
"Zbornik radova", Sveska 39, 2003.

***UTICAJ KONCENTRACIJA Cd I FAZE RASTENJA
I RAZVIĆA NA VODNI REŽIM BILJAKA***

Kevrešan, Ž.¹, Petrović, N.², Mihailović, V.³

IZVOD

Uticaj koncentracija Cd na vodni režim biljaka graška je ispitan u staklari u polukontrolisanim uslovima. Biljke su gajene na potpunom hranjivom rastvoru a zatim je deo biljaka, 25 odnosno 63 dana nakon klijanja tretiran sa Cd u koncentracije 10^{-7} ili 10^{-5} M. Biljke su bile izlagane Cd 48h nakon čega su analizirane na pokazatelje vodnog režima. Tretman Cd smanjio je intenzitet transpiracije, površinu korena, aktivnost nitrat-reduktaze, intenzitet disanja i sadržaj pigmentata hloroplasta, a povećao vodni potencijal, difuzni otpor stoma i ukupan sadržaj prolina. Izlaganje biljaka Cd 25 dana nakon klijanja imalo je izraženiji efekat na intenzitet disanja i vodni potencijal, a 63 dana nakon klijanja intenzivnije je menjalo relativni sadržaj vode, intenzitet transpiracije, difuzni otpor stoma, ukupan sadržaj prolina, aktivnost nitrat-reduktaze i sadržaj pigmentata.

KLJUČNE REČI: kadmijum, grašak, starost biljaka, vodni režim

Uvod

Sredinu zagađuju brojna organska i neorganska jedinjenja, prirodnog ili antropogenog porekla. Među njima važno mesto zauzimaju teški metali (TM). Kadmijum, neesencijalni TM, u životnu sredinu dospeva upotrebom veštačkih boja, baterija i preradom rude Zn (Jensen i Bro-Rasmussen, 1992), a u obradiva zemljišta upotrebom fosforinih đubriva (Bogdanović i sar., 1997).

-
- 1 Mr Žarko Kevrešan, istraživač-saradnik, Tehnološki fakultet, Novi Sad
 - 2 Dr Novica Petrović, redovni profesor, Poljoprivredni fakultet i Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad.
 - 3 Dr Vojislav Mihailović, viši naučni saradnik, Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

Najvećim delom Cd biljke usvajaju preko korena. Usvojeni Cd u biljkama direktno ili indirektno utiče na brojne procese (Woolhouse, 1983). Direktno toksično dejstvo Cd ogleda se u smanjenju aktivnosti enzima (Van Assche and Clijsters, 1990; Petrović i sar., 1990), oštećenju ćelijskih membrana (Tu i Broullettes, 1987) i inhibiranju rastenja biljaka (Lang et al., 1995; Chen et al., 2003). Ove promene imaju veliki broj sekundarnih efekata na rasteenje i razviće biljaka među kojima je i poremećaj vodnog režima (Kastori i sar., 1995a), inhibicija procesa fotosinteze (Lang et al., 1995) i poremećaj u mineralnoj ishrani (Nunes et al., 1995).

Tolerantnost biljaka prema Cd može biti stečeno svojstvo tokom filogeneze (konstitutivna tolerantnost) i/ili predstavljati stresnu adaptaciju, odnosno odgovor na nepovoljne uslove sredine (indukovana tolerantnost). Uočeno je da biljne vrste otpornije na Cd veći deo usvojenog Cd zadržavaju u korenu (Das et al., 1997). Cd koji dospe u biljke pokreće jedan ili više mehanizama odgovornih za njegovu imobilizaciju, npr. vezivanje za ćelijski zid, premeštanje i zadržavanje u vakuoli, sintezu fitohelatina, metalionena, i drugih "stresnih proteina" (Sanità di Topi i Gabbrielli, 1999).

Ispitivanje reakcije biljaka prema Cd uglavnom se ogleda kao funkcija njegove koncentracije u hranjivom rastvoru, tipa hranjivog supstrata, biljne vrste, genotipa i drugo (Kastori i sar., 1997). Pored ovih istraživanja sve su značajnija i ispitivanja reakcija biljaka na Cd u zavisnosti od njihove starosti (Sheoran et al., 1990; Skórzyśkan-Polit i Baszyński, 1997; Krupa i Monaik, 1998). Stoga je cilj ovih istraživanja bio da se utvrdi uticaj Cd u različitim fazama rastenja i razvića biljaka graška, na njihov vodni režim.

Materijal i metod rada

Ogledi su izvedeni u polukontrolisanim uslovima, u staklari, sa biljkama graška sorte Jezero. Klijanje semena je sprovedeno u vermakulitu u termostatu na temperaturi od 25°C. Mlade biljke su nakon naklijavanja prenete u posude za vodene kulture zapremine 2l na potpuni hranjivi rastvor sledećeg sastava: (mM) 2,5 Ca(NO₃)₂; 2,5 KNO₃; 1,0 KH₂PO₄; 1,0 MgSO₄ · 7H₂O i (µM) 23,1 B; 4,6 Mn; 0,38 Zn; 0,16 Cu; 0,052 Mo i 8,59 Fe u obliku Fe_(III)NaEDTA.

Deo biljaka gajenih na potpunom hranjivom rastvoru je nakon 25 dana rasta, u fazi intenzivnog rastenja i razvića, tretiran sa 10⁻⁷ ili 10⁻⁵ M Cd u trajanju od 48h. Drugi deo biljaka gajen je 63 dana odnosno do faze punog cvetanja a zatim je na isti način kao i biljke gajene 25 dana tretiran Cd 48h. Nakon 48h sati tretmana Cd biljke graška su požnjevene i korišćene za ispitivanja. Cd je korišćen u obliku CdCl₂. Kao kontrolne biljke korišćene su biljke gajene na potpunom hranjivom rastvoru s tim da su se u vreme tretiranja dela biljaka sa Cd nalazile 48h u dejonizovanoj vodi.

Relativni sadržaj vode (RWC) određen je u 1g kružnih lisnih isečaka (prečnika 1cm) koji su nakon merenja potopljeni u destilovanu vodu u trajanju od 4h na temperaturi od 25°C. Nakon pomenutog perioda isečci su ponovo izmereni a zatim osušeni u sušnici pri temperaturi od 80°C. Relativni sadržaj vode je računat prema jednačini Barrs i Weatherley (1962). Intenzitet transpiracije određen je gravimetrijski. Difuzni otpor stoma meren je na aparatu Diffusive resistance meter model LI-COR 300, Lambda Instruments Corporation, Lincoln, Nebraska, SAD. Vodni potencijal određen je na Plant Water Status Console model 3005, Santa Barbara, Kalifornija, SAD. Aktivnost nitrat-reduktaze (NRA) u korenu i nadzemnom delu u *in vivo* uslovima, određena je u fosfatnom puferu pH 7,4. Očitavanja na spektrofotometru vršena su na 540nm. NRA je izražena u $\mu\text{mol NO}_2 \text{ g}^{-1}$ sveže materije h^{-1} (Hageman i Reed, 1980). Koncentracija slobodnog prolina određena je u svežoj materiji nakon ekstrakcije sa 3% sulfosalicilnom kiselinom i bojenja sa ninhidrinom u prisustvu glacijalne sirćetne kiseline i spektrofotometrijskim očitanjem na 520 nm (Bates et al., 1973). Sadržaj hlorofila *a* i *b* i karotenoida određen je spektrofotometrijski u acetonskom ekstraktu. Za izračunavanje sadržaja pigmenata hloroplasta korišćeni su molekularni ekstinkcioni koeficijenti prema Holm (1954) i von Wettstein (1957). Intenzitet disanja određen je manometarskom metodom na aparatu Wartburga. Površna korena određena je korišćenjem monomolekularnog rastvora metilenskog plavog (Sarić i sar., 1991).

Dobijeni rezultati statistički su obrađeni analizom varijanse a razlike između pojedinih tretmana pomoću Duncan s multiple range testa.

Rezultati ispitivanja i diskusija

Sadržaj Cd u biljkama

Najveći sadržaj Cd imale su biljke tretirane većom ispitanom koncentracijom Cd, i to 63 dana nakon klijanja. Sadržaj Cd u biljkama različite starosti tretiranih nižom ispitanom koncentracijom bio je sličan. Najveći udeo usvojenog Cd zadržao se u korenu a njegov transport u nadzemne delove zavisio je od starosti biljke i ispitane koncentracije Cd. Tako na primer tretman Cd 63 dana nakon klijanja povećao je njegovo premeštanje u nadzemne organe i to za 1,46 puta kod niže a 2,38 puta kod više ispitane koncentracije (Tab. 1).

Značajnije nakupljanje Cd u korenu posebno pri njegovim većim ispitanim koncentracijama uočili su i drugi autori i to kod graška (Obata i Umabayashi, 1997; Hern nderzi sar., 1996), kukuruza (Lagriffoul et al., 1998), durum i meke pšenice (Ciešliński et al., 1996) i šećerne repe (Petrović i sar., 1990). Pretpostavlja se da znatno veće nakupljanje i zadržavanje Cd u korenu biljaka može predstavljati jedan vid mehanizma zaštite osetljivih fotosintetskih i reproduktivnih organa od prekomerne akumulacije Cd (Leita et al., 1992). Transport Cd iz korena u nadzemne organe u direktnoj je vezi sa količinom odate vode

(Hardiman i Jacoby, 1984), čime se može objasniti povećani transport Cd kod biljaka tretirani u kasnijim fazama rastenja i razvića.

Tab. 1. Uticaj koncentracija Cd na nakupljanje Cd kod biljaka graška različite starosti ($\mu\text{g Cd / biljci}$)

Tab. 1. Effect of Cd concentrations on Cd accumulation in pea plants differing in age ($\mu\text{g Cd / plant}$)

Koncentracije Cd (M) Cd concentrations (M)	Koren Root	Nadzemni deo Above-ground parts	Koren/Nadzemni deo Root/Above-ground parts
Tretman Cd 25 dana nakon klijanja Cd treatments 25 days after germination			
10^{-7}	17,33	6,35	2,73
10^{-5}	34,26	10,80	3,17
Duncan 5%	5,552	1,218	
Tretman Cd 63 dana nakon klijanja Cd treatments 63 days after germination			
10^{-7}	23,56	5,88	4,00
10^{-5}	108,53	14,40	7,54
Duncan 5%	7,504	0,667	

Relativni sadržaj vode

Kod biljaka tretiranih 25 dana nakon klijanja ispitivane koncentracije Cd 48 sati nakon tretmana, nisu vidno uticale na relativni sadržaj vode (RWC). Za razliku od pomenutog tretmana, kod biljaka tretiranih Cd 63 dana nakon klijanja uočeno je smanjenje RWC u odnosu na njegove vrednosti kod kontrolnih biljaka. Razlike u RWC kod biljaka tretiranih u ranijoj ili kasnijoj fazi uočene su i između ispitivanih koncentracija Cd (Tab. 2).

Tab. 2. Uticaj koncentracija Cd na relativni sadržaj vode (RWC) u listovima biljaka graška različite starosti (u %)

Tab. 2. Effect of Cd concentrations on relative water content (RWC) in leaf of pea plants differing in age (in %)

Koncentracije Cd (M) Cd concentrations (M)	Tretman Cd Cd treatment on	
	25 dana nakon klijanja 25 days after germination	63 dana nakon klijanja 63 days after germination
(bez Cd) (without Cd)	89,3	88,8
10^{-7}	89,3	87,0
10^{-5}	89,1	83,4
Duncan 5%	1,01	1,66

Više autora je pokazalo da prisustvo toksičnih koncentracija Cd i drugih TM u hranjivom supstratu smanjuje sadržaj vode, na primer Zn (Palvöke, 1983) i Pb (Lane i Martin, 1980; Petrović i sar. 1992; Kastori i sar. 1995a; Petrović i sar. 1998).

Intenzitet transpiracije

Kod ispitivanih biljaka nezavisno od njihove starosti, 48h nakon tretmana sa Cd smanjio se intenzitet transpiracije, posebno nakon primene više ispitivane koncentracije Cd (Tab. 3). Teški metali, pa i Cd mogu da utiču na vodni režim biljaka direktno i/ili indirektno preko procesa usvajanja i transporta vode kao i njenog odavanja (Barceló i Poschenrieder, 1990). Uticaj TM na vodni režim biljaka zavisi od brojnih činilaca: vrste, koncentracije TM u hranjivom supstratu, trajanja kontaminacije, biljne vrste i genotipa (Pearson i Kirkham, 1981; Dueck, 1986a). U većini slučajeva, prisustvo TM ima za posledicu smanjenje intenziteta transpiracije. Tako na primer, Kirkham (1978) i Dueck (1986b) uočili su smanjenje intenziteta transpiracije nakon tretmana sa Cu kod *Lolium perene* za 63% u odnosu na kontrolu, dok je prisustvo Cd kod *Chysanthemum morifolatum* smanjilo transpiraciju za 90%.

Tab. 3. Uticaj koncentracija Cd na intenzitet transpiracije kod biljaka graška različite starosti ($\text{gH}_2\text{O h}^{-1} \text{ biljka}^{-1}$)

Tab. 3. Effect of Cd concentrations on transpiration intensity in pea plants differing in age ($\text{gH}_2\text{O h}^{-1} \text{ plant}^{-1}$)

Koncentracije Cd (M) Cd concentrations (M)	Tretmana Cd Cd treatment	
	25 dana nakon klijanja 25 days after germination	63 dana nakon klijanja 63 days after germination
(bez Cd) (without Cd)	0,296	1,411
10^{-7}	0,285	1,342
10^{-5}	0,245	1,229
Duncan 5%	0,0297	0,174

Površina korena

Koren je u hranjivom supstratu u direktnom kontaktu sa prisutnim koncentracijama TM. Kao posledica pomenutog kontakta često dolazi do smanjenja veličine korena, njegove gustine i poremećaja u njegovoj morfologiji i anatomiji (Breckle, 1989; Janjatović i sar., 1991). U vezi sa pomenutim promenama je i smanjenje površine korena izazvano dejstvom Cd. Slično kao kod transpiracije, 48 sati nakon tretmana Cd samo njegova viša ispitivana koncentracija smanjila je površinu korena nezavisno od starosti biljaka u momentu aplikacije Cd (Tab. 4). Kod nekih biljnih vrsta visoke koncentracije TM mogu da izazovu sekundarne promene ćelijskog zida, kao npr. suberizaciju i

lignifikaciju (Palvöke, 1983). U takvim uslovima smanjuje se ne samo kontaktna površina korena nego se povećava otpor prilikom ulaska vode u koren, a zatim i otežava njeno kretanje unutar korena (Kastori i sar., 1997).

Tab. 4. Uticaj koncentracija Cd na ukupnu površinu korena kod biljaka graška različite starosti (m²/biljci)

Tab. 4. Effect of Cd concentrations on total root area of pea plant differing in age (m²/plant)

Koncentracije Cd (M) Cd concentrations (M)	Tretman Cd Cd treatment on	
	25 dana nakon klijanja 25 days after germination	63 dana nakon klijanja 63 days after germination
(bez Cd) (without Cd)	1,72	7,21
10 ⁻⁷	1,68	7,10
10 ⁻⁵	1,27	4,64
Duncan 5%	0,156	1,140

Vodni potencijal

Kratkotrajni, dvodnevni tretman Cd značajno je povećao vodni potencijal (VP) korena i nadzemnog dela u odnosu na vrednosti uočene kod kontrolnih biljaka. Kod korena i nadzemnog dela, biljaka tretiranih 25 dana nakon klijanja uočava se razlika u VP između ispitivanih koncentracija Cd. Nasuprot ovome, razlike u VP između ispitivanih koncentracija Cd kod korena i nadzemnog dela biljaka tretiranih 63 dana nakon klijanja nisu značajno zavisile od ispitanih koncentracija Cd (Tab. 5).

Tab. 5. Uticaj koncentracija Cd na vodni potencijal biljaka graška različite starosti (-KPa)

Tab. 5. Effect of Cd treatments on water potential in pea plants differing in age (-KPa)

Koncentracije Cd (M) Cd concentrations (M)	Tretman Cd Cd Treatment			
	25 dana nakon klijanja 25 days after germination		63 dana nakon klijanja 63 days after germination	
	Koren Root	Nadzemni deo Above-ground parts	Koren Root	Nadzemni deo Above-ground parts
(bez Cd) (without Cd)	267	407	186	342
10 ⁻⁷	310	462	242	404
10 ⁻⁵	485	680	264	440
Duncan 5%	35	52	23	39

Pretpostavlja se da TM utiču na transport vode u provodnim sudovima smanjujući, pre svega broj i prečnik provodnih sudova (Robb et al., 1980; Vásquez et al., 1987; Barceló et al., 1988), a time i na VP.

Difuzni otpor stoma

Dejstvo Cd na biljke graška, tretiranih Cd u ranim i kasnim fazama, imalo je za posledicu promene difuznog otpora stoma. Tretman Cd posle 25 dana gajenja, nezavisno od ispitane koncentracije, povećao je difuzni otpor stoma za oko 29% u odnosu na kontrolne biljke. Kasnijim tretmanom Cd povećanje difuznog otpora stoma, u odnosu na kontrolne biljke, nižom ispitanoj koncentracijom Cd iznosilo je 51%, a višom čak 137% (Tab. 6).

Teški metali mogu da utiču na vodni režim, odnosno odavanje vode, povećanjem difuznog otpora stoma kao i putem smanjenja površine listova (Petrović i sar., 1998), promenom anatomske građe listova (Janjatić i sar., 1991), promenom veličine i gustine stoma (Kastori i sar., 1995a). Na ovaj način TM, pa i Cd, mogu smanjiti količinu odate vode iz nadzemnih delova biljaka. Povećanje difuznog otpora stoma često može da podstakne značajniju akumulaciju abscisinske kiseline u listovima (Rauser i Dumbroff, 1981) i/ili povećanjem sadržaja CO₂ u ćelijama zatvaračicama (Barceló i Poschenrieder, 1990). Prisustvo TM u ćelijama zatvaračicama može uticati na metabolizam ugljenih hidrata i energije što takođe može imati za posledicu promenu difuznog otpora stoma (Schnabl i Zeigler, 1975).

Tab. 6. Uticaj koncentracija Cd na difuzni otpor stoma kod biljaka graška različite starosti (sec/cm)

Tab. 6. Effect of Cd concentrations on stomata diffusive resistance in pea differing in age (sec/cm)

Koncentracije Cd (M) Cd concentrations (M)	Tretman Cd Cd treatment	
	25 dana nakon klijanja 25 days after germination	63 dana nakon klijanja 63 days after germination
(bez Cd) (without Cd)	0,254	0,136
10 ⁻⁷	0,333	0,206
10 ⁻⁵	0,324	0,323
Duncan 5%	0,0316	0,0257

Ukupan prolin

U uslovima stresa, npr. nedostatka vode, kod većine biljaka značajno se povećava sadržaj prolina (Yoshida i sar., 1995). Povećan sadržaj prolina može da

bude posledica usporene oksidativne razgradnje prolina u mitohondrijama ili sporijeg ugrađivanja u proteine, a najvećim delom rezultat je intenzivnijeg preobražaja glutamniske kiseline u prolin.

Tab. 7. Uticaj koncentracija Cd na sadržaj ukupnog prolina kod biljaka graška različite starosti ($\mu\text{g g}^{-1}$ sveže materije)

Tab. 7. Effect of Cd concentrations on total proline content in pae plants differing in age ($\mu\text{g g}^{-1}$ fresh weighb)

Koncentracije Cd (M) Cd concentrations (M)	Tretman Cd Cd treatment	
	25 dana nakon klijanja 25 days after germination	63 dana nakon klijanja 63 days after germination
(bez Cd) (without Cd)	240,4	50,0
10^{-7}	260,3	61,4
10^{-5}	278,6	64,9
Duncan 5%	32,59	10,4

Nakupljanje prolina, kao posledica kratkotrajnog delovanja Cd, uočeno je kod biljaka graška nezavisno od vremena njegove primene. Kod biljaka graška tretman Cd 25 dana nakon klijanja, u trajanju od 48h značajno je povećao sadržaj ukupnog prolina u odnosu na kontrolne biljke za 8% dejstvom niže, odnosno 16% dejstvom više ispitivane koncentracije Cd. Tretman Cd 63 dana nakon tretmana vidno je povećao sadržaj prolina i to za 23% dejstvom niže, odnosno za 30% dejstvom više ispitivane koncentracije Cd (Tab. 7). Tretman biljaka drugim TM, npr. Pb, povećao je sadržaj ukupnog prolina u biljkama šećerne repe (Petrović i sar., 1998) i suncokreta (Kastori i sar., 1995a).

Aktivnost nitrat-reduktaze

Teški metali koji se kroz plazmalemu u većoj meri transportuju u obliku jona, u citoplazmi brzo reaguju sa prisutnim supstancama, posebno sa enzimima menjajući njihovu aktivnost. Najosetljiviji enzim citoplazme na prisustvo TM je nitrat-reduktaza (NR) (Weber et al., 1991). Stoga je Cd 48h nakon tretmana vidno smanjio aktivnost nitrat-reduktaze (ANR) kod biljaka graška tretiranih u različitim fazama starosti (Tab. 8). Dejstvom Cd intenzivnije se smanjila ANR u korenu nego u nadzemnom delu, što je verovatno posledica većeg nakupljanja Cd u korenu (Tab. 1).

Smanjenje ANR u prisustvu TM uočeno je od strane većeg broja autora, npr. kod šećerne repe u prisustvu Cd (Petrović i sar., 1990) i Pb (Kastori i sar., 1995b). Kadmijum, za razliku od drugih TM na primer, Ni, Pb i Mo u većoj meri inhibira ANR (Kevrešan i sar., 1998). Nepovoljan uticaj Cd i drugih TM na asimilaciju azota zavisi i od prisustva drugih, neophodnih jona u hranjivom supstratu. S tim u vezi,

veći broj autora uočio je da joni kalijuma (Petrović i sar., 1991) i sulfata (Popović i sar., 1996), prisutni u hranjivom supstratu ili biljkama, ublažuju nepovoljno dejstvo Cd na metabolizam azota.

Burzinsky (1988) pretpostavlja da TM, naročito Cd, inhibiraju translokaciju nitrata iz provodnih sudova ksilema u citoplazmu. Smanjenje ANR u fotosintetskim organima biljaka se često povezuje sa pojavom vodnog deficita biljaka kontaminiranih TM (Rauser i Dumbroff, 1981). Naime, u prisustvu TM smanjuje se intenzitet transpiracije, pa se u tim uslovima transport vode i nitrata u ksilemu redukuje (Barceló i Poschenrieder, 1990).

Tab. 8. Uticaj koncentracija Cd na aktivnost nitrat-reduktaze korena i nadzemnog dela kod biljaka graška različite starosti ($\mu\text{mol NO}_2 \text{ g}^{-1}$ sveže materije h^{-1})

Tab. 8. Effect of Cd concentration on root and above-ground parts nitrate-reductase activity of pea plants differing in age ($\mu\text{mol NO}_2 \text{ g}^{-1}$ fresh weight h^{-1})

Koncentracije Cd (M) Cd concentrations (M)	Tretman Cd Cd treatment			
	25 dana nakon klijanja 25 days after germination		63 dana nakon klijanja 63 days after germination	
	Koren Root	Nadzemni deo Above-ground parts	Koren Root	Nadzemni deo Above-ground parts
(bez Cd) (without Cd)	12,57	1,046	12,13	0,198
10^{-7}	8,10	1,010	7,67	0,105
10^{-5}	4,42	0,729	4,63	0,087
Duncan 5%	2,234	0,168	0,725	0,043

Uticaj koncentracija Cd na intenzitet disanja

Teški metali prisutni u citoplazmi i mitohondrijama inhibiraju proces disanja. Na primer u citoplazmi olovo inhibira aktivnost enzima direktne oksidacije glukoze (Hampp et al., 1973). U mitohondrijama kadmijum, olovo i nikal u suvišku inhibiraju proces disanja, odnosno Krebsov ciklus, kao i transport elektrona u respiratornom lancu i proces oksidativne fosforilacije (Miller et al., 1973; Hampp et al., 1976). Mitohondrije, naročito kriste, bubre u prisustvu kadmijuma i bakra (Ouzounidou et al., 1995), podstiče se oksidacija malata, piruvata, sukcinata, a posebno NADH, čime se smanjuje nakupljanje ekvivalenata redukcije.

Kratkotrajno izlaganje biljaka Cd značajno je smanjilo intenzitet disanja. Tretman Cd vidnije je uticao na intenzitet disanja korena biljaka tretiranih 25 dana nakon klijanja dok je kod biljaka tretiranih u 63 dana nakon klijanja njegov uticaj bio izraženiji na promenu intenziteta disanja u nadzemnom delu (Tab. 9)

Tab. 9. Uticaj koncentracija Cd na intenzitet disanja kod biljaka graška različite starosti ($\mu\text{O}_2 \text{ g}^{-1}$ sveže materije h^{-1})

Tab. 9. Effect of Cd concentrations on respiration intensity of pea plants differing in age ($\mu\text{O}_2 \text{ g}^{-1}$ fresh weight h^{-1})

Koncentracije Cd (M) Cd concentrations (M)	Tretman Cd Treatment Cd on			
	25 dana nakon klijanja 25 days after germination		63 dana nakon klijanja 63 days after germination	
	Koren Root	Nadzemni deo Above-ground parts	Koren Root	Nadzemni deo Above-ground parts
(bez Cd) (without Cd)	408,3	219,4	229,1	154,2
10^{-7}	271,7	164,4	177,5	105,9
10^{-5}	196,7	116,9	120,0	79,0
Duncan 5%	40,17	14,38	50,47	34,04

Uticaj koncentracija Cd na sadržaj pigmenata hloroplasta

Posle 25 dana gajenja biljaka obe ispitivane koncentracije Cd nakon tretmana smanjile su sadržaj hlorofila *b*, ukupan sadržaj hlorofila i odnos sadržaja hlorofila *a+b* i karotenoida. Veći uticaj Cd na sadržaj pigmenata hloroplasta imao je kratkotrajni tretman Cd u kasnijim fazama rastenja i razvića, u fazi punog cvetanja. Primenom Cd u ovoj fazi umanjeno je sadržaj hlorofila *a* i *b* dok se sadržaj karotenoida smanjio samo dejstvom više ispitivane koncentracije Cd. Isto tako kod biljaka tretiranih Cd 63 dana nakon klijanja odnos sadržaja hlorofila *a+b* i karotenoida smanjio se dejstvom niže ispitivane koncentracije dok se u prisustvu više ispitivane koncentracije, usled značajnog smanjenja sadržaja karotenoida, ovaj odnos povećavao (Tab. 10).

Veća je osetljivost hlorofila *a* prema kadmijumu u odnosu na hlorofil *b*, o čemu nam govori i odnos sadržaja hlorofila *a* i *b* (Tab. 10). Vidnije smanjenje sadržaja hlorofila *a*, odnosno veća otpornost hlorofila *b*, uočeno je i kod suncokreta u prisustvu Pb (Kastori i sar., 1998).

Teški metali inhibiraju sintezu hlorofila na nivou protohlorofilida delujući na protohlorofilid reduktazu (Stobart et al., 1985). Smatra se da smanjenje sadržaja hlorofila može da bude rezultat njegove enzimske razgradnje, obzirom da je uočena veća aktivnost hlorofilaze u biljkama tretiranim TM (Keshan i Mukherji, 1992). Inhibitorno dejstvo Cd na fototransformaciju protohlorofilida u hlorofil potvrđeno je u listovima ječma gajenog u mraku (Böddi et al., 1995). Utvrđeno je da neki TM mogu da zamene Mg u molekulu hlorofila (Küpper et al., 1996). Pored navedenog, u prisustvu visoke koncentracije teških metala dolazi i do destrukcije ultrastrukturne građe hloroplasta, što takođe vodi smanjenju sadržaja pigmenata (Rebechini i Hanzley, 1974).

Tab. 10. Uticaj koncentracija Cd na sadržaj pigmenata hloroplasta kod biljaka graška različite starosti (mg g⁻¹ suve materije)

Tab. 10. Effect of Cd concentration on chloroplast pigment content in pea plants differing in age (mg g⁻¹ dry weigh)

Koncentracija Cd (M) Cd concentrations (M)	Hlorofil a Chlorophyl a	Hlorofil b Chlorophyl b	Hlorofil a+b Chlorophyl a+b	Karotenoidi Carotenoids	Hlorofil a+b/ karotenoidi Chlorophyl a+b/ carotenoids
Tretman Cd nakon 25 dana klijanja Cd tretments on 25 days after germination					
(bez Cd) (without Cd)	10,3	3,36	13,6	7,79	1,75
10 ⁻⁷	10,2	2,84	13,1	7,56	1,73
10 ⁻⁵	9,3	2,76	12,1	7,02	1,72
Duncan 5%	0,84	0,296		0,503	
Tretman Cd nakon 63 dana klijanja Cd tretments on 63 days after germination					
(bez Cd) (without Cd)	23,1	7,66	30,8	17,9	1,72
10 ⁻⁷	17,3	6,02	23,3	17,6	1,33
10 ⁻⁵	12,1	5,21	17,3	8,7	1,95
Duncan 5%	3,79	0,723		0,85	

ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su biljke graška intenzivnije usvajale Cd ukoliko su bile tretirane višom ispitanom koncentracijom Cd i to u kasnijim fazama rastenja i razvića. Takođe, biljke tretirane sa višom ispitanom koncentracijom Cd u kasnijim fazama veći deo usvojenog Cd zadržavale su u korenu.

Kadmijum je u manjoj ili većoj meri uticao na sve ispitivane pokazatelje vodnog režima. Izlaganje biljaka Cd smanjilo je intenzitet transpiracije, površinu korena, aktivnost nitrat-reduktaze, intenzitet disanja i sadržaj pigmenata hloroplasta, a povećalo vodni potencijal, difuzni otpor stoma i ukupan sadržaj prolina. Tretman Cd u ranijim fazama imao je izraženiji efekat na intenzitet disanja i vodni potencijal, a u kasnijim fazama intenzivnije je menjao relativni sadržaj vode, intenzitet transpiracije, difuzni otpor stoma, ukupan sadržaj prolina, aktivnost nitrat-reduktaze i sadržaj pigmenata.

Napomena. Zahvaljujemo se Ministarstvu za Nauku i tehnologiju Republike Srbije na finansiranju Projekta 0412 "Unapređenje krmnih biljaka na oranicama" iz koga je prikazan deo istraživanja.

LITERATURA

- Barceló, J., Vásquez, M. D., Poschenrieder, Ch. (1988): Cadmium induced structural and ultrastructural changes in the vascular system of bush bean stems. *Botanica Acta*, 101: 254-261.
- Barceló, J., Poschenrieder, Ch. (1990): Plant water relations as affected by heavy metal stress, A review. *J. Plant Nutr*, 13: 1-37.
- Barrs, L. S., Weatherley, P. E. (1962): A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Aust. J. Biol. Sci*, 15: 413-428.
- Bates, L. S., Waldren, R. P., Teare, J. D. (1973): Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil*, 39: 205-209.
- Bogdanović, D., Ubavić, M., Hadžić, V. (1997): Teški metali u zemljištu. U: Kastori R. (ed). *Teški metali u Životnoj sredini*. Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, str.197-257.
- Böddi, B., Oravec, A. R., Lehoczky, E. (1995): Effect of cadmium on organization and photoreduction of protochlorophyllide in dark-grown leaves and etioplast inner membrane preparations of wheat. *Photosynthetica* 31: 411-420.
- Breckle, S.W. (1989): Growth under stress: heavy metals. In: Y. Waisel, U. Kafkafi, A. Eshel (eds.) *The root system: The hidden half*. Marcel Dekker Inc. New York.
- Burzinsky, M. (1988): The uptake and accumulation of phosphorus and nitrates and the activity of nitrate reductase in cucumber seedlings treated with Pb and Cd. *Acta Soci Botan Poloniae* 57: 349-359.
- Cieśliński, G., Van Rees, J.C.K., Huang, M.P., Kozak, M.L., Rostad, W.P.H., Knott, R.D. (1996): Cadmium uptake and bioaccumulation in selected cultivars of durum wheat and flax as affected by soil type. *Plant Soil*, 182: 115-124.
- Chen, Y. X., He, Y. F., Lou, Y. M., Yu, Y.L., Lin, Q., Wong, M.H. (2003): Physiological mechanism of plant roots exposed to cadmium. *Chemosphere*, 50: 789-793.
- Das, P., Samantaray, S., Rout, G. R. (1997): Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environmental Pollution*, 98, 1: 29-36.
- Dueck, Th.A. (1986a): The combined influence of sulphur dioxide and copper on two populations of *Trifolium repens* and *Lolium perene*. *Academisch Proefschrift*. Free University Press, Amsterdam. pp. 102-114
- Dueck, Th.A. (1986b): Effects on sulphur dioxide, zinc and copper on life history characteristics of *Silene cucubaalus*. In: Th. A. Dueck (ed.) *Impact of heavy metals and air pollutants on plants*. *Academisch Proefschrift*, Free University Press, Amsterdam, pp. 102-270.
- Hageman, R. H. and Reed, A. J. (1980): Nitrate reductase from higher plants. *Methods Enzymol*. 69: 270-280
- Hampp, R., Zigler, H., Zigler, I. (1973): Influence of lead ions on the activity of enzymes of the reductive pentose phosphate pathway. *Biochem. Physiol. Pflanz*, 164: 588-595.

- Hampp, R., Beulich, K., Ziegler, H. (1976): Effects of zinc and cadmium on photosynthetic CO₂-fixation and Hill activity of isolated spinach chloroplasts. *Z. Pflanzenphysiol*, 77: 336-344.
- Hardiman, R. T., Jacoby, B. (1984): Absorption and translocation of Cd in bush beans (*Phaseolus vulgaris*). *Physiol. Plant.* 61: 670-674.
- Hernández, L. E., Carpena-Ruiz, R., Gárate, A. (1996): Alterations in the mineral nutrition of pea seedlings exposed to cadmium. *J. Plant Nutr.* 19(12): 1581-1598.
- Holm, G. (1954): Chlorophyll mutations in barley. *Acta Agronomica Scandinavica* 4: 457-471.
- Janjatović, V., Kastori, R., Petrović, N., Knežević, A., Kabić, D. (1991): Effect of lead on morpho-anatomical structure of soya leaves and its accumulation in plants. *Rev. Res. Fac. Sc. Univ. Novi Sad, Ser. Biol*, 23: 48-53.
- Jensen, A., Bro-Rasmussen, F. (1992): Environmental cadmium in Europe. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 125: 101-181.
- Kastori, R., Petrović, M., Petrović, N., Štrbac, D. (1995a): Effect of heavy metals on water relations in plants. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, 88: 5-17.
- Kastori, R., Petrović, N., Arsenijević-Maksimović, I. (1995b): Effect of lead on the activity of some enzymes of nitrogen metabolism in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Glasnik instituta za botaniku i botaničke bašte univerziteta u Beogradu*, XXIX, str. 77-84.
- Kastori, R., Petrović, N., Arsenijević-Maksimović, I. (1997): Teški metali i biljke. U: Kastori R. (ed). *Teški metali u ivotnojsredini*. Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, str. 197-257.
- Kastori, R., Plesničar, M., Sakač, Z., Panković, D., Arsenijević-Maksimović, I. (1998): Effect of excess lead on sunflower growth and photosynthesis. *J. Plant Nutr.* 21: 75-85.
- Keshan, U., Mukherji, S. (1992): Effect of cadmium toxicity on chlorophyll content, Hill activity and chlorophyllase activity in *Vigna radiata* L. leaves. *Indian J. Plant Physiol.* 35: 225-230.
- Kevrešan, S., Petrović, N., Popović, M., Kandrač, J. (1998): Effect of heavy metals on nitrate and protein metabolism in sugar beet. *Biol. Plant*, 41: 235-240.
- Kirkham, M.B. (1978): Water relations of cadmium treated plants. *J. Environ. Qual.* 7: 334-336.
- Krupa, Z., Monaik, M. (1998): The stage of leaf maturity implicates the response of the photosynthetic apparatus to cadmium toxicity. *Plant Sci.* 138: 149-156.
- 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.
- Lagriffoul, A., Mocquot, B., Mench, M., Vangronsveld, J. (1998): Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.). *Plant Soil* 200: 241-250.
- Lane, S. D., Martin, E. S. (1980): Further observations on the distribution of lead in juvenile roots *Raphanus sativus*. *Z. Pflanzenphysiol*, 97: 145-152.

- Lang, F., Sarvari, T., Szigeti, Z., Fodor, F., Cseh, E. (1995): Effect of heavy metals on the photosynthetic apparatus in cucumber. *In: Photosynthesis: from light to biosphere*. Vol. IV (P. Mathis, ed.). Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 553-536.
- Leita, L., Baca-Gars a, M.T., Maggoni, A. (1992): Cadmium uptake by *Pisum sativum*: accumulation and defense mechanism. *Agrochimca* 36: 253-259.
- Miller, R. J., Bittel, J. E., Koeppe, D. E. (1973): The effect of cadmium on electron and energy transfer reactions in corn mitochondria. *Physiol. Plant.* 28: 166-171.
- Nunes, M.A., Matos, C.M., Azinheira, H.G., Quartin, V.L. (1995): Indirect effects of aluminium on photosynthesis and mineral concentration in triticales. *In: Mathis P (ed) Photosynthesis: from light to biosphere Vol IV*. Kluwer Academic Publisher, Netherland, pp. 713-716.
- Obata, H., Umabayashi, M. (1997): Effect of cadmium on mineral nutrient concentrations in plants differing in tolerance for cadmium. *J. Plant. Nutr.* 20, 1: 97-105.
- Ouzounidou, G., Moustakas, M., Lannoye, R. (1995): Chlorophyll fluorescence and photoacousti characteristic in relationship to changes in chlorophyll and Ca²⁺ content of a Cu-tolerant *Silene compasta* ecotype under Cu tretment. *Physiol. Plant.* 93: 551-557.
- Palvöke, A. (1983): The short-term effects of zinc on the growth, anatomy and acid phosphatase of pea seedlings. *Ann. Bot. Fenn.* 20: 197-203.
- Pearson, Ch., Kirkham, M.B. (1981): Water relations of wheat cultivars grown with cadmium. *J. Plant Nutr.* 3: 309-318.
- Petrović, N., Kastori, R., Rajčan, I. (1990): The effect of cadmium on nitrate reductase activity in sugar beet (*Beta Vulgaris*). *In: Plant nutrition - Physiology and Application*, Van Beusichem, M.L. ed, Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, London, pp. 107-109.
- Petrović, N., Kastori, R., Rajčan, I. (1991): Effect of cadmium on nitrate reductase activity in young sugar beet (*Beta vulgaris*) plants differently supplied with potassium. *Zemljište i biljka*, 40: 29-36.
- Petrović, M., Kastori, R., Petrović, N. (1992): Uticaj olova na vodni re imuncokreta i šećerne repe. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, 83: 69-74.
- Petrović, N., Kastori, R., Arsenijević-Maksimović, I., Čačić, N. (1998): Effect of lead on the growth and water relations in young sugar beet plants. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, 94: 33-41.
- Popović, M., Kevrešan, S., Kandrač, J., Nikolić, J., Petrović, N., Kastori, R. (1996): The role of sulphur in detoxication of cadmium in young sugar beet plants. *Biol. Plant.* 38: 281-287.
- Rauser, W. E., Dumbroff, E. B. (1981): Effects on excess cobalt, nickel and zinc on the water relations of *Phaseolus vulgaris*. *Environ. exp. Bot.* 21: 249-255.
- Rebecchini, H. M, Hanzley, L. (1974). Lead induced ultrastructural changes in chloroplasts of the hydrophyte, *Ceratophyllum demersum*. *Z. Pflanzenphysiol.* 73: 377-386.

- Robb, J., Busch, L., Rauser, W. E. (1980): Zinc toxicity and xilem vessel alterations in white beans. *Ann. Bot.* 46: 43-50.
- Sanitá di Topi, L., Gabbrielli, R. (1999): Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, 41: 105-130.
- Sarić, M., Kastori, R., Petrović, M., Stanković, Ž., Krstić, B., Petrović, N. (1991): *Praktikum iz fiziologije biljaka*. Naučna knjiga, Beograd.
- Schnabl, H., Zeigler, H. (1975): Über die Wirkung von Aluminiumionen auf die Stomatabewegung von *Vicia faba*-Epidermen. *Z. Pflanzenphysiol*, 74: 394-403.
- Sheoran, I.S., Aggarwal, N., Singh, R. (1990): Effects of cadmium and nickel on *in vivo* carbon dioxide exchange rate of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.), *Plant Soil* 129: 243- 249.
- Skórzyskań-Polit, E., Baszyński, T. (1997): Differences in sensitivity of the photosynthetic apparatus in Cd-stressed runner bean plants in relation to their age, *Plant Sci.* 128: 11-21.
- Stobart, A. K., Griffiths, W. T., Ameen-Bukhari, I., Sherwood, R. P. (1985): The effect of Cd+2 on the bio synthesis of chlorophyll in leaves of barley. *Physiol. Plant.* 63: 293-298.
- Tu, S. I., Broullettes, J. N. (1987): Metal ion inhibition of cotton root plasma membrane ATPase. *Phytochemistry* 26: 119-128,.
- Van Assche, F., Clijsters, H. (1990): Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ* 13: 195-206.
- Vásquez, M. D., Poschenrieder, Ch., Barceló, J. (1987): Chromium VI induced structural and ultrastructural changes in bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.), *Ann. Bot.* 59: 427-438.
- Von Wettstein, D. (1957): Chlorophyll-letale und submikroskopische formwechsel der plastiden. *Exp. Cell. Res.* 12: 427-506.
- Weber, M. B., Schat, H., Ten Bookum-vander Maarel, W. M. (1991): The effect of copper toxicity on the contents of nitrogen compounds in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke. *Plant Soil*, 133: 101-109.
- Woolhouse, H. W. (1983): Toxicity and tolerance in responses of plant to metals. In: O. L. Lange, P. S. Nobel, C. B. Osmond, H. Ziegler (Ed). *Encyclopedia of Plant Physiology*. III. *Plant Ecology*, vol. 12C, Springer Verlag, NY, pp. 2145-3000.
- Yoshiba, Y., Kiyosue, T., Katagiri, T., Ueda, H., Miziguchi, Y., Shinozaki, K. (1995): Correlation between the induction of a gene for proline-5-carboxilate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress, *Plant J*, 7: 751-760.

EFFECT OF Cd CONCENTRATIONS AND PHASE OF GROWTH AND DEVELOPMENT ON PLANTS WATER RELATIONS

Kevrešan, Ž.¹, Petrović, N.², Mihailović, V.³

¹Faculty of Tehnology, Novi Sad

²Faculty of Agriculture, Novi Sad and Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad

³Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad

SUMMARY

Effect of Cd on water relations in pea plants was investigated in semi-controlled conditions in a glasshouse. After growing on nutrient solution, plants were treated with 10^{-7} or 10^{-5} M Cd 25 or 63 days after seed germination. Treatments with Cd lasted for 48 hours. After treatment plants were harvested and analyzed on water relation parameters. Cd treatment decreased plant transpiration, root area, nitrate-reductase activity, respiration intensity, chloroplast pigment content and increased water potential, stomata diffusive resistance and proline content. Plants treated 25 days after germination decreased respiration and water potential more intensely, while plants treated 63 days after treatment severely decreased relative water content, plant transpiration, stomata diffusive resistance, proline content, chloroplast pigment content and nitrate-reductase activity.

KEY WORDS: cadmium, peas, plant age, plants water relation