

»56. srečanje mladih raziskovalcev Slovenije 2022«

Vpliv koncentracije NaCl na maso, kalitev, vsebnost
fotosintetskih pigmentov in encimsko aktivnost pri
kalčkih zelenega mungo fižola (*Vigna radiata L.*) in
lucerne (*Medicago sativa L.*)

Raziskovalno področje: BIOLOGIJA

Raziskovalna naloga

Avtorica: Maša Drevenšek

Mentorica: Helena Bajec

Šola: II. gimnazija Maribor

MARIBOR, 2022

Kazalo vsebine

Povzetek	I
Zahvala	III
1 Uvod	1
2 Teoretično ozadje	2
2.1 Izbira rastlin	2
2.1.1 Zeleni mungo fižol (<i>Vigna radiata</i> L.)	2
2.1.2 Lucerna/alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.)	3
2.2 Fotosintetski pigmenti	4
2.2.1 Klorofili	5
2.2.1.1 Klorofil a	5
2.2.1.2 Klorofil b	6
2.2.2 Karotenoidi	7
2.3 Abiotski stres	8
2.3.1 Reaktivne kisikove zvrsti (ROS)	8
2.3.1.1 Obrambni mehanizmi	9
2.3.1.1.1 Katalaze in peroksidaze	9
2.3.1.1.2 Superoksid dismutaze (SOD)	11
2.3.1.1.3 Karotenoidi	11
2.3.2 Slanost kot stresor	11
2.3.2.1 <i>Vigna radiata</i>	12
2.3.2.2 <i>Sativa medicago</i>	12
2.3.3 Gvajakol peroksidaza	12
3 Metoda dela	13
3.1 Gojenje kalčkov	13
3.1.1 Seznam materiala	13
3.1.2 Postopek gojenja	13
3.1.2.1 Priprava raztopin	14

3.1.2.1.1	Seznam materiala	15
3.1.2.1.2	Postopek.....	15
3.2	Analiza pridelka	15
3.2.1	Določanje uspešnosti kalitve	15
3.2.1.1	Seznam materiala	16
3.2.1.2	Eksperiment.....	16
3.2.2	Sveža masa	16
3.2.3	Merjenje rastlinskih pigmentov	16
3.2.3.1	Seznam materiala	16
3.2.3.2	Postopek.....	17
3.2.4	Določanje antioksidativne aktivnosti z gvajakol peroksidazo	18
3.2.4.1	Seznam materiala	18
3.2.4.2	Postopek.....	18
4	Rezultati.....	21
4.1	Sveža masa pridelka	21
4.1.1	<i>V. radiata</i>	21
4.1.2	<i>M. sativa</i>	21
4.2	Uspešnost kalitve	22
4.2.1	<i>V. radiata</i>	22
4.2.2	<i>M. sativa</i>	22
4.3	Vsebnost rastlinskih pigmentov	23
4.3.1	<i>V. radiata</i>	23
4.3.2	<i>M. sativa</i>	24
4.4	Encimska aktivnost gvajakol peroksidaze.....	24
4.4.1	<i>V. radiata</i>	25
4.4.2	<i>M. sativa</i>	25
5	Diskusija.....	26
5.1	Hipoteza 1.....	26

5.2	Hipoteza 2.....	26
5.3	Hipoteza 3.....	27
5.4	Hipoteza 4.....	27
6	Družbena odgovornost.....	29
7	Zaključek.....	30
8	Priloge.....	31
8.1	Priloga I: Preglednice kalitvenega poskusa	31
8.2	Priloga II: Preglednice absorpcij etanolnih ekstraktov pri 470 nm, 646,8 nm in 663,2 nm ..	32
8.3	Priloga III: Grafikoni sprememb absorpcije puferskih ekstraktov v časovnih intervalih po 5 sekund za obdobje 1 minute	33
8.4	Priloga 4: Grafikoni, ki ponazarjajo spremembo absorpcije za različne koncentracije NaCl v eni minuti	36
9	Bibliografija.....	37
	Tabela 1: ROS glede na število dodanih elektronov.....	9
	Tabela 2: Vloga peroksidaz.....	10
	Tabela 3: Masa NaCl glede na določeno koncentracijo pri volumnu raztopine 250 mL.....	15
	Tabela 4: Redčenje rastlinskih ekstraktov lucerne.....	20
	Tabela 5: Redčenje rastlinskih ekstraktov zelenega mungo fižola.....	20
	Tabela 6: Kalitev lucerne 1. dan	31
	Tabela 7: Kalitev lucerne 2. dan	31
	Tabela 8: Kalitev mungo fižola, enaka za 1. in 2. dan.....	31
	Tabela 9: Absorpcija etanolnih ekstraktov lucerne.....	32
	Tabela 10: Absorpcija etanolnih ekstraktov mungo fižola	32
	Slika 1: <i>V. radiata</i> : semena v stroku (Feedipedia, 2020)	3
	Slika 2: Cvetoča <i>M. sativa</i> (Pevac, 2019)	4
	Slika 3: Absorpcijski spekter najpogostejših fotosintetskih pigmentov (BioNinja, 2020)	4
	Slika 4: Razlika v kemijski zgradbi med klorofiloma a in b (Toppr, 2020).....	5
	Slika 5: Skeletne formule nekaterih karotenoidov (Ellison, 2015)	7

Slika 6: Lewisove formule nekaterih ROS (Singh, Bal, & Satpute, 2017).....	9
Slika 7: Kozarci s semeni na doma narejenem stojalu (lastni vir)	14
Slika 8: Natehtani vzorci za pripravo etanolnih ekstraktov (lastni vir).....	17
Slika 9: Pred svetlobo zaščiten reagenčni pufer (lastni vir).....	18
Slika 10: Razlika v barvi med puferskima ekstraktoma lucerne (levo) in zelenega mungo fižola (desno)(lasten vir)	19
Slika 11: Delovna površina, pripravljena na merjenje spremembe absorpcije s spektrofotometrom za določanje encimske aktivnosti gvajakol peroksidaze (lastni vir).....	19
Graf 1: Sveža masa <i>V. radiata</i>	21
Graf 2: Sveža masa pridelka <i>M. sativa</i>	22
Graf 3: Uspešnost kalitve <i>M. sativa</i> po 1. dnevu.....	22
Graf 4: Uspešnost kalitve <i>M. sativa</i> po 2. dnevu.....	23
Graf 5: Vsebnost fotosintetskih pigmentov za <i>V. radiata</i>	23
Graf 6: Vsebnost fotosintetskih pigmentov za <i>M. sativa</i>	24
Graf 7: Encimska aktivnost gvajakol peroksidaze pri <i>V. radiata</i>	25
Graf 8: Encimska aktivnost gvajakol peroksidaze pri <i>M. sativa</i>	25
Graf 9: Sprememba absorpcije pri različnih koncentracija NaCl v eni minuti za lucerno	36
Graf 10: Sprememba absorpcije pri različnih koncentracijah NaCl v eni minuti za mungo fižol	36

Povzetek

Zaslanjevanje prsti je globalni problem, katerega posledica je lahko zmanjšana količina pridelka. Slanost je abiotični stresor, ki povzroči kopičenje ionov, ROS in osmotski stres. V tej raziskovalni nalogi smo preučevali vpliv različnih koncentracij NaCl na maso, kalitev, vsebnost pigmentov in aktivnost gvajakol peroksidaze pri zelenem mungo fižolu (*Vigna radiata*) in lucerni (*Medicago sativa*). Z naraščanjem koncentracije soli je opazen trend zmanjševanja mase pri obeh vrstah. Slanost negativno vpliva na kalitev lucerne, na kalitev mungo fižola ne vpliva v kolikor je bil ta predhodno namočen v vodovodni vodi. Vsebnost pigmentov ne pada, viša se vsebnost karotenov. To pripišemo prilagoditvi na stres. Pri mungo fižolu zaradi odstopanj ne moremo zanesljivo govoriti o višanju aktivnosti gvajakol peroksidaze z izjemo najvišje koncentracije soli. Pri lucerni je naraščajoči trend statistično verjetnejši, opazimo padec aktivnosti pri 150 mM NaCl, verjetno zaradi denaturacije beljakovin.

Zahvala

Rada bi se iskreno zahvalila mentorici za vodenje in pomoč pri pisanju raziskovalne naloge. Zahvala gre tudi profesoricama biologije, ki sta mi bili v ogromno pomoč pri eksperimentalnem delu naloge.

Iskrena hvala mojim najbližjim za podporo in strpnost.

1 Uvod

Povečana slanost prsti je globalni problem v kmetijstvu, saj je 20% vseh kmetijskih površin s pridelki podvrženih solnemu stresu. (Taiz, Zeiger, Moller, & Murphy, 2015) Zaslanjevanje degradira prst ter lahko sčasoma ogrozi stabilnost ekosistema, v kmetijstvu pa zmanjša rodovitnost. Posledično zaslanjevanje prsti predstavlja grožnjo preskrbi ljudi s hrano, zlasti v suhih in plosuhih podnebnih pasovih. (FAO, 2021)

Ljudje smo v veliki meri odgovorni za problem kopičenja soli v prsti zaradi pretiranega namakanja. Kombinacija pretiranega namakanja in slabe vodoprepustnosti prsti ter segrevajočega se ozračja povzroča zaslanjevanje prsti. Ko voda izhlapi za seboj pusti ione, ki so bili v njej raztopljeni, da se nalagajo v prsti. (Vidal, 2019)

Pretirano slana prst pridelku onemogoča optimalno črpanje vode in hranil iz tal, povzroča stres za rastlino ter se kaže v kopičenju ionov in prostih radikalov v telesu rastline. Ioni so za rastlino lahko v preveliki količini toksični in povzročijo njen propad. Povišano nastajanje prostih radikalov rastlino uničuje na celični ravni in vodi v programirano celično smrt. (FAO, 2021) (Taiz, Zeiger, Moller, & Murphy, 2015)

Ta raziskovalna naloga se ukvarja z vplivom slanega okolja (raztopin NaCl različnih koncentracij) na rast kalčkov zelenega mungo fižola (*Vigna radiata*) in lucerne (*Medicago sativa*). Namen raziskovalne naloge je določiti uspešnost kalitve, vsebnost fotosintetskih pigmentov ter izračunati encimsko aktivnost »stresnega encima« - gvajakol peroksidaze v obeh vrstah rastlin. Koncentracije NaCl, uporabljene v eksperimentih, so med 0 mM in 150 mM, razlike med njimi so 25 milimolarne. Cilj je opozoriti na negativni vpliv salinizacije (zaslanjevanja) prsti na pridelek.

Po pregledu literature sem si zastavila naslednje hipoteze:

1. Z naraščanjem slanosti okolja bodo semena *V. radiata* in *M. sativa* uspešno kalila v manjšem odstotku.
2. Z naraščanjem slanosti okolja bodo rastline *V. radiata* in *M. sativa* vsebovale manj klorofila in karotena.
3. Z naraščanjem slanosti okolja bo sveža masa obeh vrst rastlin padala.
4. Z naraščanjem slanosti okolja bo izračunana encimska aktivnost gvajakol peroksidaze višja.

2 Teoretično ozadje

2.1 Izbira rastlin

Za kalitev smo izbrali semena zelenega mungo fižola (*Vigna radiata* L.) in lucerne, znane tudi pod imenom alfalfa (*Medicago sativa* L.). Omenjene rastline smo izbrali zaradi njihove dostopnosti na trgu ter zaradi nezahtevnosti za gojenje kalčkov in hitre rasti.

2.1.1 Zeleni mungo fižol (*Vigna radiata* L.)

Kraljestvo: Plantae

Deblo: *Magnoliophyta*

Razred: *Magnoliopsida*

Podrazred: *Rosidae*

Red: *Fabales*

Družina: *Fabaceae*

Rod: *Vigna*

Podrod: *Ceratotropis*

Vrsta: *Radiata*

(Podvrsta: *Radiata*)

Vigna radiata izvira iz Azije, najverjetneje iz mongolske stepe. Zlasti v Indiji, Severovzhodni in Vzhodni Aziji predstavlja kot stročnica pomemben dodatek k prehrani zaradi visoke vsebnosti beljakovin. Na Zahodu se uporablja predvsem v obliki kalčkov. (Lambrides & Godwin, 2007)

Zeleni mungo fižol spada med metuljnice (*Fabaceae*). Je enoletna rastlina vzpenjajoče se rasti, zelene barve. Stebla so precej razvejana, pri odraslih rastlinah rumenkasta ali rjava, lahko se končujejo z vitico. Stebla podvrste *radiata* so pokončna, rastlina doseže višino do 125 cm. Cveti so rumene barve, stroki pa rjavi z zelenimi semeni. Razvile so se tri podvrste; *Vigna radiata* subsp. *radiata* se uporablja v kmetijstvu, obstajata pa še dve divji podvrsti *subloata* in *glabra*. *V. radiata* uspeva v tropskih in subtropskih pokrajinah, zmrzali ne prenaša. (MDidea, 2014) (Lambrides & Godwin, 2007)

Največji abiotski stres za *V. radiata* predstavljajo suša, zadrževanje vode, slanost in vročina. (Nair, in drugi, 2019)



Slika 1: *V. radiata*: semena v stroku (Feedipedia, 2020)

2.1.2 Lucerna/alfalfa (*Medicago sativa* L.)

Kraljestvo: *Plantae*

Deblo: *Magnoliophyta*

Razred: *Magnoliopsida*

Podrazred: *Rosidae*

Red: *Fabales*

Družina: *Fabaceae / Leguminosae*

Rod: *Medicago* L.

Vrsta: *Medicago sativa* L.

(USDA, 2022)

Alfalfa je trajnica in spada med stročnice. Zelenkasta stebela so pokončna, visoka med 60 in 90 cm ter rastejo iz rozete, ki je pri starejših rastlinah pri dnu olesenela. Listi so trikrpi in zeleni, izraščajo iz stebela. Cvetovi so lahko različnih barv, pogosto so vijolični in rastejo v socvetjih. V tankih strokih so drobna rjava semena v obliki ledvičk.

Lucerna je v prehrani ljudi večinoma prisotna v obliki kalčkov in je cenjena zaradi visoke vsebnosti vitaminov. Še bolj znana pa je v krmi živine zaradi svoje hranilnosti. Uporablja se še rastoča kot obogatitev pašnikov, pogosto pa je predelana tudi v pelete in nudena živini kot prehranski dodatek.

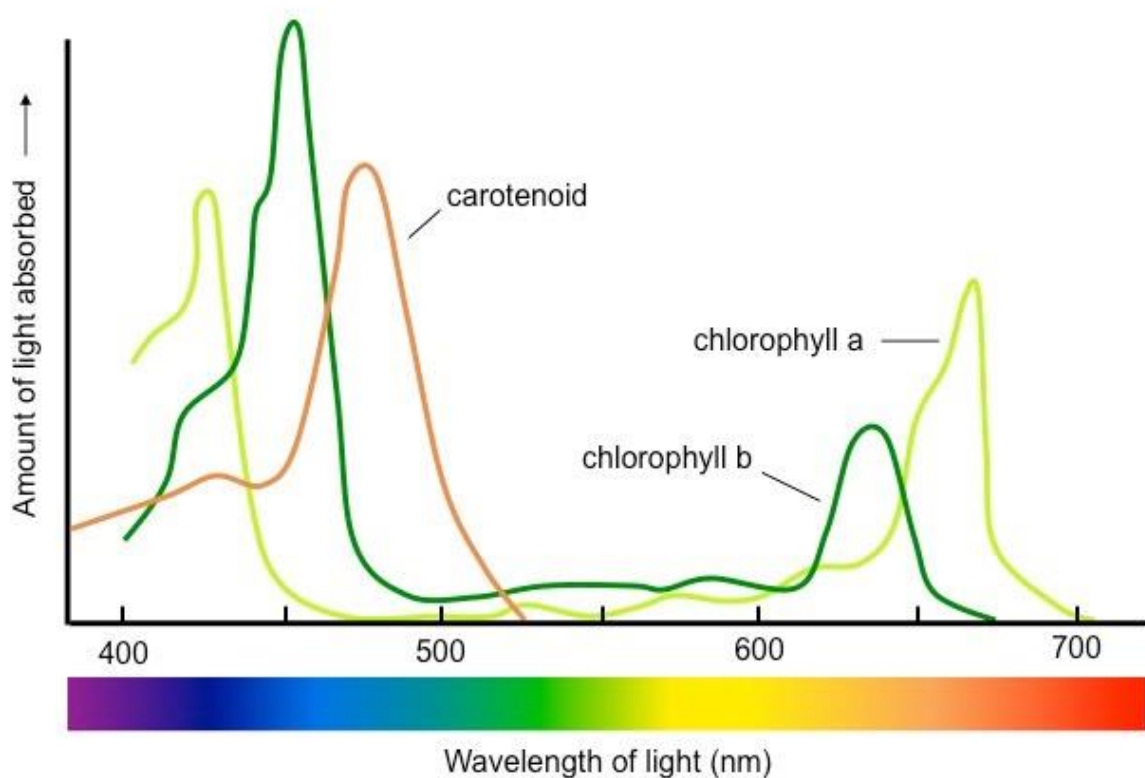
(USDA, 2022)



Slika 2: Cvetoča *M. sativa* (Pevec, 2019)

2.2 Fotosintetski pigmenti

Fotosintetski pigmenti v kloroplastih fotosintetskih organizmov imajo nalogo absorpiranja svetlobe, prenašanja te do reakcijskih centrov, kasneje pa se po verigi elektronskih prenašalcev svetlobna energija pretvarja v kemično. (Taiz, Zeiger, Moller, & Murphy, 2015)



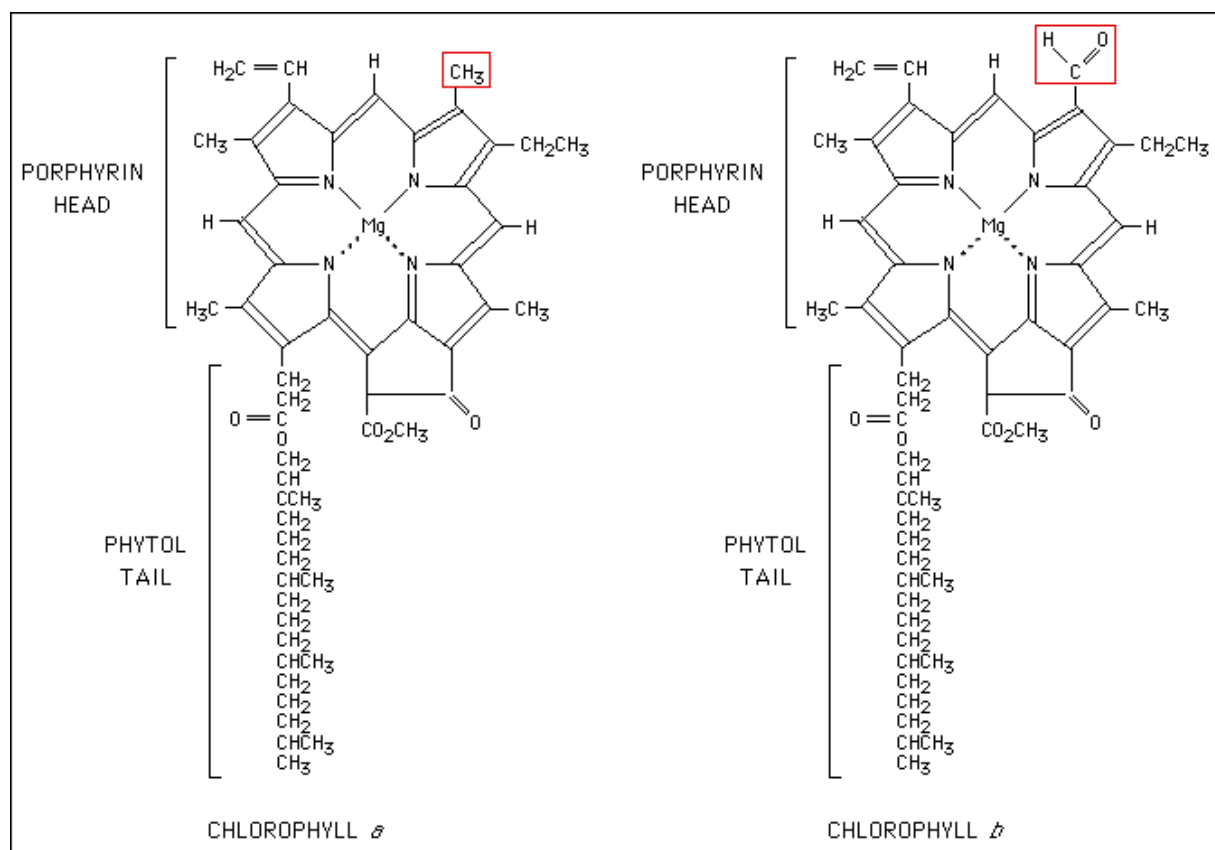
Slika 3: Absorpcijski spekter najpogostejših fotosintetskih pigmentov (BioNinja, 2020)

2.2.1 Klorofili

Ime izvira iz grških besed *khloros* (zeleno) in *phyllon* (list). Gre za molekule, ki v procesu fotosinteze absorbirajo sončno svetlobo in s sprejemanjem in oddajanjem fotonov med prehajanjem iz mirujočega v ekscitirano stanje pretvarjajo svetlobno energijo v kemijsko. Ta energija se še v istem procesu porabi za izgradnjo organskih molekul (sladkorjev).

Klorofili so eni izmed najpomembnejših rastlinskih pigmentov, ki imajo pri fotosintezi ključno vlogo. Molekula klorofila je sestavljena iz hidrofilne glave v obliki mreže, ki ima na sredini atom magnezija (podobna struktura hemoglobinu) ter iz hidrofobnega repa, ki je pravzaprav dolga ogljikovodikova veriga.

V rastlinah najdemo predvsem klorofila a in b, med tem ko imajo klorofile c, d in f predvsem cianobakterije in nekateri protisti (Taiz, Zeiger, Moller, & Murphy, 2015)



Slika 4: Razlika v kemijski zgradbi med klorofiloma a in b (Toppr, 2020)

2.2.1.1 Klorofil a

Klorofil a je primarni fotosintetski pigment in je nujno prisoten v vseh fotosintetskih organizmih. Absorbira svetlobo v spektrih med oranžno in rdečo ter med vijolično in modro svetlobo. Maksimalna absorpcija klorofila a je pri 670 nm. (Taiz, Zeiger, Moller, & Murphy, 2015)

Klorofil a prenese energijo reakcijskemu centru in donira dva ekscitirana elektrona verigi elektronskih prenašalcev. Je torej primarni darovalec elektronov v procesu fotosinteze. (Martin, 2019)

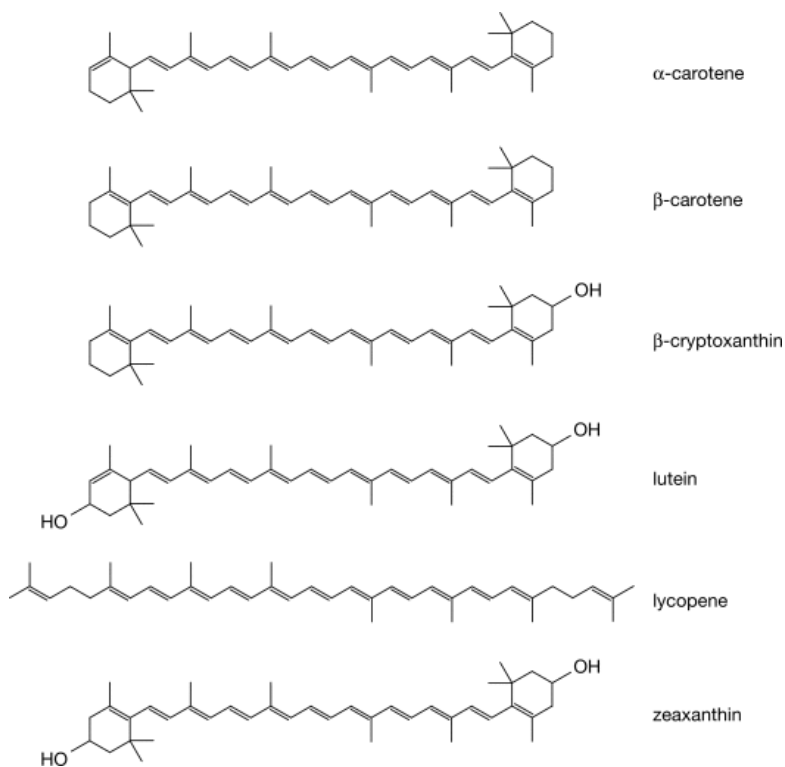
2.2.1.2 Klorofil b

Osnovna naloga klorofila b je širjenje absorpcijskega spektra klorofila a. Klorofil b najbolje absorbira modro svetlobo. Maksimalna absorpcija klorofila b je pri 650 nm. (Taiz, Zeiger, Moller, & Murphy, 2015) Je spremljevalni pigment in ni nujno potreben za potek fotosinteze saj fotosintezo naredi bolj učinkovito.

Višja vsebnost klorofila b v kloroplastih je pri višjih rastlinah pogosta prilagoditev na senčno lego rastline. Klorofil b prenese dodatno absorbirano energijo do klorofila a. (Martin, 2019)

2.2.2 Karotenoidi

Karotenoidi pripadajo skupini antioksidantov, ki lahko rastlino varujejo pred mnogimi vrstami kisikovih radikalov zaradi svoje kemijske zgradbe (veliko dvojnih vezi). Najdemo jih tako v rastlinah kot tudi v mikroorganizmih. V rastlinah karotenoidi absorbirajo med 400 in 550 nm valovne dolžine vidne svetlobe in jo podajo klorofilom. Karotenoidi sodelujejo tudi kot posredniki, ki do signalnih molekul prenašajo informacije o potrebnem odzivu na stres. Znanstveniki so poročali o prednosti, ki jo povečano število karotenoidov predstavlja za rastline pod stresom zaradi slanosti okolja. (Sharma, Jha, Dubey, & Pessaraki, 2012) Predstavljajo 40 organskih molekul, ki so odgovorni za rumeno, oranžno in rdečo pigmentacijo v naravi. Ljudje moramo karotene zaužiti s hrano, saj se npr. β -karoten v telesu pretvori v vitamin A, ki je nujno potreben za delovanje vida, imunskega sistema, celične komunikacije in diferenciacije. (Ellison, 2015)



Slika 5: Skeletne formule nekaterih karotenoidov (Ellison, 2015)

2.3 Abiotski stres

Abiotski stres ima negativen vpliv na rast rastlin in predstavlja pomemben vzrok za velike izgube v kmetijstvu. Tekom desetletij se problem abiotskega stresa in z njim povezane izgube pridelka večja.

Abiotski stresorji so povezani z UV ali ionsko radiacijo, pomanjkanjem ali presežkom vode, ekstremnimi vremenskimi razmerami (zmrzal, mraz, vročina), sestavo prsti (izčrpanost prsti, presežek težkih kovin, akumulacija pesticidov, zaslanjevanje, idr.) ter mehanskimi faktorji kot sta veter in kompaktnost prsti.

Vsi omenjeni dejavniki neposredno vplivajo na rast rastlin, saj jim odvzemajo vire, ki jih rastline za rast nujno potrebujejo. Te vire so ogljik, voda, svetloba in minerali v prsti.

Rastline so zmožne izboljšati svojo sposobnost prilagajanja na okoljske stresorje. To sposobnost imenujemo aklimatizacija, znanstveniki pa poročajo o tovrstnih prilagoditvah na mraz, sušo, slanost in druge faktorje okolja. (Umezawa, Shimizu, Kato, & Ueda, 2000)

Spopadanjem z abiotskim stresom se začne na celični ravni, vpliva pa na rastlino kot celoto. Spremembe pod vplivom abiotskega stresa se kažejo na molekularni, biokemični, fiziološki in morfološki ravni. Zaradi podnebnih sprememb postaja okolje vedno bolj neugodno za rast rastlin, ki so ključnega pomena tudi za prehrano ljudi. (Nair, in drugi, 2019)

2.3.1 Reaktivne kisikove zvrsti (ROS)

Atmosferski kisik je že več kot stoletje znan kot vir življenja in sprememb na Zemlji, šele v zadnjem času pa so znanstveniki odkrili vzporedno in nič manj pomembno vlogo kisika v živih organizmih – kot destruktivno (toksično) snov, ki torej življenje tako poganja kot tudi žene k neizogibnemu propadu. (Larson, 1988)

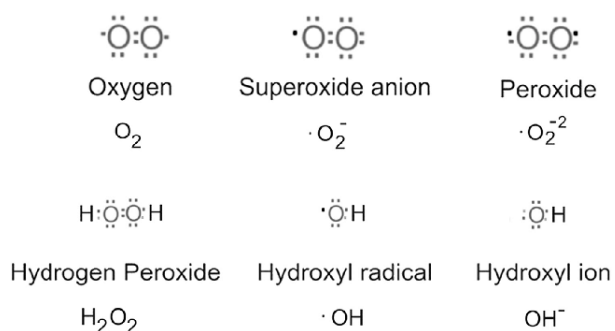
Kratica ROS izhaja iz angleškega izraza »Reactive Oxygen Species« in je prevedena v reaktivne kisikove zvrsti. ROS so delno reducirane oblike atmosferskega kisika (O_2). Nastanejo z ekscitacijo O_2 do nastanka samostojnega atoma kisika. Absorbirana energija pretvori kisikovo stabilno stanje v ekscitirano stanje, presežek energije pa se izrazi v drugačni in načeloma manj stabilni elektronski konfiguraciji. Pri padcu iz ekscitiranega stanja nazaj v normalno stanje opazimo fluorescenco zaradi emisije fotona. Ko se kisik spet vrne v normalno stanje lažje reagira z bližnjimi molekulami.

Druga možnost reduciranja kisika je z dodajanjem elektronov molekuli O_2 . Tabela 1 prikazuje nastale ROS glede na število dodanih elektronov.

Tabela 1: ROS glede na število dodanih elektronov

Sprejeti elektroni	Kemijska formula	Ime
1	O_2^-	Superoksidni radikal
2	H_2O_2	Vodikov peroksid
3	HO^-	Hidroksilni radikal

Za razliko od atmosferskega kisika (O_2), so ROS sposobne neomejene oksidacije različnih celičnih komponent, kar lahko vodi v oksidativno uničenje celice. (Mittler, 2002)



Slika 6: Lewisove formule nekaterih ROS (Singh, Bal, & Satpute, 2017)

Nastajanje ROS je neizogibno, saj so ROS stranski produkti metabolizma, npr. celičnega dihanja in fotosinteze. Nevarno je povečanje nastajanja ROS zaradi metabolnih poti, ki delujejo pospešeno zaradi abiotskega stresa ter nastajajo pri obrambi pred patogeni. ROS nastajajo tudi pri procesu programirane celične smrti.

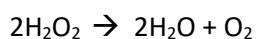
Povečana proizvodnja ROS v stresnih situacijah je po eni strani lahko sama po sebi grožnja organizmu, po drugi strani pa prav povišane ravni ROS služijo kot signal za aktivacijo odgovora na stres in obrambe organizma. Nizke ravni ROS so v celici normalne, čezmerna akumulacija ROS v celici pa lahko povzroči celično smrt zaradi peroksidacije lipidov v membranah, oksidacije beljakovin, inhibicije encimov ter poškodbe RNA in DNA. (Mittler, 2002)

2.3.1.1 Obrambni mehanizmi

Z evolucijo so rastline razvile kompleksen sistem antioksidantov, ki popravljajo in omejujejo škodo, ki jo lahko prosti radikali (ROS) povzročijo. V celicah imajo encime, ki ščitijo celico pred citotoksičnimi učinki prostih radikalov. (Larson, 1988) (Umezawa, Shimizu, Kato, & Ueda, 2000)

2.3.1.1.1 Katalaze in peroksidaze

Katalaze so metalo encimi in eni izmed najučinkovitejših beljakovinskih katalizatorjev. Pospešujejo redoks reakcijo:



Vodikov peroksid sam po sebi večinoma ne reagira z biološko gledano najpomembnejšimi molekulami, predstavlja pa vmesni člen, ki lahko vodi k nastanku HO, ki je za celico veliko nevarnejši.

Katalaze so precej specifične in se odzivajo le na vodikov peroksid uporabljajo pa omejeno število organskih hidro peroksidov (MeOOH), ki opravljajo reakcije oksidacije na akceptorskih molekulah, hkrati pa reducirajo peroksidni substrat. (Larson, 1988) Katalaze in peroksidaze delujejo po enakem principu. Peroksidaze imajo v celici še druge pomembne naloge (Tabela 2). (Pandey, Awasthi, Singh, Tiwari, & Dwivedi, 2017) Med encimi v vlogi antioksidantov so peroksidaze esencialni element sistema za razstrupljanje celice, ki je reguliran z zaznano koncentracijo H₂O₂ znotraj celice. Peroksidaze pripadajo veliki skupini encimov, najdenih v glivah, vretenčarjih in višjih rastlinah. (Tayefi-Nasrabadi, Dehghan, Daeihassani, Movafegi, & Samadi, 2011)

Tabela 2: Vloga peroksidaz

Naloga	Opis
Metabolizem ROS	Prisotnost ROS v celicah je regulirana s strani peroksidaz in katalaz, v prvi vrsti z reduciranjem vodikovega peroksida na vodo in atmosferski kisik.
Kaljenje semen	Koncentracija peroksidaz v semenu se med kaljenjem močno poveča, saj peroksidaze odstranjujejo potencialno toksične snovi s površine semen in bližnje okolice.
Katabolizem avksina (regulacija podaljševanja korenin in poganjkov)	Avksini so rastlinski hormoni, ki lahko pospešujejo ali zavirajo rast. Peroksidaze avksine po potrebi razgrajujejo.
Obrambni odziv	Peroksidaze sodelujejo pri ustvarjanju fizične prepreke pred patogeni (lignin, pluta) in proizvodnji protimikrobnih snovi v rastlini.
Celjenje ran	Pri poškodbi tkiva se poveča aktivnost peroksidaz kot zaščite pred patogeni in izgubo vode (lignin, pluta, protimikrobne snovi).
Nastajanje lignina in plute (izgradnja celične stene)	Lignin (za trdnost, oporo in obrambo celične stene) nastane s polimerizacijo monolignolov in vključuje oksidativni mehanizem, ki ga

	omogočajo in katalizirajo peroksidaze. Pluta ščiti rastlino pred vdorom patogenov in izgubo vode ob poškodbah. Predstavlja sekundarni sloj celične stene, nastane pa s polimerizacijo hidroksicinamične kisline in njenih derivatov. Polimerizacijo omogočajo peroksidaze.
Rast in zorenje plodu	Peroksidaze sodelujejo pri sintezi etilena, ki je esencialni rastlinski hormon, odgovoren za iniciacijo zorenja sadeža.

2.3.1.1.2 Superoksid dismutaze (SOD)

Superoksidni radikal O_2^- nastane z dodajanjem enega elektrona molekuli kisika. Superoksid dismutaze pretvarjajo superoksidne radikale v vodikov peroksid. Z reduciranjem slednjega se naprej ukvarjajo katalaze in peroksidaze. (Larson, 1988)

2.3.1.1.3 Karotenoidi

Karotenoidi so najbolj znani po svoji vlogi v procesu fotosinteze – absorpiranje svetlobe, ki je klorofil ne more – vendar pa ima zlasti β -karoten zaščitno vlogo pri oksidativnih poškodbah. V začetnih fazah fotosinteze lahko pri preskakovanju klorofila v ekscitiranem stanju med fotosistemi pride do pomembnih izgub, saj se ekscitiran klorofil preusmeri drugam in je lahko potencialno nevaren za celico, saj hitro formira superoksidne radikale. Zaradi nenasičene maščobne kisline linolenat, ki gradi membrano kloroplasta, je slednji podvržen peroksidaciji membrane.

β -karoten zelo učinkovito lovi in onemogoča superoksidne radikale in je tudi pri nizkih koncentracijah v celici zelo učinkovita zaščita membrane.

Prosti radikali z β -karotenom hitro reagirajo, zato je lahko β -karoten dober potencialni antioksidant. (Larson, 1988)

2.3.2 Slanost kot stresor

Slanost kot stresor pri rastlinah povzroči večje nastajanje reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS), ki so posebej zaznavne v mitohondrijih in kloroplastih. (Mittler, 2002) Te povzročijo peroksidacijo lipidov in s tem poškodbe membrane, povzročajo pa tudi degradacijo beljakovin kar lahko vodi v deaktivacijo encimov.

Neposredna učinka slanosti na rastlino sta predvsem dva; nespecifični osmotski stres, vodi do pomanjkanja vode v celici, ter bolj specifični ionski stres. Slednji se izraža v nalaganju toksičnih ionov oz. toksične količine sicer koristnih ionov, ki lahko v presežku motijo ostale metabolne poti v celicah. Visoke koncentracije soli v so lahko citotoksične tudi zaradi povzročitve denaturacije beljakovin in destabilizacije membrane zaradi dehidracije. (Taiz, Zeiger, Moller, & Murphy, 2015)

2.3.2.1 *Vigna radiata*

Slanost pri zelenem mungo fižolu povzroča zmanjšano vsebnost klorofila a in b ter karotenoidov, klorozo¹ in nekrozo². V slanem okolju semena dalj časa kalijo, koreninice in poganjki so krajši, manjša je tudi sveža masa rastlin. Markerji, ki nakazujejo na povečan stres v rastlini so npr. prolin, glicin in pinitol. Njihova koncentracija v rastlini se viša z višanjem stresa kot način za prilagajanje osmotskega gradienta. (Saha, Chatterjee, & Biswas, 2010)

2.3.2.2 *Sativa medicago*

Lucerna naj bi bila zmerno tolerantna glede solnega stresa. Na sol je lucerna občutljiva v času kalitve in zgodnje rasti, v kasnejših obdobjih pa slanost boljše prenaša. Slanost okolja negativno vpliva na dolžino koreninic in poganjkov ter povzroča vidne poškodbe listov. (Noble, Halloram, & West, 1984) Glede na raziskavo argentinskih znanstvenikov iz leta 2014, naj bi slanost okolja upočasnila kalitev semen in negativno vplivala na svežo maso pridelka. (Castroluna, Ruiz, Quiroga, & Pedranzani, 2014)

2.3.3 Gvajakol peroksidaza

Gvajakol peroksidaza spada v pomembno skupino peroksidaz, ki oksidirajo aromatske darovalce elektronov kot je npr. gvajakol, pogosto uporabljen reducirajoči se substrat. V rastlinah je prisotna v citoplazmi, vakuolah ter celični steni, ter je vključena v mnogo procesov povezanih z rastjo in razvojem rastline. (Tayefi-Nasrabadi, Dehghan, Daeihassani, Movafegi, & Samadi, 2011) Med njih sodijo predvsem tvorba lignina, degradacija avksinov, biosinteza etilena, celjenje poškodb in obramba pred biotskim in abiotskim stresom. Gvajakol peroksidaza je poznana tudi pod imenom »stresni encim« zaradi svoje sposobnosti obrambe celice pred ROS. (Sharma, Jha, Dubey, & Pessarakli, 2012)

¹ kloroza – v botaniki je z njo opisano stanje, ko običajno zeleni deli rastlin porumenijo zaradi pomanjkanja klorofila. (The Morton Arboretum, 2022)

² nekroza – nepovratno stanje, odmiranje tkiv. (Kumar, Abbas, & Aster, 2019)

3 Metoda dela

3.1 Gojenje kalčkov

3.1.1 Seznam materiala

- Semena lucerne (*Medicago sativa* L.), ekološko pridelano za vzgojo kalčkov, Znamke Semenarna Ljubljana, Linija Valentin, poreklo: Italija
- Semena zelenega mungo fižola (*Vigna radiata* L.), ekološko pridelano za vzgojo kalčkov, znamke Semenarna Ljubljana, Linija Valentin, poreklo: Italija
- 14 steklenih kozarcev za vlaganje (volumen: 720 ml, premer: 82 mm, oblike valja)
- sterilna vpojna gaza (razrezana na kvadrate dimenzij $(15 \pm 0,5) \times (15 \pm 0,5)$ cm, bombaž, Tosama)
- Leseno stojalo za kozarce pod kotom $20 \pm 2^\circ$ (domača izdelava)
- gumice
- 4 steklene merilne bučke s pokrovom ($V = 250 \pm 0,150$ ml; Isolab)
- plastični merilni valj ($100:1 \pm 1$ ml; Isolab)
- 4 plastične kapalke ($3:0,5 \pm 0,25$ ml)
- 2 stekleni čaši ($250 \pm 12,5$ ml; Ilmabor)
- Digitalna tehtnica
- Elektronski termometer ($\pm 0,1^\circ$; Checktemp 1; Mikro+polo)

3.1.2 Postopek gojenja

Skupna teža semen *Vigna radiata* L. je 140,76 g (*M. sativa*: 96.11 g). Semena smo enakomerno razdelili v 7 kozarcev, za *V. radiata* v vsak kozarec 20,10 g semen (*M. sativa*: 13,73 g). Semena smo namakali v vodi iz pipe za 12 ur, ves čas so bila pokrita z gazo. Vodo, v kateri so stala semena, smo odlili in odcedili ob pritrjeno gazo, kalčke sprali s svežo vodo in jo takoj spet odlili. Semena smo nato za 30 min namakali v ustrezni koncentraciji NaCl. Po 30 minutah smo raztopino NaCl odlili in semena ponovno sprali z navadno vodo. Kozarec s semeni smo postavili na leseno stojalo pod kotom 20° , tako da je preostala voda lahko odtekala skozi gazo. Stojalo s kozarci smo postavili stran od neposredne sončne svetlobe na stalno temperaturo $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Postopek smo ponovili 2 krat na dan, 6 dni zapored.



Slika 7: Kozarci s semeni na doma narejenem stojalu (lastni vir)

3.1.2.1 Priprava raztopin

Pripravili smo vodne raztopine NaCl. Izbrane koncentracije 0,0 mM, 25,0 mM, 50,0 mM, 75,0 mM, 100,0 mM, 125,0 mM in 150,0 mM.

3.1.2.1.1 Seznam materiala

- steklene merilne bučke s pokrovom ($V = 250 \pm 0,150$ ml; Isolab)
- plastični merilni valj ($100:1 \pm 1$ ml; Isolab)
- plastične kapalke ($3:0,5 \pm 0,25$ ml)
- steklene čaše ($250 \pm 12,5$ ml; Ilmabor)
- Digitalna tehtnica

3.1.2.1.2 Postopek

Za vsako namakanje v solni raztopini smo pripravili sveže raztopine. Pripravljali smo jih v merilnih bučkah z volumnom 250 ml. Z digitalno tehtnico smo natehtali ustrezno maso NaCl na papirju (Tabela 1). Sol smo prenesli v bučko in dolili vodovodno vodo približno do polovice. Bučko smo zaprli in mešali s stresanjem dokler se vsa sol ni raztopila. Nato smo vodo počasi dolivali do oznake 250 mL s spiranjem.

Tabela 3: Masa NaCl glede na določeno koncentracijo pri volumnu raztopine 250 mL

c [mM]	m(NaCl) [g]
0	0,00
25	0,37
50	0,73
75	1,10
100	1,46
125	1,83
150	2,19

3.2 Analiza pridelka

Pridelek smo analizirali s tremi eksperimenti, pri katerih smo kalčke vedno jemali iz istih kozarcev. Uporabljeni poskusi so določanje uspešnosti kalitve, merjenje rastlinskih pigmentov s spektrofotometrom ter določanje antioksidativne aktivnosti z gvajakol peroksidazo.

Sedmi dan od začetka gojenja kalčkov v kozarcih smo svežo maso kalčkov vsakega kozarca posebej tehtali z digitalno tehtnico.

3.2.1 Določanje uspešnosti kalitve

Za določanje uspešnosti kalitve smo uporabili preprosti kalitveni poskus. Kalitev smo spremljali dva dneva.

3.2.1.1 Seznam materiala

- 7x3x30 semen zelenega mungo fižola (*Vigna radiata L.*)
- 7x3x30 semen lucerne (*Medicago sativa L.*)
- filtrirni papir
- 21 plastičnih petrijev s premerom 60 mm
- 21 plastičnih petrijev s premerom 100 mm
- kovinska sterilizirana pinceta
- škarje

3.2.1.2 Eksperiment

Filtrirni papir smo razrezali tako, da so se krogi popolnoma prilegali na dno vsake izmed petrijev (1 izrezan krog filter papirja na 1 petrijevko). Pomočili smo ga v ustrezno vnaprej pripravljeno raztopino NaCl ter ga namestili na dno petrijevke, ki smo jo ustrezno označili. Za vsako vrsto rastline smo pripravili 21 petrijev (7 koncentracij NaCl in 3 ponovitve za vsako izmed teh). S pinceto smo v vsako petrijevko našteali točno 30 semen, pri čemer smo v večje petrijevke dali semena mungo fižola, med tem ko smo v manjše našteali semena lucerne. Petrijevke smo pokrili in postavili kaliti v temo. Naslednja dva dneva smo ob istem času prešteli koliko semen je začelo kliti v vsaki izmed petrijev. Število smo preračunali tudi v odstotke.

3.2.2 Sveža masa

Z digitalno tehtnico smo izmerili svežo maso pridelka. Vse kozarce kalčkov smo stekali znotraj ene ure.

3.2.3 Merjenje rastlinskih pigmentov

Rastlinske pigmente smo ekstrahirali in njihove etanolne redčine analizirali s spektrofotometrom.

3.2.3.1 Seznam materiala

- PVC makro kivete za enkratno uporabo (Ratiolab),
- keramične terilnice in pestila
- steklene epruvete z gumijastimi pokrovi
- avtomatska pipeta s pripadajočim nastavkom (LLG Micropipette; 1 - 10 mL)
- centrifuga (LC – 321; Tehnica Železniki)
- plastične centrifugirke s pokrovi
- spektrofotometer SpectroVis Plus (Vernier)
- kovinska stojala za epruvete
- avtomatska pipeta s pripadajočim nastavkom (LLG Micropipette; 100 - 1000 μ L)

- digitalna tehtnica (Kern, natančnost 0,01 g)
- vorteks
- prenosni računalnik s programom Logger Pro
- etanol (95,0%)

3.2.3.2 Postopek

Terilnice in pestila smo dali v zmrzovalnik saj so karotenoidi izredno nestabilni in začnejo takoj razpadati. To razpadanje lahko upočasnimo z omejevanjem dostopa svetlobe in delom pri nizki temperaturi.

Pripravili smo 14 ekstraktov (2 vrsti rastlin in 7 koncentracij soli pri vsaki vrsti), zato smo predhodno pripravili 14 epruвет z 10,0 mL etanola in 14 epruвет s 4,5 mL etanola. Vse epruветe smo zaprili s pokrovčkom in jih prav tako postavili v zmrzovalnik čez noč. V zmrzovalniku smo pustili tudi pripravljenih 14 centrifugirk.



Slika 8: Natehtani vzorci za pripravo etanolnih ekstraktov (lastni vir)

Naslednji dan smo natehtali 0,50 g rastlinskega materiala iz vsakega kozarca posebej na digitalni tehtnici. Prostor smo zatemnili in iz zmrzovalnika vzeli terilnice. Za vsak vzorec svežega rastlinskega smo uporabili svojo terilnico s pestilom. Rastlinski material smo čim hitreje zmečkali v terilnici, dolili 10 mL predhodno namerjenega mrzlega etanola in še nekaj sekund mečkali. Vse skupaj smo prelili v centrifugirko in jo dali v centrifugo za 15 minut s 6.000 obrati na minuto.

Z avtomatsko pipeto smo prenesli 0,5 mL supernatanta v epruветo s 4,5 mL mrzlega etanola. Epruветo smo zaprili in vsebino premešali z vorteksom. Z dobljeno raztopino smo napolnili makro kiveto in odčitali absorpcijo pri valovni dolžini 469,7 nm; 646,8 nm in 663,2 nm.

3.2.4 Določanje antioksidativne aktivnosti z gvajakol peroksidazo

Pripravili smo rastlinske ekstrakte s pufrom, jim dodali reagenčni pufer ter hitrost reakcije zmerili s spektrofotometrom. Spremljali smo naklon krivulje, ki predstavlja spremembo absorpcije pri 469,7 nm.

3.2.4.1 Seznam materiala

- svež rastlinski material
- steklene epruvete z gumijastimi zamaški
- kovinska stojala za epruvete
- plastične centrifugirke
- steklena erlenmajerica z navojem in pripadajoč plastični pokrov
- aluminijasta folija
- keramične terilnice s pestili
- PVC pol-mikro kivete za enkratno uporabo (Ratiolab)
- avtomatska pipeta s pripadajočim nastavkom (LLG Micropipette; 10 - 100 μL)
- avtomatska pipeta s pripadajočim nastavkom (LLG Micropipette; 100 - 1000 μL)
- avtomatska pipeta s pripadajočim nastavkom (LLG Micropipette; 1 - 10 mL)
- spektrofotometer SpectroVis Plus (Vernier)
- centrifuga (LC – 321; Tehnica Železniki)
- vodikov peroksid H_2O_2 (30%)
- fosfatni pufer (pH 7,00)
- gvajakol peroksidaza
- destilirana voda
- digitalna tehtnica (Kern, natančnost 0,01 g)

3.2.4.2 Postopek

Najprej smo pripravili reagenčni pufer. Pripravljali smo ga v erlenmajerici, oviti v aluminijasto folijo za zaščito pred svetlobo.

Med tem smo v zmrzovalnik že postavili terilnice s pestili, napipetirali 4,5 mL fosfatnega pufera v 14 epruвет. Tudi slednje smo postavili v zmrzovalnik, zamašene z gumijastim zamaškom.

Reagenčni pufer smo pripravili iz 99,0 mL fosfatnega pufera, 1,0 mL gvajakola in 78 μL H_2O_2 . V zatemnjeni erlenmajerici smo reagenčni pufer postavili v zmrzovalnik do nadaljnje uporabe.



Slika 9: Pred svetlobo zaščiten reagenčni pufer (lastni vir)

Med tem smo naredili puferske ekstrakte rastlin, in sicer 14 ekstraktov (2 vrsti rastlin in 7 koncentracij NaCl pri vsaki vrsti). Z digitalno tehtnico smo odtehtali 0,30 g svežega rastlinskega materiala. Uporabili smo samo vrhove rastlin, torej prve poganjke listov. Strli smo jih v ohlajenih terilnicah. Za vsak vzorec smo uporabili svojo terilnico. Vanjo smo k strtim rastlinam dodali



Slika 10: Razlika v barvi med puferskima ekstraktoma lucerne (levo) in zelenega mungo fižola (desno)(lasten vir)

predhodno napipetiran in ohlajen fosfatni pufer (4,5 mL) in zmes še nekaj sekund homogenizirali. Homogenat smo prelili v centrifugirko in jo postavili v centrifugo za 20 minut na 6.000 obratov na minuto. Supernatant smo prelili v epruvete in jih do uporabe postavili na hladno.

Priprave testne mešanice smo se lotili po ohladitvi supernatanta. V pol-mikro kiveto smo z avtomatsko pipeto odpipetirali 900 μ L reagenčnega pufera. V trenutku, ko smo dodali 100 μ L rastlinskega ekstrakta (ohlajenega supernatanta), smo začeli odšteti 20 sekund. Po pretečenem času smo kiveto vstavili v kamrico spektrofotometra in pri valovni dolžini 469,7 nm beležili spreminjanje absorpcije na 5 sekund za obdobje ene minute.

Priprave testne mešanice smo se lotili po ohladitvi supernatanta. V pol-mikro



Slika 11: Delovna površina, pripravljena na merjenje spremembe absorpcije s spektrofotometrom za določanje encimske aktivnosti gvajakol peroksidaze (lastni vir)

Nekatere vzorce smo zaradi zelo visoke absorpcije razredčili. V Tabeli 2 so predstavljene redčine za lucerno, v Tabeli 3 pa redčine za mungo fižol.

Tabela 4: Redčenje rastlinskih ekstraktov lucerne

c [mM]	razredčenost [krat]
0	8
25	8
50	16
75	64
100	64
125	128
150	128

Tabela 5: Redčenje rastlinskih ekstraktov zelenega mungo fižola

c [mM]	razredčenost [krat]
0	/
25	/
50	/
75	/
100	/
125	/
150	2

Graf, izrisan v programu Logger Pro, je imel obliko krivulje. Glede na trendno črto smo odčitali naklon krivulje. Večji naklon pomeni hitrejši potek reakcije.

Hitrost encimske reakcije smo izračunali po enačbi: $EA = \Delta A / \text{min} \times \epsilon \times l$

$\Delta A / \text{min}$ = sprememba absorpcije v eni minuti

l = debelina kivete (1 cm)

ϵ = ekstinkcijski koeficient tetragvajakola pri 470 nm = 26,6/mM×cm

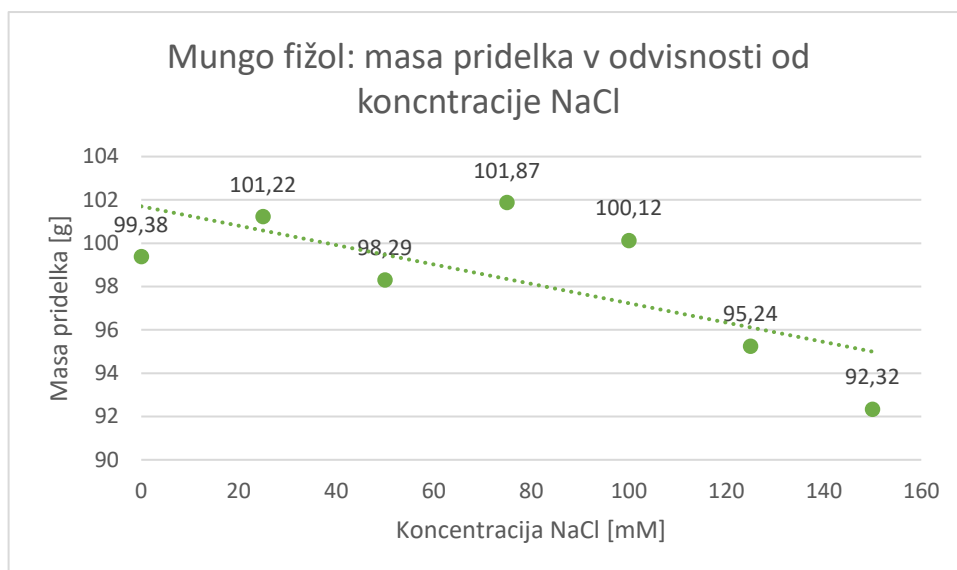
4 Rezultati

4.1 Sveža masa pridelka

Znotraj časovnega obdobja 60 minut smo stekali vseh 14 skupin kalčkov.

4.1.1 *V. radiata*

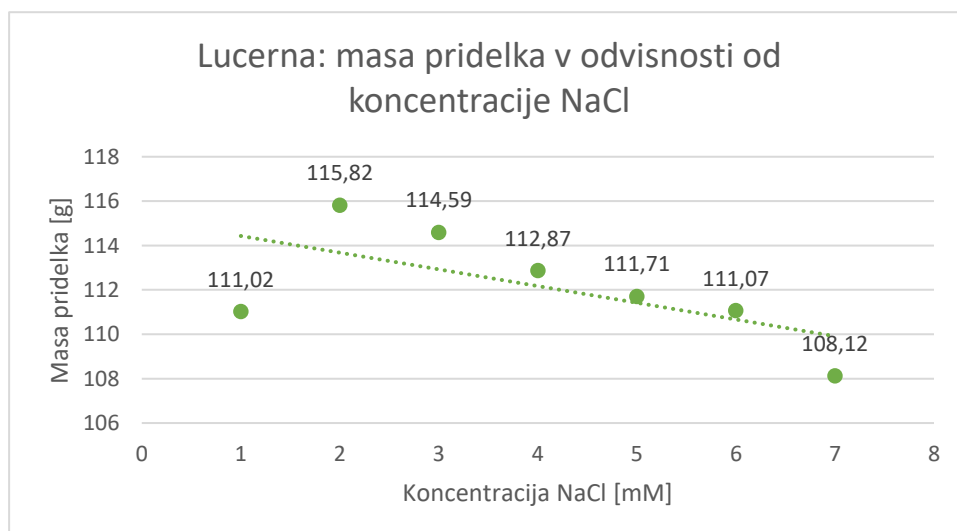
Sveže mase *V. radiata* so prikazane v grafu 1. Najvišja zabeležena masa je bila izmerjena pri 75 mM koncentraciji NaCl, med tem ko je najnižja izmerjena pri najvišji koncentraciji (150 mM).



Graf 1: Sveža masa *V. radiata*

4.1.2 *M. sativa*

Masa svežega pridelka *M. sativa* je prikazana v grafu 2. Masa je najvišja pri 25 mM koncentraciji NaCl, med tem ko je pri 150 mM najnižja. Pri naraščanju koncentracije soli je viden padajoči trend pri masi svežega pridelka.



Graf 2: Sveža masa pridelka *M. sativa*

4.2 Uspešnost kalitve

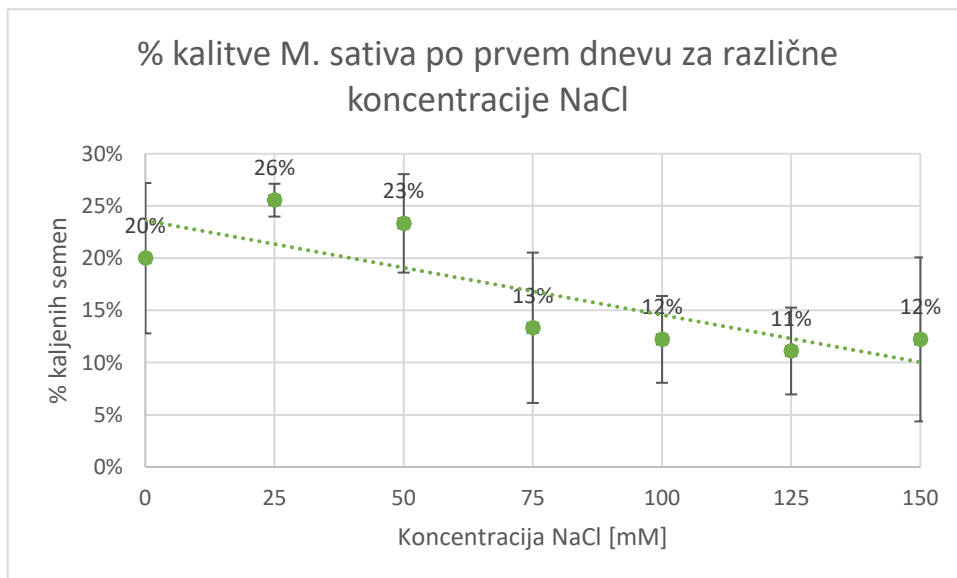
Vse petrijevke smo dva dni zapored pregledali ob približno enakem času. Štetje smo vsak dan opravili znotraj ene šolske ure. Pripadajoče preglednice so v prilogi I.

4.2.1 *V. radiata*

Zeleni mungo fižol je že prvi dan v vseh primerih dosegel 100% uspešnost kalitve.

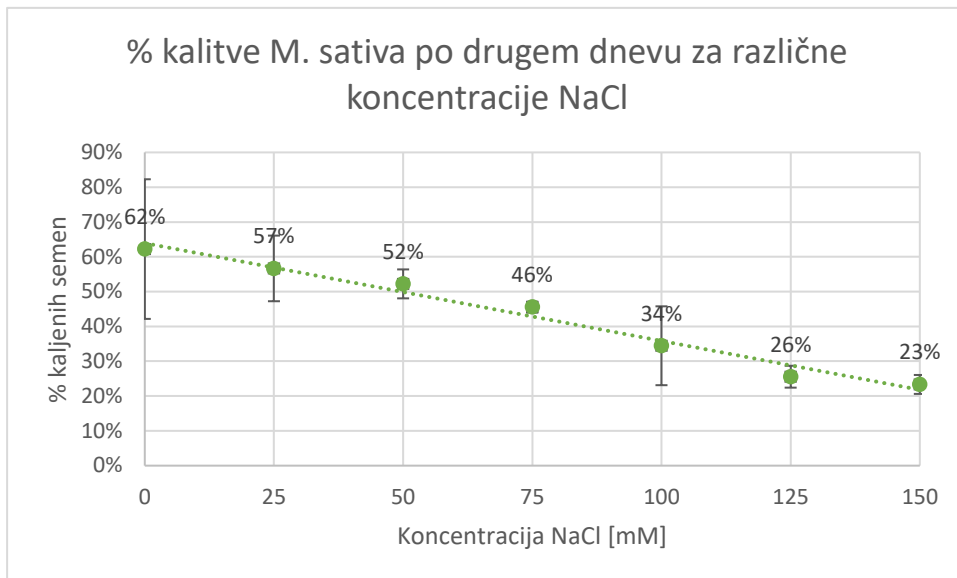
4.2.2 *M. sativa*

Prvi dan ima opazimo največji delež kaljenih semen pri koncentraciji NaCl 25mM (26%), najnižji pa pri 125 mM (11%). Sledita ji 100mM in 150mM z 12% kalitve.



Graf 3: Uspešnost kalitve *M. sativa* po 1. dnevu

Drugi dan kalitve z naraščanjem koncentracije uspešnost kalitve linearno upada.



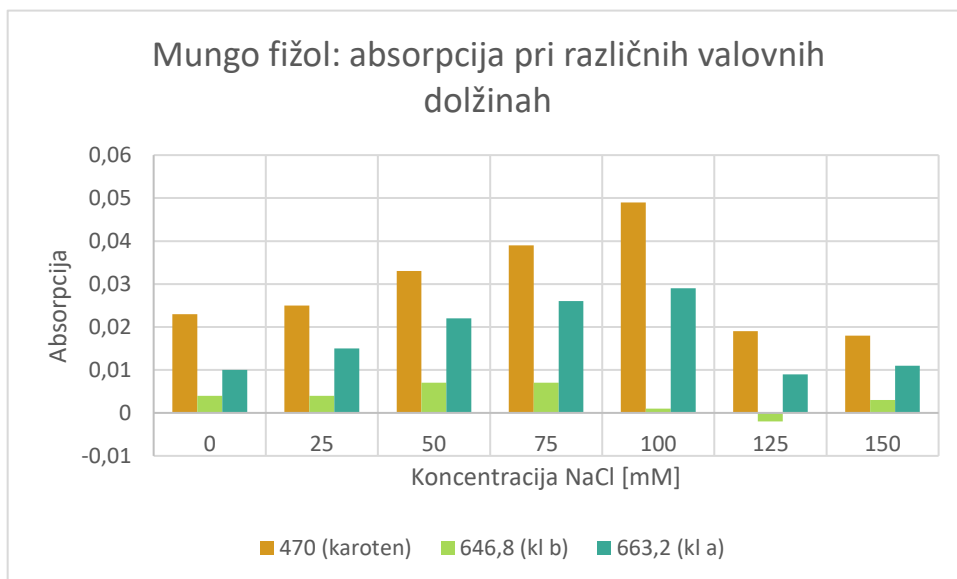
Graf 4: Uspešnost kalitve M. sativa po 2. dnevu

4.3 Vsebnost rastlinskih pigmentov

Spektrofotometrično smo izmerili absorpcijo pri valovnih dolžinah 470,0 nm za karotene, 646,8 nm za klorofil b in 663,2 nm za klorofil a. Preglednice se nahajajo v prilogi II.

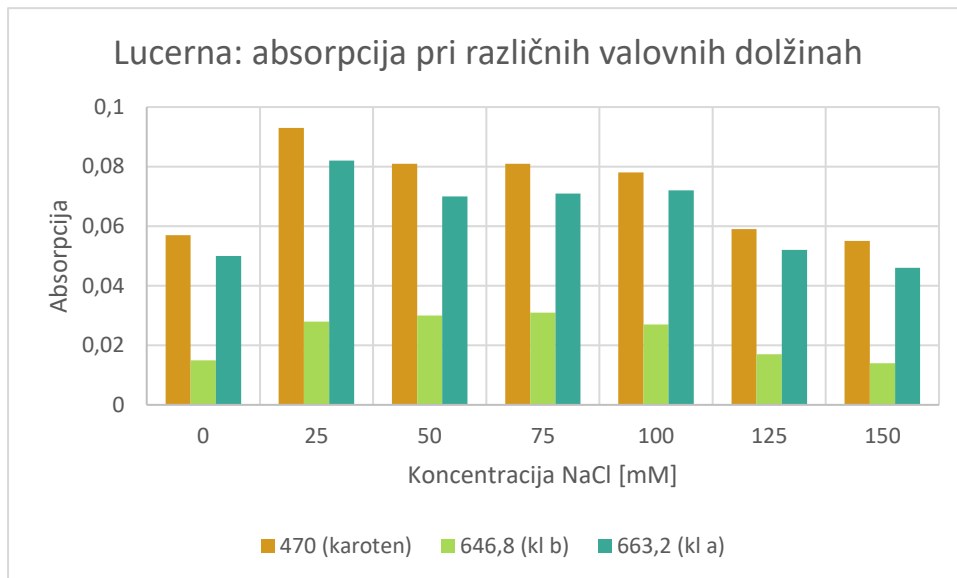
4.3.1 V. radiata

Od 0 do 100 mM koncentracije NaCl se vsebnost klorofila a in karotenov večja, nato strmo pade. Vsebnost klorofila b je splošno nizka.



Graf 5: Vsebnost fotosintetskih pigmentov za V. radiata

4.3.2 *M. sativa*



Graf 6: Vsebnost fotosintetskih pigmentov za *M. sativa*

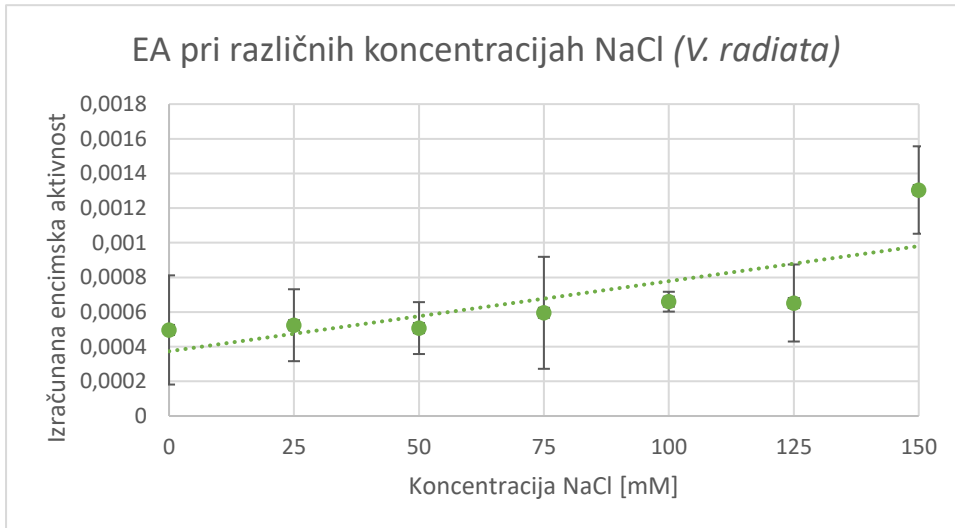
Opazimo povišanje vsebnosti vseh merjenih pigmentov iz koncentracije NaCl 0 mM na 25 mM, nato vse vrednosti počasi padajo. Izmerjene absorpcije vseh ekstraktov *M. sativa* so višje od absorpcij ekstraktov *V. radiata*.

4.4 Encimska aktivnost gvajakol peroksidaze

Znotraj 12 ur so bili pripravljene in izmerjeni vsi puferski ekstrakti. V prilogi III so grafikoni za vsak vzorec posebej. Grafikoni v prilogi IV ponazarjajo spremembo absorpcije.

4.4.1 *V. radiata*

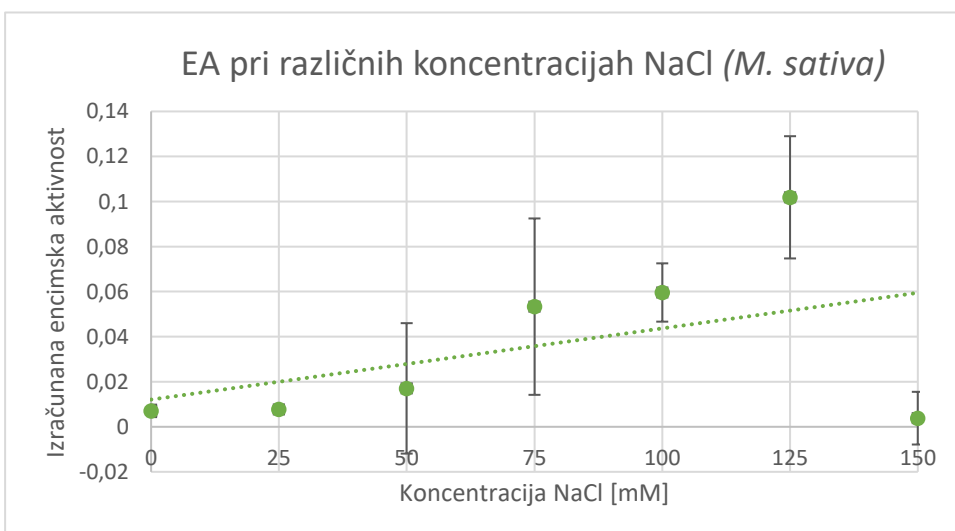
Z višanjem koncentracije NaCl vidimo tudi pri aktivnosti gvajakol peroksidaze naraščajoči trend. Intervali standardnega odklona se med seboj prekrivajo z izjemo encimske aktivnosti pri najvišji koncentraciji (150 mM), ki je absolutno višja kot pri ostalih koncentracijah.



Graf 7: Encimska aktivnost gvajakol peroksidaze pri *V. radiata*

4.4.2 *M. sativa*

Z višanjem koncentracije NaCl opažamo naraščajoči trend za aktivnost gvajakol peroksidaze. Intervali standardnih odklonov se med seboj delno prekrivajo. Pri najvišji koncentraciji NaCl (150 mM) encimska aktivnost drastično pade oz. se približa ničli.



Graf 8: Encimska aktivnost gvajakol peroksidaze pri *M. sativa*

5 Diskusija

5.1 Hipoteza 1

»Z naraščanjem slanosti okolja bodo semena *V. radiata* in *M. sativa* uspešno kalila v manjšem odstotku.«

Prvo hipotezo delno potrjujem. Pri lucerni (*M. sativa*) se je zlasti drugi dan spremljanja kalitve pokazal izrazito padajoči trend odstotka vzkaljenih semen z višanjem slanosti okolja. Rezultati kaljenja lucerne v stresnih okoliščinah, ki jih povzroča slanost, se skladajo s pričakovanji in sorodnimi raziskavami. (Farissi, Bouizgaren, Faghire, Bargaz, & Ghoulam, 2011)

Zeleni mungo fižol (*V. radiata*) je že od prvega dne kalil v vseh petrijevkah s 100% uspešnostjo. Pridobljeni rezultati so si na prvi pogled v nasprotju z obstoječo literaturo: »Najvišji odstotek kalitve je bil opažen v kontrolni skupini, sledile so koncentracije 0,1%; 0,2%; 0,3% in 0,4%. NaCl inhibira kalitev zelenega mungo fižola.« (Naheer & Alam, 2010)

Za razliko od citirane raziskave so bila vsa semena čez noč namočena v vodovodni vodi. Do razporeditve semen v petrijevke naslednji dan so večini semen že popokale lupinice. Predvidevamo, da bi bil rezultat bolj podoben rezultatom iz literature, če bi semena namakali v ustrezni koncentraciji NaCl ali pa semen sploh ne bi namakali pred razporeditvijo v petrijevke.

5.2 Hipoteza 2

»Z naraščanjem slanosti okolja bodo rastline *V. radiata* in *M. sativa* vsebovale manj klorofila in karotena.«

Drugo hipotezo sem ovrgla. Pri zelenem mungo fižolu vsebnost fotosintetskih pigmentov, zlasti karotena, izrazito narašča do koncentracije NaCl 100 mM. Pri naslednji koncentraciji (125 mM) močno upade, še nižja je pri 150 mM. Saha in drugi (2010) navajajo, da se z naraščanjem koncentracije NaCl postopno zmanjšuje vsebnost fotosintetskih pigmentov, vključujoč klorofila a in b ter karoten. Ista študija navaja, da je mogoče občutljivost na solni stres pri mungo fižolu znižati. Glede na dobljene rezultate v moji raziskovalni nalogi sklepam, da so uporabljena semena bodisi vnaprej preparirana in prilagojena na rast v rahlo slanah tleh, bodisi jim genotip ali podvrsta nudi prednost, ki se kaže v dobri prilagojenosti na koncentracije soli v podlagi, ki ne presega 100 mM. (Saha, Chatterjee, & Biswas, 2010) Obstajajo študije, ki navajajo, da znotraj vrste *Vigna radiata* obstajajo kultivarji, ki se smatrajo za tolerantne na slano okolje (T-44) ter občutljive na slanost (SML-32). (Misra & Dwivedi, 2004)

Lucerna (*M. sativa*) je pokazala največjo vsebnost fotosintetskih pigmentov pri 25 milimolarni raztopini NaCl. Vsebnost fotosintetskih pigmentov začne nato padati vendar je vse do najvišje koncentracije NaCl (150 mM) vsebnost vseh merjenih pigmentov višja od tistih v kontrolni skupini. Sorodna raziskava je dala drugačne rezultate, saj je bila vsebnost vseh pigmentov manjša že pri koncentraciji NaCl 75 mM. (Najar, Aydi, Sassi-Aydi, Zarai, & Abdelly, 2018)

Zaradi pozitivnega odziva lucerne na rahlo slanost okolja v moji raziskovalni nalogi lahko zaključim, da so bila verjetno uporabljena semena kultivarja, ki dobro prenaša sol. Raziskava iz leta 2020 omenja dva kultivarja, (HS-A in HS-B) ki se na slanost okolja odzoveta z večjim številom listov, daljšim stebлом ter močno povišano vsebnostjo klorofila. (Bhattacharai, Biswas, Fu, & Biligetu, 2020)

Pri obeh vrstah rastlin lahko povišano vsebnost karotenoidov delno pripisujemo uporabi teh za onemogočanje ROS. Karotenoidi so rastlinski antioksidanti in rastlino ščitijo pred oksidativnim stresom. (Larson, 1988) Povečano število karotenoidov je lahko tudi način prilagajanja na abiotični stres. (Taiz, Zeiger, Moller, & Murphy, 2015)

5.3 Hipoteza 3

»Z naraščanjem slanosti okolja bo sveža masa obeh vrst rastlin padala.«

Tretjo hipotezo potrjujem. Kljub manjšim odstopanjem v obe smeri je opazen padajoči trend mase pridelka z večanjem koncentracije NaCl. Zaradi majhne skupne teže vzorca ne moremo z gotovostjo trditi, da bi v veliko večjih količinah (za kmetijske namene) prišlo do enakih odstopanj od trendne črte v odstotkih. Do podobnih rezultatov so prišli tudi drugi znanstveniki. (Bhattacharai, Biswas, Fu, & Biligetu, 2020) (Castroluna, Ruiz, Quiroga, & Pedranzani, 2014) (Nair, in drugi, 2019)

5.4 Hipoteza 4

»Z naraščanjem slanosti okolja bo izračunana encimska aktivnost gvajakol peroksidaze višja.«

Hipotezo 4 delno potrjujem. Pri obeh rastlinah se razkriva linearno naraščajoč trend aktivnosti gvajakol peroksidaze z naraščanjem koncentracije NaCl, vendar so nekatera odstopanja precejšnja.

Pri *M. sativa* encimska aktivnost gvajakol peroksidaze od 0 do 125 mM raztopine približno linearno narašča, nato pade skoraj na ničlo pri koncentraciji 150 mM. Tako nagla sprememba v aktivnosti encima je lahko denaturacija beljakovine zaradi kopičenja ROS in posledično deaktivacije encimov. Poleg nevarnosti degradacije beljakovin in s tem zaustavitve delovanja encimov kot so npr. peroksidaze, lahko denaturacijo beljakovin povzroči tudi visoka slanost (kopičenje ionov v celici) sama. (Mittler, 2002) (Taiz, Zeiger, Moller, & Murphy, 2015)

V. radiata pri koncentracijah od 0 do 125 mM ne kaže bistvenega višanja aktivnosti gvajakol peroksidaze. Aktivnost se bistveno poveča šele pri najvišji koncentraciji NaCl (150 mM). Glede na kopičenje karotenoidov do koncentracije 100 mM, povezujem povišanje aktivnosti peroksidaze pri zadnji koncentraciji s tem, da karotenoidi niso več zmožni braniti rastline pred ROS, zato je nenadno povišanje aktivnosti peroksidaze neke vrste kompenzacija. (Taiz, Zeiger, Moller, & Murphy, 2015) (Larson, 1988)

Druge raziskave razkrivajo, da naj bi aktivnost gvajakol peroksidaze linearno naraščala s koncentracijo. O padcih aktivnosti ni omemb. (Tayefi-Nasrabadi, Dehghan, Daeihassani, Movafegi, & Samadi, 2011)

Do popolne potrditve hipoteze imam zadržke tudi zaradi širokega območja standardnega odklona. Pri *V. radiati* se vsi standardni odkloni razen zadnjega med seboj prekrivajo. To lahko pomeni tudi, da pri aktivnosti gvajakol peroksidaze znotraj teh koncentracij sploh ni zanesljivih oz. statistično pomembnih razlik. Standardni odkloni pri *M. sativi* se prekrivajo le delno, vendar tudi to nakazuje, da dobljene razlike niso nujno dovolj zanesljive, da bi lahko na njihovi podlagi delali kakršnekoli zanesljive sklepe, trend pa verjetno obstaja.

Standardne odklone bi lahko zmanjšala z drugačnim pristopom pri delanju redčin puferskih ekstraktov. Zaradi redčenja že redčenih vzorcev (do željene stopnje razredčenosti) se morebitna napaka, narejena pri prvem redčenju prenaša naprej in se posledično veča. Poskus bi izboljšala s predhodnim računanjem in natančnim odmerjanjem ekstrakta in topila za redčenje z avtomatsko pipeto.

6 Družbena odgovornost

Družbena odgovornost se v tej raziskovalni nalogi kaže v izboru teme ter v ravnanju z odpadki, ki so nastali med izvajanjem eksperimentov.

Zaradi globalnega spreminjanja podnebja smo priča zaslanjevanju prsti na vseh celinah. Ta raziskovalna naloga se ukvarja s posledicami zaslanjevanja prsti, ki se kaže kot povečan oksidativni stres v rastlinah. Ta lahko vodi v zmanjšano maso pridelka in tako poglobi globalni problem pomankanja površin, primernih za kmetijstvo, hkrati pa pogloblja tudi problem lakote zaradi večje potrebe po zemljiščih in manjšemu pridelku.

Pomen te naloge se kaže v odlični osnovi za ozaveščanje javnosti o posledicah, ki ga ima globalno segrevanje, izčrpavanje prsti in pretirano namakanje, kaže pa se v salinizaciji prsti po vsem svetu. Ves svet je tako podvržen tudi morebitni krizi zaradi pomanjkanja kmetijskih proizvodov, katerih razlog je prav slanost prsti.

7 Zaključek

Z raziskovalno nalogo sem dosegla cilj, ki sem si ga zadala pred začetkom pisanja. S poskusi in primerjavo različne literature z dobljenimi rezultati se je izkazalo, da slanost prsti negativno vpliva na končno maso svežega pridelka. Najdena je bila povezava med povišano slanostjo in zmanjšano sposobnostjo kaljenja semen lucerne, med tem ko so semena *V. radiata* uspešno kalila neglede na slanost okolja. V kolikor bi semena pred poskusom namakali v ustrezni koncentraciji NaCl namesto v vodovodni vodi, bi lahko pričakovali drugačen rezultat, podoben rezultatu kalitvenega poskusa z lucerno. Zmanjšane vsebnosti rastlinskih pigmentov praviloma ni bilo zaznane, zato domnevam, da so v nalogi uporabljeni kultivarji, ki slanost dobro prenašajo. Specifično gledano za *M. sativo* gre verjetno za kultivarja HS-A ali HS-B. Pri mungo fižolu ne moremo z zanesljivostjo govoriti o postopnem višanju aktivnosti gvajakol peroksidaze z izjemo najvišje koncentracije soli. Bolj verjeten je trend naraščanja aktivnosti gvajakol peroksidaze pri lucerni, kljub prisotnemu delnemu prekrivanju standardnih odklonov. Pri najvišji koncentraciji soli aktivnost encima pade skoraj na ničlo, kar lahko pripišemo denaturaciji beljakovine zaradi visoke slanosti kot posledice kopičenja ionov v celici.

8 Priloge

8.1 Priloga I: Preglednice kalitvenega poskusa

Tabela 6: Kalitev lucerne 1. dan

	n/c [mM]	Lucerna						
		0	25	50	75	100	125	150
1	n (max. 30)	3	8	6	2	2	5	7
	%	10%	27%	20%	7%	7%	17%	23%
2	n (max. 30)	8	8	6	3	4	2	2
	%	27%	27%	20%	10%	13%	7%	7%
3	n (max. 30)	7	7	9	7	5	3	2
	%	23%	23%	30%	23%	17%	10%	7%
AVRG.	n (max. 30)	6	8	7	4	4	3	4
	%	20%	26%	23%	13%	12%	11%	12%
st. dev.		0,0720082	0,0157135	0,0471405	0,0720082	0,041574	0,041574	0,0785674

Tabela 7: Kalitev lucerne 2. dan

	n/c [mM]	Lucerna						
		0	25	50	75	100	125	150
1	n (max. 30)	13	19	16	14	15	7	8
	%	43%	63%	53%	47%	50%	23%	27%
2	n (max. 30)	27	13	14	13	7	7	7
	%	90%	43%	47%	43%	23%	23%	23%
3	n (max. 30)	16	19	17	14	9	9	6
	%	53%	63%	57%	47%	30%	30%	20%
AVRG.	n (max. 30)	19	17	16	14	10	8	7
	%	62%	57%	52%	46%	34%	26%	23%
st. dev.		0,2006163	0,0942809	0,041574	0,0157135	0,1133115	0,031427	0,027217

Tabela 8: Kalitev mungo fižola, enaka za 1. in 2. dan

	n/c [mM]	Mungo						
		0	25	50	75	100	125	150
1	n (max. 30)	30	30	30	30	30	30	30
	%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
2	n (max. 30)	30	30	30	30	30	30	30
	%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
3	n (max. 30)	30	30	30	30	30	30	30
	%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
AVRG.	n (max. 30)	30	30	30	30	30	30	30
	%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
st. dev.		0	0	0	0	0	0	0

8.2 Priloga II: Preglednice absorpcij etanolnih ekstraktov pri 470 nm, 646,8 nm in 663,2 nm

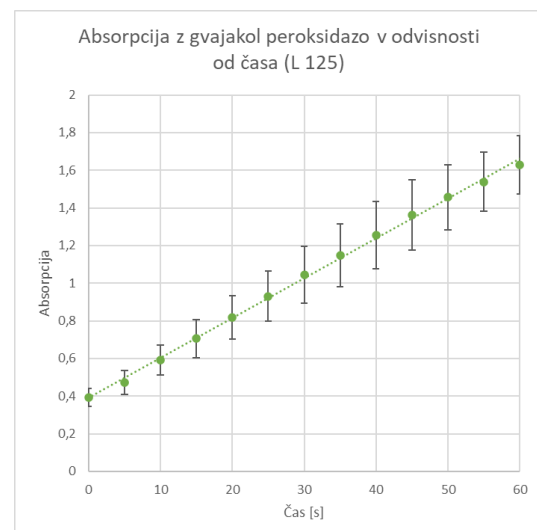
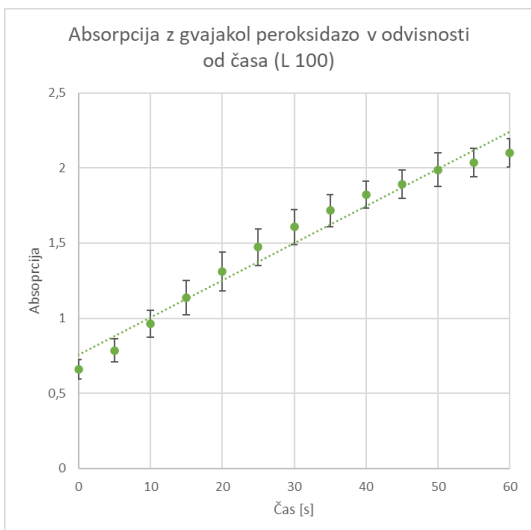
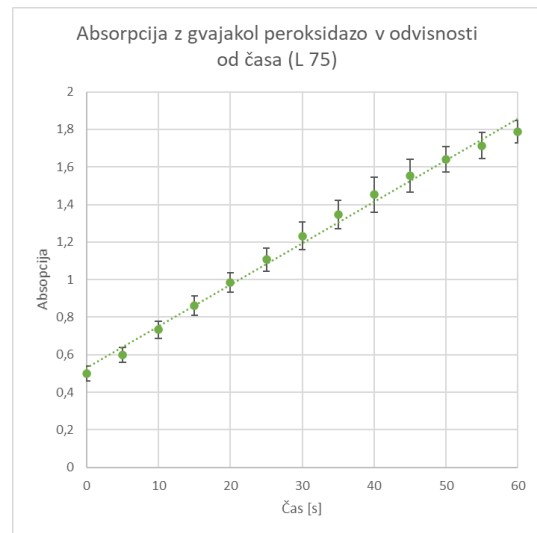
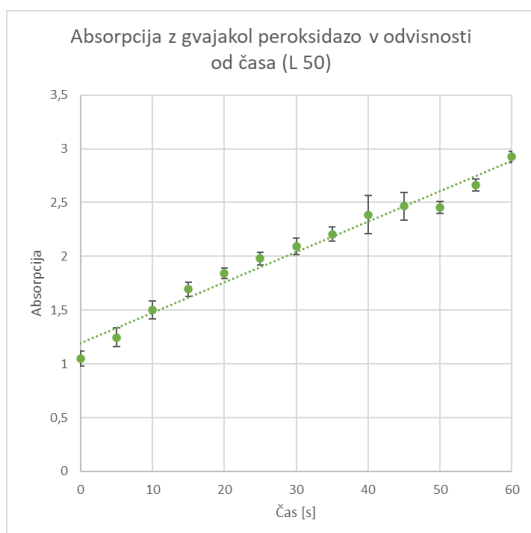
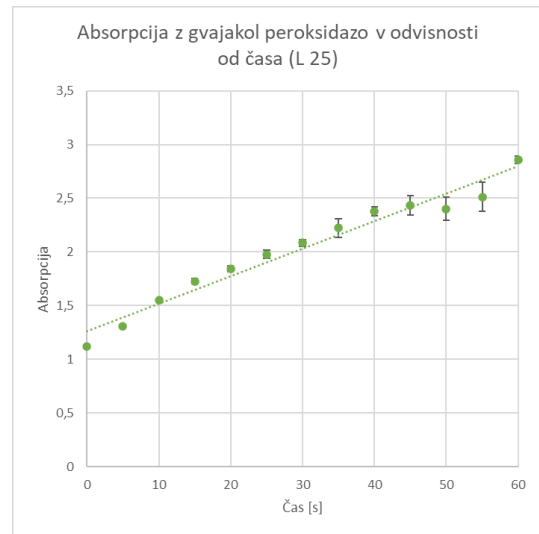
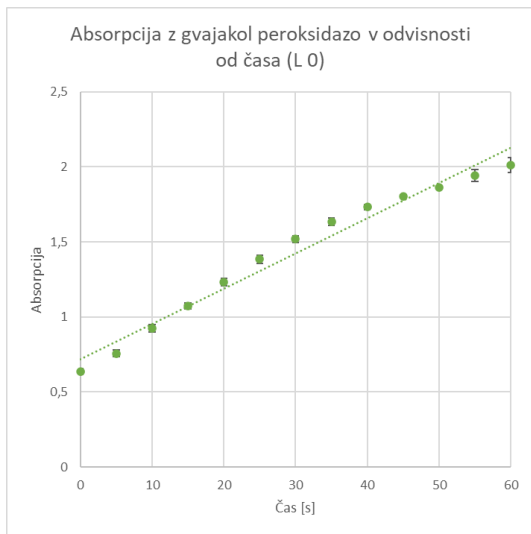
Tabela 9: Absorpcija etanolnih ekstraktov lucerne

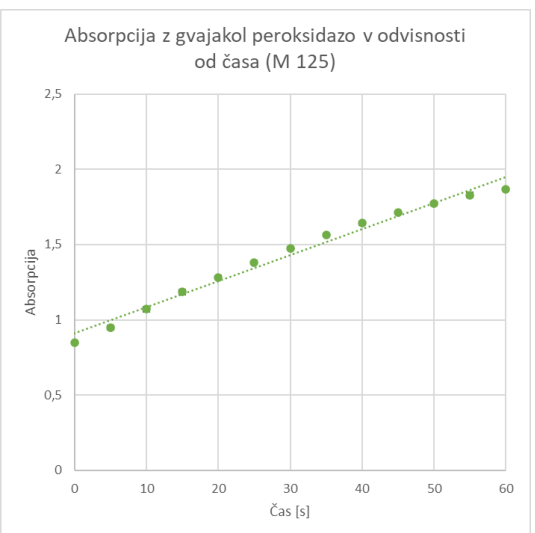
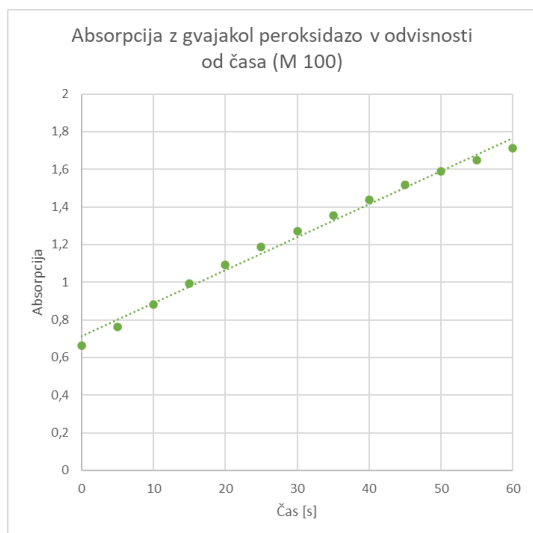
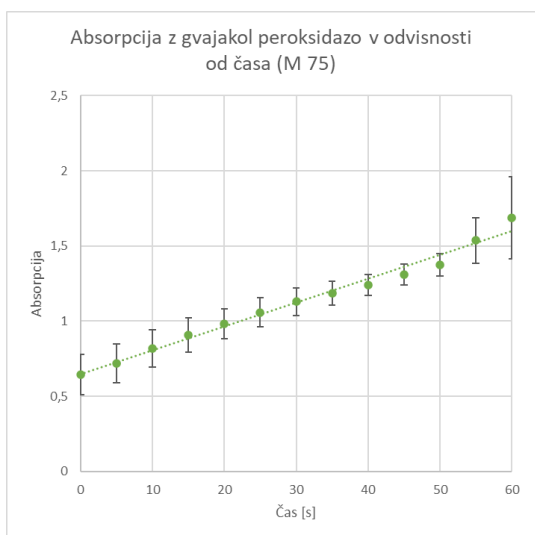
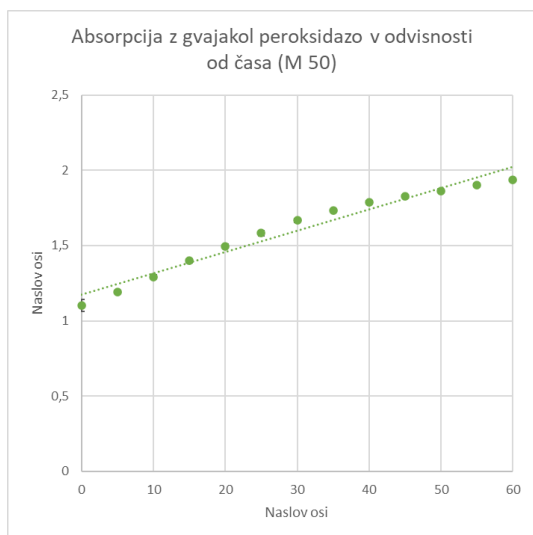
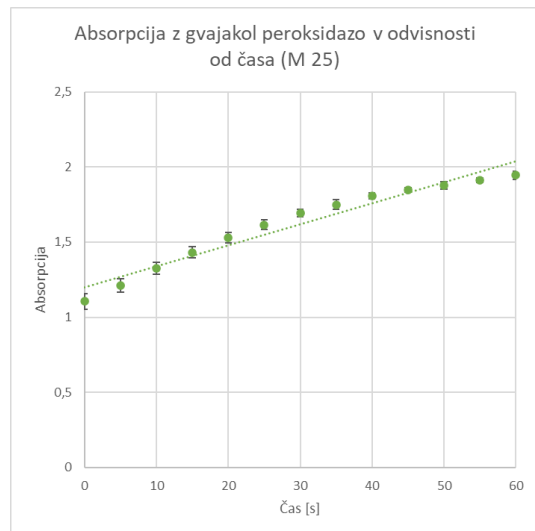
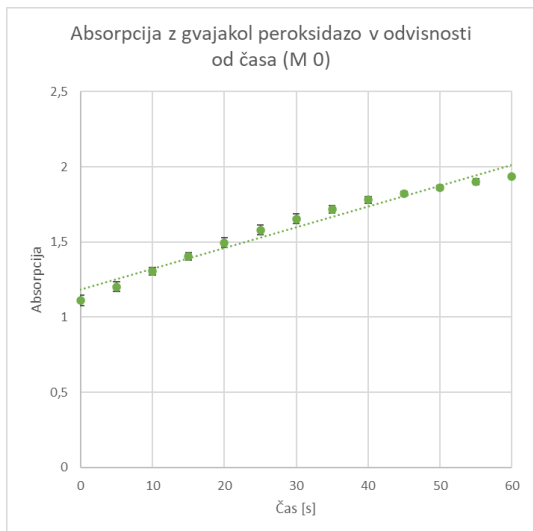
	Lucerna (<i>M. sativa</i>)		
c [mM]	470 (karoten)	646,8 (kl b)	663,2 (kl a)
0	0,057	0,015	0,050
25	0,093	0,028	0,082
50	0,081	0,030	0,070
75	0,081	0,031	0,071
100	0,078	0,027	0,072
125	0,059	0,017	0,052
150	0,055	0,014	0,046

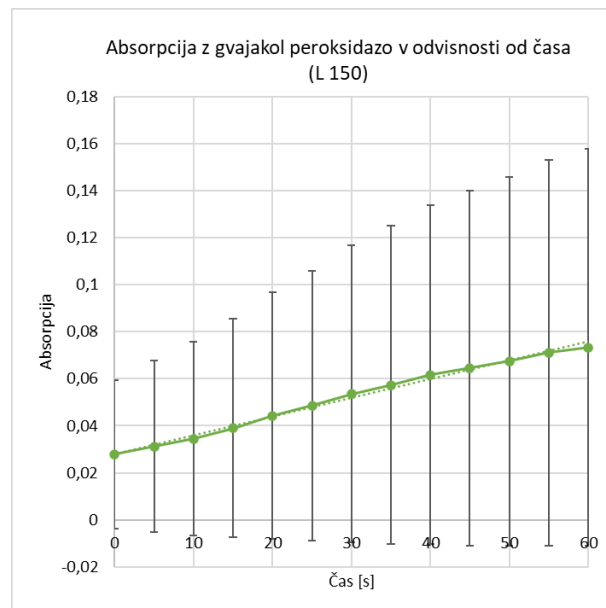
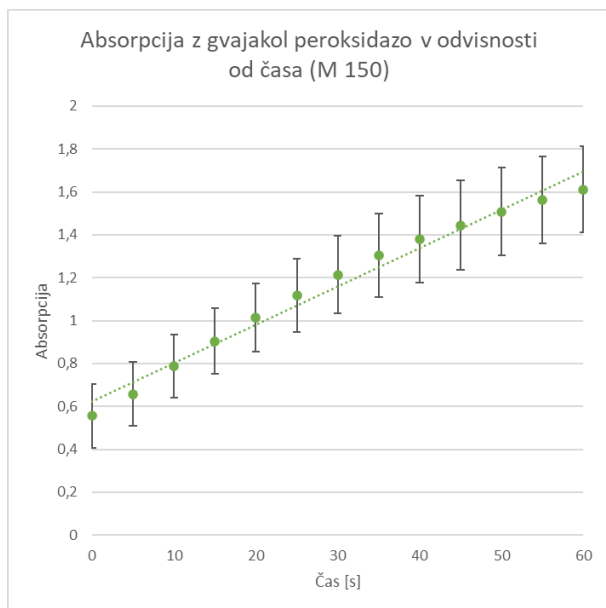
Tabela 10: Absorpcija etanolnih ekstraktov mungo fižola

	Mungo (<i>V. radiata</i>)		
c [mM]	470 (karoten)	646,8 (kl b)	663,2 (kl a)
0	0,023	0,004	0,010
25	0,025	0,004	0,015
50	0,033	0,007	0,022
75	0,039	0,007	0,026
100	0,049	0,001	0,029
125	0,019	-0,002	0,009
150	0,018	0,003	0,011

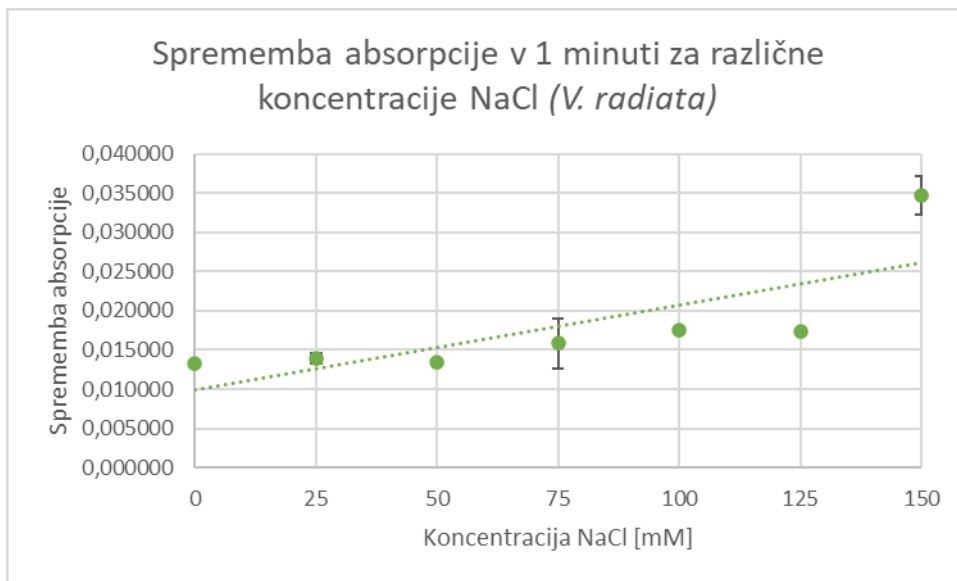
8.3 Priloga III: Grafikoni sprememb absorpcije puferskih ekstraktov v časovnih intervalih po 5 sekund za obdobje 1 minute



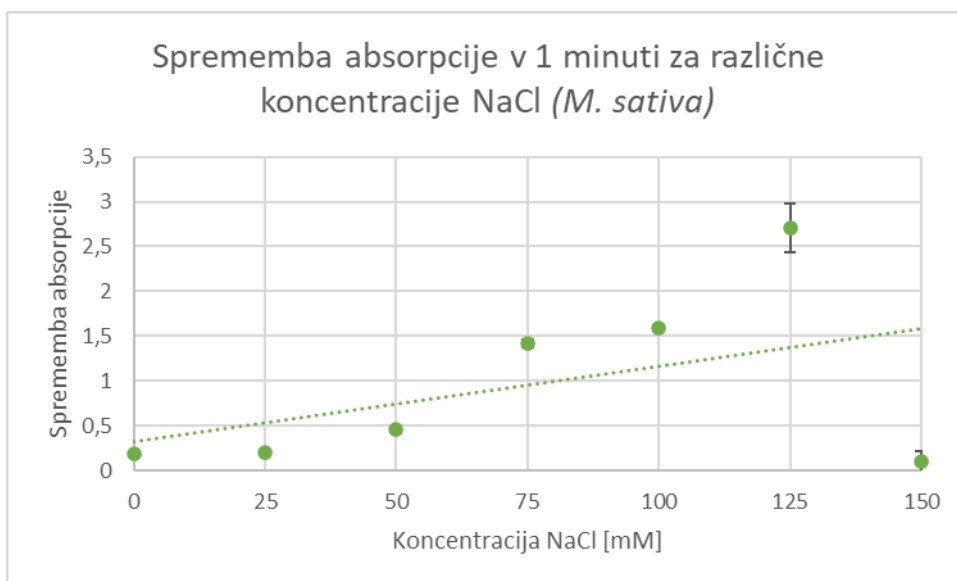




8.4 Priloga 4: Grafikoni, ki ponazarjajo spremembo absorpcije za različne koncentracije NaCl v eni minuti



Graf 10: Sprememba absorpcije pri različnih koncentracijah NaCl v eni minuti za mungo fižol



Graf 9: Sprememba absorpcije pri različnih koncentracijah NaCl v eni minuti za lucerno

9 Bibliografija

- Bhattarai, S., Biswas, D., Fu, Y.-B., & Biligetu, B. (2020). Morphological, Physiological, and Genetic Responses to Salt Stress in Alfalfa: A Review. *Agronomy*, 1-15.
- BioNinja. (2020). *Absorption spectrum*. Pridobljeno iz BioNinja: <https://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-2-molecular-biology/29-photosynthesis/action-spectrum.html>
- Castroluna, A., Ruiz, O. M., Quiroga, A. M., & Pedranzani, H. E. (2014). Effects of salinity and drought stress on germination, biomass and growth in three varieties of *Medicago sativa* L. *Avances en Investigación Agropecuaria*, str. 39-50. Pridobljeno iz <http://ww.ucol.mx/revaia/portal/pdf/2014/enero/4.pdf>
- Ellison, S. L. (2015). Carotenoids: Physiology. doi:10.1016/B978-0-12-384947-2.00120-3
- FAO. (2021). *Soil salinization and sodification*. Pridobljeno iz Food and Agriculture Organization of the United Nations: <https://www.fao.org/global-soil-partnership/areas-of-work/soil-salinity/en/>
- Farissi, M., Bouizgaren, A., Faghire, M., Bargaz, A., & Ghoulam, C. (2011). Agro-physiological responses of Moroccan alfalfa (*Medicago sativa* L.) populations to salt stress during germination and early seedling stages. *Seed Science and Technology*, str. 389-401. doi:10.15258/sst.2011.39.2.11
- Feedipedia. (2020). *Mung bean (Vigna radiata) pods*. Pridobljeno iz Feedipedia: <https://www.feedipedia.org/content/mung-bean-vigna-radiata-pods>
- Kumar, v., Abbas, A. K., & Aster, J. C. (16. avgust 2019). *Medical Encyclopedia: Necrosis*. Pridobljeno iz MedlinePlus: <https://medlineplus.gov/ency/article/002266.htm>
- Lambrides, C. J., & Godwin, I. D. (2007). Chapter 4: Mungbean. V C. Kole, *Pulses, Sugar and Tuber Crops* (str. 69-90). Berlin: Springer.
- Larson, R. A. (1988). The Antioxidants of Higher Plants. *Phytochemistry*, str. 969-978.
- Martin, L. (10. junij 2019). *What are the roles of Chlorophyll A & B?* Pridobljeno iz Sciencing: <https://sciencing.com/what-are-the-roles-of-chlorophyll-a-b-12526386.html>
- MDidea. (15. april 2014). *Brief Introduction of Vigna radiata and Mung Bean*. Pridobljeno iz MDidea Botantics: <https://web.archive.org/web/20180612184421/https://mdidea.com/products/proper/prope r05402.html>

- Misra, N., & Dwivedi, U. N. (2004). Genotypic difference in salinity tolerance of green gram cultivars. *Plant Science*, str. 1135-1142. doi:10.1016/j.plantsci.2003.11.028
- Mittler, R. (september 2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *TRENDS in Plant Science*, str. 405-410.
- Naher, N., & Alam, A. (maj 2010). Germination, growth and nodulation of mungbean (*Vigna radiata* L.) as affected by sodium chloride. *Int. J. Sustain. Crop. Prod.*, str. 8-11. Pridobljeno iz <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.1063.2355&rep=rep1&type=pdf>
- Nair, M. R., Pandey, A. K., Rasheed, A., Hanumantha, R. B., Shwe, T., Alam, A., . . . Schafleitner, R. (september 2019). Biotic and abiotic constraints in mungbean production - progress in genetic improvement. *Frontiers in Plant Science*. doi:10.3389/fpls.2019.01340
- Najar, R., Aydi, S., Sassi-Aydi, S., Zarai, A., & Abdelly, C. (2018). Effect of salt stress on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in *Medicago truncatula*. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, str. 1-10. doi:10.1080/11263504.2018.1461701
- Noble, C. L., Halloram, G. M., & West, D. W. (1984). Identification and Selection of Salt tolerance in Lucerne (*Medicago sativa* L.). *Australian Journal of Agricultural Research*, str. 239-252. doi:10.1071/AR9840239
- Pandey, V. P., Awasthi, M., Singh, S., Tiwari, S., & Dwivedi, U. N. (2017). A Comprehensive Review on Function and Application of Plant Peroxidases. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*. doi:10.4172/2161-1009.1000308
- Pevac, T. (17. september 2019). *Setev lucerne*. Pridobljeno iz Kmetijski zavod Celje: <https://www.kmetijskizavod-celje.si/aktualno/setev-lucerne-2019-09-17>
- Saha, P., Chatterjee, P., & Biswas, A. K. (junij 2010). NaCl pretreatment alleviates salt stress by enhancement of antioxidant defense system and osmolyte accumulation in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek). *Indian Journal of Experimental Biology*, str. 593-600.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (februar 2012). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*. doi:10.1155/2012/217037
- Singh, Y., Bal, M. L., & Satpute. (2017). Plant Stress Signaling Through Corresponding Nanobiotechnology. *Nanotechnology Applications in Food*, 381-391.

- Taiz, L., Zeiger, E., Moller, I. M., & Murphy, A. (2015). *Plant Physiology and Development, Sixth Edition*. Sunderland: Sinauer Associates, Inc.
- Tayefi-Nasrabadi, H., Dehghan, G., Daeihassani, B., Movafegi, A., & Samadi, A. (januar 2011). Some biochemical properties of guaiacol peroxidases as modified by salt stress in leaves of salt-tolerant and salt-sensitive safflower (*Carthamus tinctorius* L.cv.) cultivars. *African Journal of Biotechnology*, str. 751-763. doi:10.5897/AJB10.1465
- The Morton Arboretum. (2022). *Chlorosis*. Pridobljeno iz The Morton Arboretum: <https://mortonarb.org/plant-and-protect/tree-plant-care/plant-care-resources/chlorosis/#overview>
- Toppr. (2020). *Mention one difference in the structure of chlorophyll a and chlorophyll b*. Pridobljeno iz Toppr answers : <https://www.toppr.com/ask/en-ae/question/mention-one-difference-in-the-structure-of-chlorophyll-a-and/>
- Umezawa, T., Shimizu, K., Kato, M., & Ueda, T. (6. marec 2000). Enhancement of salt tolerance in soybean with NaCl pretreatment. *Physiologia Plantarum*, str. 59-63.
- USDA. (februar 2022). *Medicago sativa* L. Pridobljeno iz United States Department of Agriculture: <https://plants.usda.gov/home/plantProfile?symbol=MESA>
- Vidal, J. (11. april 2019). *Irrigation, drought, sea level rise and more are causing salt to build up in soils around the world. What can we do?* Pridobljeno iz Ensia: <https://ensia.com/features/salinization-salt-threatens-soil-crops-ecosystems/>