

## AKUMULACIJA SUHE TVARI I SADRŽAJ FOTOSINTETSKIH PIGMENATA U ROTKVICI (*Raphanus sativus* L.) KAO POKAZATELJI TOKSIČNOSTI BAKRA I OLOVA

*M. Lisjak, Meri Engler, B. Đurđević, K. Karalić, Nada Paradiković*

Izvorni znanstveni članak  
Original scientific paper

### SAŽETAK

*Uključivanje teških metala u metabolizam biljaka prouzročuje promjene specifičnih metaboličkih putova, poput procesa sinteze organske tvari. Biljke tri kultivara rotkvice izložene su tretmanu s 0,5 mM Cu, odnosno Pb u hranjivoj otopini tijekom 48 h. Sadržaj fotosintetskih pigmenata u listovima utvrđen je spektrofotometrijski i izražen na jedinicu mase suhe i svježe tvari lista. Manja akumulacija suhe tvari u listu i hipokotilu tretiranih biljaka rezultirala je relativnim povećanjem sadržaja pigmenata u suhoj tvari lista. Ovim je istraživanjem utvrđeno da je sadržaj fotosintetskih pigmenata, u uvjetima kratkog izlaganja navedenim teškim metalima, neprecizan pokazatelj njihove toksičnosti za rotkvicu.*

*Ključne riječi: bakar, klorofili, karotenoidi, olovo, rotkvica, stres, teški metali*

### UVOD

Zbog ljudskoga djelovanja te posljedičnoga onečišćenja okoliša, teški metali dospijevaju u biosferu, gdje, zbog svoje toksičnosti, dovode do određenih promjena specifičnih putova metabolizma u živim organizmima. Poput ostalih stresnih činitelja okoliša, u biljci izazivaju stanje oksidacijskoga stresa te je neophodno što bolje upoznati mehanizme njihovoga štetnoga djelovanja, kao i tolerantnost pojedinih vrsta i specifičnu reakciju njihovih varijeteta, na povećanu pristupačnost teških metala u okolišu. Prema Maxymiec (2007.), toksičnost teških metala jedan je od glavnih oblika abiotskoga stresa, koji dovodi do rizičnih učinaka na zdravlje životinja i biljaka. Učinak na biljke, smatra autor, može biti rezultat njihovoga direktnoga štetnoga djelovanja na membrane i fotosintetski aparat, čime dovode do inhibicije sinteze organske tvari i stimulacije starenja biljke. Kao najizrazitiji vanjski pokazatelj stresa u biljkama, pored usporenoga rasta, često se uočava smanjenje koncentracije kloroplastnih pigmenata, kako pri drugim vrstama okolišnog stresa (npr. poremećaji opskrbe vodom i hranivima, ekstremne temperature, napadi patogena, UV zračenje), tako i kod stresa izazvanoga teškim metalima. Utvrđeno je da zamjena Mg kao centralnog atoma u molekuli klorofila, teškim metalom (Hg, Cu, Cd, Ni, Zn, Pb), *in vivo* predstavlja značajan mehanizam oštećenja biljaka, a stupanj oštećenja ovisi o intenzitetu svjetla (Prasad, 1998.). Međutim, treba istaknuti da sadržaj i međusobni omjeri fotosintetskih pigmenata mogu značajno varirati, ovisno o biljnoj vrsti pa čak i genotipu, kao i o jačini i vrsti stresa.

Pojam «teški metal» u načelu se koristi za metale i polumetale koji su u vezi s onečišćenjem okoliša i pojavama toksičnosti, ali i za neke elemente koji su esencijalna hraniva u maloj koncentraciji u stanicama (Gratão i sur., 2005.). Prema mišljenju Dučić i Polle (2005.), Cu je glavni kontaminant koji se pojavljuje u okolišu zbog antropogenih aktivnosti, naročito zbog dugotrajne primjene fungicida na osnovi Cu (Díaz i sur., 2001.). Također, razina Pb u okolišu brzo se povećavala zbog industrijalizacije i urbanizacije u posljednjih nekoliko desetljeća (Singh i sur., 1997.). Za razliku od Cu, Pb nije esencijalni element, tj. ne sudjeluje u izvornoj građi žive tvari, ali se ipak lako apsorbira i nakuplja u

---

*Miroslav Lisjak, dipl. inž., Meri Engler, dipl. inž.; Boris Đurđević, dipl. inž.; Krunoslav Karalić, dipl. inž.; dr. sc. Nada Paradiković, izv. prof. – Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet Osijek, Trg Sv. Trojstva 3, 31000 Osijek*

različitim biljnim dijelovima. Time izaziva inhibiciju enzimatske aktivnosti, poremećaje mineralne ishrane, vodnoga režima, promjene razine hormona u biljkama i propustljivosti staničnih membrana (Sharma i Dubey, 2005.).

Rotkvice (*Raphanus sativus* L.) se kao povrće koristi već od doba Starog Rima i Grčke (Lešić i sur., 2002.). Danas se uzgaja u cijelome svijetu u područjima umjerene klime. U Hrvatskoj se često uzgaja u gradskim i prigradskim vrtovima, gdje zbog ljudskih djelatnosti postoji potencijalna opasnost od povećane izloženosti teškim metalima. Cilj ovoga rada bio je utvrditi dolazi li do poremećaja u sadržaju kloroplastnih pigmenata i posljedično inhibicije rasta kod tri genotipa rotkvice, ukoliko je stres izazvan naglo, visokom koncentracijom Cu, odnosno Pb u hranjivome mediju, što se može dogoditi presađivanjem iz optimalnih uvjeta uzgoja presadnica u kontaminirano tlo ili hidropon. Kako bi se izbjegla mogućnost pojave drugih vrsta abiotskoga stresa, istraživanje je provedeno u kontroliranim uvjetima klima komore, a ispitivani teški metali dodani su u hranjivu otopinu.

## MATERIJAL I METODE

Sjeme tri kultivara rotkvice (*Raphanus sativus* L.) posijano je u komercijalni supstrat i uzgajano tri tjedna u uvjetima staklenika, do faze od četiri do pet listova. Jednoliko razvijene biljke izvađene su iz supstrata s korijenom, koji je ispiran finim mlazom vodovodne vode, uz minimalno oštećenje. Nakon dodatnog ispiranja deioniziranom vodom, učvršćene su u perforirane plastične poklopce staklenih posuda (0,75 L), koje su sadržavale Hoagland hranjivu otopinu. Električni konduktivitet hranjive otopine bio je 1,2 mS/cm, a pH 6,5. Hranjiva otopina zamjenjivana je svaka tri dana i prozračivana 1 sat svakog dana. Eksperiment je bio postavljen u tri ponavljanja s po četiri biljke u posudi. Biljke su uzgajane tri tjedna u termo-komori, u potpuno slučajnome blok rasporedu uz rotaciju posuda pri svakoj zamjeni hranjive otopine. Temperatura je bila održavana na 20°C, uz zadanu relativnu vlažnost zraka 70% i 12-satni fotoperiod. Svjetlo je osigurano pomoću hladnih, bijelih fluorescentnih cijevi, koje su osiguravale intenzitet svjetla od 120  $\mu\text{mol}$  fotona/ $\text{m}^2/\text{s}$  na razini listova. U konačnici (u fazi šest listova) su biljke dva dana tretirane s 0,5 mM  $\text{Cu}(\text{SO}_4)$  ili  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  (konačna koncentracija) u hranjivoj otopini, uz kontrolu kojoj nisu dodani teški metali u suvišku te je sadržala neophodnih 0,05 mg Cu/L (0,000787 mM). Po završetku tretmana, biljke su podijeljene na hipokotil i listove, hipokotili su isprani 10 minuta u 10 mM  $\text{CaCl}_2$  i deioniziranoj vodi. Kloroplastni pigmenti su ekstrahirani iz listova 100%-tnim acetonom. Određivanje sadržaja pigmenata izvedeno je spektrofotometrom, mjerenjem apsorpcije u ekstraktima na 662, 644 i 440 nm. Pojedinačni sadržaji klorofila a (kl a), klorofil b (kl b), ukupnih klorofila (kl a+b) i karotenoida (karot) izračunati su koristeći formule prema Wettstein (1957.) te izraženi po g svježe i suhe tvari lista. Masa svježe tvari listova i hipokotila izvagana je prije sušenja (24 sata na 70 °C) i izražena u g/biljka. Podaci dobiveni mjerenjima i analizama statistički su obrađeni analizama varijance, a LSD test korišten je za testiranje značajnosti razlika (za  $P \leq 0,05$ ) u slučajevima značajnosti tretmana prema F-testu u analizi varijance. Za testiranje povezanosti ispitivanih parametara korištena je korelacijska analiza, uz ocjenu značajnosti t-testom.

## REZULTATI I RASPRAVA

Kratkotrajno izlaganje mladih biljaka rotkvice visokoj koncentraciji Cu i Pb u hranjivoj otopini nije rezultiralo značajnim promjenama u sadržaju kloroplastnih pigmenata u svježoj tvari lista. Prema F-testu, ispitivani kultivari nisu se razlikovali po sadržaju pigmenata, niti po njihovim međusobnim omjerima (kla/klb, kl/karot), niti je sadržaj pigmenata u svježoj tvari lista pokazao reakciju sorata na primjenjene teške metale (podaci nisu prikazani). Vasilev i sur. (2003.) su pri kombiniranome tretmanu mladih biljaka krastavca, graha i salate s 50  $\mu\text{M}$  Cd, 20  $\mu\text{M}$  Cu i 500  $\mu\text{M}$  Zn, utvrdili pad koncentracije klorofila a i b te karotenoida, čak i više od 50%. Autori pretpostavljaju da je takav učinak teških metala nastao zbog mogućega nedostatka Fe, zamjene Mg u molekulama klorofila ili oksidacijskoga stresa. U pokusima koje su proveli Yurekli i Porgali (2006.) također nije utvrđeno značajno smanjenje sadržaja klorofilnih pigmenata u soji nakon tretmana s 0,1 mM Cu te autori zaključuju da su pigmenti slabi pokazatelji oksidacijskog stresa, pogotovo ako su biljke tretirane u kratkome roku. Iako je u našem istraživanju primjenjena pet puta veća koncentracija Cu i Pb, također se može zaključiti da je sadržaj pigmenata, izražen na svježju tvar lista, neprecizan pokazatelj

njihovoga štetnoga djelovanja, odnosno reakcije biljke na povećanu pristupačnost navedenih teških metala.

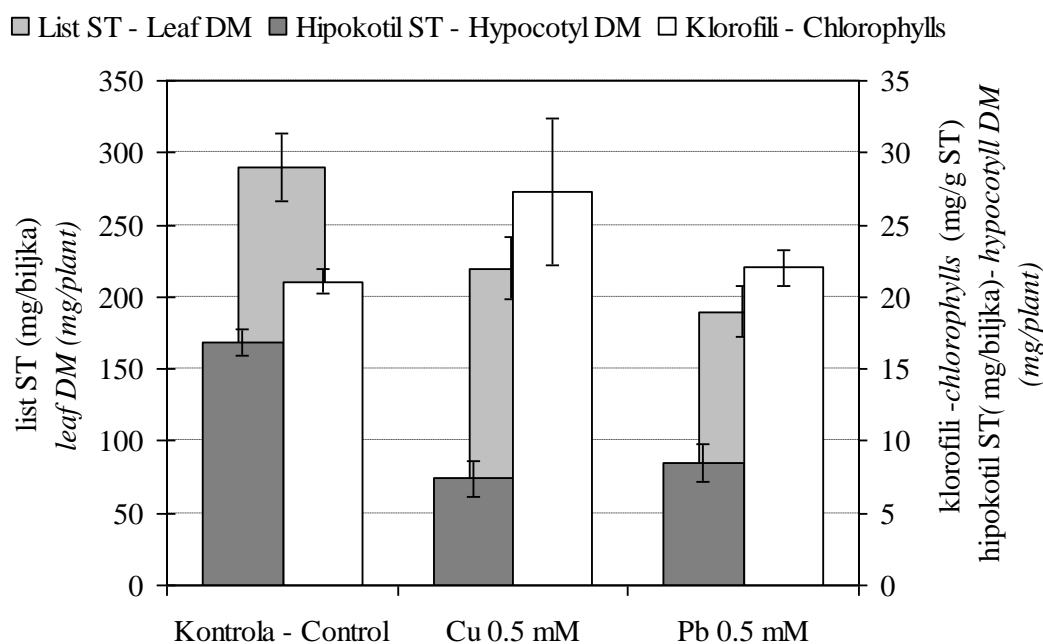
Wang i sur. (2004.) tvrde da je inhibicija rasta biljaka i produktivnosti usjeva zbog suviška teških metala, poput Cu, Cd, Zn ili Ni, u kontaminiranome tlu globalni problem poljoprivrede. Kako je glavna funkcija kloroplastnih pigmenata sinteza organske tvari, koja čini najveći dio suhe tvari biljke i neophodan je preduvjet njenoga rasta i razvoja, u ovom istraživanju analiziran je utjecaj primjenjenih teških metala na sadržaj svježe i suhe tvari lista i hipokotila rotkvice. Prema F-testu, svježa masa lista nije značajno ovisila o kultivaru, teškim metalima, kao ni o njihovoj interakciji, dok je na svježju tvar hipokotila vrlo značajan utjecaj ( $P \leq 0,01$ ) imao tretman teškim metalima, uz izraženije smanjenje kod tretmana s Pb, ali ne značajno različito u odnosu na tretman s Cu (Tablica 1.). Prema istraživanjima Díaz i sur. (2001.), 50  $\mu\text{M}$  Cu u hranjivoj otopini u trajanju od 10 dana, dovela je do smanjenja svježe mase svih biljnih dijelova paprike. Duljina tretmana teškim metalima u našem istraživanju vjerojatno je bila nedovoljna da bi se pojavile značajne razlike u svježjoj masi lista između tretiranih biljaka i kontrole.

**Tablica 1. Utjecaj kultivara, teškoga metala i interakcije na svježju i suhu masu lista i hipokotila (Lsvt - svježa masa lista; Lst - suha masa lista; Hsvt - svježa masa hipokotila; Hst - suha masa hipokotila) kod tri kultivara rotkvice uzgajanih u kontroliranim uvjetima u hranjivoj otopini bez (Kontrola; 0,05 mg Cu/L ili 0,000787 mM) i s dodanim teškim metalima (0,5 mM Cu odn. Pb, 48 h), ( $\pm$ S.E.).<sup>a, b, c</sup> – značajne razlike u prosječnim vrijednostima tretmana prema LSD testu ( $P \leq 0,05$ ) označene su različitim slovima.**

*Table 1. The influence of cultivar, heavy metal treatment and interaction on leaf and hypocotyls fresh and dry matter (LFM - leaf fresh matter; LDM - leaf dry matter; HFM - hypocotyls fresh matter; HDM - hypocotyls dry matter), for three radish cultivars grown in controlled conditions in nutrient solution, without excess heavy metals (Control; 0.05 mg Cu/L or 0,000787 mM) and supplied with 0.5mM Cu or Pb for 48 h, ( $\pm$ S.E.).<sup>a, b, c</sup> – significantly different treatment means (LSD test,  $P \leq 0.05$ ) are marked with different letter*

Tretman <i>Treatment</i>	Kultivar <i>Cultivar</i>	LSVT <i>LFM</i>	LST <i>LDM</i>	HSVT <i>HFM</i>	HST <i>HDM</i>
		g/biljka – g/plant			
Kontrola <i>Control</i>	Saxa 2	4,46 $\pm$ 0,90	0,28 $\pm$ 0,06	0,19 $\pm$ 0,04	18,27 $\pm$ 0,29
	Saxa Treib	5,80 $\pm$ 0,79	0,34 $\pm$ 0,05	0,21 $\pm$ 0,05	16,15 $\pm$ 1,67
	Non Plus Ultra	3,67 $\pm$ 0,49	0,26 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,04	16,11 $\pm$ 0,86
Prosjek – <i>Mean</i>		4,64 <sup>a</sup>	0,29 <sup>a</sup>	0,22 <sup>a</sup>	16,84 <sup>a</sup>
Cu	Saxa 2	3,24 $\pm$ 0,39	0,27 $\pm$ 0,03	0,13 $\pm$ 0,03	6,27 $\pm$ 1,34
	Saxa Treib	4,86 $\pm$ 0,76	0,15 $\pm$ 0,02	0,14 $\pm$ 0,01	4,28 $\pm$ 0,26
	Non Plus Ultra	4,25 $\pm$ 0,18	0,23 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,03	11,72 $\pm$ 1,37
Prosjek – <i>Mean</i>		4,12 <sup>a</sup>	0,22 <sup>b</sup>	0,17 <sup>b</sup>	7,42 <sup>b</sup>
Pb	Saxa 2	3,64 $\pm$ 0,92	0,19 $\pm$ 0,05	0,09 $\pm$ 0,02	3,96 $\pm$ 0,94
	Saxa Treib	2,99 $\pm$ 0,48	0,18 $\pm$ 0,03	0,14 $\pm$ 0,01	9,08 $\pm$ 0,76
	Non Plus Ultra	3,96 $\pm$ 0,20	0,19 $\pm$ 0,02	0,20 $\pm$ 0,02	12,30 $\pm$ 1,04
Prosjek – <i>Mean</i>		3,53 <sup>a</sup>	0,19 <sup>b</sup>	0,14 <sup>b</sup>	8,45 <sup>b</sup>
F-test (* $P \leq 0,05$ , ** $P \leq 0,01$ )					
Kultivar – <i>Cultivar</i>		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Tretman – <i>Treatment</i>		n.s.	**	**	**
Interakcija – <i>Interaction</i>		n.s.	*	n.s.	**

Vrlo značajan utjecaj teških metala ( $P \leq 0,01$ ), kao i značajan utjecaj njihove interakcije s kultivarom ( $P \leq 0,05$ ), utvrđen je za suhu tvar lista, koja je kod tretiranih biljaka bila manja u odnosu na kontrolu, s najmanjim vrijednostima kod tretmana s Pb, pri čemu između tretmana s Cu i Pb nije bilo značajne razlike. Najmanja vrijednost suhe mase hipokotila utvrđena je u tretmanu s Cu. Na suhu tvar lista i hipokotila kultivar nije imao značajan utjecaj, dok je tretman teškim metalima utjecao na razini visoke značajnosti ( $P \leq 0,01$ ) na oba parametra. Interakcija tretmana i kultura za suhu tvar lista pokazala se značajnom na razini  $P \leq 0,05$ , a za suhu tvar hipokotila na razini  $P \leq 0,01$ . U prosjeku za sve kulture, suha masa lista i hipokotila bile su izrazito manje u tretiranim biljkama nego u kontroli (Grafikon 1), što znači da je čak i tako kratko izlaganje biljaka visokoj koncentraciji teških metala dovelo do inhibicije sinteze organske tvari.



**Grafikon 1. Učinak toksičnosti Cu i Pb (0,5 mM u hranjivoj otopini, 48 h) na prosječan sadržaj klorofila i akumulaciju suhe tvari u listu i hipokotilu rotkvice ( $\pm$  S.E.)**

*Figure 1. The effect of Cu and Pb toxicity (0.5 mM in nutrient solution, 48 h) on mean chlorophylls content as well as dry matter accumulation in radish leaf and hypocotyl ( $\pm$  S.E.)*

Uočljivo manja akumulacija suhe tvari u listovima u biljkama tretiranim s Cu i Pb odrazila se na koncentraciju pigmenta u suhoj tvari (Grafikon 1.). Stoga je utvrđen vrlo značajan utjecaj kultura, tretmana teškim metalima, kao i njihove interakcije, na sadržaj klorofila te ukupnih klorofila u suhoj tvari lista (Tablica 2.). Kultivar Non Plus Ultra koji je u netretiranim biljkama imao najniže sadržaje svih analiziranih pigmenta u suhoj tvari lista, pokazao je najveće vrijednosti sadržaja pigmenta u biljkama tretiranim s Pb, dok je u tretmanu s Cu najveće sadržaje pigmenta imao kultivar Saxa Treib.

**Tablica 2. Sadržaji i omjeri kloroplastnih pigmenta (kla - klorofil a; kl b - klorofil b; kl (a+b) - ukupni klorofili; karot - ukupni karotenoidi) u suhoj tvari lista (ST) tri kultura rotkvice uzgajanih u kontroliranim uvjetima u hranjivoj otopini bez (Kontrola; 0,05 mg Cu/L ili 0,000787 mM) i s dodanim teškim metalima (0,5 mM Cu odn. Pb, 48 h), ( $\pm$ S.E.).<sup>a, b, c</sup> – značajne razlike u prosječnim vrijednostima tretmana prema LSD testu ( $P \leq 0,05$ ) označene su različitim slovima**

*Table 2. Chloroplast pigments contents (Chla - chlorophyll a; Chlb - chlorophyll b; Chl - total chlorophylls; Carot - total carotenoids) and their ratios in leaf dry matter (DM) of three radish cultivars grown in controlled conditions in nutrient solution, without excess heavy metals (Control; 0.05 mg Cu/L or 0,000787 mM) and supplied with 0.5 mM Cu or Pb for 48 h, ( $\pm$ S.E.).<sup>a, b, c</sup> – significantly different treatment means (LSD test,  $P \leq 0.05$ ) are marked with different letters*

Tretman <i>Treatment</i>	Kultivar <i>Cultivar</i>	Kla <i>Chla</i>	klb <i>Chlb</i>	kl (a+b) <i>Chl</i>	karot <i>Carot</i>	kla/klb <i>Ch a/Chlb</i>	kl/karot <i>Chl/Carot</i>
		mg/g ST - mg/g DM					
Kontrola <i>Control</i>	Saxa 2	14,95±1,28	5,50±0,46	20,45±1,74	2,73±0,45	2,73±0,03	4,63±0,13
	Saxa Treib	15,35±1,74	5,65±0,36	21,00±2,10	2,67±0,35	2,67±0,15	4,77±0,11
	Non Plus Ultra	10,84±0,44	4,00±0,15	14,83±0,58	2,73±0,11	2,73±0,02	4,80±0,03
Prosjek – <i>Mean</i>		13,71 <sup>a</sup>	5,05 <sup>a</sup>	18,76 <sup>a</sup>	3,98 <sup>a</sup>	2,71 <sup>a</sup>	4,73 <sup>a</sup>
Cu	Saxa 2	10,57±0,88	3,84±0,37	14,40±1,25	3,03±0,27	2,77±0,05	4,77±0,06
	Saxa Treib	34,63±3,75	11,68±1,00	46,31±4,75	10,12±1,37	2,93±0,08	4,63±0,19
	Non Plus Ultra	15,29±1,64	5,75±0,60	21,05±2,24	4,45±0,52	2,67±0,02	4,70±0,05
Prosjek - <i>Mean</i>		20,16 <sup>b</sup>	7,09 <sup>b</sup>	27,25 <sup>b</sup>	5,87 <sup>b</sup>	2,79 <sup>a</sup>	4,70 <sup>a</sup>
Pb	Saxa 2	17,00±1,75	6,51±0,57	23,51±2,31	4,97±0,53	2,60±0,06	4,73±0,07
	Saxa Treib	16,85±0,45	5,79±0,14	22,63±0,58	4,99±0,12	2,99±0,03	4,53±0,15
	Non Plus Ultra	20,55±1,87	8,12±0,86	28,66±2,73	6,67±0,66	2,57±0,07	4,68±0,09
Prosjek - <i>Mean</i>		18,13 <sup>ab</sup>	6,80 <sup>ab</sup>	24,93 <sup>ab</sup>	5,54 <sup>b</sup>	2,70 <sup>a</sup>	4,64 <sup>a</sup>
F-test (* P≤0,05, ** P≤0,01)							
Kultivar - <i>Cultivar</i>		**	*	**	n.s.	*	n.s.
Tretman - <i>Treatment</i>		**	**	**	n.s.	*	n.s.
Interakcija - <i>Interaction</i>		**	**	**	*	**	n.s.

Povišena koncentracija Cu u hranjivoj otopini rezultirala je značajno većim sadržajem ukupnih klorofila ( $P \leq 0,05$ ), u odnosu na tretman s Pb i kontrolu. Na sadržaj klorofila b kultivar je utjecao na razini značajnosti  $P \leq 0,05$ , dok su tretman teškim metalima te interakcija kultivara i tretmana imali vrlo značajan utjecaj ( $P \leq 0,01$ ). Xiong i Wang (2005.) također su utvrdili povećanje sadržaja kloroplastnih pigmenata kod kineskoga kupusa, nakon tretmana s Cu. Autori tvrde da su tretirane biljke izgledale zdravo, bez obzira što su imale visoku koncentraciju Cu. Pri tretmanu tla s koncentracijom Pb od 4 mM/kg tla u istraživanjima Xiong i sur. (2006.), kineski kupus je akumulirao čak 202,3 mg Pb/kg suhe tvari lista, uz povećanje sadržaja klorofila b, dok na klorofil a tretman s Pb nije imao značajan utjecaj. Unatoč visokome sadržaju Pb u listu, biljke nisu prikazivale simptome toksičnosti. Za razliku od navedenih autora, Zaman i Zereen (1998.) su utvrdili značajno smanjenje ( $P \leq 0,05$ ) sadržaja klorofilnih pigmenata u suhoj tvari lista rotkvice uzgajane 30 dana na tlu kontaminiranom s 500 i 1000 mg/kg Cd, odn. Pb.

Na omjer klorofilnih pigmenata u suhoj tvari lista rotkvice, kultivar i tretmani s Cu, odn. Pb, nisu značajno utjecali, dok je njihova interakcija prema F-testu bila značajna ( $P \leq 0,05$ ). Tretman i kultivar imali su, također, značajan utjecaj na sadržaj karotenoida, dok je njihova interakcija imala vrlo značajan utjecaj ( $P \leq 0,01$ ) na navedeni parametar. Kao i kod klorofila, u odnosu na kontrolu, utvrđen je veći sadržaj karotenoida u suhoj tvari lista, kod oba tretmana teškim metalima. Omjer ukupnih klorofila i karotenoida u suhoj tvari lista nije se značajno razlikovao između kontrolnih i tretiranih biljaka u našem istraživanju, niti između kultivara.

S obzirom na to da utjecaj teških metala nije statistički značajno djelovao na sadržaj pigmenata u svježoj tvari lista i utvrđenu svježju masu lista (Tablica 1), manja akumulacija suhe tvari u biljkama pod stresom je rezultirala većom koncentracijom pigmenata izraženom na g suhe tvari lista. To znači da koncentracija kloroplastnih pigmenata nije realno povećana zbog stresa teškim metalima, već se može pretpostaviti da je učinkovitost fotosintetskoga sustava bila manja te su biljke akumulirale manje

suhe tvari. U nekim vrstama utvrđeno je povećanje sadržaja fotosintetskih pigmenata zbog bakrom izazvanoga smanjenja fiksacije CO<sub>2</sub> (Romeu-Moreno i Mas, 1999.). Također prema rezultatima Marchiol i sur. (2004.), koji su uzgajali rotkvicu na tlu kontaminiranome s više teških metala (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn), mehanizam sprječavanja transporta teških metala iz korijena u list rotkvice bio je smanjenje transpiracije zatvaranjem puči, zbog čega je utvrđena slabija asimilacija CO<sub>2</sub>, time i smanjeni porast. Međutim, autori iznose da se učinkovitost usvajanja svjetlosne energije nije značajnije mijenjala, unatoč manjem relativnom sadržaju pigmenata mjerenom klorofilmetrom u biljkama na kontaminiranome tlu, u odnosu na kontrolne biljke. Može se pretpostaviti da ispitivani teški metali u našem istraživanju nisu direktno utjecali na sadržaj kloroplastnih pigmenata u listu rotkvice. Uobičajeni simptomi stresa, poput venuća, kloroze i nekroze listova i drugih biljnih dijelova, nisu bili vidljivi, ali je akumulacija suhe tvari u tretiranim biljkama bila značajno manja u odnosu na kontrolu. Sadržaj kloroplastnih pigmenata u listu rotkvice u ovom istraživanju nije bio dovoljno pouzdan pokazatelj toksičnosti Cu ili Pb u datim eksperimentalnim uvjetima. Smatramo da bi bilo potrebno analizirati razinu oksidacijskoga stresa i posljedično inhibiciju rasta rotkvice pri različitim koncentracijama teških metala, u interakciji s drugim oblicima abiotskoga stresa i različitim supstratima, s ciljem boljšega poznavanja fizioloških mehanizama otpornosti biljaka i selekcije tolerantnih genotipova. Ispitivanje reakcije biljke na staničnoj i molekularnoj razini doprinjelo bi sagledavanju učinka teških metala na metabolizam biljke i sintezu organske tvari, kao preduvjet njenoga rasta i ostvarenja prinosa, u čemu su sadržaj i funkcija fotosintetskih pigmenata vrlo bitni činitelji.

## ZAKLJUČAK

Kod ispitivanih kultivara rotkvice tretman teškim metalima rezultirao je smanjenjem akumulacije suhe tvari lista i hipokotila te svježje tvari hipokotila, dok za svježju tvar lista nisu utvrđene značajnije promjene. U datim eksperimentalnim uvjetima razlike sadržaja pigmenata izražene na svježju masu lista nisu bile značajne, dok se povećanje sadržaja pigmenata, izraženoga na jedinicu suhe tvari, javilo kao rezultat njene smanjene akumulacije u listovima tretiranih biljaka. Dobiveni rezultati upućuju na zaključak da pri kratkom izlaganju rotkvice visokoj koncentraciji Cu ili Pb, sadržaj fotosintetskih pigmenata nije pouzdan pokazatelj razine toksičnosti tih teških metala. Reakcija te biljne vrste na stres zbog teških metala trebala bi se ispitivati na staničnoj i molekularnoj razini, analizama antioksidacijskih metabolita i enzimatske aktivnosti te ekspresije gena, u kontroliranim i poljskim uvjetima. Takvim bi se pristupom dobila cjelovitija slika o učinku teških metala na metabolizam biljke i sintezu organske tvari, kao preduvjet njenoga rasta i ostvarenja prinosa, u čemu su sadržaj i funkcija fotosintetskih pigmenata vrlo bitni činitelji.

Ovo je istraživanje rađeno u okviru projekta uz potporu Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa "Fiziološki mehanizmi otpornosti biljaka na abiotski stres", čiji je voditelj prof.dr.sc. Tihana Teklić.

## LITERATURA

1. Díaz, J., Bernal, A., Pomar, F., Merino, F. (2001): Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. *Plant Science*, 161: 179-188.
2. Dučić, T., Polle, A. (2005): Transport and detoxification of manganese and copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(1): 103-112.
3. Gratão, P.L., Polle, A., Lea, P.J., Azevedo, R.A. (2005): Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*, 32: 481-494.
4. Lešić, R., Borošić, J., Butorac, I., Čustić, M., Poljak, M., Romić, D. (2002.): Rotkvica. *Povrćarstvo*, 3(14):241.-245.
5. Marchiol, L., Assolari, S., Sacco, P., Zerbi, G. (2004): Phytoextraction of heavy metals by canola (*Brassica napus*) and radish (*Raphanus sativus*) grown on multicontaminated soil. *Environmental Pollution*, 132: 21-27.
6. Maxymiec, W. (2007): Signaling responses in plants to heavy metal stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29: 177-187.

7. Prasad, M.N.V. (1998): Metal-biomolecule complexes in plants: Occurrence, functions, and applications. *Analysis*, 26(6): 25-28.
8. Romeu-Moreno, A., Mas, A. (1999): Effects of copper exposure in tissue cultured *Vitis Vinifera*. *Agricultural and Food Chemistry* 47: 2519-2522.
9. Singh, R.P., Tripathi, R.D., Sinha, S.K., Maheshwari, R., Srivastava, H.S. (1997): Response of higher plants to lead contaminated environment. *Chemosphere* 34(11): 2467-2493.
10. Sharma, P., Dubey, R.S. (2005): Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17(1): 35-52.
11. Vassilev, A., Lidon F., Ramalho, J.C., Do Ceu Matos, M., Da Graca, M. (2003): Effects of excess Cu on growth and photosynthesis of barley plants. Implication with a screening test for Cu tolerance. *Journal of Central European Agriculture* 4(3): 225-236.
12. Wang, S.-H., Yang, Z.M., Yang, H., Lu, B., Li, S.Q., Lu, Y.P. (2004): Copper-induced stress and antioxidative responses in roots of *Brassica juncea* L. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 45: 203-212.
13. Wettstein, D. (1957): Chlorophyll-letale und submikroskopische Formwechsel der Plastiden. *Experimental Cell Research*, 12: 427-433.
14. Xiong, Z.T., Wang, H. (2005): Copper toxicity and bioaccumulation in Chinese cabbage (*Brassica pekinensis* Rupr.). *Environmental Toxicology*, 20(2): 188-194.
15. Xiong, Z.T., Zhao, F., Li, M.J. (2006): Lead toxicity in *Brassica pekinensis* Rupr.: Effect on nitrate assimilation and growth. *Environmental Toxicology*, 21(2): 147-153.
16. Yurekli, F. and Porgali, Z.B. (2006): The effects of excessive exposure to copper in bean plants. *Acta Biologica Cracoviensia - Series Botanica*, 48(2): 7-13.
17. Zaman, M.S., Zereen, F. (1998): Growth Responses of Radish Plants to Soil Cadmium and Lead Contamination. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 61: 44-50.

## **DRY MATTER ACCUMULATION AND PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS CONTENT IN RADISH (*Raphanus sativus* L.) AS INDICATORS OF COPPER AND LEAD TOXICITY**

### **SUMMARY**

*The involvement of heavy metals in plant metabolism leads to the alterations of specific metabolic pathways such as organic matter synthesis. The plantlets of three radish cultivars have been exposed to 0.5 mM Cu or Pb in nutrient solution for 48 h. The content of photosynthetic pigments was determined spectrophotometrically and expressed on leaf fresh and dry matter basis. The lower dry matter accumulation in leaves and hypocotyls of stressed plants was accompanied by the relative increment of pigments content in leaf dry matter. This research showed that the photosynthetic pigments content in short exposure conditions to mentioned heavy metals was inaccurate indicator of their toxicity in radish.*

*Key-words: carotenoids, chlorophylls, copper, heavy metals, lead, radish, stress*

(Primljeno 02. rujna 2008.; prihvaćeno 29. rujna 2008. - Received on 2 September 2008; accepted on 29 September 2008)