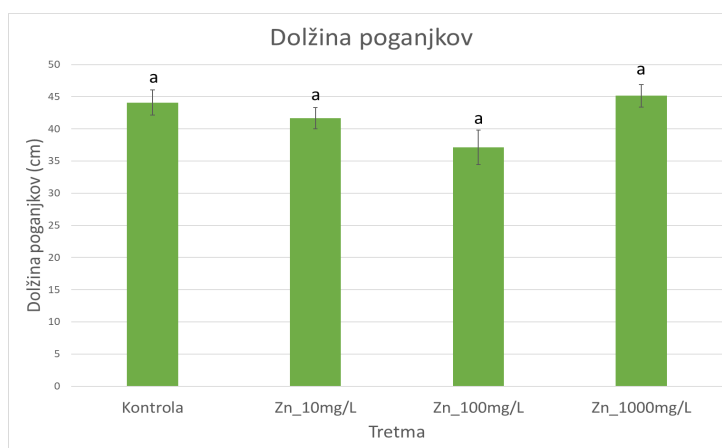
**Slika 2:** Izmerjena dejanska fotokemična učinkovitost fotosistema II koruze pri različnih obravnavah: zalivanje koruze z deionizirano vodo (Kontrola, n=3), z raztopino cinkovega klorida v koncentraciji 10 mg/L (Zn\_10mg/L, n=3), 100 mg/L (Zn\_100mg/L, n=3) in 1000 mg/L (Zn\_1000mg/L, n=3). Posamezen stolpec predstavlja povprečno vrednost meritev, interval napak je standardna napaka meritev. Enaka črka (a) nad vsakim stolpcem ponazarja, da med obravnavami ni statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm posthoc test,  $p < 0,05$ ).



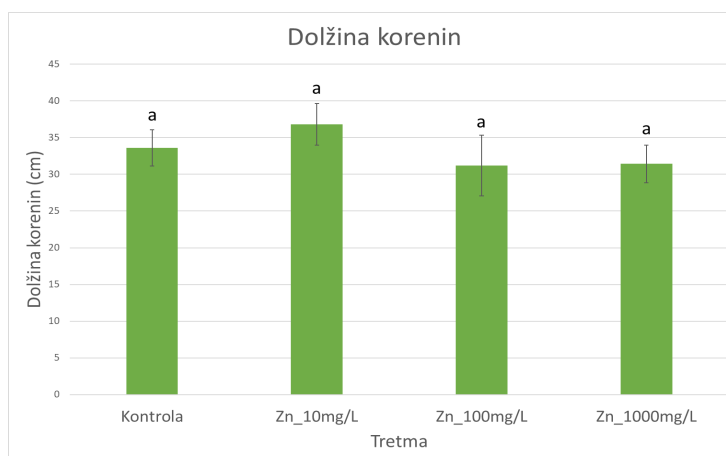
**Slika 3:** Izmerjena potencialna fotokemična učinkovitost fotosistema II koruze pri različnih obravnava: zalivanje koruze z deionizirano vodo (Kontrola, n=3), z raztopino cinkovega klorida v koncentraciji 10 mg/L (Zn\_10mg/L, n=3), 100 mg/L (Zn\_100mg/L, n=3) in 1000 mg/L (Zn\_1000mg/L, n=3). Posamezen stolpec predstavlja povprečno vrednost meritev, interval napak je standardna napaka meritev. Enaka črka (a) nad vsakim stolpcem ponazarja, da med obravnava ni statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm posthoc test,  $p < 0,05$ ).

### Dolžina poganjkov in korenin

Slika 4 in Slika 5 prikazujeta rezultate merjenja dolžine poganjkov in korenin pri kontrolnih rastlinah in rastlinah, zalivanih z različnimi koncentracijami cinka. V nobenem primeru nismo zaznali statistično značilnih razlik med različnimi obravnava.



**Slika 4:** Izmerjena dolžina poganjkov koruze pri različnih obravnava: zalivanje koruze z deionizirano vodo (Kontrola, n=13), z raztopino cinkovega klorida v koncentraciji 10 mg/L (Zn\_10mg/L, n=15), 100 mg/L (Zn\_100mg/L, n=14) in 1000 mg/L (Zn\_1000mg/L, n=14). Posamezen stolpec predstavlja povprečno vrednost meritev, interval napak je standardna napaka meritev. Enaka črka (a) nad vsakim stolpcem ponazarja, da med obravnava ni statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm posthoc test,  $p < 0,05$ ).

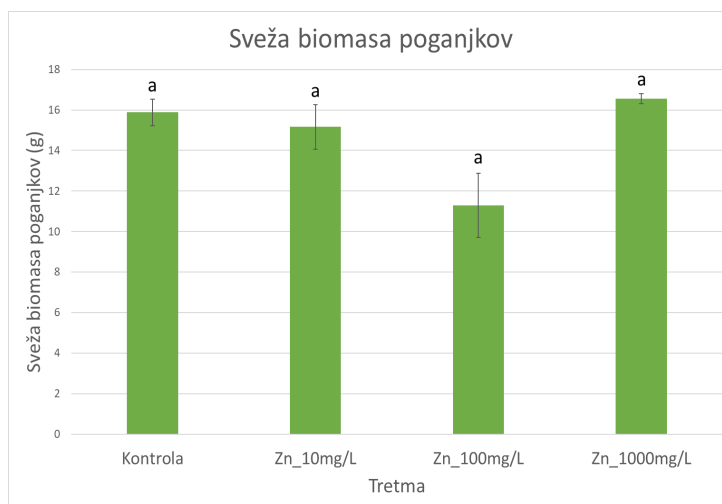


**Slika 5:** Izmerjena dolžina korenin koruze pri različnih obravnava: zalivanje koruze z deionizirano vodo (Kontrola, n=13), z raztopino cinkovega klorida v koncentraciji 10 mg/L (Zn\_10mg/L, n=15), 100 mg/L (Zn\_100mg/L, n=14) in 1000 mg/L (Zn\_1000mg/L, n=14). Posamezen stolpec predstavlja povprečno vrednost meritev, interval napak je standardna napaka meritev. Enaka črka (a) nad vsakim stolpcem ponazarja, da med obravnava ni statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm posthoc test,  $p < 0,05$ ).

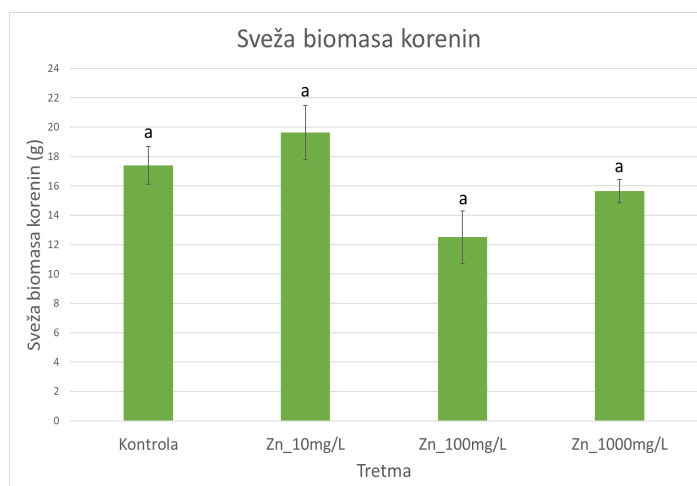
stolpcem ponazarja, da med obravnavami ni statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm posthoc test,  $p < 0,05$ ).

### Sveža in suha biomasa poganjkov in korenin

Slike 6-9 prikazujejo rezultate merjenja sveže in suhe biomase poganjkov in korenin kontrolnih rastlin in rastlin, zalivanih z različnimi koncentracijami cinka. V nobenem primeru nismo zaznali statistično značilnih razlik med različnimi obravnavami.

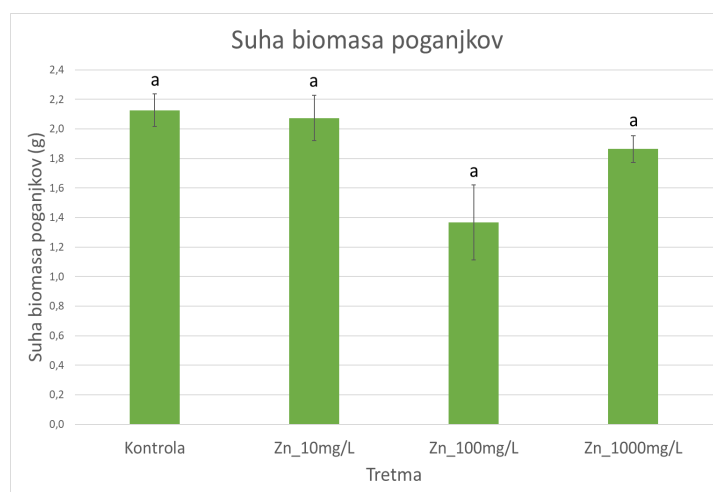


Slika 6: Izmerjena sveža biomasa poganjkov koruze pri različnih obravnavah: zalivanje koruze z deionizirano vodo (Kontrola,  $n=3$ ), z raztopino cinkovega klorida v koncentraciji 10 mg/L (Zn\_10mg/L,  $n=3$ ), 100 mg/L (Zn\_100mg/L,  $n=3$ ) in 1000 mg/L (Zn\_1000mg/L,  $n=3$ ). Posamezen stolpec predstavlja povprečno vrednost meritev, interval napak je standardna napaka meritev. Enaka črka (a) nad vsakim stolpcem ponazarja, da med obravnavami ni statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm posthoc test,  $p < 0,05$ ).

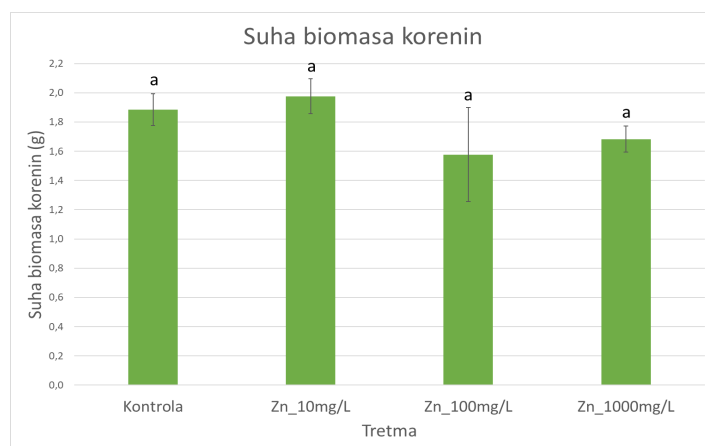


Slika 7: Izmerjena sveža biomasa korenin koruze pri različnih obravnavah: zalivanje koruze z deionizirano vodo (Kontrola,  $n=3$ ), z raztopino cinkovega klorida v koncentraciji 10 mg/L (Zn\_10mg/L,  $n=3$ ), 100 mg/L (Zn\_100mg/L,  $n=3$ ) in 1000 mg/L (Zn\_1000mg/L,  $n=3$ ). Posamezen stolpec predstavlja povprečno vrednost meritev, interval napak je standardna napaka meritev. Enaka črka (a) nad vsakim

stolpcem ponazarja, da med obravnavami ni statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm posthoc test,  $p < 0,05$ ).



**Slika 8:** Izmerjena suha biomasa poganjkov koruze pri različnih obravnavah: zalivanje koruze z deionizirano vodo (Kontrola,  $n=3$ ), z raztopino cinkovega klorida v koncentraciji 10 mg/L (Zn\_10mg/L,  $n=3$ ), 100 mg/L (Zn\_100mg/L,  $n=3$ ) in 1000 mg/L (Zn\_1000mg/L,  $n=3$ ). Posamezen stolpec predstavlja povprečno vrednost meritev, interval napak je standardna napaka meritev. Enaka črka (a) nad vsakim stolpcem ponazarja, da med obravnavami ni statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm posthoc test,  $p < 0,05$ ).



**Slika 9:** Izmerjena suha biomasa korenin koruze pri različnih obravnavah: zalivanje koruze z deionizirano vodo (Kontrola,  $n=3$ ), z raztopino cinkovega klorida v koncentraciji 10 mg/L (Zn\_10mg/L,  $n=3$ ), 100 mg/L (Zn\_100mg/L,  $n=3$ ) in 1000 mg/L (Zn\_1000mg/L,  $n=3$ ). Posamezen stolpec predstavlja povprečno vrednost meritev, interval napak je standardna napaka meritev. Enaka črka (a) nad vsakim stolpcem ponazarja, da med obravnavami ni statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm posthoc test,  $p < 0,05$ ).

## Razprava

Glede na literaturo, da prekomerne ravni cinka zavirajo fotosintezo zaradi spremembe v transportu elektronov in sposobnosti encima RuBisCO za fiksiranje ogljikovega dioksida (Abedi et al. 2022), smo pričakovali, da se bo fotokemična učinkovitost obravnavanih rastlin v primerjavi s kontrolnimi rastlinami zmanjšala. Kljub temu med kontrolnimi rastlinami in rastlinami, obravnavanimi z različnimi koncentracijami cinka, nismo zaznali statistično značilnih razlik niti pri dejanski niti potencialni fotokemični učinkovitosti.

Prav tako po končanem eksperimentu nismo zaznali statistično značilnih razlik v dolžini poganjkov in korenin med kontrolnimi rastlinami in rastlinami, obravnavanimi z različnimi koncentracijami cinka. Cink naj bi sicer glede na literaturo v presežnih koncentracijah vplival tako na rast korenin kot tudi na rast poganjkov koruze. Simptomi toksičnosti naj bi bili bolj očitni v poganjkih kot koreninah, saj naj bi cink spremenil morfologijo listnih rež, strukturo tilakoidnih membran in kloroplastov (Intorne et al. 2009). Souza et al. (2005) pa so v svoji raziskavi vrednotili vpliv  $ZnSO_4$  na rast koruze, kjer so semena kalili v zaviti papirnati brisači, prepojeni z raztopino hranil in 1 mM  $ZnSO_4$ . Ta koncentracija je glede na prejšnje raziskave (Souza in Rauser 2003) že predstavljala presežno koncentracijo cinka glede na podatke, pridobljene iz krivulje odziva na odmerek. Po osmih dneh pa so preverili rezultate in ugotovili, da med dolžino obravnavanih in kontrolnih korenin ni prišlo do značilnih razlik (Souza et al. 2005).

Do statistično značilnih razlik med kontrolnimi rastlinami in rastlinami, obravnavanimi z različnimi koncentracijami cinka, v našem primeru ni prišlo niti pri sveži in suhi biomasi poganjkov in korenin. Po drugi strani AbdElgawad et al. (2020) navajajo, da so v 21-dnevni raziskavi opazili vpliv povišanih koncentracij cinkovega klorida na suho in svežo maso obravnavanih rastlin koruze. Ob tem dodajajo, da so največjo razliko v suhi masi opazili pri starejših listih in koreninah, kjer omenjajo, da je razlog za zmanjšanje mase povišanje akumulacije cinka, ki naj bi povzročal njihov propad (AbdElgawad et al. 2020).

Najverjetnejša razlaga za statistično neznačilne rezultate pri vseh meritvah v naši raziskavi se po našem mnenju navezuje na uporabljene koncentracije cinka in način obravnavanja rastlin koruze. Pri pregledu literature smo namreč našli podatek, da naj bi bila priporočena vsebnost cinka v tleh med 1,8 in 3,5 ppm (George 2018). Količina suhe mase koruze naj bi se povečevala z večanjem vsebnosti cinka v prsti do vrednosti 3,3 ppm. Nato naj bi količina suhe mase ostajala praktično konstantna z večanjem vsebnosti cinka v prsti do 11 ppm, zatem pa naj bi se začela nižati in pri vsebnosti 15,9 ppm cinka v prsti naj bi bila rast koruze okrnjena in omejena (Takkar in Mann 1978). Pri interpretaciji naših dobljenih rezultatov in primerjavi le-teh z literaturnimi podatki se moramo sicer zavedati dejstva, da večina strokovne literature torej navaja koncentracijo cinka v tleh, v našem poskusu pa smo imeli izmerjeno le koncentracijo cinka v raztopini za zalivanje koruze. Ker ne moremo z gotovostjo vedeti, kolikšen del cinka iz raztopine se je izpral iz lončka na pladenj in kolikšen del se je dejansko obdržal v ristem substratu, je neposredna primerjava z literaturnimi podatki nemogoča, kar dodatno oteži poglobljeno interpretacijo naših rezultatov. Ena od možnih razlag, da med kontrolnimi in obravnavanimi rastlinami ni bilo zaznanih statistično značilnih razlik, bi lahko bila uporaba prenizkih koncentracij cinka v raztopini za zalivanje. To bi posledično lahko pomenilo, da z zalivanjem nismo presegli zgornje meje optimalnega območja koncentracije cinka v substratu, torej nismo vstopili v območje strupenosti. Obenem je možnost tudi, da je bil uporabljen začetni substrat reven z mikrohranili, kar bi dodatno vplivalo na to, da z zalivanjem koruze s cinkovo raztopino nismo presegli zgornje kritične vsebnosti cinka v substratu, posledično pa se niso kazali nobeni toksični efekti na rast koruze. Za potrditev te razlage bi bilo potrebno izvesti dodatne poskuse.

Na privzem cinka oz. njegovo biološko dosegljivost vplivajo tudi sami pogoji v tleh, kot so pH, vsebnost organskih snovi in gline, kapaciteta kationske izmenjave in tekstura tal (Abedi et al. 2022). Na privzem negativno vplivajo tla z manj organske snovi, višjimi ravnmi fosforja in visokim pH (BRANDT 2019), pri čemer bi moral ta biti za najboljšo absorpcijo cinka med 5 in 6,5 (Leštan et al. 2010). Omenjeni



faktorji v substratu bi prav tako lahko vodili do manjšega privzema cinka, posledično pa manjše toksičnosti in statistično neznačilnih rezultatov.

Razlog za statistično neznačilne rezultate bi lahko bile tudi same tehnične napake pri izvedbi poskusa, na primer napake pri tehtanju sveže mase korenin, saj ob nezadostnem spiranju po odvzemu rastlin iz substrata ob koreninah lahko ostane tudi nekaj substrata, ta pa posledično lahko prispeva k lažno višji izmerjeni masi korenin in posledično statistično neznačilnih razlik med obravnavami.

Po pregledu literature lahko torej predlagamo naslednje izboljšave izvedbe poskusa: uporaba višjih koncentracij cinka v deionizirani vodi za zalivanje, predhodno dodajanje cinka direktno v zemljo namesto zalivanja, merjenje pH zemlje in koncentracij cinka v kombinaciji z ostalimi mikrohranili v substratu ter merjenje količine cinka v samih koreninah in poganjkih rastlin.

Poleg tega bi za bolj zanesljive rezultate lahko izvajali več hkratnih tehničnih ponovitev, rastline pod omenjenimi pogoji pa gojili dlje časa, saj bi bil učinek čez čas morda bolj opazen. Pomembna tehnična izboljšava bi lahko bila tudi povsem enakomerna osvetlitev vseh testiranih rastlin v rastni komori, saj smo tekom zasnove poskusa že v prvem tednu opazili razlike v rasti posameznih rastlin, čeprav so bile vse zalite le z destilirano vodo.

## **Zaključki**

Cink je esencialen mikroelement, ki pri rastlinah povzroča tako simptome pomanjkanja ob prenizki koncentraciji kot simptome toksičnosti ob previsoki koncentraciji (Liu et al. 2020). Kljub domnevi, da bomo z dodajanjem cinka v povišanih koncentracijah vplivali na fiziološki odziv koruze, zaradi trenutno nepojasnjenih razlogov nismo po analizi rezultatov pri nobeni od izvedenih meritev zaznali statistično značilnih razlik med kontrolnimi in obravnavanimi rastlinami, posledično pa ne moremo potrditi nobene od zastavljenih hipotez. V razpravi smo diskutirali o več možnih razlogih in hkrati predlagali izboljšave, ki bodo v nadaljnjih raziskavah lahko pripomogle k boljšemu razumevanju dobljenih rezultatov.

## **Literatura**

- AbdElgawad H, Zinta G, Hamed BA, et al (2020) Maize roots and shoots show distinct profiles of oxidative stress and antioxidant defense under heavy metal toxicity. *Environmental Pollution* 258:113705. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113705>
- Abedi T, Gavanji S, Mojiri A (2022) Lead and Zinc Uptake and Toxicity in Maize and Their Management. *Plants* 11:1922. <https://doi.org/10.3390/plants11151922>
- BRANDT (2019) Zinc at Plant on Corn. In: Info to grow. <https://brandt.co/zinc-at-plant-on-corn/>. (dostopano 13. junij 2023)
- Clemens S, Ma JF (2016) Toxic Heavy Metal and Metalloid Accumulation in Crop Plants and Foods. *Annual Review of Plant Biology* 67:489–512. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-112301>
- George A (2018) Micronutrient Focus: Zinc. In: Ag PhD Newsletter. <https://agphd.com/ag-phd-newsletter/micronutrient-focus-zinc/>. Accessed 13 Jun 2023
- Intorne AC, de Oliveira MVV, Lima ML, et al (2009) Identification and characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc. *Arch Microbiol* 191:477–483. <https://doi.org/10.1007/s00203-009-0472-0>

- Kaur R, Das S, Bansal S, et al (2021) Heavy metal stress in rice: Uptake, transport, signaling, and tolerance mechanisms. *Physiol Plant* 173:430–448. <https://doi.org/10.1111/ppl.13491>
- Leštan D, Grčman H, Zupan M, Bačac N (2003) Relationship of Soil Properties to Fractionation of Pb and Zn in Soil and Their Uptake into *Plantago lanceolata*. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal* 12:507–522. <https://doi.org/10.1080/713610986>
- Liu D-Y, Zhang W, Liu Y-M, et al (2020) Soil Application of Zinc Fertilizer Increases Maize Yield by Enhancing the Kernel Number and Kernel Weight of Inferior Grains. *Frontiers in Plant Science* 11:188. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00188>
- National Institutes of Health, Office of Dietary Supplements (2022) Zinc - Fact Sheet for Health Professionals. In: *Dietary Supplement Fact Sheets*. <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Zinc-HealthProfessional/>. (dostopano 13. junij 2023)
- Reichman S (2002) The Responses of Plants to Metal Toxicity: A review focusing on Copper, Manganese and Zinc. Australian Minerals & Energy Environment Foundation, Melbourne, Australia
- Sharma A, Kapoor D, Gautam S, et al (2022) Heavy metal induced regulation of plant biology: Recent insights. *Physiologia Plantarum* 174:e13688. <https://doi.org/10.1111/ppl.13688>
- Souza JF, Dolder H, Cortelazzo AL (2005) Effect of Excess Cadmium and Zinc Ions on Roots and Shoots of Maize Seedlings. *Journal of Plant Nutrition* 28:1923–1931. <https://doi.org/10.1080/01904160500310435>
- Souza JF, Rauser WE (2003) Maize and radish sequester excess cadmium and zinc in different ways. *Plant Science* 165:1009–1022. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00289-9](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00289-9)
- Takkar PN, Mann MS (1978) Toxic levels of soil and plant zinc for maize and wheat. *Plant and Soil* 49:667–669. <https://doi.org/10.1007/BF02183293>
- Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ (2012) Heavy Metals Toxicity and the Environment. *EXS* 101:133–164. [https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6)

# VPLIV CINKA NA RAST IN RAZVOJ KUMARE

Sara Stopar, Neža Škoda, Lara Šušmelj, Eva Žejn, Sara Žitko

## Izvleček

Namen dela je bil preučiti vpliv različnih koncentracij cinka v raztopini, s katero smo zalivali kumare. Izmerili smo potencialno in dejansko fotokemično učinkovitost fotosistema II, dolžino poganjkov in korenin ter določili svežo in suho biomaso poganjkov in korenin. Rezultati niso dali statistično značilnih razlik.

**Ključne besede:** kumare, cink, strupenost

## Uvod

Cink (Zn) je esencialna prehodna kovina v vseh živih organizmih, v katerih opravlja pomembne funkcije. V rastlinskem svetu ima pomembno vlogo pri razvoju in razmnoževanju rastlin, njihovi signalizaciji ter je kofaktor encimov, kot so karbonska anhidraza, karboksipeptidaza in Zn-superoksid dismutaza. Optimalna koncentracija cinka za rast večine rastlin je med 15 in 20 mg kg<sup>-1</sup> (Balafrej et al., 2020; International Zinc Association), nekateri viri navajajo tudi drugačne koncentracije, npr. 20 – 60 mg kg<sup>-1</sup> suhe snovi (Natasha et al., 2022). Za višje rastline so glavni vir cinka tla. Privzamejo ga lahko s pomočjo korenin preko Zn transporterjev in jih prenesejo v nadzemne dele rastline. Pomanjkanje cinka se pri rastlinah kaže v obliki listnih kloroz in okrnjeni rasti rastline, poleg tega pa se poveča količina reaktivnih kisikovih spojin (ang. reactive oxygen species – ROS) in zmanjša sinteza proteinov, prevodnost listnih rež ter fotosinteza in njena učinkovitost (Bityutskii in sod., 2023). Cinka je v tleh lahko tudi preveč, kar je lahko nevarno tako za rastline, kot tudi za živali in ljudi. V rastlinah se toksičnost poveča z njegovo dostopnostjo, ki pa je odvisna od organske snovi, koreninskih eksudatov, pH in mikrobnih skupnosti (Balafrej et al., 2020). Izpostavljenost visokim koncentracijam cinka lahko vodi do zmanjšanja rasti in vsebnosti pigmentov ter motenj v aktivnosti encimov. Med drugim je omejena fotosinteza, saj lahko inhibira aktivnost encima Rubisco zaradi kompeticije z magnezijem. Zmanjša lahko prevodnost listnih rež in tako vsebnost CO<sub>2</sub>. V tilakoidni membrani lahko cink zamenja mangan in negativno vpliva na učinkovitost PSII. Kot že omenjeno, cink tekmuje z magnezijem, pa tudi z železom in tako privede do njihovega pomanjkanja, kar se kaže v klorozah, ali pa tekmuje s fosforjem in tako zmanjša njegovo koncentracijo, kar se kaže v vijoličastih listih. Na sploh lahko prevelike vsebnosti cinka omejijo rast in razvoj rastline (Natasha et al., 2022).

Z našo raziskavo smo želeli ugotoviti, kako se kumara (*Cucumis sativus* L.), kmetijsko pomembna rastlinska vrsta, odzove na različne koncentracije cinka v substratu. Z uporabo različnih metod in meritev smo preverili, kako povišana koncentracija cinka vpliva na rast in razvoj rastline ter njeno fotokemično učinkovitost.

Postavili smo si tri hipoteze:

- Kumare, zalivane z najvišjo koncentracijo cinkovega klorida, bodo imele najmanjše poganjke in korenine.
- Kumare, zalivane z najvišjo koncentracijo cinkovega klorida, bodo imele najbolj zmanjšano fotokemično učinkovitost fotosistema II.
- Kumare, zalivane z najvišjo koncentracijo cinkovega klorida, bodo imele najmanjšo svežo in suho biomaso poganjkov in korenin.

## Metode in materiali

### Materiali

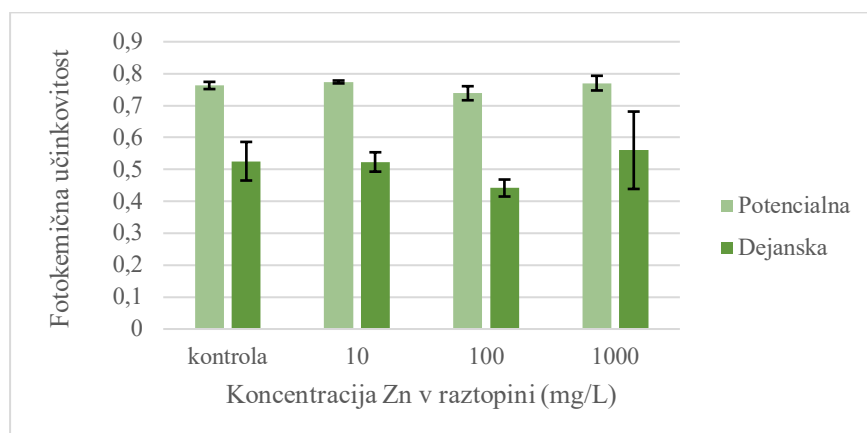
Poskus smo izvedli tako, da smo rastline kumare zalivali z različnimi koncentracijami raztopine cinkovega klorida ( $ZnCl_2$ ): 10 mg/L, 100 mg/L ter 1000 mg/L. Vsako obravnavo smo imeli v treh ponovitvah, v katere smo posejali po pet semen kumare. Skupaj s kontrolo, kjer smo zalivali le z destilirano vodo, smo torej imeli 12 lončkov. Rastline smo z isto količino tekočine (100 mL), le z drugimi koncentracijami zalivali pet tednov, dvakrat na teden. Ker nam niso vsa semena skalila, smo v drugem tednu zalivanja izenačili število rastlin na lonček, tako da so bile v vsaki ponovitvi po tri.

### Metode

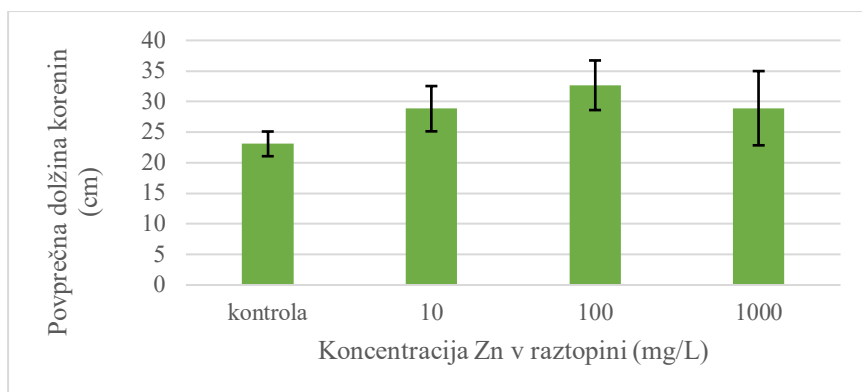
Po petih tednih smo izmerili potencialno in dejansko fotokemično učinkovitost ( $F_v/F_m$ ) s fluorometrom (PAM-2100, Portable Chlorophyll Fluorometer) in poskuse podrli, izmerili dolžine korenin in poganjkov rastlin ter jih stehali. Tako smo dobili svežo biomaso korenin in poganjkov, ki smo jo posušili in po enem tednu ponovno stehali ter dobili suho biomaso. Rezultate smo statistično obdelali s pomočjo analize variance ANOVA v programu Microsoft Excel.

## Rezultati

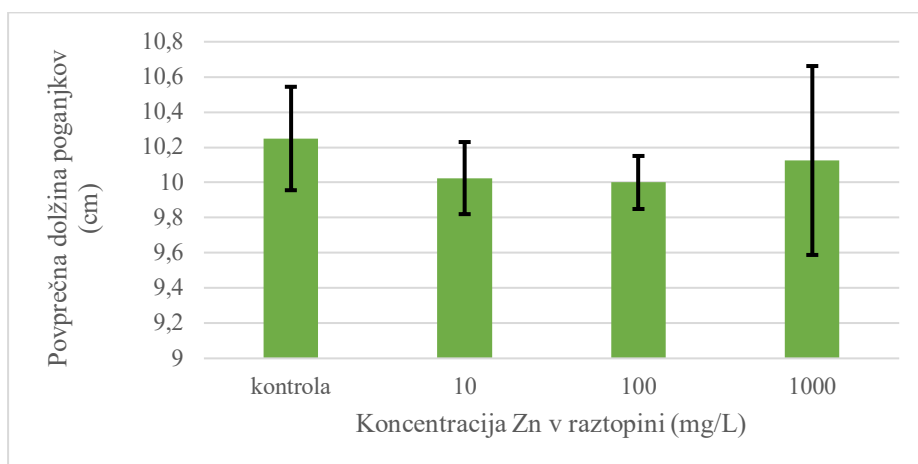
Po Meritve fotokemične učinkovitosti (Slika 1), povprečne dolžine korenin (Slika 2) in poganjkov (Slika 3) ter določanje sveže biomase (Slika 4) in suhe biomase (Slika 5) niso pokazale statistično značilnih razlik med različnimi obravnavami. Ob vsakem zalivanju smo zajeli fotografijo (Sliki 6 in 7).



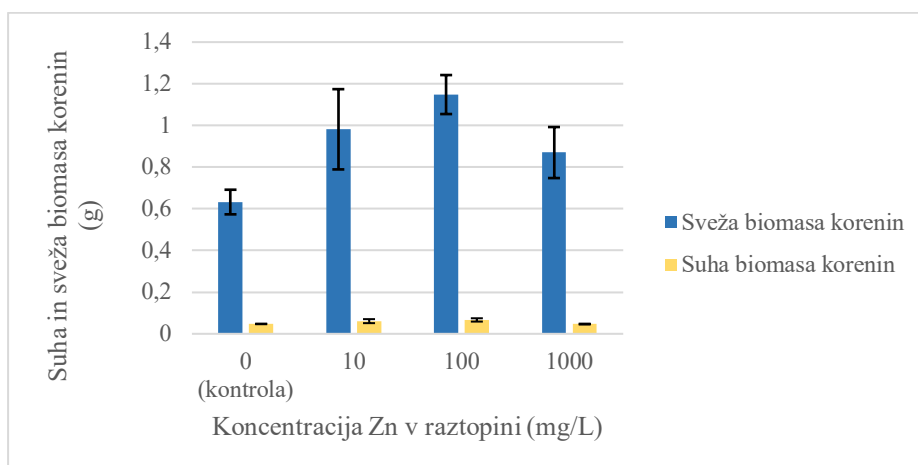
**Slika 1:** Potencialna in dejanska fotokemična učinkovitost fotosistema II kumare pri različnih koncentracijah Zn v raztopini: 0 (kontrola), 10, 100 in 1000 mg/L (povprečje  $\pm$  SN;  $n = 3$ ). Obdelava podatkov z enosmerno ANOVA.



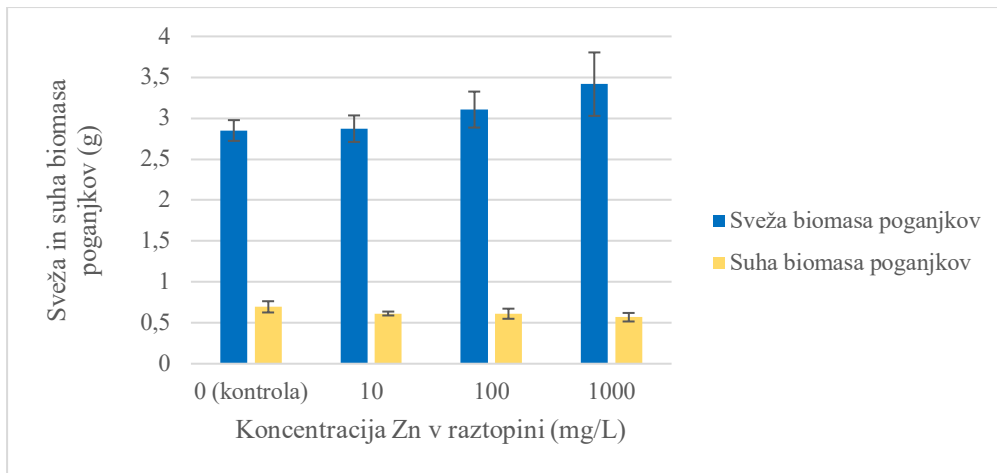
**Slika 2:** Povprečna dolžina korenin kumar (cm) pri različnih koncentracijah Zn v raztopini: 0 (kontrola), 10, 100 in 1000 mg/L (povprečje  $\pm$  SN; n = 12). Obdelava podatkov z enosmerno ANOVO.



**Slika 3:** Povprečna dolžina poganjkov kumar pri različnih koncentracijah Zn v raztopini: 0 (kontrola), 10, 100 in 1000 mg/L (povprečje  $\pm$  SN; n = 12). Obdelava podatkov z enosmerno ANOVO.



**Slika 4:** Povprečna sveža in suha biomasa korenin kumar (g) pri različnih koncentracijah Zn v raztopini: 0 (kontrola), 10, 100 in 1000 mg/L (povprečje  $\pm$  SN; n = 12). Obdelava podatkov z enosmerno ANOVO.



**Slika 5:** Povprečna sveža in suha biomasa poganjkov kumar (g) pri različnih koncentracijah Zn v raztopini: 0 (kontrola), 10, 100 in 1000 mg/L (povprečje ± SN; n = 12). Obdelava podatkov z enosmerno ANOVO.



**Slika 6:** Rastline ob drugem zalivanju. Najhitreje rastejo rastline kontrole, listi te skupine so najbolj razviti. Z naraščanjem koncentracije cinka se rast upočasnjuje, rastline so manj razvite.



**Slika 7:** Rastline pred podiranjem poskusov. Med skupinami ni vidnih bistvenih razlik.

## Razprava

### Glede Dolžine poganjkov in korenin

Cink ima pomembno vlogo pri razvoju, razmnoževanju rastlin in pri signalizaciji. Je kofaktor za različne encime kot so karbonska anhidraza, karboksipeptidaza in cink-superoksid dismutaza. Koncentracije, večje od približno 15 do 20 mg/kg suhe teže so toksične za žive organizme (Balafrej in sod., 2020). Med dolžinami poganjkov kumar pri različnih obravnavaх ni bilo statistično značilnih razlik. Hipotezo smo torej ovrgli. Čeprav je bila povprečna dolžina kontrolnih rastlin večja od tistih s koncentracijama 10 mg/L in 100 mg/L, posthoc test Holm-Sidak ni pokazal statistično značilnih razlik med skupinami. Povprečje skupine, obravnavane s 1000 mg/L je manjše od kontrole, ampak večje od skupin s koncentracijama 10 mg/L in 100 mg/L. Tak rezultat je bil nepričakovan. Rizwan M. in sod. (2019) so dokazali, da se je pri koncentraciji 1000 mg/L Zn v substratu dolžina poganjkov bistveno zmanjšala. Z visoko koncentracijo Zn se je pokazal učinek toksičnosti. Tudi med dolžinami korenin kumar med skupinami ni bilo statistično značilnih razlik. Najdaljšo povprečno dolžino korenine ima skupina 100 mg/L. Vse povprečne dolžine korenin skupin, obravnavanih s cinkom, so daljše kot povprečna dolžina korenin kontrole. Presenetljiv in nepričakovan rezultat. Aydin in sod. (2012) navajajo, da se je inhibicija rastli korenin začela pri koncentraciji 80 mg/L, kar je v nasprotju z našimi rezultati. Opazili so minimalne inhibitorne učinke pri koncentracijah 40 mg/L, 80 mg/L in 160 mg/L. To delno razloži naše rezultate.

### Biomasa poganjkov in korenin

Biomase svežih korenin in poganjkov med različnimi skupinami niso bile statistično značilno različne, kot je pokazal Posthoc Holm-Sidak test. Hipoteze nismo potrdili. Največjo povprečno svežo maso so imeli poganjki skupine 1000 mg/L in korenine skupine 100 mg/L, kar je zelo nepričakovan rezultat. Najmanjša je bila povprečna masa poganjkov in korenin kontrolne skupine. Mase suhih poganjkov se niso statistično značilno razlikovale ne od kontrole, ne med sabo. Hipotezo smo torej ovrgli. Suha masa rastlin se je v raziskavi Aydin in sod. (2012) pri obravnavanju s cinkom povečala v primerjavi s kontrolnim vzorcem. Prve spremembe so zaznali pri koncentraciji 240 mg/L. Točnost meritev je odvisna tudi od napak. Korenine kumar so bile med seboj v ločku zelo prepletene, tako da so se ob

ločevanju posameznih rastlin pretrgale. To je lahko vplivalo na točnost naših meritev, še posebej pri dolžini in masi korenin.

### **Fotokemična učinkovitost**

Pri merjenju potencialne in dejanske fotokemične učinkovitosti fotosistema II, Posthoc test Holm-Sidak ni pokazal statistično značilnih razlik med skupinami. Nepričakovano je bilo v skupini 1000 mg/L povprečje dejanske fotokemične učinkovitosti večje v primerjavi s kontrolo in drugimi skupinami. Druge študije so pokazale, da lahko povečana količina Zn zmanjša translokacijo Fe, Mg, K. Inhibicija translokacije Fe lahko v nekaterih primerih povzroči tudi pojav kloroz, ki se običajno pojavijo pri mladih listih. Pojav kloroz je lahko tudi posledica povečane translokacije Mn na vrh listov, ki je posledica povečane količine Zn v tleh (Liščakova in sod., 2022). Pojav kloroz zmanjša fotokemično učinkovitost, kar je v nasprotju z našimi rezultati.

### **Zaključki**

Naš cilj poskusa je bil preveriti vpliv povečane koncentracije cinka v prsti na rast kumar. V ta namen smo si postavili tri hipoteze. Prvo hipotezo smo ovrgli, saj povišana koncentracija ni delovala zaviralno na rast poganjkov in korenin. Pri meritvah sveže in suhe biomase nismo dobili statistično značilnih razlik, vendar smo lahko razbrali trend, da tako korenine kot poganjki bolje rastejo pri višjih koncentracijah Zn. Žal tekom poskusa nismo naredili analize substrata, ki bi nam omogočil boljši vpogled v biodostopnost elementov za rastlino, vendar pa lahko sklepamo, da je bil substrat, ki smo ga uporabili, reven z mikrohranili. Tudi pri meritvah fotokemične učinkovitosti ni bilo statistično značilnih razlik med skupinami, vendar smo drugo hipotezo ovrgli, saj je trend nakazoval, da so imele kumare največjo fotokemično učinkovitost fotosistema II ravno pri najvišjih koncentracijah cinka. Pri meritvah sveže in suhe biomase korenin in poganjkov prav tako ni bilo statistično značilnih razlik, vendar smo tudi tretjo hipotezo ovrgli, saj so kumare pridelale večjo biomaso pri višjih koncentracijah. Nekako smo zaključili, da je bila kontrola revna z mikrohranili in je posledično slabše rasla. Tekom poskusa torej nismo potrdili nobene zastavljene hipoteze. Predvsem problematično pri sami interpretaciji je bilo dejstvo, da smo tekom poskusa spremljali le skupno vsebnost kovin, ki nam pogosto ne pove ali je element za rastlino toksičen ali ne. Za boljšo pojasnitev rezultatov bi mogli preveriti biodostopnost elementov za rastlino pri čemer bi mogli opraviti analizo substrata, kjer bi preverjali količino organske snovi, pH substrata, velikost delcev. Na ta način bi lažje določili aktivno koncentracijo, ki bi bila bolj primeren kazalnik vpliva toksičnosti različnih koncentracij cinkovega klorida na kumaro. Ugotovili smo tudi, da literatura sicer navaja zaznane toksične doze, vendar je primerjava z našimi rezultati nesmiselna, saj je le-ta odvisna od številnih dejavnikov kot so lastnosti uporabljenega substrata in dostopne aktivne koncentracije, ki jo v literaturi najpogosteje ne navedejo.

### **Literatura**

- Bityutskii NP, Yakkonen KL, Semenov KN (2023) Zinc deficiency in cucumber plants can be alleviated by fullerenol. *Journal of Plant Nutrition*, 46(8), 1504–1518. <https://doi.org/10.1080/01904167.2022.2089166>
- Aydina SS, Gökc E, Büyükb I., Aras S. (2012) Characterization of stress induced by copper and zinc on cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings by means of molecular and population parameters. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 746, 1: 49-55
- Balafrej H, Bogusz D, Triqui Z-EA, Guedira A, Bendaou N, Smouni A, Fahr M (2020) Zinc Hyperaccumulation in Plants: A Review. *Plants*, 9, 5: 562, doi: 10.3390/plants9050562: 22 str.



- Natasha N, Shahid M, Bibi I, Iqbal J, Khalid S, Murtaza B, Bakhat HF, Farooq ABU, Amjad M, Hammad HM, Niazi NK, Arshad M (2022) Zinc in soil-plant-human system: A data-analysis review. *Science of The Total Environment*, 808, 152024, doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.152024: 13 str.
- Rizwan M, Ali S, Rehman MZ, Maqbool A (2019) A critical review on the effects of zinc at toxic levels of cadmium in plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 7: 6279–6289
- Zinc.org. (n.d.). International zinc association. <https://www.zinc.org/> (3. junij 2023)
- Liščakova P, Nawaz A, Molnarova M (2022) Reciprocal effects of copper and zinc in plants. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 19; 9297–9312, doi: 10.1007/s13762-021-03854-6: 16 str.

# VPLIV KADMIJA NA RAST IN RAZVOJ KORUZE

Ciril Cerovšek, Anja Javornik, Teja Knafelj, Barbara Knez, Lucija Štih

## Izvleček

V eksperimentalni študiji smo preučevali vpliv različnih koncentracij kadmija (Cd) na rast, razvoj in fotokemično učinkovitost fotosistema II rastlin. Rastline koruze smo pod kontroliranimi pogoji dvakrat tedensko zalivali s 100 mL raztopine kadmijevega klorida (0 µg/ mL, 10 µg/ mL, 100 µg/ mL in 1000 µg/ mL). S fluorometrom (PAM-2500) smo izmerili fotokemično učinkovitost fotosistema II preko fluorescence klorofila a na zatemnjenih in na osvetljenih listih. Rastlinam smo izmerili še višino poganjkov in dolžino korenin, določili svežo biomaso, po sušenju pa še suho biomaso. Na koncu smo statistično obdelavo opravili s programom Microsoft Excel (one way ANOVA post-hoc test). Ne glede na koncentracijo dodanega Cd pri merjenju dolžine korenin, sveže ter suhe biomase poganjkov v primerjavi s kontrolo nismo zaznali statističnih razlik. Statistične razlike med kontrolo in obravnavanimi rastlinami smo zaznali le pri sveži in suhi biomasi korenin pri rastlinah, ki so bile zalivane z raztopino Cd koncentracije 1000 µg/ mL. Pri merjenju potencialne in dejanske fotokemične učinkovitosti fotosistema II smo ugotovili, da ni prišlo do razlik med posameznimi skupinami rastlin.

**Ključne besede:** kovine v presežku, fotokemična učinkovitost fotosistema II, rast poganjkov in korenin, stresni odziv

## Uvod

Kovine so naravno prisotni elementi, ki se nahajajo v zemeljski skorji. Večina okoljskega onesnaženja izvira iz antropogenih dejavnosti, kot so rudarjenje, industrijska proizvodnja, energetika ter domača in kmetijska uporaba kovin in spojin, ki vsebujejo kovine, s čimer se koncentracija kovin v okolju povečuje (Tchounwou s sod. 2012).

Rastline za svoje fiziološke in biokemične funkcije potrebujejo nekatere kovine, vključno z bakrom, manganom, kobaltom, cinkom, železom, ki predstavljajo mikrohranila (Rengel 1999). So pomembne sestavine več ključnih encimov in sodelujejo pri različnih oksidacijsko-redukcijskih reakcijah. Neustrezna oskrba s temi mikrohranili povzroči različne bolezni ali sindrome pomanjkanja (Tchounwou s sod. 2012). Če so kovine prisotne v prevelikih količinah in absorpcija presega potrebe rastlin, imajo lahko za rastline toksične učinke. Problem predstavljajo predvsem Zn, Cu, Al, Pb in Cd, ki onesnažujejo rodovitno prst (Nagajyoti s sod. 2010). Rastline, ki rastejo na onesnaženih območjih s kovinami, kažejo spremenjen metabolizem, zmanjšanje rasti, manjšo biomaso in kopičenje kovin. Z zaužitimi rastlinami kovine vstopijo v prehranjevalno verigo in se bioakumulirajo v živa bitja, pride pa tudi do postopnega nalaganja kovin v višje razvite organizme (biomagnifikacija), med katere spada tudi človek, torej se koncentracije kovin viša po prehranjevalni verigi navzgor (Blowes s sod. 2003).

Kadmij se pogosto uporablja v različnih industrijskih dejavnostih predvsem za proizvodnjo zlitin, pigmentov in baterij. Čeprav je uporaba kadmija v baterijah velika, je njegova komercialna uporaba v razvitih državah zaradi skrbi za okolje, upadla (Tchounwou s sod. 2012). Namen naše raziskave je ugotoviti, kako različne koncentracije kadmija vplivajo na rast in razvoj koruze ter na fotokemično učinkovitost fotosistema II. Nagajyoti s sod. (2010) opisujejo, da je za koruzo ob prisotnosti Cd značilna kloroza listov, zaviranje rasti poganjkov in korenin, porjavitev koreninskih vršičkov, kovina pa moti tudi privzem, transport in uporabo različnih elementov v rastlini, kot so Ca, Mg, P in K. Kadmij zavira koreninsko Fe (III) reduktazo, kar povzroči pomanjkanje Fe (III) in posledično zmanjša učinkovitost

fotosistema II (Asati s sod. 2016). Kadmij tudi zmanjša absorpcijo nitrata in njegov transport od korenin do poganjkov, saj zavira aktivnost nitrat reduktaze v poganjkih (Hernandez s sod. 2008). Na podlagi tega smo si postavili hipoteze, da bo ob prisotnosti Cd rast poganjkov in korenin slabša kot pri kontroli, da bodo negativni učinki večji pri višjih koncentracijah Cd in da bo prisotnost Cd zmanjšala fotokemično učinkovitost fotosistema II v rastlini.

## **Materiali in metode**

Naš poskus je potekal v časovnem razmiku šestih tednov. V prvem tednu poskusa smo posejali semena koruze in pripravili raztopino s Cd. Sledilo je zalivanje dvakrat tedensko. V petem tednu smo izmerili fotokemično učinkovitost fotosistema II, dolžine korenin in poganjkov in določili svežo biomaso le-teh. V zadnjem tednu smo določili še suho biomaso korenin in poganjkov, sledila je statistična analiza pridobljenih podatkov.

### ***Nastavitev poskusa***

V 12 lončkov smo natresli zemljo in v vsak lonček posadili po 5 semen koruze. Za vsako obravnavo smo pripravili po 3 tehnične ponovitve. Prvič smo vse dobro zalili z vodo, nato pa dvakrat tedensko s po 100 mL določene raztopine kadmijevega klorida. Lončke s koruznimi semeni smo imeli tekom poskusa v rastni komori pri temperaturi 23°C in fotoperiodi 16/8h.

### ***Merjenje fotokemične učinkovitosti fotosistema II***

S fluorometrom (PAM-2500) smo izmerili fluorescenco klorofila a. Merili smo potencialno fotokemično učinkovitost fotosistema II (Fv/Fm) na zatemnjenih listih in dejansko fotokemično učinkovitost fotosistema II (Y) na osvetljenih listih.

### ***Merjenje dolžine in tehtanje sveže in suhe biomase***

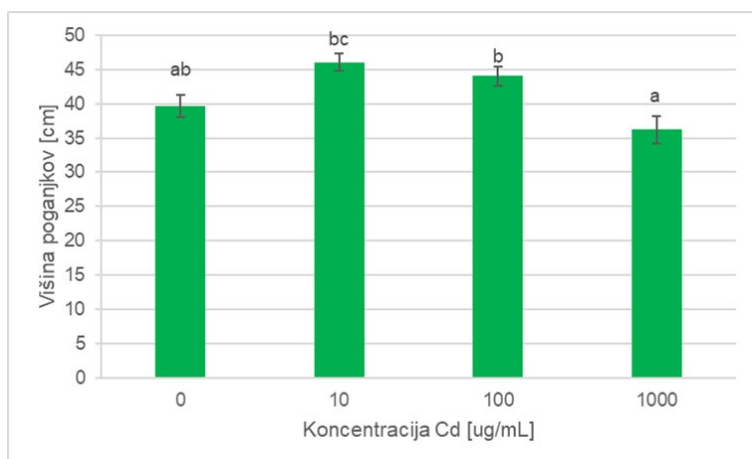
Z ravnilom smo na koncu poskusa izmerili dolžine poganjkov in korenin posamičnih rastlin. Rastline iz posamičnih lončkov smo stehali za izračun sveže biomase poganjkov in korenin. Poganjke in korenine smo dali v sušilnik na 60°C za cca. 3 dni in po tem času določili suho biomaso.

### ***Statistična obdelava podatkov***

Pridobljene podatke smo obdelali s programom Microsoft Excel, kjer smo uporabili orodje XL toolbox in one way ANOVA post-hoc test. Rezultate smo prikazali na grafih v programu Microsoft Excel.

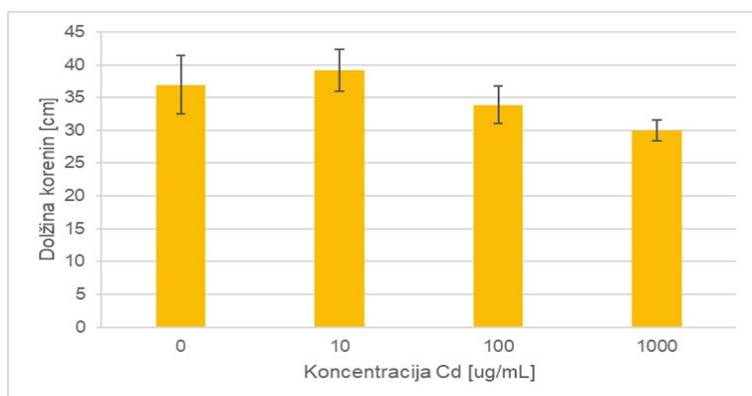
## **Rezultati**

Pri višini poganjkov je imela najnižje vrednosti koruza, ki je bila obravnavana s koncentracijo Cd 1000 µg/ mL, najvišje pa tista s koncentracijo 10 µg/ mL. Statistične razlike smo zaznali med koruzo obravnavano s 1000 µg/ mL in 100 µg/ mL ter 1000 µg/ mL in 10 µg/ mL (**Slika 1**).



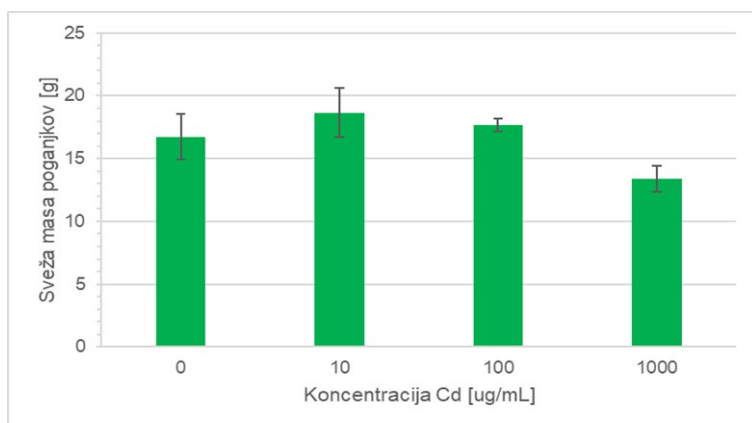
**Slika 1:** Vpliv različnih koncentracij kadmija na višino poganjkov kuruze. Na grafu so prikazane povprečne vrednosti višine poganjkov in standardne napake. Različne črke na grafu prikazujejo statistično značilne razlike v višini poganjkov (enosmerna ANOVA, Holm-Šidak post-hoc test,  $p < 0,05$ ) ( $n=58$ ).

Pri dolžini korenin kuruze ni bilo statističnih razlik med različnimi koncentracijami Cd. Najdaljše korenine smo izmerili pri kuruzi, obravnavani s koncentracijo 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , najkrajše pa pri 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (**Slika 2**).



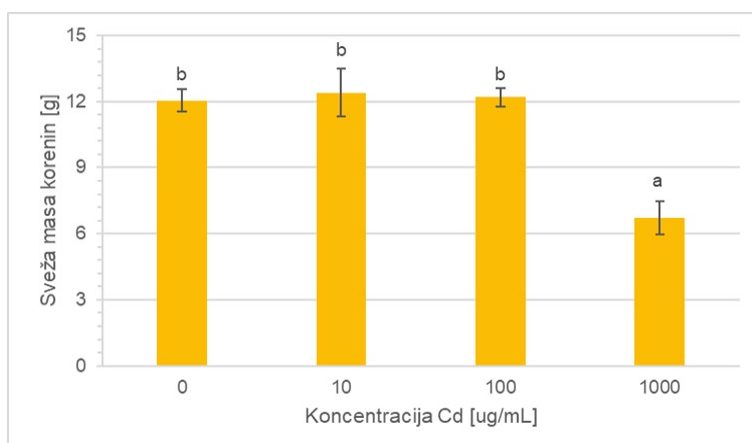
**Slika 2:** Vpliv različnih koncentracij kadmija na dolžino korenin kuruze. Na grafu so prikazane povprečne vrednosti dolžine korenin in standardne napake ( $n=58$ ).

S statistično analizo meritev smo ugotovili, da pri sveži masi poganjkov ni statističnih razlik. Najvišje vrednosti smo pridobili pri kuruzi obravnavani s koncentracijo 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in najnižje pri koncentraciji 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (**Slika 3**).



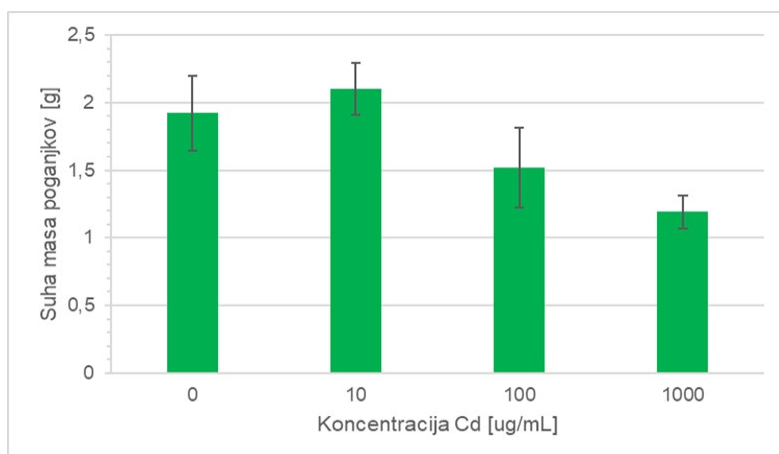
**Slika 3:** Vpliv različnih koncentracij kadmija na svežo maso poganjkov koruze. Na grafu so prikazane povprečne vrednosti sveže mase poganjkov in standardne napake (n=58).

Na Sliki 4 vidimo svežo maso korenin pri različnih koncentracijah Cd. Najvišje vrednosti smo izmerili pri koruzi, ki smo jo zalivali s koncentracijo 10  $\mu\text{g/mL}$ , najnižje pa pri koruzi s 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Statistično značilne razlike smo zaznali le med rastlinami, ki so bile obravnavane s kontrolno raztopino ter rastlinami, ki so bile obravnavane z raztopino koncentracije 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Med svežo maso korenin obravnavanimi s kontrolno raztopino, raztopino 10  $\mu\text{g/mL}$  ter raztopino 1000  $\mu\text{g/mL}$ , ni bilo zaznanih statističnih razlik.



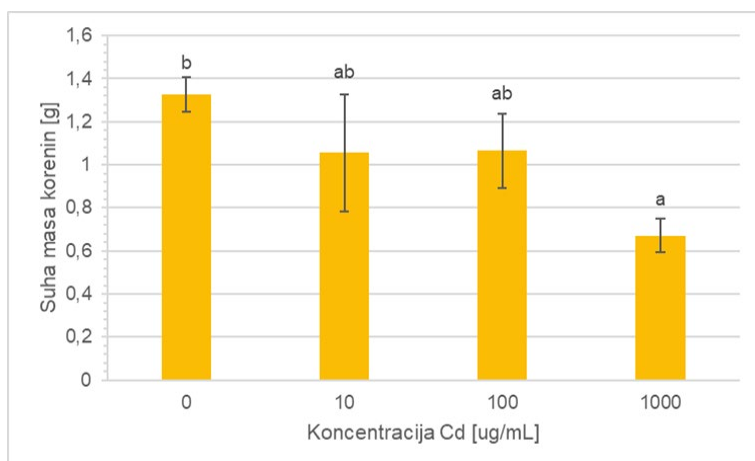
**Slika 4:** Vpliv različnih koncentracij kadmija na svežo maso korenin koruze. Na grafu so prikazane povprečne vrednosti sveže mase korenin in standardne napake. Različne črke na grafu prikazujejo statistično značilne razlike v sveži masi korenin (enosmerna ANOVA, Holm-Šidak post-hoc test,  $p < 0,05$ ) (n=58).

Pri suhi masi poganjkov nismo zaznali statističnih razlik. Ponovno je imela najvišje vrednosti kuruza, obravnavana s koncentracijo 10  $\mu\text{g/mL}$ , najnižje pa kuruza obravnavana z najvišjo koncentracijo kadmija 1000  $\mu\text{g/mL}$  (Slika 5).



**Slika 5:** Vpliv različnih koncentracij kadmija na suho maso poganjkov koruze. Na grafu so prikazane povprečne vrednosti suhe mase poganjkov in standardne napake (n=58).

Pri merjenju suhe mase korenin je imela najvišje vrednosti koruza, obravnavana s kontrolno raztopino. Nato ji sledita skupini koruze s koncentracijo 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ter 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Najnižje vrednosti pa smo izmerili pri koruzi obravnavani s koncentracijo 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , ki se tudi statistično razlikuje od koruze obravnavane s kontrolno raztopino.



**Slika 6:** Vpliv različnih koncentracij kadmija na suho maso korenin koruze. Na grafu so prikazane povprečne vrednosti suhe mase korenin in standardne napake. Različne črke na grafu prikazujejo statistično značilne razlike v suhi masi korenin (enosmerna ANOVA, Holm-Šidak post-hoc test,  $p < 0,05$ ) (n=58).

V Tabeli 1 lahko vidimo izmerjene vrednosti potencialne in dejanske fotokemične učinkovitosti fotosistema II. Pri merjenju potencialne fotokemične učinkovitosti smo dobili podobne rezultate pri vseh koncentracijah Cd, in sicer med 0,742 in 0,772. V našem primeru je imela kontrola najnižjo vrednost, najvišjo pa koruza, ki je bila obravnavana z raztopino koncentracije 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Med rezultati ni bilo opaženih statističnih razlik.

Pri merjenju dejanske fotokemične učinkovitosti fotosistem II smo ugotovili, da so imele kontrolne rastline najvišje vrednosti, najnižje pa rastline, ki smo jih zalivali s koncentracijo 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Koruze obravnavane s koncentracijama 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  imajo zelo podobne vrednosti. Med rezultati pa nismo opazili statističnih razlik.

**Tabela 1:** Vrednosti potencialne in dejanske fotokemične učinkovitosti fotosistema II pri različnih koncentracijah kadmija ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) s podanimi statističnimi napakami ( $n=58$ ).

Koncentracija Cd [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	Potencialna fotokemična učinkovitost FS II	Dejanska fotokemične učinkovitost FS II
0 (kontrola)	$0,742 \pm 0,011$	$0,326 \pm 0,033$
0	$0,762 \pm 0,007$	$0,264 \pm 0,045$
100	$0,772 \pm 0,005$	$0,273 \pm 0,023$
1000	$0,759 \pm 0,003$	$0,150 \pm 0,018$

## Razprava

Pri opazovanju rastlin nismo opazili velikih razlik v obarvanosti listov, saj smo rumenenje listov opazili tako pri kontrolnih rastlinah, kot tudi pri vseh ostalih. To je bilo nekoliko izven naših pričakovanj, saj smo pričakovali, da bo kloroza bolj opazna pri rastlinah, zalivanih z višjimi koncentracijami Cd (Zhang in sod., 2022). Nismo prepričani, zakaj je prišlo do določenega dela kloroze pri vseh listih, morda je rastlinam primanjkovalo drugih mineralnih hranil, ali pa rastne razmere niso bile optimalne.

Cd zmanjšuje rast in razvoj rastlin, kar so s poskusi potrdili Ibrahim in sod. (2017) pri koruzi. To smo v našem eksperimentu dokazali tudi mi, saj smo pri merjenju poganjkov in korenin opazili padajoče vrednosti rezultatov ob naraščanju koncentracije Cd.

Rezultati pa so nas do neke mere presenetili. Res je, da smo pri merjenju višine poganjkov, dolžin korenin, poganjkov sveže in suhe mase ter korenin sveže mase dobili padajoče rezultate ob naraščanju koncentracije Cd, kot že omenjeno; presenetilo pa nas je, da vrednosti kontrolnih rastlin pri teh merjenjih niso bile najvišje, kot bi pričakovali. Predvidevali smo, da je do takih rezultatov prišlo, saj je bila kontrolna skupina v začetnih dveh tednih bolj odmaknjena od vira svetlobe, kot pa ostale skupine rastlin in je zato zaostajala v rasti. Kasneje smo to napako odpravili, rast kontrolnih rastlin pa vseeno ni dosegla rasti skupine rastlin z nizko koncentracijo Cd. Pri omenjenih meritvah smo opazili, da so bili rezultati kontrolnih rastlin slabši kot rezultati rastlin, zalivanih z  $10 \mu\text{g Cd}/\text{mL}$ . To lahko pripisujemo stresnemu odzivu, pri katerem se rast poveča, zato da se koncentracija Cd na maso tkiva zmanjša. To imenujemo hormeza, podobno so opazili Wang in sod. (2023), in sicer pozitiven vpliv Cd v nizkih koncentracijah pri poprovi meti. Zanimivo pa je, da pri merjenju suhe mase korenin tega učinka ni. Zato lahko sklepamo, da je za takšne rezultate delno odgovorno tudi vlaganje energije s strani korenin v razvejanost korenin v ugodnih razmerah (kontrolne rastline), saj si s tem zagotovijo boljšo oporo in večjo površino za privzem vode in hranil.

Atabeyeva in sod. (2020) so opazovali vpliv Cd na vsebnost fotosinteznih pigmentov pri pšenici in opazili signifikantno zmanjšanje teh, zato smo pričakovali, da bo pri naših rastlinah prišlo do zmanjšanja fotokemične učinkovitosti fotosistema II. Pri merjenju potencialne fotokemične učinkovitosti ni bilo razlik med posameznimi skupinami rastlin. Pričakovali bi, da bo vrednost najvišja pri kontrolnih rastlinah. Tako smo predpostavili, da dodatek Cd nima vpliva na raven potencialne fotokemične učinkovitosti fotosistema II.

Drugačne rezultate pa smo zasledili pri merjenju dejanske fotokemične učinkovitosti fotosistema II. Opazili smo trend, da so imele kontrolne rastline najvišje vrednosti; tiste, ki smo jih zalivali z najvišjo koncentracijo Cd, pa najnižje vrednosti, vendar razlike zaradi velike variabilnosti podatkov in majhnega števila ponovitev niso bile statistično značilne. Jia in sod. (2015) so z opazovanjem vpliva Cd na fotokemično učinkovitost *Lonicera japonica* opazili efekt hormoneze, česar pri našem eksperimentu nismo opazili; pri njihovem eksperimentu so merili vsebnost Cd v zemlji, tako da so morda imeli manjše razlike v dodani količini Cd v prst, zato pri nas hormoneza, ki bi jo pričakovali, ni bila opažena. Na vse rezultate je imela lahko nekolikšen vpliv nižja svetlost, ki so je bile ob začetku eksperimenta deležne kontrolne rastline. V začetnem tednu smo opazili tudi, da se je voda, ki je odtekala iz posodic z rastlinami, zbirala v skupnem podstavku in se tako mešala, zaradi česar je morda prišlo do privzema nekaj Cd tudi pri kontrolnih rastlinah, kar bi lahko vplivalo na naše rezultate. Ker odtečene vode ni bilo veliko in ker smo kasneje preprečili mešanje vode, smo to pri analizi podatkov zanemarili. Glede na ostale znanstvene članke o učinku Cd na rastline, lahko sklepamo, da je pojav, ki smo ga opazili pri večini meritev, torej najboljša rast pri dodatku Cd v nizkih koncentracijah, pogost pojav pri vplivu Cd na rastline.

Statistično značilne razlike so bile prisotne zgolj med rastlinami zalivanimi s 1000 µg Cd/mL ter med rastlinami, zalitimi z 10 µg/mL in 100 µg/mL Cd pri primerjavi višin poganjkov; med rastlinami, zalivanimi s 1000 µg Cd/mL in ostalimi pri primerjavi sveže mase korenin; ter med kontrolno rastlino in rastlino, zalivano s 1000 µg Cd/mL pri merjenju suhe mase. Med ostalimi rezultati ni bilo opaženih statistično značilnih razlik, za doseg teh bi morali poskus ponoviti na večjem številu rastlin.

## Zaključki

V eksperimentu smo preučevali vpliv Cd na rast in fotokemično učinkovitost rastlin. Potrdili smo hipotezo, da bo ob prisotnosti kadmija rast poganjkov in korenin slabša pri višji koncentraciji Cd, kot pri nižji. Nismo uspeli potrditi hipoteze, da bo rast kontrolnih rastlin najboljša. Prav tako nismo potrdili hipoteze, da bo prisotnost kadmija znižala fotokemično učinkovitost v rastlini. Rezultati kažejo, da je dodatek Cd vplival na razvoj rastlin, pri čemer so se vrednosti merjenih parametrov zmanjševale ob naraščanju koncentracije Cd. Presenetljivo je, da kontrolne rastline niso dosegle najvišjih vrednosti pri večini meritev, kar smo pričakovali. Naši rezultati nakazujejo, da je stresni odziv rastlin na prisotnost Cd pripomogel k povečanju rasti, da bi se zmanjšala koncentracija Cd na maso tkiva. Vpliva na fotokemično učinkovitost fotosistema II nismo zaznali, saj razlike, ki smo jih opazili med kontrolo in najvišjo koncentracijo Cd niso bile statistično značilne. Naše ugotovitve temeljijo namreč na omejenem številu meritev, zato v večini primerov nismo mogli statistično dokazati razlik med skupinami rastlin. Prav tako lahko nekoliko vpliva na naše rezultate nižja svetlost, ki so je bile kontrolne rastline deležne v začetni fazi eksperimenta, ter morebiten privzem Cd s strani kontrolnih rastlin preko odtekajoče vode.

Skupaj z drugimi znanstvenimi članki o vplivu Cd na rastline lahko sklepamo, da je pojav najboljše rasti pri nizkih koncentracijah Cd pogost. Kljub temu pa bi bilo za pridobitev bolj zanesljivih rezultatov potrebno ponoviti poskus na večjem številu rastlin.

## Literatura

- Asati A, Pichhode M, Nikhil K (2016) Effect of Heavy Metals on Plants: An Overview. International Journal of Application or Innovation in Engineering & Management (IJAIEM), 5(3): 56-66.
- Atabeyeva Ss, Minocha R, Minocha Sc, Rakhymgozhina A, Nabieva Am, Nurmahanova AC, Kenzhebayeva SS, Alybayeva RA, Asrandina SS (2020) Response of plants to cadmium stress. International Journal of Biology and Chemistry 13, 1: 109. doi: 10.26577/ijbch.2020.v13.i1.11



- Blowes DW, Ptacek CJ, Jambor JL, Weisener CG (2003) The Geochemistry of Acid Mine Drainage. *Treatise on Geochemistry*, 9: 149-204.
- Hernandez LE, Carpena-Ruiz R, Gárate A (2008) Alterations in the mineral nutrition of pea seedlings exposed to cadmium. *Journal of Plant Nutrition*, 12: 1581-1598.
- Jia L, Liu Z, Chen W, Ye Y, Yu S, He X (2015) Hormesis effects induced by cadmium on growth and photosynthetic performance in a hyperaccumulator, *Lonicera japonica* Thunb. *Journal of Plant Growth Regulation*, 34, 13-21. doi: 10.1007/s00344-014-9433-1
- Nagajyoti PC, Lee KD, Sreekanth TVM (2010) Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 8: 199-216.
- Rengel Z (1999) Heavy Metals as Essential Nutrients. *Heavy Metal Stress in Plants*, 231-251.
- Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ (2012) Heavy Metals Toxicity and the Environment. *Experientia Supplementum*, 101: 133-164.
- Wang B, Lin L, Yuan X, Zhu Y, Wang Y, Li D, He J, Xiao Y (2023) Low-level cadmium exposure induced hormesis in peppermint young plant by constantly activating antioxidant activity based on physiological and transcriptomic analyses. *Frontiers in plant science*, 14, 1088285. doi: 10.3389/fpls.2023.1088285
- Zhang Q., Wen Q, Ma T, Zhu Q, Huang D, Zhu H, Xu C, Chen H (2022) Cadmium-induced iron deficiency is a comprise strategy to reduce Cd uptake in rice. *Environmental and experimental botany*, 206, 105155. doi: 10.1016/j.envexpbot.2022.105155

# VPLIV KADMIJA NA RAST IN RAZVOJ KUMAR

Aljaž Kravanja, Hana Kovač, Tara Mesarič, Luka Mravlje

## Izveček

Namen našega dela je bil raziskati vpliv različnih koncentracij kadmija na rast kumar. Metode so vključevale: sajenje rastlin (3 lončki x 5 semen), pripravo založne raztopine kadmija za zalivanje z dodatkom kadmijevega klorida destilirani vodi (1000 µg/mL). Nato so sledile obravnave z raztopino kadmija pri različnih koncentracijah (0 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL in 1000 µg/mL). Kumare smo zalivali 2x tedensko (ob ponedeljkih in četrkih) s 100 mL določene koncentracije. Sledilo je merjenje fotokemične učinkovitosti fotosistema II, izkop in čiščenje rastlin, merjenje dolžin poganjkov ter korenin ter merjenje sveže in suhe mase poganjkov in korenin. Ugotovili smo, da so bili dejanski vplivi kadmija zanemarljivi ter v večini primerov statistično neznačilni, z izjemo sveže mase in dolžine korenin.

**Ključne besede:** kadmij, kumare, fotokemična učinkovitost fotosistema II,

## Uvod

Kadmij (Cd) je potencialno strupena kovina, ki se pogosto sprošča v okolje kot posledica industrijskih procesov, odpadnih vod in kmetijskih dejavnosti. Njegova prisotnost v vodnih virih ima lahko negativne posledice na zdravje ljudi in ekosistemsko ravnovesje. Poleg tega ima kadmij tudi pomemben vpliv na rast rastlin, kar ima lahko resne gospodarske posledice (Qadir in sod., 2014). Kadmij ni esencialen za rast rastlin in je toksičen že pri nizkih koncentracijah. Vpliva na rast in metabolizem rastlin, tako da tvori ROS, ovira privzem, uporabo ter transport esencialnih hranil in vode ter ovira procese fotosinteze, kar povzroči odmiranje listov. (Haider in sod., 2021). Rastline so razvile tudi nekatere mehanizme tolerance, ki vključujejo sintezo osmolitov, encimske in neencimske antioksidante, detoksifikacijske peptide, regulacijo na ravni ekspresije genov in drugo... (Viehweger, 2014).

Predhodne raziskave so že pokazale, da je Cd toksičen za rastline in da lahko vpliva na različne fiziološke procese, kot so fotosinteza, absorpcija hranil, presnova in rast (Zulfiqar in sod., 2022). Vendar pa obstajajo razlike med rastlinami v njihovi občutljivosti na Cd in prav tako so lahko različne vrste rastlin bolj ali manj tolerantne na to kovino. Zato smo se osredotočili na rast kumar, ki spada pod dvokaličnice in predstavljajo pomemben kmetijski pridelek. Prav tako ima pri odzivu rastlin na Cd pomemben vpliv doza.

Cilj naše študije je bil raziskati vpliv vsebnosti Cd v vodi za zalivanje na rast kumar (*Cucumis sativus*) ter raziskati spremembe fizioloških parametrov, kot je fotokemična učinkovitost fotosistema II, v odvisnosti od koncentracije Cd. V ta namen smo izvedli eksperiment, kjer smo posadili kumare in jih več tednov zalivali z vodo, ki je vsebovala različne koncentracije Cd, in sicer 0, 10, 100 in 1000 µg/mL. Nato je sledilo merjenje fotokemične učinkovitosti fotosistema II, izkop in čiščenje rastlin, merjenje dolžin poganjkov ter korenin, merjenje sveže in suhe mase poganjkov in korenin. S tem smo želeli ugotoviti, kako Cd vpliva na fiziološke procese rastlin, razumeti mehanizme odziva rastlin na prisotnost Cd ter napovedati pričakovane rezultate.

Na podlagi predhodnih študij smo oblikovali naslednje hipoteze:

1. Pričakujemo, da bo prisotnost Cd v vodi za zalivanje negativno vplivala na rast kumar.
2. Najslabšo rast pričakujemo pri najvišji koncentraciji Cd.
3. Pričakujemo, da se bodo fiziološki procesi rastlin, kot je fotosinteza, zmanjšali s povečanjem koncentracije Cd v vodi.

Naša raziskava tako prinaša nov vpogled v razumevanje vpliva Cd na rast kumar in odpira možnosti za prihodnje ukrepe za zmanjšanje tveganj onesnaževanja s to strupeno kovino. Rezultati naše študije bodo pomagali k boljšemu razumevanju odziva kumar na Cd ter mogoče celo prispevali k dolgoročni vzdržnosti kmetijskih sistemov.

## Metode in materiali

Eksperimentalna časovnica je obsegala šest tednov; v prvem so bila semena posajena v lončke, med 1. in 5. tednom so bile rastline gojene v rastni komori, hkrati pa smo spremljali njihovo rast ter morfologijo. V 5. tednu smo rastline izkopal iz rastnih lončkov. 5. in 6. teden sta bila namenjena analizi rasti ter fotokemične učinkovitosti fotosistema II.

Eksperiment je bil postavljen tako, da je bil opazovani rezultat vpliv Cd v zalivalni vodi, spremenljivi dejavnik pa so bile različne koncentracije kadmija v vodi. Koncentracije, ki smo jih izbrali za poskus so bile 0, 10, 100 in 1000  $\mu\text{g Cd/ mL}$ . V 1. tednu smo ob sajenju semen v rastne lončke tudi pripravili založno raztopino Cd, in sicer z raztapljanjem kadmijevega klorida v destilirani vodi v koncentraciji 1000  $\mu\text{g/mL}$ , iz katere smo nato ob vsakem zalivanju pripravljali redčitve v ustrezni koncentraciji.

Semena kumare (*Cucumis sativus*) so bila komercialno dostopna semena iz Semenarne Ljubljana. Vsaka izmed določenih koncentraciji je bila testirana v triplikatu za boljšo statistično veljavnost rezultatov. V rastne lončke je bilo posajenih 5 semen kumare, prst, ki je bila uporabljena je bila komercialna prst, namenjena domačemu vrtnarjenju. 12 lončkov, nastavljenih za poskus, je bilo postavljenih v rastno komoro s konstantno temperaturo in 16/8 urno dnevno/ nočno fotoperiodo. Rastline smo zalivali dvakrat tedensko v razmaku dveh oziroma treh dni za štiri tedne. Zalivali smo jih z volumnom 100 mL, redčitve Cd pa smo pripravili z dodajanjem založne raztopine k destilirani vodi, npr. za pripravo vode s koncentracijo 10  $\mu\text{g/mL}$  je bil v 99 mL vode dodan 1 mL založne raztopine.

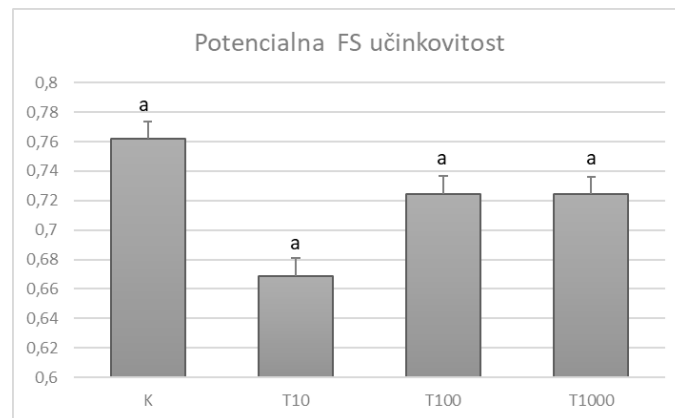
Po koncu obdobja rasti smo rastline izkopal iz lončkov, prst pa odstranili iz prepleta korenin z ročnim čiščenjem in spiranjem. Rastline smo prerezali na meji med korenino in poganjkom, nato pa z metrom izmerili maksimalno dolžino korenin in poganjkov posamičnih rastlin. Določeni sta bili tudi sveža in suha masa poganjkov in korenin. Sveža masa je bila določena na pultni laboratorijski tehtnici vzporedno z meritvijo dolžine, suha masa pa je bila določena po izsušitvi rastlinskega materiala v peči pri 60°C.

Izmerjena je bila tudi fotokemična učinkovitost fotosistema II s fluorometrom (PAM-2500). Merjenje je potekalo na rastlinah po končanem obdobju rasti ter pred njihovim izkopom iz rastnih lončkov. Izbran

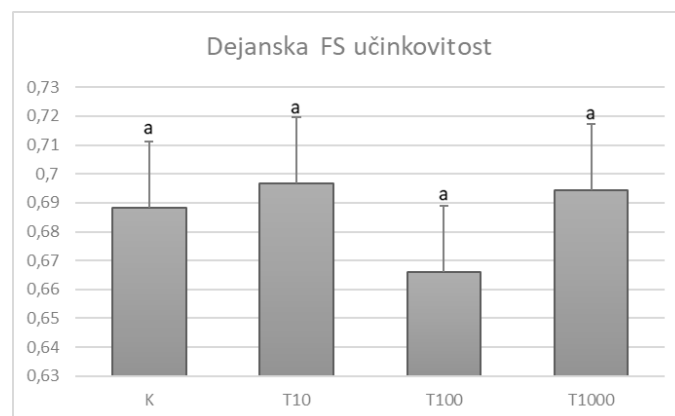
je bil optimalen list na vsaki rastlini (velika površina, odsotnost poškodb in kloroz), ki je nato na območju meritve bil izoliran od okolja.

## Rezultati

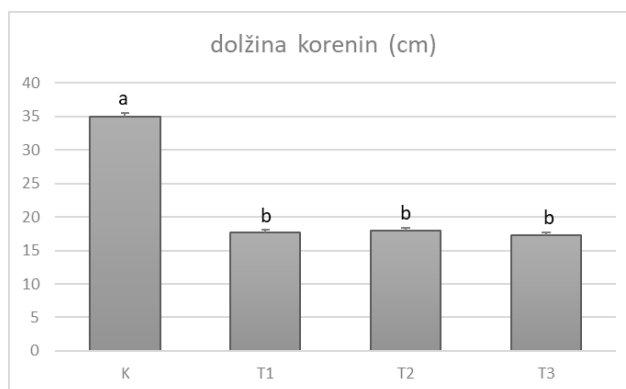
Rezultate meritev potencialne in dejanske fotokemične učinkovitosti fotosistema II, dolžine korenin, višine poganjkov, sveže in suhe mase poganjkov ter korenin, smo statistično analizirali z uporabo ANOVA analize in posthoc testa, da smo ugotovili, če med posameznimi skupinami, razvrščenimi glede na koncentracijo Cd v zalivalni vodi, obstajajo statistično značilne razlike. Prav tako smo rezultate meritev prikazali grafično.



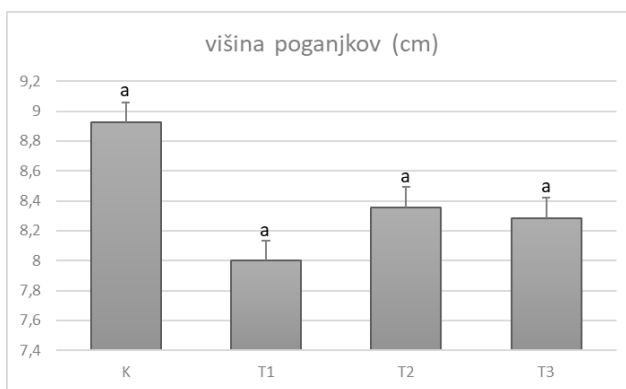
**Slika 1:** Graf povprečnih vrednosti meritev potencialne fotokemične učinkovitosti FS II in SN pri kontroli (0 µg/mL Cd), T1 skupini (10 µg/mL Cd), T2 skupini (100 µg/mL Cd) in T3 skupini (1000 µg/mL Cd), n=3. \* iste črke indicirajo statistično enakovredne rezultate pri Posthoc testu s 95% zaupanjem.



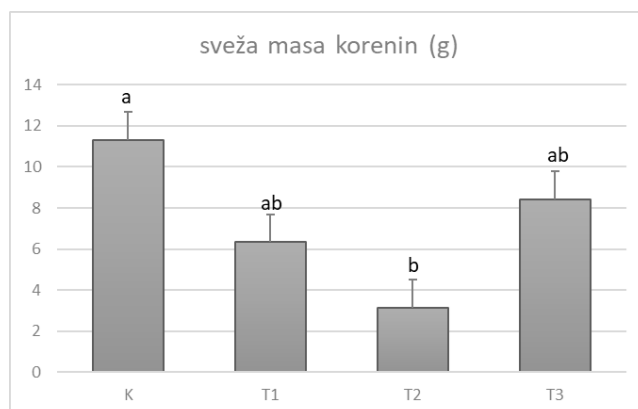
**Slika 2:** Graf povprečnih vrednosti meritev dejanske fotokemične učinkovitosti fotosistema II in SN pri kontroli (0 µg/mL Cd), T1 skupini (10 µg/mL Cd), T2 skupini (100 µg/mL Cd) in T3 skupini (1000 µg/mL Cd), n=3. \* iste črke indicirajo statistično enakovredne rezultate pri Posthoc testu s 95% zaupanjem.



**Slika 3:** Graf povprečnih vrednosti meritev dolžine korenin in SN pri kontroli (0 µg/mL Cd), T1 skupini (10 µg/mL Cd), T2 skupini (100 µg/mL Cd) in T3 skupini (1000 µg/mL Cd). \* iste črke indicirajo statistično enakovredne rezultate pri Posthoc testu s 95% zaupanjem.



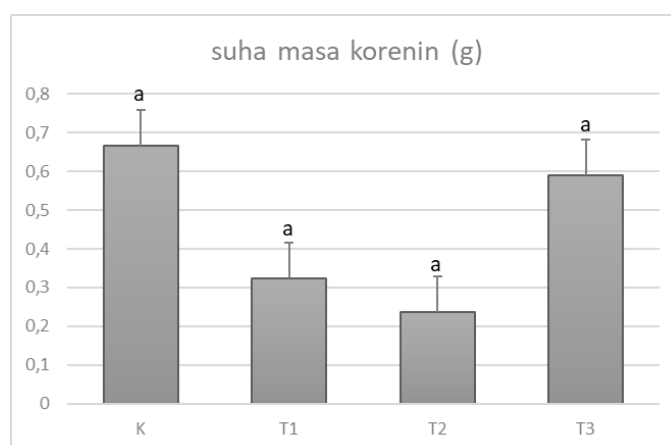
**Slika 4:** Graf povprečnih vrednosti meritev višine poganjkov in SN pri kontroli (0 µg/mL Cd), T1 skupini (10 µg/mL Cd), T2 skupini (100 µg/mL Cd) in T3 skupini (1000 µg/mL Cd), n=3. \* iste črke indicirajo statistično enakovredne rezultate pri Posthoc testu s 95% zaupanjem.



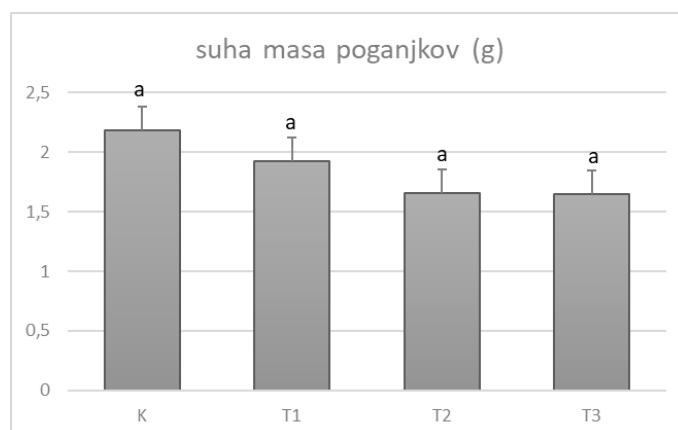
**Slika 5:** Graf povprečnih vrednosti meritev sveže mase korenin in SN pri kontroli (0 µg/mL Cd), T1 skupini (10 µg/mL Cd), T2 skupini (100 µg/mL Cd) in T3 skupini (1000 µg/mL Cd), n=3. \* iste črke indicirajo statistično enakovredne rezultate pri Posthoc testu s 95% zaupanjem.



**Slika 6:** Graf povprečnih vrednosti meritev sveže mase poganjkov in SN pri kontroli (0 µg/mL Cd), T1 skupini (10 µg/mL Cd), T2 skupini (100 µg/mL Cd) in T3 skupini (1000 µg/mL Cd), n=3. \* iste črke indicirajo statistično enakovredne rezultate pri Posthoc testu s 95% zaupanjem.



**Slika 7:** Graf povprečnih vrednosti meritev suhe mase korenin in SN pri kontroli (0 µg/mL Cd), T1 skupini (10 µg/mL Cd), T2 skupini (100 µg/mL Cd) in T3 skupini (1000 µg/mL Cd), n=3. \* iste črke indicirajo statistično enakovredne rezultate pri Posthoc testu s 95% zaupanjem.



**Slika 8:** Graf povprečnih vrednosti meritev suhe mase poganjkov in SN pri kontroli (0 µg/mL Cd), T1 skupini (10 µg/mL Cd), T2 skupini (100 µg/mL Cd) in T3 skupini (1000 µg/mL Cd), n=3. \* iste črke indicirajo statistično enakovredne rezultate pri Posthoc testu s 95% zaupanjem.

## Razprava

V okviru našega poskusa smo naše hipoteze delno potrdili. Rast kumar ter njihova fotokemična učinkovitost fotosistema II sta bili sicer okrnjeni, ampak rezultati niso bili statistično značilni, torej o samem vplivu kadmija na te lastnosti ne moremo govoriti. Bile so sicer morfološke razlike pri sami rasti pri različnih koncentracijah kadmija, saj so tiste z najvišjo koncentracijo imele najbolj rumene in dotrajane liste, medtem ko niso imele kontrolne skupine nič vidnih sprememb. Statistično značilne razlike smo lahko opazili v primeru same dolžine korenin, saj so imele vse rastline obravnavane s kadmijem enako statistično značilne krajše korenine v primerjavi s kontrolnimi rastlinami. Opazili smo tudi razlike v sveži masi rastlin, in sicer pri kumarah obravnavanih s 100 µg/mL Cd smo opazili edino statistično značilno razliko, saj so imele manjšo svežo maso. Glede samega dela, smo opazili, da se je tekom zalivanja rastlin z različnimi koncentracijami pod lonci tvoril kupen »bazen« in je najverjetneje prišlo do mešanja različnih koncentracij raztopin kadmija, kar pa bi potencialno lahko vplivalo na sam naš rezultat in razlike med posameznimi obravnavami rastlin. Menimo, da je takšen rezultat lahko posledica samega človeškega dela, saj smo imeli težave pri ločevanju korenin kumare od zemlje in se je v samem procesu ločevanja verjetno izgubila sama masa korenin. Predlagamo tudi, da bi sam poskus naslednjič izvajali dalj časa, saj mogoče vpliv toksičnosti kadmija ni akutna, ampak mogoče kronična in bi se več toksičnih učinkov pokazalo po daljšem časovnem obdobju gojenja.

## Zaključki

Ugotovili smo, da ima Cd določen vpliv na rast kumar, saj je zaviral njihovo rast, a ne v presežku, saj ni bilo statistično značilnih razlik. 1. hipotezo smo lahko potrdili, saj je prisotnost Cd v vodi negativno vplivala na rast kumar, podatki so bili statistično značilni ter tudi sama morfologija rastlin se je spremenila ob višanju koncentracij Cd v prsti. 2. in 3. hipotezo smo ovrgli, saj na podlagi statistične analize, ni bilo statistično značilnih razlik. Menimo, da bi morali sam eksperiment za nadaljnje raziskave ponoviti ter ga izvajati dalj časa in pod bolj kontroliranimi pogoji ter še z več različnimi koncentracijami kadmija.

## Literatura

- Viehweger K (2014) How plants cope with heavy metals. *Bot Stud* 55: 35 <https://doi.org/10.1186/1999-3110-55-35>
- Qadir S, Jamshieed S, Rasool S, Ashraf M, Akram NA, Ahmad P (2014) Modulation of plant growth and metabolism in cadmium-enriched environments. *Rev Environ Contam Toxicol* 229: 51-88. doi: 10.1007/978-3-319-03777-6\_4. PMID: 24515810.
- Haider FU, Liqun C, Coulter JA, Cheema SA, Wu J, Zhang R, Wenjun M, Farooq M (2021) Cadmium toxicity in plants: Impacts and remediation strategies. *Ecotoxicol Environ Saf.* 211: 111887
- Zulfiqar, U, Ayub A, Hussain S et al (2022) Cadmium Toxicity in Plants: Recent Progress on Morpho-physiological Effects and Remediation Strategies. *J Soil Sci Plant Nutr* 22: 212–269. <https://doi.org/10.1007/s42729-021-00645-3>

# VPLIV KROMA NA RAST IN RAZVOJ KORUZE

Ana Gabrovšek, Monika Gregorič Tasić, Urša Grohar, Domen Hočevar, Zala Vraničar

## Izvleček

Namen dela je bil raziskati vplive kroma na rast in razvoj koruz. Semena koruze smo sejali v mešanico zemlje in vermikulita, zalivali z raztopino kromovega (III) klorida; 4 različne koncentracije (0, 10, 100, 1000 µg/mL), tri ponovitve za eno koncentracijo (= 3 lončki), tri rastline na lonček, zalivali 7x, po 2x na teden po 100 ml. Merili smo fotokemično učinkovitost (potencialno in dejansko), dolžine korenin in poganjkov, rastline smo stehali (svežo in suho biomaso poganjkov ter korenin). Rezultati niso pokazali statistično značilnih razlik me posameznimi obravnavami.

**Ključne besede:** koruza, ne-esencialne kovine, krom, odziv rastline, stres

## Uvod

Koruza (*Zea mays L.*) je ena izmed najpomembnejših poljščin na svetu, ki se uporablja tako za prehrano ljudi in živali kot tudi za industrijske namene. Spada med žita in jo uvrščamo v družino trav (*Poaceae*). Gre za eno izmed najstarejših kulturnih rastlin, ki smo jo udomačili pred 7000 leti in izvira iz Srednje Amerike, danes pa jo gojijo po vsem svetu. Poznamo številne sorte in barve storžev, od rumene in bele, do rdeče, vijolične in črne (Ranum in sod., 2014). Koruza je bogat vir hranil, kot so ogljikovi hidrati, beljakovine, vlaknine in antioksidanti, zato ima pomembno vlogo pri prehrani ljudi in živali. Največji delež (70 %) suhe mase predstavlja škrob. Poleg tega ima pomembno vlogo tudi v industriji, saj se koruza uporablja za proizvodnjo različnih izdelkov, kot so etanol (za proizvodnjo biogoriva), koruzni škrob, olje, plastika in drugi izdelki (Sharma in sod. 2020). Koruza ima velik potencial na področju izboljšanja prehrane in preprečevanja pomanjkanja hranil v revnih družbah po svetu. Številne raziskave se ukvarjajo z genetskim izboljšanjem koruze (npr. QTL pristop), da bi povečali pridelek in odpornost proti škodljivcem in boleznim (Kumar in sod., 2023).

Strupenost določenih kovin je ena izmed glavnih skrbi tako za kmetijstvo, kot tudi za zdravje ljudi in živali, saj se lahko kopičijo v užitnih delih poljščin in povzročajo bolezni. Kovine in kovinski ioni so sicer naravno prisotni v okolju in za rastline predstavljajo tako esencialna kot ne-esencialna mikrohranila. Njihova strupenost je odvisna od njihove koncentracije. Veliko povečanje industrializacije, urbanizacije in porast drugih antropogenih dejavnosti so močno povečali vnos kovin v okolje in zaradi tega so naraščajoče koncentracije kovin v okolju globalno vedno večji problem, to pa vpliva tudi na rast, razvoj in pridelek rastlin. Tekom evolucije so rastline razvile določene mehanizme za premagovanje stresa, ki ga povzročajo povečane koncentracije kovin v okolju, recimo kelacija z organskimi molekulami ali hiperakumulacija (Jogawat in sod., 2021).

Krom za rastline ni esencialen element, je pa izredno pomemben pri presnovi sladkorjev pri ljudeh (Kapoor in sod., 2022). Krom (VI) je citotoksična kovina za rastline in v koruzi inducira aktivacijo protein kinaze, aktivirane z mitogenom, kar v celici sproži aktivacijo določenih transkripcijskih faktorjev in genov povezanih s stresom (Ding in sod., 2009). Krom (III) je manj topen in manj toksičen kot njegova šestvalentna oblika (Kapoor in sod., 2022).

Zaradi bioakumulacije in biomagnifikacije kovin v rastlinah, ki jih gojimo in uživamo ter tudi zaradi možnosti uporabe rastlin pri bioremediaciji (fitoremediaciji) nas je zanimal vpliv trivalentnega kroma na rast in razvoj koruze. Njegov vpliv smo ocenjevali preko merjenja potencialne in dejanske fotokemične učinkovitosti fotosistema II, merjenja dolžine poganjkov in korenin ter merjenja sveže in



suhe biomase rastlin, gojenih v prisotnosti različnih koncentracij kroma. Naša hipoteza je bila, da bosta rast in razvoj koruze na nivoju rasti korenin in poganjkov, biomase in fotokemične učinkovitosti zavrta sorazmerno z naraščajočo koncentracijo kroma v lončku.

## **Metode in materiali**

### **Sajenje rastlin v različne substrate**

Semena koruze smo posejali v mešanico zemlje in vermikulita. V vsak lonček smo posejali po 5 semen koruze. Testirali smo 4 različne koncentracije kroma: 0, 10, 100 in 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Za testiranje vsake posamezne koncentracije kovine smo naredili po tri ponovitve. Semena koruze smo torej posadili v skupno 12 lončkov in jih dobro zalili z destilirano vodo.

### **Spremljanje rasti rastlin**

Lončke s semeni smo postavili v rastno komoro in njihovo rast spremljali vsak teden. Pomembno je bilo, da so bili vsi lončki izpostavljeni enakim pogojem - vlagi, temperaturi, svetlobi in količini vode. Edina spremenljivka, ki naj bi torej vplivala na rast je bila koncentracija kroma v vodni raztopini. Rastline smo po 9 dneh zalili z destilirano vodo (100 mL) in poskrbeli, da so bile v vsakem lončku po tri rastline. Torej smo imeli za vsako od 4 koncentracij kroma 3 lončke (oz. 3 ponovitve), v katerih so bile 3 rastline. Na 15. dan od začetka poskusa smo začeli rastline zalivati z raztopinami kroma. En mesec, smo rastline dvakrat na teden zalivali z različnimi koncentracijami raztopine kroma (100 mL).

### **Meritve fotokemične učinkovitosti**

Na 35. dan poskusa smo v vsakem lončku na listu ene od rastlin izmerili dejansko in potencialno fotokemično učinkovitost fotosistema II (PE) z napravo OS5-FL modulated fluorometer (OptiSciences). Pozorni smo bili, da so bile meritve izvedene na čim bolj podobnih listih. Na liste smo najprej za 15 minut namestili sponko in zaprli odprtino ter tako preprečili dostop svetlobe do lista. Po preteklem času smo odprtino odprli in s pomočjo optičnega kabla na list usmerili svetlobo. Naprava je zaznala absorbirano svetlobo in izmerila potencialno fotokemično učinkovitost fotosistema II. Dejansko fotokemično učinkovitost smo merili direktno na svetlobi, pri tem pa smo pazili, da je bila razdalja med listom in senzorjem ustrezna.

### **Merjenje dolžine korenin in poganjkov**

Na 35. dan poskusa smo poskus zaključili. Iz korenin rastlin smo pod vodo odstranili ves substrat in izmerili dolžino vseh korenin in poganjkov. Za vsak lonček posebej smo izračunali povprečne vrednosti dolžine korenin in poganjkov treh rastlin.

### **Merjenje sveže in suhe biomase korenin in poganjkov**

Očiščene korenine in poganjke smo ločili med seboj in sortirali po lončkih. Nato smo določili mase svežih poganjkov in korenin, jih zavili v folijo in posušili. Suh material smo ponovno stekali.

### **Statistična analiza**

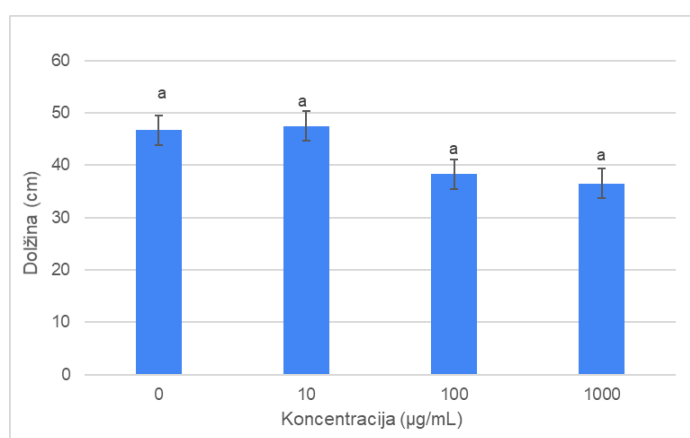
Za interpretacijo rezultatov je bilo potrebno na koncu vse meritve poskusa urediti in statistično obdelati. Vrednosti meritev smo sproti vnašali v Microsoft Excel, temu je sledilo računanje povprečnih vrednosti za vsak lonček posebej. Nato smo s pomočjo programa XL\_toolbox v Excelu naredili test 1-way ANOVA. Test omogoča primerjavo podatkov in pove ali med dvema meritvama obstaja statistično značilna razlika. P-vrednost smo nastavili na 0,05 kar pomeni, da če je ta večja od 0,05 med rezultati ni statističnih razlik. Rezultate testa vsake meritve smo grafično prikazali na stolpičnem grafu

(koncentracija kroma na x osi, povprečna vrednost meritve na y osi in razvrstitev podatkov v razrede glede na statistično razliko).

## Rezultati

Zalivanje s PEG je pustilo vizualne posledice na ječmenu, saj smo zaznali razlike v velikosti med **Dolžina poganjkov**

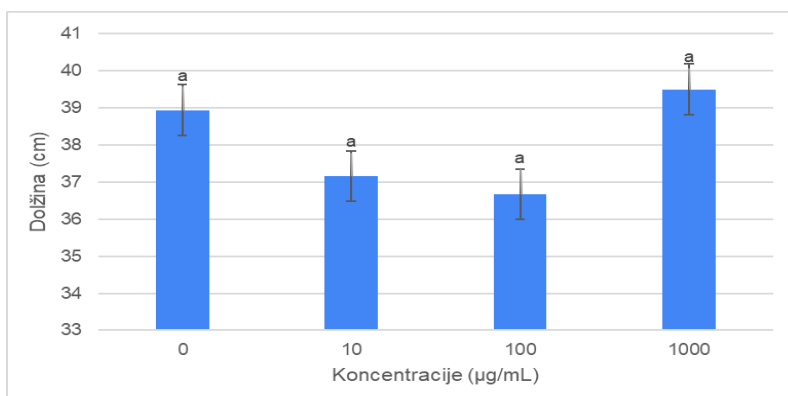
Povprečne dolžine poganjkov in njihove standardne napake so prikazane na Sliki 1. Tekom gojenja in zalivanja rastlin smo opazili hitrejšo in boljšo rast kontrole ter manjšo rast ostalih poganjkov, ki smo jih zalivali z različnimi koncentracijami raztopine kroma. Podatki kažejo, da se povprečna dolžina poganjkov med kontrolo (0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ter preostalimi koncentracijami statistično ne razlikuje. Pričakovali bi, da je rast poganjkov najboljša pri kontroli, kjer smo rastline zalivali z destilirano vodo, najmanjša rast pa pri najvišji koncentraciji kroma. Z našimi podatki tega nismo dokazali.



**Slika 1:** Povprečna dolžina poganjkov koruze, s pripadajočimi standardnimi napakami, pri obravnavi z različnimi koncentracijami raztopine kroma ( $n=9$ , izjema pri koncentraciji 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $n=8$ ).

## Dolžina korenin

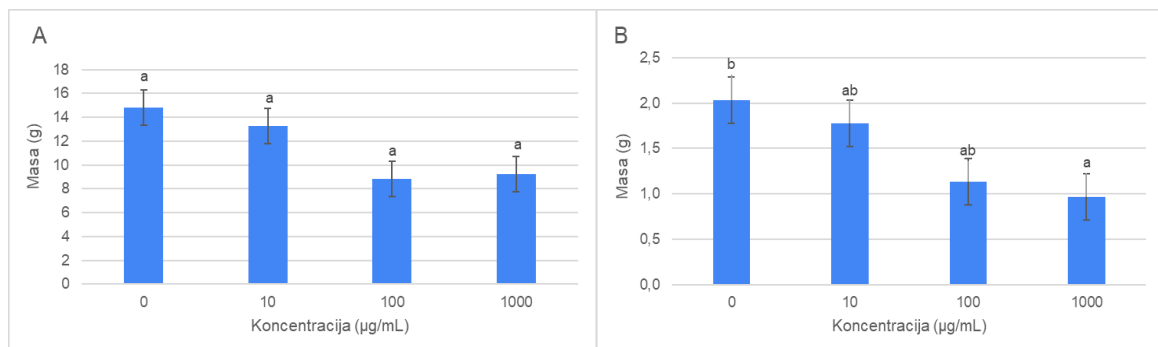
Po končanem poskusu smo izmerili tudi dolžino korenin in rezultate prikazali na Sliki 2. Dolžina korenin se med posameznimi koncentracijami ni pretirano razlikovala in tudi podatki kažejo, da ni prisotne statistične razlike med različnimi koncentracijami.



**Slika 2:** Povprečna dolžina korenin koruze, s pripadajočimi standardnimi napakami, pri obravnavi z različnimi koncentracijami raztopine kroma ( $n=9$ , izjema pri koncentraciji 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $n=8$ ).

## Biomasa poganjkov

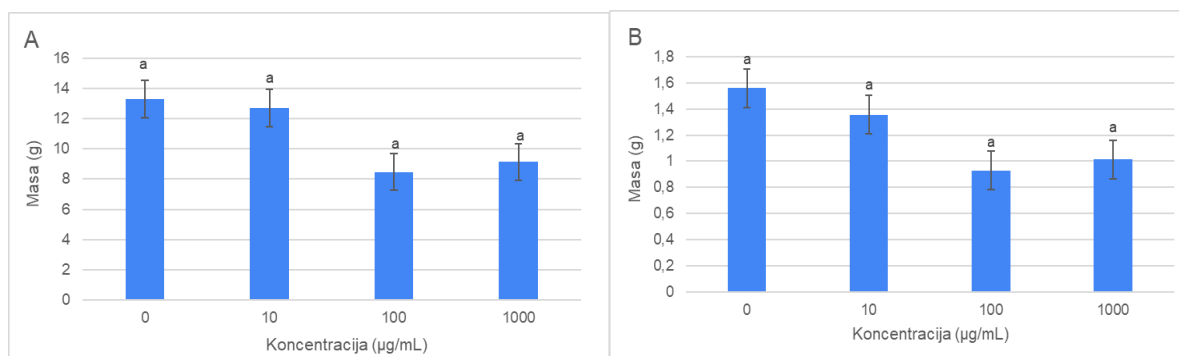
Primerjali smo svežo in suho maso poganjkov ter rezultate prikazali na Sliki 3. Pri masi svežih poganjkov se podatki statistično ne razlikujejo, pri merjenju suhe mase poganjkov pa je prišlo do statistično značilnih razlik, in sicer kontrola (0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) se razlikuje od najvišje koncentracije (1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), iz česar lahko sklepamo, da je najvišja koncentracija kroma negativno vplivala na rast poganjkov in posledično na samo biomaso poganjkov.



**Slika 3:** (A) Povprečna sveža biomasa poganjkov koruze, s pripadajočimi standardnimi napakami, pri obravnavi z različnimi koncentracijami raztopine kroma (n=9, izjema pri koncentraciji 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  n=8). (B) Povprečna suha biomasa poganjkov koruze, s pripadajočimi standardnimi napakami, pri obravnavi z različnimi koncentracijami raztopine kroma (n=9, izjema pri koncentraciji 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  n=8). Različne črke nad stolpci ponazarjajo statistično značilne razlike med obravnavami.

## Sveža biomasa korenin

Primerjali smo tudi svežo in suho biomaso korenin ter rezultate prikazali na Sliki 4. Med rezultati ni statističnih razlik, tako za svežo kot tudi suho biomaso korenin. Če primerjamo rezultate sveže in suhe mase, lahko opazimo samo zmanjšanje mase pri vseh koncentracijah, kar je posledica sušenja korenin.

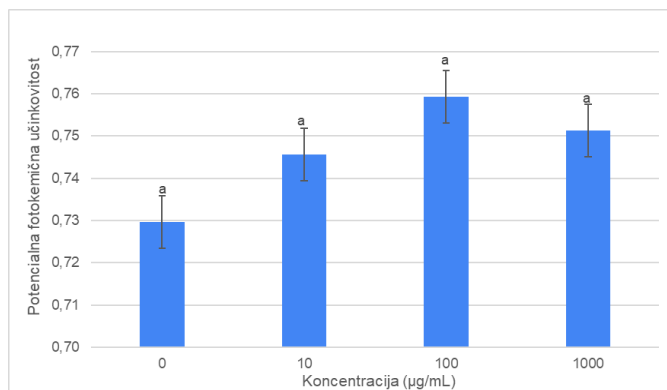


**Slika 4:** (A) Povprečna sveža biomasa korenin koruze, s pripadajočimi standardnimi napakami, pri obravnavi z različnimi koncentracijami raztopine kroma (n=9, izjema pri koncentraciji 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  n=8). (B) Povprečna suha biomasa korenin koruze, s pripadajočimi standardnimi napakami, pri obravnavi z različnimi koncentracijami raztopine kroma (n=9, izjema pri koncentraciji 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  n=8).

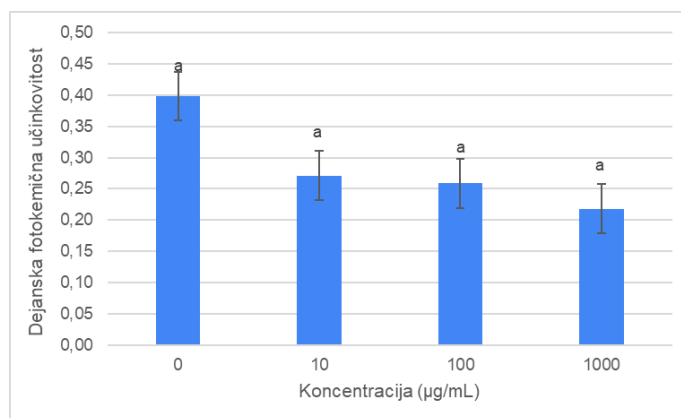
## Meritve fotokemične učinkovitosti

Na Sliki 5 in 6 smo zbrali podatke fotokemične učinkovitosti pet tednov po začetku poskusa. Pričakovali smo, da se bo z naraščajočo koncentracijo kroma v substratu zmanjšala tako potencialna kot tudi dejanska fotokemična učinkovitost. S statistično analizo smo pridobili podatke in narisali grafe, ki nakazujejo, da med našimi vzorci ni statističnih razlik niti v potencialni niti v dejanski fotokemični

učinkovitosti. Pri potencialni fotokemični učinkovitosti so vrednosti višje kot pri dejanski, kar je ustrezno.



**Slika 5:** Povprečna potencialna fotokemična učinkovitost koruze, s pripadajočimi standardnimi napakami, pri obravnavi z različnimi koncentracijami raztopine kroma (n=3).



**Slika 6:** Povprečna dejanska fotokemična učinkovitost koruze, s pripadajočimi standardnimi napakami, pri obravnavi z različnimi koncentracijami raztopine kroma (n=3).



**Slika 7:** Rastline koruze na 35. dan poskusa. Od leve proti desni si koncentracije sledijo v padajočem vrstnem redu: 1000, 100, 10 in 0 µg/mL.

## Razprava

Tekom poskusa smo ugotovili kako krom v različnih koncentracijah vpliva na rast in razvoj koruze. Med obravnavanjem rastlin z različnimi koncentracijami Cr večinoma nismo opazili statistično značilnih razlik. Če bi rastline ocenjevali zgolj vizualno, bi lahko zaključili, da so bile rastline obravnavane z največjo koncentracijo kroma najnižje, hkrati najbolj zelene, čeprav je bila njihova dejanska fotokemična učinkovitost najnižja. Tudi nekatere meritve so kazale na to, da krom ima vpliv na rast rastlin, saj na prvi pogled iz grafov vidimo opazno razliko med neobravnavanimi rastlinami ter tistimi obravnavanimi z najvišjo koncentracijo. To lahko opazimo pri dolžini poganjkov, pri sveži in suhi biomasi poganjkov, pri suhi in sveži biomasi korenin ter pri dejanski fotokemični učinkovitosti. Tega pa ne opazimo pri dolžini korenin in potencialni fotokemični učinkovitosti fotosistema II. Za samo dolžino korenin smo že pri meritvah opazili, da se dolžine med seboj res razlikujejo in ni opazne povezave z obravnavo s kromom. Statistične analize pa so nam pokazale, da krom v resnici nima bistvenega vpliva na gojenje koruze, z izjemo vpliva na suho biomaso poganjkov. Pri slednji smo med vrednostmi kontrolnih rastlin in rastlin obravnavanih z največjo koncentracijo kroma ugotovili statistično značilne razlike.

Pretekle raziskave o vplivu kroma na koruzo so večinoma pokazale, da ima krom vpliv na kaljivost semen, dolžino poganjkov, dolžine korenin, dolžine sadik, svežo biomaso, suho biomaso, hranilno vrednost, na samo vsebnost kroma v rastlini, vsebnost kislih fosfataz in aktivnost peroksidaz (Mohammed in sod., 2021; Naseem in sod., 2015). Pokazali so tudi, da je koruza lahko hiperakumulator kroma v podzemnem delu, vendar je navadno v tem primeru precej zmanjšana nadzemna rast (Saad in sod., 2022). Kot že omenjeno, smo vpliv opazili tudi mi, a nismo dobili statistično značilnih razlik. Vzrok tega bi lahko bilo dejstvo, da celice ob višji koncentraciji kroma sprožijo aktivacijo določenih transkripcijskih faktorjev in genov povezanih s stresom (Ding in sod., 2009). Tako so se morda naše rastline v začetnih fazah rasti uspešno spopadale s prisotnostjo kroma. Po drugi strani pa je potrebno poudariti, da smo v poskusu uporabili relativno majhno število rastlin, ki smo jih opazovali le v začetnih fazah rasti in morda že zaradi tega nismo dobili dovolj zanesljivih rezultatov. Poleg večjega števila rastlin v poskusu, bi morali za bolj reprezentativne rezultate uporabiti tudi primernejše raztopine kroma, kajti v našem primeru je bil krom zelo slabo topen v vodi in posledično raztopine kljub pazljivosti in mešanju niso bile homogene. Ker so se v raztopinah še vedno nahajali neraztopljeni delci, ne vemo zagotovo, kakšni količini kroma so bile rastline dejansko izpostavljene v času eksperimenta.

## Zaključki

Tekom našega eksperimenta smo prišli do zaključka, da ima krom manjši vpliv na rast koruze v začetnih fazah. Vseeno ne moremo potrditi hipoteze, ki pravi, da bosta rast in razvoj koruze na nivoju rasti korenin in poganjkov, biomase in fotokemične učinkovitosti zavrta sorazmerno z naraščajočo koncentracijo kroma v lončku. Kot smo že omenili, smo razlike lahko opazili pri izgledu rastlin, prav tako pri večini rezultatov, vendar te razlike niso statistično značilne (z izjemo primera suhe biomase poganjkov koruze).

Po našem mnenju bi bilo potrebno izvesti še nadaljnje raziskave, v katerih bi uporabili večje število rastlin. Poleg tega bi bilo smiselno preveriti tudi končno sestavo substrata in elementno sestavo posameznih delov rastlin. S tem bi ugotovili, ali rastline koruze zares akumulirajo krom ter ga skladiščijo, ali ta ostaja v substratu zaradi morebitne nedostopnosti (vzrok slaba topnost) ali pa mehanizmov, ki uspešno preprečujejo vstop kroma v organizem. Tako bi v primeru akumulacije ugotovili v kakšnih koncentracijah ga skladiščijo in ali je v teh primerih koruza primerna za nadaljnjo uporabo, na primer za prehrano.

## Literatura

- Ding H, Tan M, Zhang C, Zhang Z, Zhang A, Kang Y (2009) Hexavalent chromium (VI) stress induces mitogen-activated protein kinase activation mediated by distinct signal molecules in roots of *Zea mays* L. *Environmental and Experimental Botany*, 67, 2: 328–334
- Erenstein O, Jaleta M, Sonder K, Mottaleb K (2022) Global maize production, consumption and trade: trends and R&D implications. *Food Security*, 14: 1295–1319. <https://doi.org/10.1007/s12571-022-01288-7>
- Jogawat A, Yadav B, Chhaya, Narayan, OP (202) Metal transporters in organelles and their roles in heavy metal transportation and sequestration mechanisms in plants. *Physiologia Plantarum*, 173, 1: 259-275
- Kapoor RT, Bani Mfarrej MF, Alam P, Rinklebe J, Ahmad P (2022) Accumulation of chromium in plants and its repercussion in animals and humans. *Environmental Pollution*, 301: 119044. [doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119044](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119044)
- Kopittke PM, Gianoncelli A, Kourousias G, Green K, McKenna BA (2017) Alleviation of Al Toxicity by Si Is Associated with the Formation of Al-Si Complexes in Root Tissues of Sorghum. *Front Plant Sci*, 8: 2189. doi: 10.3389/fpls.2017.02189
- Kumar P, Longmei N, Choudhary M, Gupta M, Kumar B, Jat BS, Bhushan B, Manesh Chander MD, Aggarwal SK (2023) Enhancement of nutritional quality in maize grain through QTL-based approach. *Cereal Research Communications*. <https://doi.org/10.1007/s42976-023-00378-2>
- Mohammed B, Mohammed T, M'hammed E, Tarik A (2021) Physiological and physico-chemical study of the effect of chromium VI on the nutritional quality of maize (*Zea mays* L.). *Procedia Computer Science*, 191, 463–468
- Naseem S, Yasin M, Ahmed A, Faisal M (2015) Chromium Accumulation and Toxicity in Corn (*Zea mays* L.) Seedlings. *Polish Journal of Environmental Studies*, 24: 899-904
- Ranum P, Peña-Rosas JP, Garcia-Casal MN (2014) Global maize production, utilization, and consumption. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1312, 1: 105-112. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-5961-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-007-5961-9_2)
- Saud S, Wang D, Fahad S, Javed T, Jaremko M, Abdelsalam NR, Ghareeb RY (2022) The impact of chromium ion stress on plant growth, developmental physiology, and molecular regulation. *Frontiers in Plant Science*, 13: 994785. [doi.org/10.3389/fpls.2022.994785](https://doi.org/10.3389/fpls.2022.994785)
- Sharma S, Handa A, Sharma S (2020) Maize: Its Importance and Future Prospects. *Agro-Techniques for Sustainable Management of Plant Diseases*. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-5172-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-15-5172-2_1)

# VPLIV KROMA RAST IN RAZVOJ KUMARE

Aneja Hvalič, Viktorija Primc, Anja Verbanec, Tina Živič

## Izvleček

Namen poskusa je bil ugotoviti vpliv različnih koncentracij kroma na rast navadne kumare (*C. sativus*) preko spremljanja višine poganjkov, dolžine korenin, merjenja sveže in suhe biomase ter fotokemične učinkovitosti fotosistema II. V našem poskusu je vpliv kroma nejasen, saj z izjemo dejanske fotokemične učinkovitosti, saj razlike med kontrolo in obravnavo s Cr niso statistično značilni. Kontrolne rastline imajo višjo fotokemično učinkovitost od obravnavanih.

**Ključne besede:** *Cucumis sativus*, krom, inhibicija rasti, toksičnost, kopičenje kovin, rakotvorne snovi, oksidativni stres, fotokemična učinkovitost

## Uvod

Krom (Cr) je dobro topna kovina, ki je v povečanih koncentracijah lahko rakotvorna. V naravi je Cr prisoten v vulkanskem prahu in kamnitih tleh (Sharma et al. 2020). V splošnem obstajata dve stabilni oksidacijski stanji kroma ( $\text{Cr}^{6+}$  in  $\text{Cr}^{3+}$ ), pri čemer je  $\text{Cr}^{6+}$  bolj toksičen kot  $\text{Cr}^{3+}$ .  $\text{Cr}^{6+}$  se lahko reducira v  $\text{Cr}^{3+}$  z redoks reakcijami. Rastline lahko sprejmejo krom v obeh oblikah, pri čemer je sprejemanje  $\text{Cr}^{3+}$  pasivno,  $\text{Cr}^{6+}$  pa aktivno (Pati et al. 2014).

Uporablja se v številnih industrijskih panogah, kot so galvanizacija, barvanje tekstila, predelava usnja in proizvodnja jekla. Odpadna voda s kromom se steka v okolje, kar znatno poveča njegovo vsebnost v okolju. V svetovne vodne ekosisteme se letno izpusti približno 112 000 ton kroma, pri čemer 40 % celotne industrijske uporabe predstavlja usnjarska industrija (Pati et al. 2014). V Sloveniji so še danes vidne posledice onesnaženja tal s kromom na območju nekdanjega usnjarskega podjetja na Vrhniki (Priatelj Videmšek 2017). Kromov ion je nevaren zaradi visoke topnosti, onesnažuje podtalnico in se lahko prenaša po prehranjevalni verigi (Sharma et al. 2020). Toksične in rakotvorne lastnosti  $\text{Cr}^{6+}$  izhajajo iz možnosti proste difuzije kromatnih ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ) ionov skozi celične membrane in njihovega oksidativnega učinka ter nastajanja prostih radikalov med redukcijo  $\text{Cr}^{6+}$  v  $\text{Cr}^{3+}$  v celicah (Pati et al. 2014).

Rastline imajo izjemno sposobnost absorpcije, prenosa in kopičenja težkih kovin in organskih spojin iz okolja. Kadar sprejmejo več kationov kot anionov, korenine zaradi ohranjanja ravnovesja sproščajo protone, ter jih v nasprotnem primeru sprejemajo. pH izrazito vpliva na biorazpoložljivost številnih hranil, odvisnih od pH, in potencialno toksičnih kovin (krom, kadmij, živo srebro). Za rastline ni esencialen element, temveč rast zavira, saj ovira njihove metabolne procese in povzroča oksidativni stres (Pati et al. 2014). Prevelike koncentracije kroma v rastlinskih tkivih lahko povzročijo več morfoloških, fizioloških in biokemičnih sprememb v rastlinah. Vsebnost kroma zmanjšuje njihovo rast, saj povzroča ultrastrukturne spremembe celičnih membran in kloroplastov, poškoduje koreninske celice, zmanjšuje vsebnost pigmentov, vpliva na transpiracijo in asimilacijo dušika ter spreminja različne encimske aktivnosti (Sharma et al. 2020).

Z izvedenim poskusom smo želeli določiti vpliv kroma na rast in fotosintezno sposobnost navadne kumare (*Cucumis sativus*). Kontrolnim in obravnavanim rastlinam smo po štirih tednih določili višine poganjkov in dolžine korenin, rastlinsko svežo in suho maso ter izmerili potencialno in dejansko fotokemično učinkovitost fotosistema II. Pričakovali smo, da se bo pri s Cr obravnavanih rastlinah zmanjšala rast korenin in poganjkov ter da bo vpliv kroma z naraščajočo koncentracijo vse večji. Bolj kot nadzemni deli naj bi bile prizadete korenine, saj se krom v večjih količinah akumulira v podzemnem

delu in zavira delitev koreninskih celic, podaljševanje korenin ter celični cikel v korenini. Prav tako smo po obravnavanju z visokimi koncentracijami kroma pričakovali, da bodo rastline kazale zmanjšanje fotokemične učinkovitosti fotosistema II (Pati et al. 2014).

## Materiali in metode

Poskus smo izvajali v treh ponovitvah, zato smo na pladenj pripravili 12 lončkov. V vsakega smo v mešanico zemlje in perlita posejali pet komercialnih semen navadne kumare in jih zalili z destilirano vodo. Rastline smo vzgajali v rastni komori Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, kjer jim je bila zagotovljena enakomerna temperatura, vlaga in osvetlitev.

Za zalivanje smo v laboratoriju pripravili raztopine kroma  $\text{Cr}^{3+}$  v koncentracijah 10, 100 in 1000 mg/l. Zaradi slabe topnosti je bilo raztapljanje precej neuspešno.

V prvem tednu smo semena zalili s 100 ml destilirane vode na lonček. Semena niso vzknila enakomerno, zato smo pred prvim obravnavanjem izenačili število rastlin v vseh lončkih - nadalje so v vsakem rastle štiri. V naslednjih treh tednih smo jih dvakrat tedensko zalili s 100 ml ustrezne raztopine kroma na lonček. Kontrolne rastline smo zalivali z destilirano vodo (koncentracija kroma 0 mg/l).

Po štirih tednih rasti smo na vsaki rastlini izbrali po en list in s fluorometrom (PAM-2500) izmerili potencialno in dejansko fotokemično učinkovitost. Meritve smo izvedli v laboratoriju. Izmerili smo dolžine nadzemnih delov rastlin (poganjkov) in jim sprali korenine. Ločili smo nadzemne in podzemne dele, jih stekali in tako pridobili podatke o sveži masi. Izmerili smo dolžino korenin in jih ločeno od poganjkov položili na označene aluminijaste folije. Rastlinski material smo tri dni sušili na 60 °C in določili suho maso.

## Rezultati

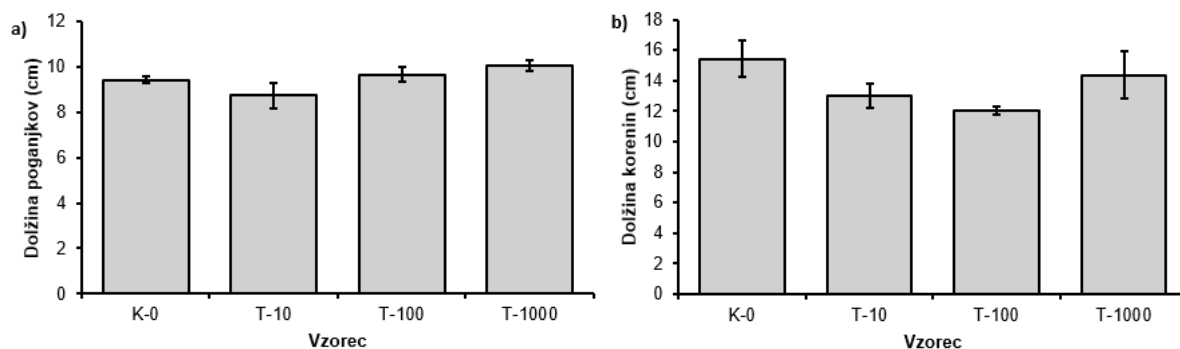
Na Sliki 1 je fotografija poskusnih rastlin navadne kumare. Razen leve (kontrolna rastlina) so bile vse obravnavane z različnimi koncentracijami kroma ( $\text{Cr}^{3+}$ ). Tistim, ki so bile zalivane z raztopino kroma, so se listi obarvali rumeno.



**Slika 8:** Poskusne rastline navadne kumare po štirih tednih obravnavanja z raztopino kroma (prva z leve je kontrolna, sledijo ji rastline, zalivane z raztopinami kroma v koncentracijah 10, 100 in 1000 mg/l).

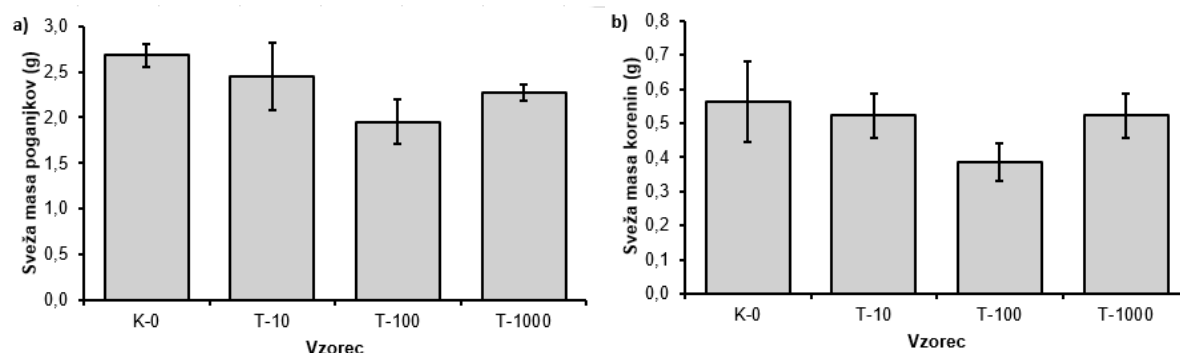
Dolžine poganjkov (a) in korenin (b) navadne kumare (*C. sativus*), obravnavane z različnimi koncentracijami kroma ( $\text{Cr}^{3+}$ ) so prikazane na Sliki 2. Po narejeni statistični analizi podatkov o dolžinah poganjkov in korenin z metodo ANOVA lahko z zanesljivostjo trdimo, da ni statistično značilnih razlik med kontrolnimi in obravnavanimi rastlinami.





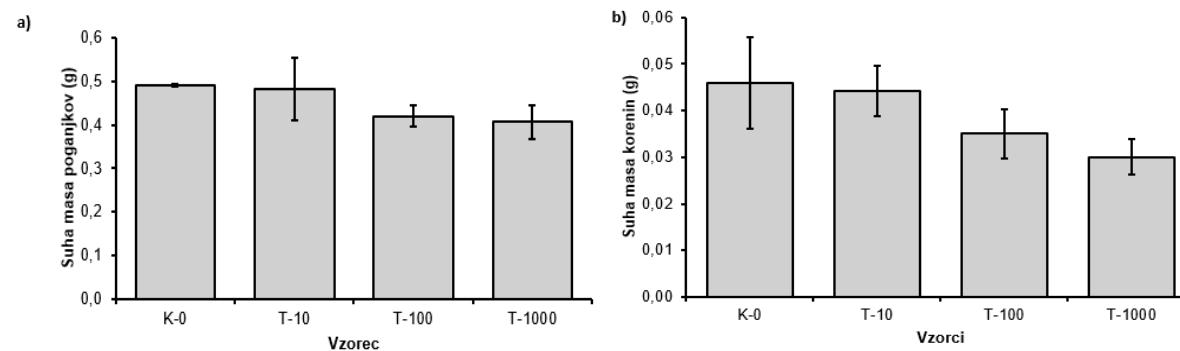
**Slika 9:** Dolžina pogankjov (a) in korenin (b) navadne kumare po štirih tednih obravnavanja z raztopino kroma, podana v centimetrih (povprečje  $\pm$  SE;  $n = 3$ ). Prvi stolpec z leve pripada kontrolnim rastlinam (K-0), sledijo ji rastline, zalivane z raztopinami kroma v koncentracijah 10 mg/l (T-10), 100 mg/l (T-100) in 1000 mg/l (T-1000) (enosmerna ANOVA, Holm-Sidak post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

Svežo maso pogankjov (a) in korenin (b) navadne kumare, obravnavane z različnimi koncentracijami kroma ( $\text{Cr}^{3+}$ ) prikazuje Slika 3. Po narejeni statistični analizi podatkov o svežih masah pogankjov in korenin z metodo ANOVA lahko z zanesljivostjo trdimo, da ni statistično značilnih razlik med kontrolnimi in obravnavanimi rastlinami.



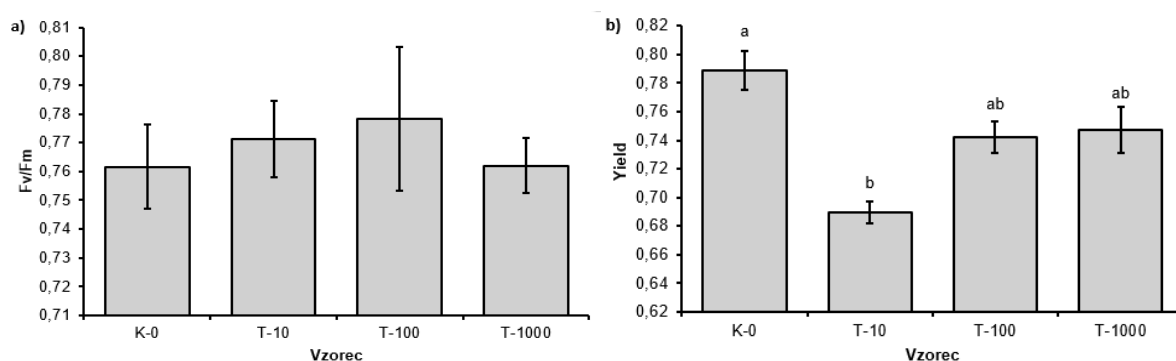
**Slika 10:** Sveža masa pogankjov (a) in korenin (b) navadne kumare po štirih tednih obravnavanja z raztopino kroma, podana v gramih (povprečje  $\pm$  SE;  $n = 3$ ). Prvi stolpec z leve pripada kontrolnim rastlinam (K-0), sledijo ji rastline, zalivane z raztopinami kroma v koncentracijah 10 mg/l (T-10), 100 mg/l (T-100) in 1000 mg/l (T-1000) (enosmerna ANOVA, Holm-Sidak post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

Suho maso pogankjov (a) in korenin (b) navadne kumare, obravnavane z različnimi koncentracijami kroma ( $\text{Cr}^{3+}$ ) prikazuje Slika 4. Po narejeni statistični analizi podatkov o suhih masah pogankjov in korenin z metodo ANOVA lahko z zanesljivostjo trdimo, da ni statistično značilnih razlik med kontrolnimi in obravnavanimi rastlinami.



**Slika 11:** Suha masa poganjkov (a) in korenin (b) navadne kumare po štirih tednih obravnavanja z raztopino kroma, podana v gramih (povprečje  $\pm$  SE; n = 3). Prvi stolpec z leve pripada kontrolnim rastlinam (K-0), sledijo ji rastline, zalivane z raztopinami kroma v koncentracijah 10 mg/l (T-10), 100 mg/l (T-100) in 1000 mg/l (T-1000) (enosmerna ANOVA, Holm-Sidak post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

Na Sliki 5 sta prikazani potencialna (a) in dejanska (b) fotokemično učinkovitost navadne kumare, obravnavane z različnimi koncentracijami kroma ( $\text{Cr}^{3+}$ ). Po narejeni statistični analizi podatkov o dejanski in potencialni fotokemični učinkovitosti z metodo ANOVA lahko z zanesljivostjo trdimo, da pri slednji ni statistično značilnih razlik med kontrolnimi in obravnavanimi rastlinami. Pri dejanski so med podatki statistično značilne razlike, in sicer imajo kontrolne rastline višjo vrednost kot kumare, obravnavane s koncentracijo 10 mg/l. Med obravnavanimi rastlinami je prišlo do segregacije pri rezultatih dejanske učinkovitosti, saj ima vzorec z najnižjo koncentracijo dodanega kroma (10 mg/l) najnižjo in vzorec z najvišjo koncentracijo dodanega kroma (1000 mg/l) najvišjo dejansko fotokemično učinkovitost.



**Slika 12:** Potencialna (a) in dejanska (b) fotokemična učinkovitost navadne kumare po štirih tednih obravnavanja z raztopino kroma (povprečje  $\pm$  SE; n = 3). Prvi stolpec z leve pripada kontrolnim rastlinam (K-0), sledijo ji rastline, zalivane z raztopinami kroma v koncentracijah 10 mg/l (T-10), 100 mg/l (T-100) in 1000 mg/l (T-1000). Različne črke prikazujejo statistično značilne razlike med posameznimi koncentracijami kroma (enosmerna ANOVA, Holm-Sidak post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

## Razprava

Pri kumarah, zalivanih s kromom, smo opazili rumene liste z nižjo vsebnostjo klorofila. Predvidevamo lahko, da je zmanjšanje vsebnosti klorofila pri višjih koncentracijah kroma posledica razgradnje tilakoidnih ovojníc in kloroplastov (Pati et al. 2014).

Izvedli smo statistično analizo podatkov dejanske fotokemične učinkovitosti med obravnavanimi in kontrolnimi rastlinami. Z zanesljivostjo lahko trdimo, da se meritve kontrolnih rastlin statistično značilno razlikujejo od obravnavanih z 10 mg/l (T-10). Kontrolne rastline imajo precej boljše dejansko fotokemično učinkovitost od T-10. To je pričakovano, saj niso bile obravnavane s kromom, medtem ko je pri T-10 le-ta negativno vplival na vršenje fotosinteze. Znano je, da je krom za rastline toksičen, saj vpliva na veliko celičnih biokemijskih procesov. Znižuje hitrost prenosa elektronov in fotosintezno učinkovitost, saj povzroča tvorbo reaktivnih kisikovih zvrsti (superoksidnega radikala ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), vodikovega peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) in hidroksilnega radikala ( $\text{OH}^{\cdot}$ )), zaradi katerih se v rastlini zmanjša proizvodnja fotosinteznih pigmentov (klorofilov in karotenoidov). Povzroči zmanjšano delovanje fotosistema II (Tripathi et al. 2016).

Dobljene informacije našemu poskusu ne dodajo velike vrednosti, saj so vse ostale meritve statistično neznačilne. Če se pri rastlinah, obravnavanih z 10 mg/l, kaže vpliv kroma pri dejanski fotokemični

učinkovitosti, bi pričakovali podkrepitev opaženega vpliva kroma tudi pri drugih izvedenih meritvah, vendar pri ostalih meritvah nimamo statistično značilnih razlik in primerjave niso možne.

Razlogi za pomanjkljive rezultate, ki nam ne omogočajo vrednotenja hipotez, so številni. Raztopine kroma so vsebovale trdne, neraztopljene delce. V rastni komori niso bili zagotovljeni optimalni pogoji za rast, saj osvetlitev ni bila enakomerna. Pri zalivanju smo opazili, da so bile rastline zaradi uporabe istega pladnja izpostavljene zalivalni tekočini sosednjih rastlin in so tako potencialno vse rastline, vključno s kontrolo, prejemale raztopine iz sosednjih obravnavanih skupin. Pri spiranju korenin in rokovanju z rastlinami med meritvami je prihajalo do poškodb ter posledično krajših odčitkov dolžin. Merjenje fotokemične učinkovitosti bi moralo potekati na soncu.

## Zaključki

Obravnavanje navadne kumare z različnimi koncentracijami kromove raztopine je večinoma rezultiralo v podatkih, pri katerih nismo imeli statistično značilnih razlik, z izjemo dejanske fotokemične učinkovitosti. Na podlagi tega ne moremo podati celostnega sklepa o vplivu kroma na rast navadne kumare. Hipoteze o zmanjšani rasti obravnavanih rastlin ne moremo ne potrditi ne zavreči zaradi prej navedenega razloga. Hipotezo o zmanjšani fotokemični učinkovitosti s kromom obravnavanih rastlin lahko z zadržkom potrdimo, saj so kontrolne rastline kazale večjo učinkovitost fotosistema II kot s Cr obravnavane rastline. Pri nadaljnjih študijah bi bilo predvsem primerno uporabiti več rastlin v posameznih lončkih za zalivanje, kar bi omogočilo ločen poskus. Višje število rastlin, ki bi jih spremljali skozi daljše časovno obdobje, bi prav tako rezultiralo v natančnejših in pravilnejših rezultatih.

## Literatura

- Pati S, Ghadei A, Arzoo A, et al (2014) Physiological responses induced by chromium +6 toxicity to *Cucumis sativus* L. and *Macrotyloma uniflorum* Lam. Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology 8:58-63. <https://doi.org/10.9790/2402-081215863>
- Prijatelj Videmšek M (2017) Potrebujemo podrobno študijo o onesnaženju tal po požaru v Kemisu. Delo. <https://old.delo.si/novice/okolje/potrebujemo-podrobno-studijo-o-onesnazenju-tal-po-pozaru-v-kemisu.html> (14. jun. 2023)
- Sharma A, Kapoor D, Wang J, et al (2020) Chromium bioaccumulation and its impacts on plants: An overview. Plants 9:100. <https://doi.org/10.3390/plants9010100>
- Tripathi A, Tripathi DK, Chauhan DK, et al (2016) Chromium (VI)-induced phytotoxicity in river catchment agriculture: evidence from physiological, biochemical and anatomical alterations in *Cucumis sativus* (L.) used as model species. Chemistry and Ecology 32:12–33. <https://doi.org/10.1080/02757540.2015.1115841>

# VPLIV SVINCA NA RAST IN RAZVOJ KORUZE

Agata Kokalj Malovrh, Juš Miklavčič, Katja Palovšnik, Pia Eva Pogač

## Izveček

Rastline so tarča širokega nabora onesnaževal, ki se razlikujejo po koncentraciji, speciaciji in strupenosti. Med pogostimi onesnaževali, ki prizadenejo rastline, je svinec eden najbolj strupenih in pogostih zaradi njegove obstojnosti. Namen raziskovalnega dela je bilo preučiti vpliv svinca na kalitev in rast koruze pod stalnimi ravnimi pogoji v komori. Poskus smo oblikovali tako, da smo vzgojili sadike koruze iz semen in od začetka kalitve zalivali z različnimi količinami raztopine svinca. Pričakovali smo različne rezultate med poskusnimi dozami. Po štirih tednih rasti rastlin smo izvedli morfološko analizo, določili suho biomaso in izmerili fotokemično učinkovitost. Izkazalo se je, da uporabljene koncentracije svinca niso vplivale na morfologijo rastlin, saj se rezultati niso statistično razlikovali od kontrolne skupine. Opazili smo zmanjšano potencialno fotokemično učinkovitost pri najvišji koncentraciji. Zaključili smo, da uporabljene raztopine svinca v poskusu nimajo vpliva na morfologijo in fotosintezo pri koruzi.

**Ključne besede:** koruza, kovine, svinec

## Uvod

Svinec (Pb) je naravno prisoten v zemeljski skorji in njegove naravne ravni ostajajo pod 50 mg/kg (Pourrut in sod., 2011). Poleg naravnih virov se svinec sprošča predvsem iz več antropogenih virov vključno z rudarjenjem, sežiganjem premoga, odpadkami iz skladišč, industrije baterij, avtomobilskimi izpušnimi plini, galvanizacijo kovin, strojenjem usnja, izdelavo gnojil in pesticidov. Zaradi vsestranske uporabe je eden najpogostejših onesnaževalcev s težkimi kovinami v tleh. Čeprav večina znanstvenih del na tem področju preučuje vpliv svinca na zdravje ljudi, je iz obstoječe literature že znano, da vpliva tudi na rast rastlin. Rezultati obstoječe literature o vplivu svinca na rast koruze so pokazali močno inhibicijo rasti primarnih korenin. Rastline akumulirajo znaten del svinčevih ionov iz tal, zato je večina svinca skoncentrirana v koreninah, prenos v stebela in liste pa je omejen (Collin in sod., 2022).

V tleh se svinec lahko pojavlja kot prosti kovinski ion, kompleksiran z anorganskimi sestavinami (npr.  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  in  $\text{Cl}^-$ ) ali kot organski ligand (npr. aminokislina, fulvo kisline in huminske kisline); lahko se tudi adsorbira na površine delcev (npr. železovi oksidi, biološki material, organske snovi in glineni delci). Vendar pa obnašanje svinca v tleh glede na vrste, topnost, mobilnost in biološko dostopnost v veliki meri nadzirajo zapletene interakcije, ki jih uravnavajo številni biogeokemični dejavniki. Ti dejavniki vključujejo pH, redoks pogoje, kationsko izmenjalno kapaciteto, mineralogijo tal, biološke pogoje in količino prisotnega svinca. Vsi naštetni dejavniki lahko spremenijo obnašanje prisotnega svinca v tleh ter hitrost sprejemanja s strani rastlin (Pourrut in sod., 2011).

Svinec v rastlinah nima biološkega namena. Dokazani toksični učinki na višjih rastlinah obsegajo zaviranje vodnega neravnovesja, moteno mineralno prehrano in encimske aktivnosti, vpliva pa tudi na spremembo hormonskega stanja ter spremembo membranske prepustnosti. Svinec v visokih koncentracijah zavira celične aktivnosti in tako povzroči celično smrt (Hussain in sod., 2013).

Naš cilj je preveriti, kako različne koncentracije svine vplivajo na kalitev in rast koruze (*Zea mays*). Predvidevali smo, da bo koruza z nizkimi koncentracijami (10 µg/mL) rasla primerljivo s kontrolno skupino, saj predvidevamo da je koruza prilagojena na prisotnost nižjih koncentracij. Pri srednji koncentraciji (100 µg/mL) bo zmanjšana rast, pri najvišji koncentraciji (1000 µg/mL) se bo rastlina začela sušiti zaradi oslabljenih korenin. Pričakujemo, da se bo učinkovitost fotosinteze s povečevanjem koncentracije svine zmanjševala.

## **Metode in materiali**

### **Priprava raztopin in potek poskusa**

Za preverjanje vpliva svine na rast in razvoj koruze smo pripravili 10 µg/mL, 100 µg/mL, 1000 µg/mL raztopine svinčevega (II) klorid anhidrata (PbCl<sub>2</sub>) tako, da smo zatehtali ustrezno količino svine in jo raztopili v destilirani vodi. Kot kontrolo smo uporabili destilirano vodo.

Semena koruze smo posejali v substrat, ki je bil mešanica zemlje za rože in vermikulita. Za vsako koncentracijo smo naredili tri ponovitve. V tri lončke z izbrano koncentracijo smo posadili po štiri semena koruze. Prvi dan smo semena zalili z destilirano vodo, 10. dan po nastavitvi poskusa pa smo rastline začeli zalivati z izbranimi koncentracijami raztopine svinčevega (II) klorid anhidrata. Rastline smo zalivali 4 tedne, dvakrat tedensko. Gojili smo jih v rastni komori pri 24 °C s fotoperiodo 16/8h.

### **Morfološka analiza**

Rastline smo po 4 tednih vzeli ven iz lončkov in s korenin temeljito odstranili ostanke substrata. Nato smo izmerili dolžine poganjkov in korenin, ter stehtali njihovo svežo biomaso. Poganjke in korenine smo posušili v sušilcu in določili še njihovo suho biomaso.

### **Merjenje fotokemične učinkovitosti**

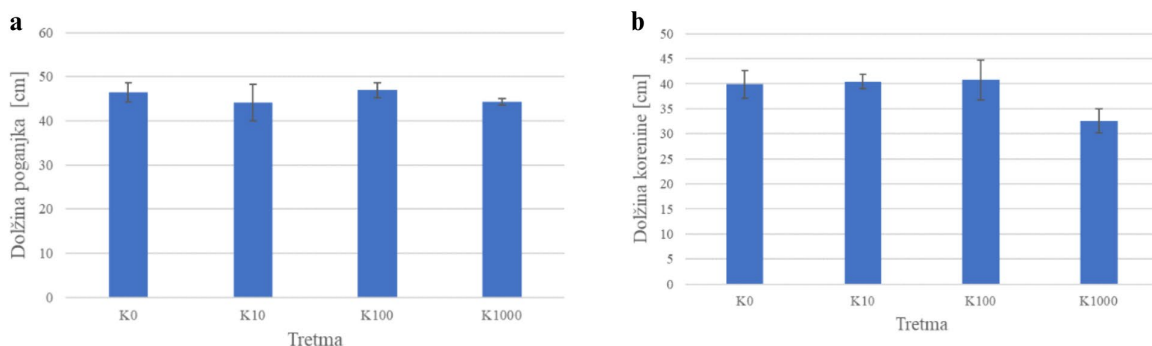
S fluorometrom (OS5-FL modulated fluorometer, OptiSciences) smo merili fotokemično učinkovitost fotosistema II. Merili smo dejansko in potencialno fotokemično učinkovitost, meritve pa smo opravili na listu ene od rastlin iz vsakega lončka. Za meritev potencialne učinkovitosti fotosistema II, smo na liste najprej za 10 minut namestili sponko, ki je preprečila dostop svetlobe do lista. Nato smo sponko odprli in na list usmerili snop svetlobe z optičnim kablom ter opravili meritve. Za meritev dejanske fotokemične učinkovitosti pa smo meritve opravili direktno na svetlobi. Obe meritvi sta bili izvedeni na istem listu.

## **Rezultati**

V nadaljevanju so dodani grafični prikazi rezultatov meritev za poskusne skupine obravnavanja koruze z: K0 = 0 µl/mL Pb raztopine, K10 = 10 µl/mL Pb raztopine, K100 = 100 µl/mL Pb raztopine, K1000 = 1000 µl/mL Pb raztopine.

## Dolžina poganjkov in korenin

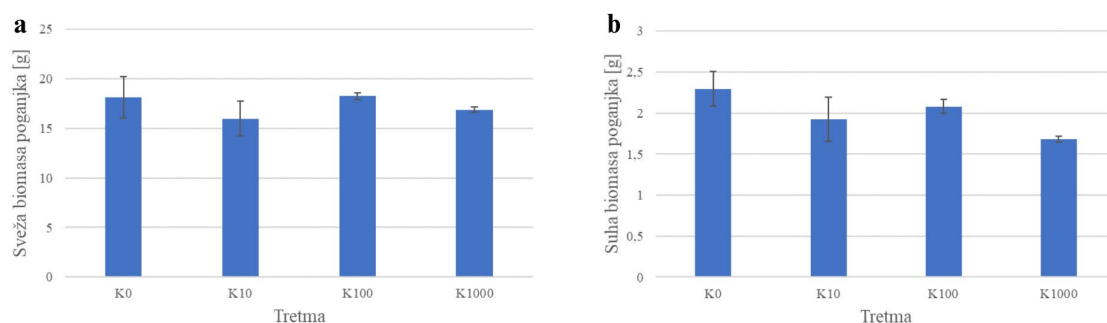
Pri merjenju dolžine poganjkov in korenin koruze (Slika 1) nismo zaznali statističnih razlik med različnimi obravnavami.



**Slika 1:** Dolžina poganjkov koruze (a) in dolžina korenin koruze (b) po štirih tednih zalivanja z 0, 10, 100 in 1000  $\mu\text{g/mL}$  raztopine Pb. Prikazana so povprečja  $\pm$  standardne napake ( $n=4$ ).

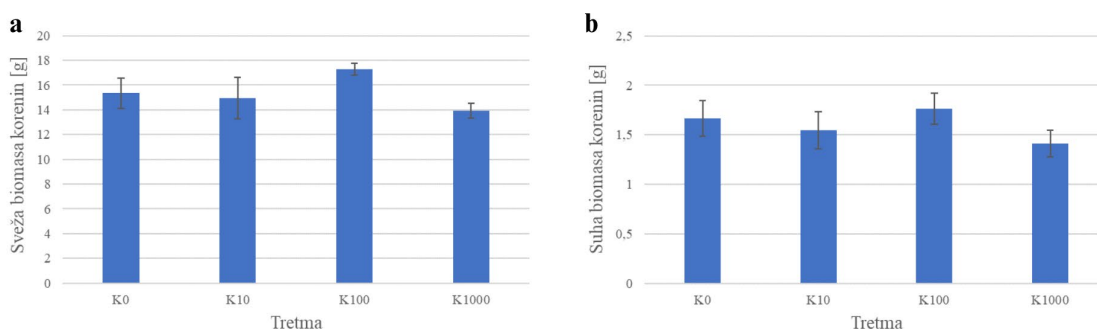
## Sveža in suha biomasa poganjkov ter korenin

Pri merjenju sveže in suhe biomase poganjkov koruze (Slika 2) nismo zaznali statističnih razlik med različnimi obravnavami.



**Slika 2:** Sveža biomasa (a) in suha biomasa (b) poganjkov koruze po štirih tednih zalivanja z 0, 10, 100 in 1000  $\mu\text{g/mL}$  raztopine Pb. Prikazana so povprečja  $\pm$  standardne napake ( $n=4$ ).

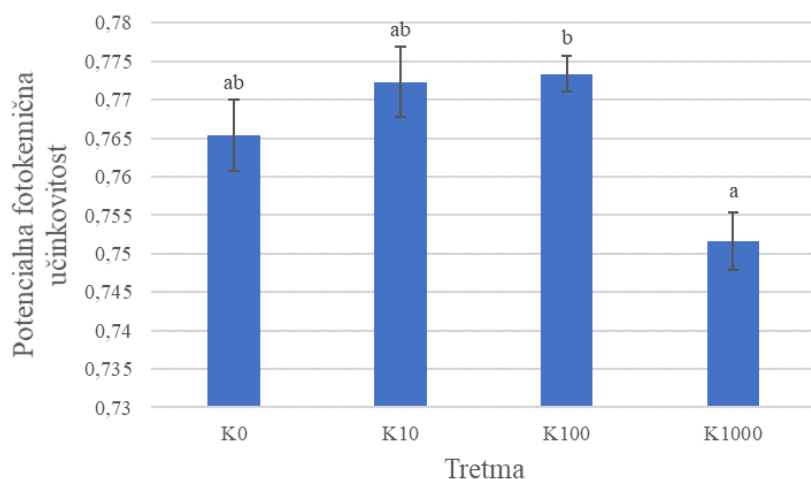
Pri merjenju sveže in suhe biomase korenin koruze (Slika 3) nismo zaznali statističnih razlik med različnimi obravnavami.



**Slika 3:** Sveža (a) in suha (b) biomasa korenin koruze po štirih tednih zalivanja z 0, 10, 100 in 1000  $\mu\text{g/mL}$  raztopine Pb. Prikazana so povprečja  $\pm$  standardne napake ( $n=4$ ).

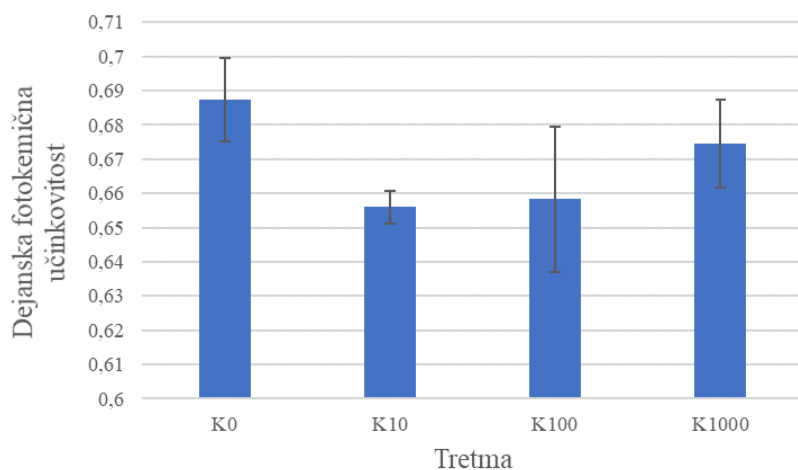
### Fotokemična učinkovitost fotosistema II

Pri potencialni fotokemični učinkovitosti obstaja statistična razlika med obravnavo 100  $\mu\text{g/mL}$  in 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Rastline obravnavane z 1000  $\mu\text{g/mL}$  Pb raztopine imajo manjšo potencialno fotokemično učinkovitost, kot rastline obravnavane z 100  $\mu\text{g/mL}$ . Med 0, 10 in 100  $\mu\text{g/mL}$  raztopine Pb ni statističnih razlik. Prav tako pa statističnih razlik ni tudi med 0, 10 in 1000  $\mu\text{g/mL}$  raztopine Pb.



**Slika 4:** Potencialna fotokemična učinkovitost fotosistema II. Prikazana so povprečja  $\pm$  standardne napake ( $n=4$ ). Nad stolpci so oznake s pripadajočimi statističnimi množicami ( $p<0,05$ ).

Pri merjenju dejanske fotokemične učinkovitosti fotosistema II koruze (Slika 5) nismo zaznali statističnih razlik med različnimi obravnavami.



**Slika 5:** Dejanska fotokemična učinkovitost fotosistema II. Prikazana so povprečja  $\pm$  standardne napake ( $n=4$ ).

## Razprava

Pri merjenju dolžine poganjkov in korenin, določanju sveže in suhe biomase korenin ter poganjkov nismo zaznali statistično značilnih razlik pri intervalu zaupanja  $p < 0,05$ . To se ne sklada z literaturo, kjer so Hussain in sodelavci (2013) ugotovili statistično značilno linearno odvisnost inhibicije rasti pri dodajanju svinca. Ta se je pojavila že pri najnižji koncentraciji 1 mM, kjer so opazili 12 % zmanjšanje rasti poganjkov, pri koncentraciji 200 mM pa so bili poganjki kar 95 % nižji od kontrole. Odstopanje naših rezultatov se da razložiti z razliko v opazovanih koncentracijah, saj so Hussain in sodelavci (2013) najnižjo opazovano koncentracijo postavili na 1 mM, kar znaša 331  $\mu\text{g/mL}$  in je bistveno večje kot naša najnižja opazovana doza pri 10  $\mu\text{g/mL}$ . Podobno primerjavo smo opazili pri merjenju dolžine korenin, katera pri nas ni statistično značilno odstopala od kontrole, pri eksperimentu v članku pa se je zmanjšala za 97,7 % pri 200 mM dozi. Podoben učinek so opazili tudi pri suhi masi, ki je upadala sorazmerno z mokro maso, ki se je pri 200 mM dozi znižala za 89,4 % za poganjke in 71,6 % za korenine, česar pri našem eksperimentu nismo zaznali.

Razloga zakaj naši rezultati tako drastično odstopajo od pričakovanih in literarnih nimamo. Predvidevamo, da je problem nastal zaradi premajhne doze svinca. Pri raziskavi Hussaina in sodelavcev (2013) je najmanjša opazovana koncentracija znašala 331  $\mu\text{g/mL}$ , kar pa je skoraj primerljivo z našo največjo opazovano koncentracijo. Eksperiment bi bilo potrebno prilagoditi z dodajanjem še večje doze svinca, da bi presegli prag toksičnosti za rastlino in mogoče opazili statistično značilno inhibicijo rasti. To bi lahko naredili z dodajanjem nove doze 10 g/L, kar bi bilo bolj podobno eksperimentom v literaturi. S tem nastanejo tudi problemi, saj take visoke koncentracije svinca v naravi tudi v primeru onesnaženja ne zaznamo. Uporabno bi bilo tudi spremljanje vpliva svinca na kalitev semen, a bi to zahtevalo popolnoma ločen eksperiment. Podobno so sklenili tudi Gupta in sodelavci (2009), ki pri dodajanju zmernih količin svinca do 200  $\mu\text{M}$  ugotavljajo, da je akumulacija svinca povzročila oksidativni stres, ki pa je bil učinkovito nadzorovan zaradi znatnega povečanja antioksidantov v koruzi. Zato je bila rast sadik prizadeta le v majhnem obsegu. To rastlino je torej mogoče gojiti na območju, onesnaženem s svincom.

Rezultati kažejo, da je prisotnost svinca v najvišji koncentraciji negativno vplivala na fotosintezo, saj je bila pri koncentraciji 1000  $\mu\text{g/mL}$  izmerjena potencialna fotokemična učinkovitost manjša od ostalih skupin. Glede nato, da ni bilo opaziti vpliva svinca pri rezultatih dejanske fotokemične učinkovitosti kot tudi na morfologiji rastlin, je mogoča tudi napaka v meritvi potencialne fotokemične učinkovitosti. Rezultati kažejo, da uporabljene količine svinca nimajo vpliva na rast koruze. To lahko pojasnimo na dva načina. Zelo verjetno je, da se ni celotna količina svinca prenesla v rastlino, na kar je lahko vplival tudi substrat. Druga razlaga je, da koruza izraža določeno stopnjo odpornosti na svinec, kar je podprto z literaturo (Gupta in sod., 2009).

## Zaključki

Na podlagi naših rezultatov zaključujemo, da dodajanje raztopine svinčevega (II) klorida v koncentracijah 10  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$  in 1000  $\mu\text{g/mL}$  ne vpliva na rast koruze. Predvidevali smo, da bo koruza s svincom v nizki koncentraciji (10  $\mu\text{g/mL}$ ) rasla primerljivo s kontrolno skupino. To hipotezo lahko potrdimo. Hipotezo o pričakovani zmanjšani rasti pri višjih koncentracijah ovržemo, saj ni bilo opaznih razlik v rasti med skupinami. Hipotezo o odvisnosti fotokemične učinkovitosti od koncentracije dodanega svinca prav tako ovržemo. Ugotavljamo, da je prisotnost svinca samo v najvišji koncentraciji



negativno vplivala na fotosintezo, vendar le na nivoju potencialne fotokemične učinkovitosti in ne dovolj, da bi se ta vpliv izrazil na morfologiji koruze.

## Literatura

- Collin S, Baskar A, Geevarghese DM, Ali M, Bahubali P, Choudhary R, Lvov, Tovar GI, Senatov F, Koppala S, Swamiappan S (2022) Bioaccumulation of lead (Pb) and its effects in plants: A review, *Journal of Hazardous Materials Letters*, 3: 100064. doi: 10.1016/j.hazl.100064.
- Gupta DK, Nicoloso FT, Schetinger MRC, Rossato LV, Pereira LB, Castro GY, Srivastava S, Tripathi RD (2009) Antioxidant defense mechanism in hydroponically grown *Zea mays* seedlings under moderate lead stress. *J Hazard Mater* 177, 1: 479–484.
- Hussain A, Abbas N, Arshad F, Akram M, Khan Z, Ahmad K, Mansha M, Mirzaei F (2013) Effects of diverse doses of Lead (Pb) on different growth attributes of *Zea mays* L. *Agricultural Sciences*, 4: 262-265. doi: 10.4236/as.2013.45037.
- Kopittke PM, Gianoncelli A, Kourousias G, Green K, McKenna BA (2017) Alleviation of Al toxicity by Si is associated with the formation of Al–Si complexes in root tissues of sorghum. *Front Plant Sci* 8: 2189. doi: 10.3389/fpls.2017.02189.
- Pourrut B, Shahid M, Dumat C, Winterton P, Pinelli E (2011) Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants. *Rev Environ Contam Toxicol*. 213: 113-136. doi: 10.1007/978-1-4419-9860-6\_4.

# VPLIV SVINCA NA RAST IN RAZVOJ KUMARE

Žiga Oven, Sergej Praček, Matija Šavli, Jakob Trebše, Ana Velikonja

## Izvelek

Namen poskusa je bil preveriti vpliv svinca na dejansko in potencialno fotokemično aktivnost fotosistema II, dolžino korenin, velikost poganjkov ter svežo in suho maso kumare *Cucumis sativa*. Za preverjanje vpliva svinca na različne aspekte rasti in razvoja kumare smo sadike kumare zalivali s tremi različnimi koncentracijami raztopin svinca in sicer z 10 mg/L, 100 mg/L ter 1000 mg/L svinca. Kot kontrolo smo kumare zalivali z destilirano vodo. Ugotovili smo, da zalivanje kumar z različnimi koncentracijami svinca ni povzročilo statistično signifikantnih razlik v potencialni in dejanski fotokemični učinkovitosti fotosistema II. Prav tako statistično signifikantnih razlik nismo opazili pri višini poganjkov, sveži in suhi masi korenin ter suhi masi poganjkov. Svinec pa je imel vpliv na rast korenin, saj smo pri obravnavanju sadik kumare z raztopino svinca s koncentracijo 10 mg/L opazili statistično značilno daljše korenine kot pri kontroli in ostalih obravnavah. Prav tako smo statistično signifikantni vpliv svinca opazili pri sveži masi poganjkov, saj je bila ta po obravnavi z 10 mg/L in 100 mg/L svinca manjša kot sveža masa poganjkov kontrolnih rastlin kumare. Rezultati poskusa niso pokazali tako velikega vpliva svinca na vse merjene parametre kot smo ga mogoče pričakovali. Svincu se namreč pripisujejo številni negativni učinki na vegetativno rast rastline, kot so: sprememba strukture kloroplasta in integritete celične membrane, oviranje transporta elektronov, zaviranje encimov Calvinovega cikla in sinteze ATP, oslabljen vnos esencialnih elementov, kot sta magnezij in železo ter inducirano pomanjkanje CO<sub>2</sub>.

**Ključne besede:** kumara, *Cucumis sativa*, svinec, fotokemična učinkovitost fotosistema II, sveža biomasa, suha biomasa, velikost poganjkov, dolžina korenin

## Uvod

Navadna kumara z znanstvenim imenom *Cucumis sativa* je razširjena enoletna kulturna rastlina iz družine bučevk (Cucurbitaceae). Izvira iz Himalaje, prvič pa so jo pred 3 000 leti gojili v Indiji. V Evropo so jo verjetno prinesli Grki ali Rimljani, gojiti pa so jih prvič začeli v Franciji v 9. stoletju (Chomicki in sod., 2020). Kumara je enodomna rastlina z enospolnimi cvetovi, vendar je večina sort samoinkompatibilnih, kar pomeni, da se mora jajčna celica oploditi s pelodom druge rastline, da se tvorijo semena in plod. Obstajajo pa tudi partenokarpne sorte kumar, ki lahko tvorijo plodove brez opraševanja in tako tudi brez semen, kar pa poslabša njihovo prehransko vrednost (Bai in Xu, 2013).

Kumara je plazeča rastlina z velikimi temno zelenimi listi in valjastimi, podolgovatimi plodovi z zoženimi konci, ki lahko v dolžino merijo tudi do 60 cm. Plod kumare je sestavljen iz 95 % vode, 4 % ogljikovih hidratov, 1 % beljakovin in zanemarljivo malo maščob ter ima nizko vsebnost mikrohranil, med katerimi je največ kalija. Plod ima trdno zunanjo skorjo in je brez notranjih razdelkov. Kot posledica prisotnosti nenasičenih aldehydov imajo plodovi nekaterih sort kumar blago aromo in okus po meloni. Značilen rahlo grenak okus listov in lupine plodu kumare pa je posledica fitokemikalij kukurbitacinov, ki predstavljajo obrambni mehanizem proti rastlinojedim živalim (Tatlioglu, 1993).

Komercialno gojene kumare za sveže uživanje imajo na severnoameriškem trgu daljše, bolj gladke, bolj enotno obarvane plodove z veliko tršo lupino. V nasprotju s tem imajo kumare gojene za preostanek sveta manj semen, so manjše s tanjšo in bolj občutljivo lupino zaradi česar se pogosto prodajajo ovite v plastično embalažo. Kumare se prav tako lahko kisa s slanico, sladkorjem, kisom in začimbami. Čeprav je mogoče kisati katero koli kumaro, so komercialne kisle kumare v primerjavi s tistimi za sveže

uživanje običajno krajše, debelejše, manj pravilnih oblik in imajo neravno skorjo z drobnimi belimi ali črnimi pikami. Uživanje kumar v obliki juh, solat in gostih sokov ima številne zdravstvene koristi, vključno z izgubo telesne teže, delujejo tudi proti kroničnemu zaprtju, protivnetno in imajo pozitiven učinek na kardiovaskularni sistem. Uporabljajo pa se tudi v kozmetiki, kjer delujejo osvežilno in vlažilno. Leta 2020 je svetovna proizvodnja kumar in kumaric znašala 91 milijonov ton, s kar 80 % celotne proizvodnje na Kitajskem (Ugwu in Suru, 2021).

Kovine in kovinski ioni so naravno prisotni na našem planetu v različnih plasteh površja. Izvirajo lahko iz naravnih virov, kjer pridejo na površje s preperevanjem kamnin in izbruhi vulkanov. Prav tako pa k povečanemu vnosu kovin v okolje pripomorejo človeške dejavnosti, kot so kmetijstvo, gradbeništvo, rudarstvo, namakanje z odpadnimi vodami, odplakami, živinskim gnojem ter uporaba umetnih gnojil in pesticidov. Zaradi pomanjkanja razgradnje so predvsem težke kovine zelo obstojne in se v tleh zadržijo dolgo časa. Poleg tega, da so strupene in v tleh vplivajo na kakovost pridelovalnih površin, se po absorpciji lahko akumulirajo v rastlinah (Mortazavi in sod., 2023). Rutinsko uživanje zelenjave kontaminirane s kovinami lahko tako resno ogroža zdravje potrošnikov. Nekatere izmed kovin, kot so cink (Zn), baker (Cu) in kobalt (Co), so v sledovih nujno potrebne za večino bioloških sistemov. Druge, kot so kadmij (Cd), svinec (Pb) in polkovina arzen (As), pa so za rastline, živali in ljudi lahko zelo strupene. Svinec lahko pri ljudeh negativno vpliva predvsem na kardiovaskularni sistem in ledvica, povzroča presnovne motnje, je rakotvoren in nevrotoksičen. Velik vnos svinca s strani nosečih mater pa lahko vodi v zgodnji porod in hude duševno zaostalost novorojenčkov (Mortazavi in sod., 2023).

Ker svinec v prsti tvori komplekse z različnimi komponentami prsti, je v prsti le majhen del svinca prost in tako biološko dostopen. Rastline lahko absorbirajo svinec preko korenin po apoplastični poti ali preko kalcijevih kanalov. Tovrsten transport je v veliki meri odvisen od koncentracije svinca v prsti, pH tal, velikosti delcev tal, kapacitete kationske izmenjave, površine korenin in stopnje mikorizne kolonizacije. Po vnosu v rastlino se svinec kopiči predvsem v koreninskih celicah, saj njegov nadaljen transport po rastlini omejuje Kasparijev trak v endodermisu. Prekomerno kopičenje svinca v rastlinskem tkivu neposredno ali posredno negativno vpliva na različne morfološke, fiziološke in biokemične funkcije v rastlini ter povzroči vrsto škodljivih učinkov. Svinec je zaradi spreminjanja prepustnosti celične membrane fitotoksičen. Prav tako reagira z aktivnimi skupinami različnih encimov, ki sodelujejo pri presnovnih procesih rastline ter zamenjuje esencialne dvovalentne ione. Reagira lahko tudi s fosfatnimi skupinami ADP ali ATP in tako zavira sintezo in porabo ATP. Prekomerna proizvodnja ROS, ki jo svinec inducira, zavira peroksidacijo lipidov in povzroča poškodbe DNA. Poleg tega svinec močno zavira kalitev semen, rast korenin, razvoj sadik, rast rastlin, transpiracijo, proizvodnjo klorofila ter zmanjšuje vsebnost vode in beljakovin. Negativni učinki, ki jih ima svinec na vegetativno rast rastlin, so v glavnem posledica naslednjih dejavnikov: spremenjene strukture kloroplasta, oviranega transporta elektronov, zaviranja encimov Calvinovega cikla, oslabljenega vnosa esencialnih elementov, kot sta magnezij in železo ter inducirano pomanjkanje CO<sub>2</sub>. Rastline so proti svincu razvile več obrambnih mehanizmov, kot so zmanjšan privzem svinca v celice, sekvestracija svinca v vakuole s tvorbo kompleksov, vezava svinca s fitokelatini, glutationom in aminokislinami ter sinteza osmolitov (Pourrut in sod., 2011).

V naši raziskavi smo želeli preveriti vpliv različnih koncentracij svinca na kumaro *Cucumis sativa*. Pri tem smo po šest tedenskem zalivanju sadik kumar z raztopinami svinca s koncentracijami 10 mg/L, 100 mg/L in 1000 mg/L opazovali vpliv svinca na potencialno in dejansko fotokemično učinkovitost fotosistema II, vpliv na višino poganjkov in dolžino korenin ter vpliv na svežo in suho maso korenin in poganjkov.

Hipoteze:

- Potencialna in dejanska fotokemična učinkovitost fotosistema II merjeni na dobro razvitih mladih zelenih listih rastline kumare bosta padali z naraščajočo koncentracijo svinca.

- Najvišje poganjke in najdaljše korenine bodo imele rastline kumare, ki smo jo zalivali s koncentracijo 10 mg/L.
- Tako sveža kot suha masa poganjkov in korenin rastlin kumare se bosta zmanjševali z naraščajočo koncentracijo svinca.

## **Metode in materiali**

### **Postavitev poskusa**

Semena kumare smo posadili v zemljo za rože, 5 semen na lonček. Pripravili smo 4 obravnave svinca v koncentracijah: 0 mg/L (kontrola), 10 mg/L, 100 mg/L in 1000 mg/L. Vsako obravnavo smo izvajali v treh ponovitvah. Svinec smo v substrat dovajali preko zalivanja z raztopino svinčevega (II) klorid anhidrata, katerega smo pripravili v založni raztopini 1000 mg/L in nato z destilirano vodo redčili do ustrezne koncentracije.

### **Gojenje kumar ob prisotnosti svinca**

Kumare smo 4 tedne vzgajali v rastni komori s 16/8-urnim dnevno/nočnim ciklom in temperaturo 20 °C. Intenzivnost svetlobe je bila približno 250  $\mu\text{mol fotonov m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , relativna zračna vlažnost pa 60 %. Rastline posameznih obravnav smo zalivali dvakrat tedensko s 100 mL raztopine z ustrezno koncentracijo svinca. Kontrolo smo zalivali z destilirano vodo.

### **Meritev fotokemične učinkovitost**

Fotokemično učinkovitost fotosistema II smo izmerili s fluorometrom PAM-2500. Potencialno fotokemično učinkovitost ( $F_v/F_m$ ) smo izmerili na zatemnjenih listih po 15 minutni aklimatizaciji, dejansko fotokemično učinkovitost ( $Y$ ) pa na svetlobi.

### **Meritev dolžine poganjkov in biomase**

V šestem tednu eksperimenta smo z merilom izmerili dolžine poganjkov. Nato smo sadike previdno ločili iz substratov in sprali z vodo ter z merilom izmerili še dolžino korenin. Nato smo ločili nadzemne dele od podzemnih, jih dobro osušili na papirnati brisači in stehali za pridobitev sveže biomase. Korenine in poganjke smo zavili v aluminijasto folijo ter jih 3 dni sušili v sušilni komori pri 60 °C. Poganjke in korenine smo ponovno stehali za določitev suhe biomase.

### **Statistična obdelava podatkov**

Pridobljene podatke smo obdelali s programom Microsoft Excel (Microsoft Corporation, 2018), kjer smo izračunali povprečno dolžino poganjkov in korenin, svežo in suho biomaso ter fotokemično učinkovitost fotosistema II. Podatki so bili statistično obdelani v programu R (R Core Team, 2021) z uporabo enosmerne analize variance in Tukeyevim post hoc testom. Rezultate smo prikazali na grafih v programu RawGraphs (Mauri in sod., 2017).

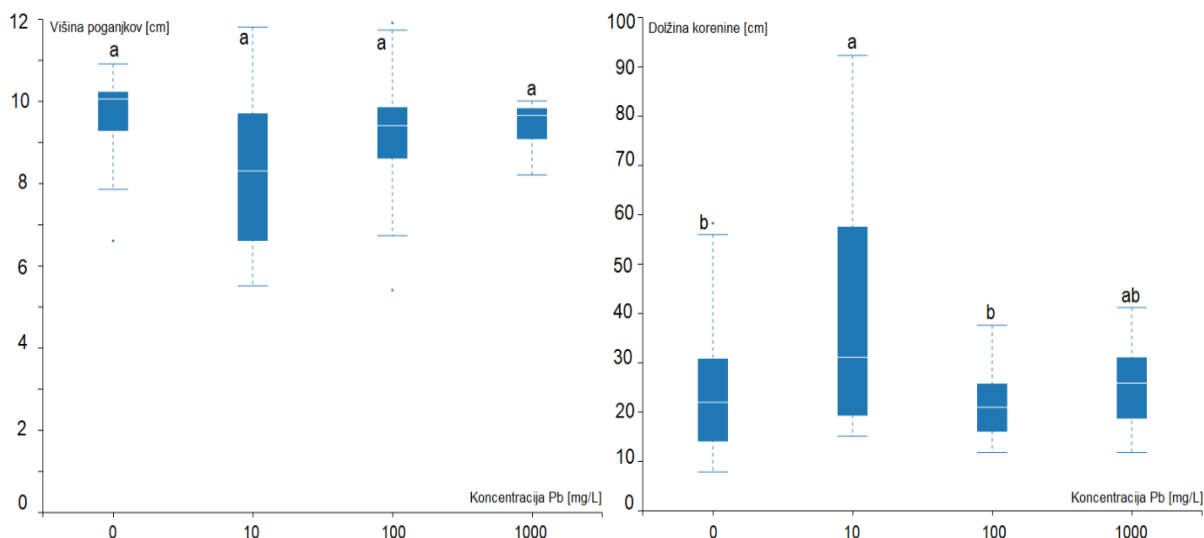
## **Rezultati**

Na sliki 1 vidimo, da se 50 dni po posaditvi semen sadike kumar morfološko niso zelo razlikovale. Le sadike, ki smo jih zalivali s 10 mg/L Pb, kažejo nekoliko nižjo rast in imajo nekoliko bolj rumeno obarvane liste. Kontrola se po velikosti in barvi listov ter rasti ne razlikuje od kumar obravnavanih s 100 mg/L ter 1000 mg/L Pb. Vse opazovane parametre smo kvantitativno določili, statistično obdelali in prikazali na naslednjih slikah.



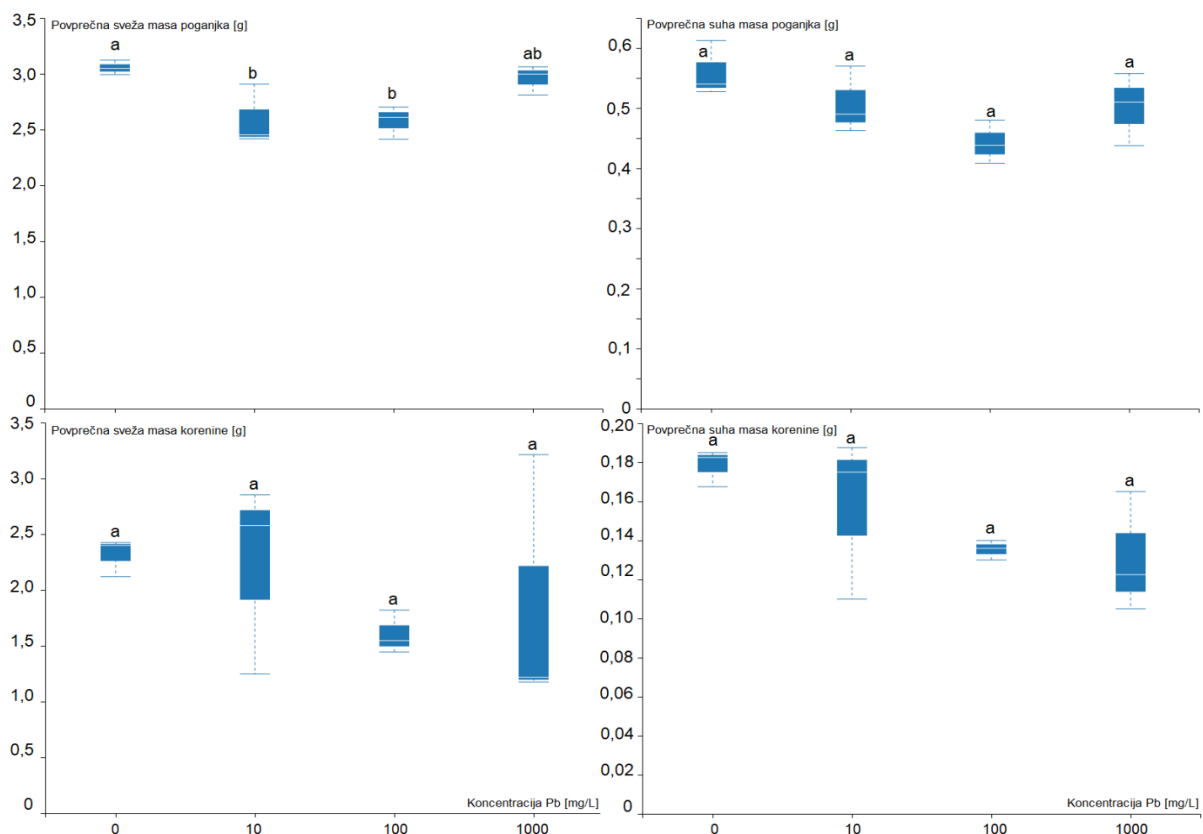
**Slika 1:** Sadike kumar po 50. dnevu (od leve proti desni: kontrola oz. 0 mg/L Pb, 10 mg/L Pb, 100 mg/L Pb in 1000 mg/L Pb)

Iz slike 2 je razvidno, da obravnavanje kumar z Pb ne statistično signifikantno vpliva na višino poganjka. Obravnavanje kumar z 10 mg/L Pb je povzročilo statistično signifikantno podaljšanje korenin. Kumare tretirane z 10 mg/L Pb so imele 69,8 % daljše korenine, glede na kontrolne (povprečna dolžina kontrolnih korenin je 24,7 cm, obravnavanih z 10 mg/L Pb pa 41,9 cm). Ostale obravnave niso povzročile statistično signifikantnih razlik.



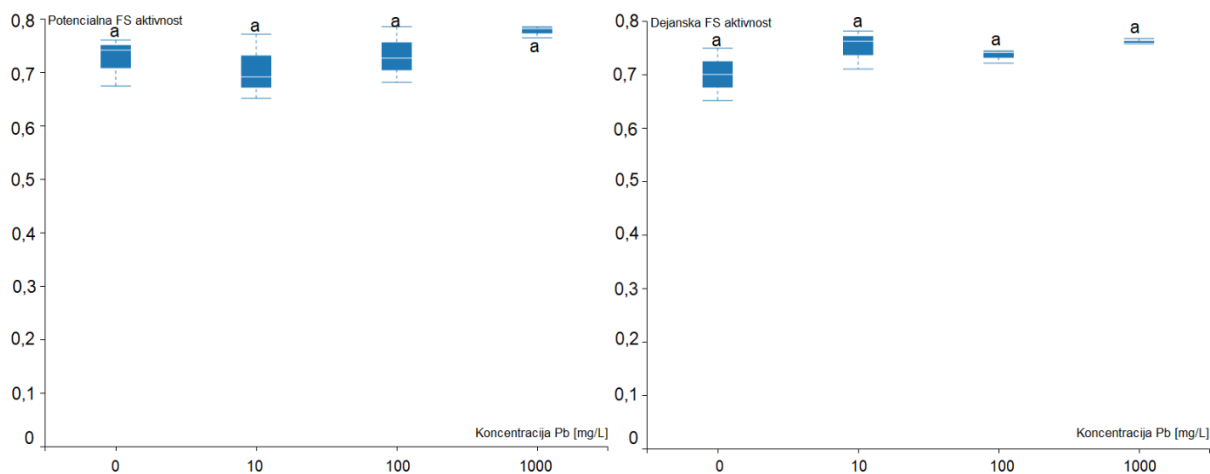
**Slika 2:** Višina poganjkov in dolžina korenin kumar v centimetrih, obravnavanih z vodo z 0, 10, 100 in 1000 mg/L Pb po 50. dnevu. Prikazane so s škatlo z brki (n=12), \* označuje osamelce. Posamezne črke (a, b, ab) prikazujejo statistične razlike med posameznimi skupinami (enosmerna ANOVA, Tukeyev post hoc test,  $p < 0,05$ ).

Prav tako smo preverili vpliv obravnave na svežo in suho maso poganjkov in korenin kumar. Obravnave niso povzročile statistično signifikantnih razlik v sveži in suhi masi korenin ter suhi masi poganjkov. Sveža masa poganjkov je statistično signifikantno upadla glede na kontrolne rastline obravnavane z 10 mg/L in 100 mg/L, za 15,1 in 15,7% (povprečna masa poganjkov kontrolnih rastlin je 3,05 g, 10 mg/L je 2,59 g, 100 mg/L pa 2,58 g).



**Slika 3:** Sveža in suha masa poganjkov in korenin kumar v gramih, obravnavanih z vodo z 0, 10, 100 in 1000 mg/L Pb po 50. dnevu. Prikazane so s škatlo z brki (n=4). Posamezne črke (a) prikazujejo statistične razlike med posameznimi skupinami (enosmerna ANOVA, Tukeyev post hoc test,  $p < 0,05$ ).

Iz slike 4 je razviden vpliv obravnav na potencialno in dejansko fotokemična učinkovitost fotosistema II. Med obravnavami ni statistično signifikantnih razlik. Potencialna fotokemična učinkovitost fotosistema II je znašala med 0,704 in 0,777, dejanska (Y) pa med 0,700 in 0,761.



**Slika 4:** Potencialna in dejanska (Y) fotokemična učinkovitost fotosistema II kumar, obravnavanih z vodo z 0, 10, 100 in 1000 mg/L Pb po 50. dnevu. Prikazane so s škatlo z brki (n=3). Posamezne črke (a) prikazujejo statistične razlike med posameznimi skupinami (enosmerna ANOVA, Tukeyev post hoc test,  $p < 0,05$ ).

## Razprava

Na podlagi pridobljenih rezultatov in postavljenih hipotez ugotavljamo, da v našem poskusu svinec ni imel velikega vpliva na rast kumar. Prvo hipotezo smo zavrnil, saj nismo opazili statistično pomembnih razlik na potencialno in dejansko fotokemično učinkovitost fotosistema II med različnimi obravnavami. Naši rezultati se ne ujemajo z drugimi raziskavami, kjer je bilo dokazano, da svinec vpliva na sintezo fotosinteznih barvil in s tem posledično tudi na fotokemično učinkovitost fotosistema II. Pomembno je omeniti, da bi lahko boljše rezultate dobili z izboljšanjem merjenja dejanske fotokemične učinkovitosti fotosistema II tako, da bi le-to merili na direktni izpostavljenosti soncu. Drugo hipotezo smo delno zavrnil, saj so rezultati pokazali, da so bile dolžine poganjkov kumar pri vseh obravnavah statistično enake, medtem ko so kumare zalivane s 10 mg/L svinca imele statistično značilno daljše korenine od drugih skupin, kar delno podpira našo drugo hipotezo. Pri tehtanju svežih mas poganjkov smo ugotovili statistično značilno manjše mase pri koncentracijah 10 mg/L in 100 mg/L v primerjavi s kontrolno skupino. To delno potrjuje hipotezo, da prisotnost svinca negativno vpliva na svežo maso poganjkov. Se pa ta hipoteza izkaže za nepravilno pri koncentraciji svinca 1000 mg/L, saj bi prav pri te obravnavi pričakovali najmanjšo maso, česar pa rezultati tega niso pokazali. Prav tako rezultati svežih mas korenin niso pokazali statistično značilnih razlik, kar zavrača tretjo hipotezo. Pri merjenju suhih mas korenin in poganjkov, ki predstavljajo boljši kazalnik nastale biomase, nismo opazili statistično značilnih razlik. To pomeni, da so rastline ne glede na koncentracijo svinca v tleh uspešno proizvedle enako količino biomase, kar pa je v nasprotju s številnimi raziskavami, ki navajajo zmanjšanje biomase rastlin v prisotnosti svinca. Na rezultate bi lahko vplivale tudi napake pri merjenju, kot je na primer odstranjevanje korenin in neustrezno sušenje rastlin.

Naši rezultati sicer kažejo, da svinec nima znatnega vpliva na rast kumar, vendar bi bilo priporočljivo raziskavo nadaljevati in dopolniti. Glede na to, da svinec v rastlinah inducira nastanek reaktivnih kisikovih vrst (ROS), bi bilo smiselno meriti koncentracije ROS ali antioksidativno aktivnost encimov v koreninah ter poganjkih. Tako bi bolje ocenili, ali so bile rastline zaradi prisotnosti svinca pod stresom ter pridobili bolj celovito sliko, kot le preverjanje morfoloških značilnosti rastline (Verma in Dubey, 2003). Poleg preverjanja fotokemične učinkovitosti fotosistema II bi lahko vpliv svinca preverjali tudi z merjenjem vsebnosti fotosinteznih barvil, kot so to storili Zhou in sod. (2016), saj naj bi svinec negativno deloval na njihovo sintezo. Večje razlike vpliva svinca na rast rastlin bi lahko opazili z daljšim trajanjem eksperimenta in večjim številom rastlin, kar bi nam omogočilo pridobitev statistično značilnih rezultatov.

## Zaključki

Če povzamemo, smo ugotovili, da svinec na naše kumare ni imel velikega vpliva. Skoraj pri vseh testnih parametrih ni prišlo do razlik med obravnavami in kontrolo. Morfologija rastlin se ni veliko razlikovala, opažene so bile sicer majhne razlike v barvi, ampak teh ni bilo mogoče pripisati samo svinču, saj so se spremembe zgodile prav v kontrolni skupini. Pri meritvi mase rastlin in korenin ni prišlo do velikih razlik med različnimi koncentracijami svinca. Potencialna in dejanska fotokemična učinkovitost fotosistema II vseh rastlin je bil enaka. Svinec je znan po temu, da ima fitotoksične učinke, kot so zmanjšana rast korenin in listov ter okrnjena sposobnost vršenja fotosinteze. Tovrstnih pričakovanih znakov fitotoksičnosti nismo opazili, zato menimo, da je bila velika možnost, da je prišlo do eksperimentalnih napak kot so neenakomerna osvetljenost rastlin in napake pri meritvi dolžine korenin. Menimo, da bi v prihodnosti bilo potrebno preveriti vpliv kronične izpostavljenosti rastlin svinču, povečati število v eksperiment vključenih rastlin, izboljšati postopek meritve dolžine korenin ter zagotoviti bolj enakomerno izpostavljenost rastlin svetlobi med njihovo rastjo.

## Literatura

- Bai S-N, Xu Z-H (2013) Unisexual Cucumber Flowers, Sex and Sex Differentiation. In: International Review of Cell and Molecular Biology. Elsevier, str 1–55.
- Chomicki G, Schaefer H, Renner SS (2020) Origin and domestication of Cucurbitaceae crops: insights from phylogenies, genomics and archaeology. *New Phytologist* 226: 1240–1255. <https://doi.org/10.1111/nph.16015>
- Mauri M, Elli T, Caviglia G, in sod (2017). RAWGraphs: A Visualisation Platform to Create Open Outputs. In Proceedings of the 12th Biannual Conference on Italian SIGCHI Chapter (28:1–28:5). New York, NY, USA: ACM. <https://doi.org/10.1145/3125571.3125585>.
- Microsoft Corporation. 2018. Microsoft Excel, Available at: <https://office.microsoft.com/excel>.
- Pourrut B, Shahid M, Dumat C, in sod (2011) Lead Uptake, Toxicity, and Detoxification in Plants. In: Whitacre DM (ed) Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 213. Springer, New York, NY, STR 113–136.
- R Core Team. (2021) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Tatlioglu T (1993) Cucumber. In: G Kalloo, BO Bergh (ed) Genetic Improvement of Vegetable Crops. Elsevier, pp 197–234.
- Ugwu C, Suru S (2021) Cosmetic, Culinary and Therapeutic Uses of Cucumber (*Cucumis sativus* L.). In: Wang H (ed) Cucumber Economic Values and Its Cultivation and Breeding. IntechOpen, Rijeka
- Verma S, Dubey RS (2003) Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science* 164: 645–655. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00022-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00022-0).
- Zhou J, Jiang Z, Ma J, in sod (2017) The effects of lead stress on photosynthetic function and chloroplast ultrastructure of Robinia pseudoacacia seedlings. *Environ Sci Pollut Res* 24: 10718–10726. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8713-2Z>.