

**УТИЦАЈ NaCl И ФИТОХОРМОНА НА КЛИЈАЊЕ СЕМЕНА  
ПШЕНИЦЕ, КАМИЛИЦЕ И БОСИЉКА**

**EFFECT OF NaCl AND PHYTOHORMONES ON SEED  
GERMINATION OF WHEAT, CHAMOMILE AND BASIL**

Кандидат: **АЛЕКСА МИЋИЋ**

Друга крагујевачка гимназија, 3. година

Ментор: др **МИЛАН СТАНКОВИЋ**, доцент

Природно-математички факултет, Институт за биологију и екологију

Крагујевац, мај 2015. година

## Резиме

У спроведеном упоредном истраживању анализиран је токсичан ефекат соли (NaCl), појединачно и у комбинацији са стимулативним биљним хормоном (GA3) и хормоном стреса (ABA) на клијање семена и пораст коренка и хипокотила пшенице (*Triticum aestivum*), камилице (*Matricaria chamomilla*) и босиљка (*Ocimum basilicum*). Семена су третирана раствором NaCl концентрације 1%, 0,5% и 0,25%, као и дестилованом водом у комбинацији са гиберелином (GA3) и апсцисинском киселином (ABA), појединачно и у комбинацији, при чему је добијено 16 различитих третмана за сваку испитивану биљну врсту. Клијање семена праћено је у лабораторијским условима, при чему је одређиван проценат клијавости, као и дужина коренка и хипокотила. Резултати указују да испитиване врсте нису једнако резистентне према стресу изазваном повишеном концентрацијом NaCl у подлози. Пшеница је најотпорнија, док је камилица на другом а босиљак на трећем месту по осетљивости. Пораст коренка и хипокотила указује да гиберелин стимулише раст хипокотила у свим концентрацијама соли. За апсцисинску киселину је утврђено да има инхибиторни ефекат. Гиберелин у комбинацији са апсцисинском киселином, за разлику од деловања у комбинацији са NaCl не смањује инхибиторно дејство апсцисинске киселине. Добијени резултати указују да се семена испитиваних врста међусобно разликују према осетљивости на деловање NaCl, као и да се штетни ефекат соли умањује третирањем гиберелином, за разлику од апсцисинске киселине за коју није утврђен позитиван ефекат на неутрализацију ефекта NaCl. Примена добијених резултата омогућава искоришћавање обрадивих површина са повећаном концентрацијом соли где се уз адекватан избор отпорних врста уз третман са гиберелином може у великој мери смањити токсично дејство соли на клијање, раст и развој гајених биљака.

**Кључне речи:** клијање семена, NaCl, гиберелин, стимулативни ефекат

## ***Summary***

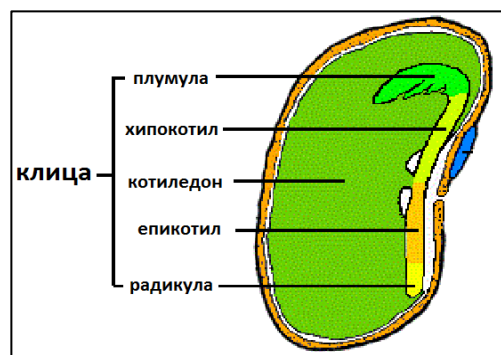
In conducted comparative research the toxic effect of salt (NaCl) is analysed, separately and in combination with stimulating plant hormone (GA3) and stress hormone (ABA) on seed germination and growth of radicle and hypocotyl of wheat (*Triticum aestivum*), chamomile (*Matricaria chamomilla*) and basil (*Ocimum basilicum*). Seeds had been treated with 1%, 0,5% and 0,25% solution of NaCl, as well as distilled water combined with gibberellin (GA3) and abscisic acid (ABA), separately and in combination, which resulted in 16 different treatments for each examined plant species . The seed germination was monitored in laboratory conditions while percentage of germination, as well as the length of hypocotyls and radicles were determined. Results indicate that examined species are not equally resistant to stress caused by increased concentration of NaCl in the medium. The wheat is the most resistant, while the chamomile is on the second place, and basil on the third place by their sensitivity. The growth of radicle and hypocotyl indicates that gibberellin stimulates the growth of hypocotyl in every concentration of salt. Abscisic acid is found to have inhibitory effect. Gibberellin, in combination with abscisic acid, unlike its effect in combination with NaCl, does not reduce the inhibitory effect of abscisic acid. The results obtained indicate that the seeds of examined species are mutually different in their sensitivity to NaCl effect and that the harmful effect of salt can be reduced by treating with gibberelin, unlike the abscisic acid for which the positive effect on neutralisation of NaCl effect had not been registered. The use of obtained results enables better usement of arable areas with increased concentration of salts where with proper choice of resistant species and with gibberellin treatment the toxic effect of salt on seed germination, growth and development of grown plants can be greatly reduced.

***Key words:*** seed germination, NaCl, gibberellin, stimulating effect

## УВОД

Семе је репродуктивни биљни орган карактеристичан само за скривеносеменице и голосеменице који биљкама омогућава да преживе неповољне временске услове и одрже континуитет у времену и простору. Развија се од семеног зачетка након процеса фертилизације и чине га семењача, спољашњи омотач семена и клица, зачетак нове биљке. Клица се развија из оплођене јајне ћелије и налази се испод семењаче. Унутар семена, клица је најчешће окружена ендоспермом, ткивом које настаје у време фертилизације и семену обезбеђује храниве материје у облику скроба, уља и протеина. Врсте биљака које имају један котиледон су монокотиле, а оне које имају два котиледона су дикотиле. Структуру клице чине следећи делови (слика 1.):

- Коренак (радикула)
- Хипокотил
- Котиледони
- Епикотил
- Пупољчић (плумула)



Слика 1. Графички приказ структуре семена

### *Клијање семена*

Клијање семена је почетна етапа развоја биљака и представља важну фазу у животном циклусу семена. Основни услови за клијање семена су температура, вода и аерација. Процес клијања семена се огледа у четири подфазе: имбибиција, фаза активације, фаза митотичких деоба и израстање коренка.

**Имбибиција** је прва етапа у клијању семена и представља процес у коме колоиди у присуству воде бубре. Количина усвојене воде зависи од разлике у водном потенцијалу земљишта и семена. **Фаза активације** представља почетак метаболичких процеса чиме се омогућава синтеза и акумулација разних продуката неопходних за трећу фазу клијања – **митотичке деобе**. Енергију потребну за деобе ћелија, семе добија приликом процеса дисања. Четврта и последња фаза клијања, **израстање коренка**, јесте издуживање радикуле и њено избијање из семена.

## *Развиће биљака под стресним условима*

Током свог вегетационог периода, биљке су изложене различитим стресним факторима. Стрес је свако стање биолошког система које одступа од оптимума и има негативан утицај на биљку тако што неповољно утиче на растење и развиће, смањује продуктивност биљака на нижи ниво од њиховог генетичког потенцијала и погоршава квалитет њихових производа. Стресни фактори могу бити **абиотички**, који су у основи физичко-хемијске природе и **биотички**, који су биолошке природе.

У зависности од врсте соли којом је земљиште презасићено постоје две врсте заслањених земљишта: оно које садржи високе количине NaCl (солицитет) и оно на којима је концентрација свих соли висока (салинитет). Висока концентрација соли у подлози код биљака изазива **осмотски** и **јонски** стрес. Због ниског осмотског потенцијала подлоге, биљке не могу да примају воду и последице су сличне суши. Биљка не може да одржи баланс између апсорпције воде и транспирације. Водни дефицит резултира слабијим растом биљака јер тургор притисак не достиже максималну вредност. Повећана концентрација јона натријума у ћелијама може знатно пореметити мембрански потенцијал ћелија и тако инактивирати многе ензиме и инхибирати поједине метаболичке процесе. Такође долази и до појаве оксидативног стреса која је праћена продукцијом реактивних облика кисеоника који имају штетан ефекат по растење и развиће.

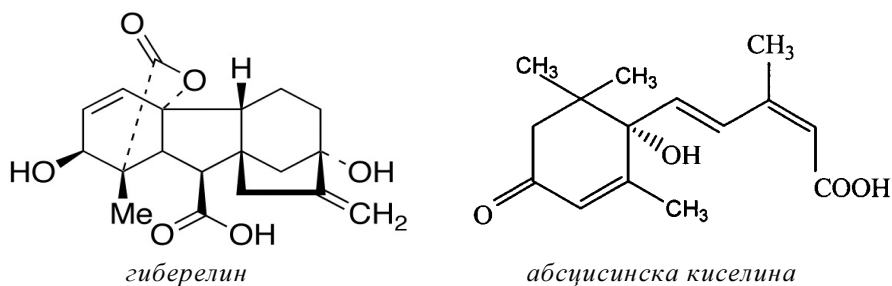
## *Фитохормони*

Онтогенетско развиће биљака остварује се кроз низ промена грађе и физиолошких и биохемијских функција. Раст и диференцијација су основни процеси у току развића и под директном су контролом фитохормона. **Фитохормони** су органске супстанце које не спадају у храњиве материје и на биљку делују у минимални концентрацијама. Њихова основна функција јесте да стимулирају, инхибирају или на други начин модификују растење и развиће и ускладе ове процесе са променама у спољашњој средини. Присутни су у свим деловима биљке и у свим фазама развића. Синтеза фитохормона врши се у одређеним деловима биљке, највише листовима и вегетационим купама, одакле се преносе до циљних места у којима остварују физиолошки ефекат.

Под називом фитохормони подразумевају се само једињења која се синтетишу у биљном организму. Постоје и синтетичке материје које на веома сличан начин делују на биљке као и фитохормони, упркос њиховој огромној разлици у грађи. Ове супстанце су означене као регулатори растења.

Фитохормони су по хемијским својствима и физиолошком дејству које имају сврстани у неколико класа, а то су: ауксини, гиберелини, цитокинини, апсцисинска киселина и етилен. У овом експерименту коришћене су класа гиберелина и апсцисинске киселине.

**Гиберелини** су биљни хормони који представљају продукте гљиве *Gibberella fujikuroi*, по којој су и добили име. Откривени су у Јапану 1926. године приликом испитивања неколико врста пиринча које су биле заражене овом гљивом. Биљке гиберелине синтетишу у ткивима која активно расту, као што су апикални врхови, млади листови, корени, незрела семена и плодови. Испитивања су показала да гиберелини стимулишу раст стабла и утичу на брзину бубрења и исклијавања семена. Поред тога имају знатан утицај и на величину, број и морфологију листова, а у неким случајевима помажу репродукцију, тј убрзавају цветање и доношење плода. Код клијања семена житарица, која као резервне материје садрже скроб, гиберелини стимулишу синтезу хидролитичког ензима  $\alpha$ -амилазе који разлаже скроб до глукозе.



Слика 2. Структурне формуле гиберелина и апсцисинске киселине

**Апсцисинска киселина** је биљни хормон који је први пут изолован из младих чаура памука 1964. године, приликом проучавања узрока прераног опадања плодова ове биљке. Апсцисинска киселина је један од главних инхибиторних хормона и има регулаторну улогу у оним фазама развића када биљка прелази из активног растења у стање мировања; спречава клијање семена утиче на брзину апсцисије листова и плодова и стварање успаваних пупољака за презимљавање. Поред тога, овај хормон се назива и "Хормон стреса" јер посредује у реакцијама биљке на стресне услове.

У Србији постоји велики број необрадивих земљишних површина која су последица високог салинитета земљишта. Циљ овог рада био је да се испита утицај фитохормона гибберелина и апсцисинске киселине на клијање семена биљних врста *Matricaria chamomilla*, *Ocimum basilicum* и *Triticum aestivum* приликом изложености семена високим концентрацијама натријум-хлорида. Оваква истраживања имају за циљ проналазак решења која би могла помоћи у што бољем искоришћавању ових тешко обрадивих површина.

## МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА

Најпре је припремљен стартни раствор NaCl концентрације 1%, који је разблажен дестилованом водом при чему је добијена концентрација 0,5% и 0,25%. Поред раствора соли, припремљен је раствор хормона: гибберелина (GA3) у концентрацији од  $10^{-4}$  и апсцисинске киселине (ABA) у концентрацији од  $10^{-5}$ . За испитивања утицаја соли и фитохормона коришљена су семена пшенице (*Triticum aestivum*), камилице (*Matricaria chamomilla*) и босиљка (*Ocimum basilicum*).

Семена су засејана у стерилним лабораторијским Петријевим шољама у којима ја претходно на дну постављен филтер папир натопљен са 5 ml одговарајућег раствора. Засејано је по 100 семена за сваку концентрацију. Петријеве кутије су постављене у стандардним лабораторијским условима (светло/мрак–16/8 h, температура 22/18 °C и влажност 55/65%). Након трећег дана од дана засејавања додаван је одговарајући раствор, а проценат клијавости и дужина коренка и хипокотила мерене су после 3 и после 9 дана у зависности од врсте.

Приликом испитивања утицаја одабраних супстанци, серија семена сваке биљке садржала је четири групе где је прва садржала дестиловану воду, друга 0,25% NaCl, трећа 0,5% NaCl и четврта 1% NaCl. Свака група подељена је на четири подгрупе: прва подгрупа третирана основним раствором, друга подгрупа третирана раствором гибберелина, трећа апсцисинском киселином и четврта која је третирана комбинацијом раствора гибберелина и апсцисинске киселине:

<i>1 група</i>	<i>2 група</i>	<i>3 група</i>	<i>4 група</i>
H <sub>2</sub> O	0,25% NaCl	0,5% NaCl	1% NaCl
H <sub>2</sub> O + GA3	0,25% NaCl + GA3	0,5% NaCl + GA3	1% NaCl + GA3
H <sub>2</sub> O + ABA	0,25% NaCl + ABA	0,5% NaCl + ABA	1% NaCl + ABA
H <sub>2</sub> O + GA3 + ABA	0,25% NaCl + GA3 + ABA	0,2% NaCl + GA3 + ABA	1% NaCl + GA3 + ABA

## РЕУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Као резултат истраживања израчунат је проценат клијавости и одређене су просечне дужине хипокотила и коренка по свакој петри шољи. Добијени резултати су представљени помоћу следећих графика.

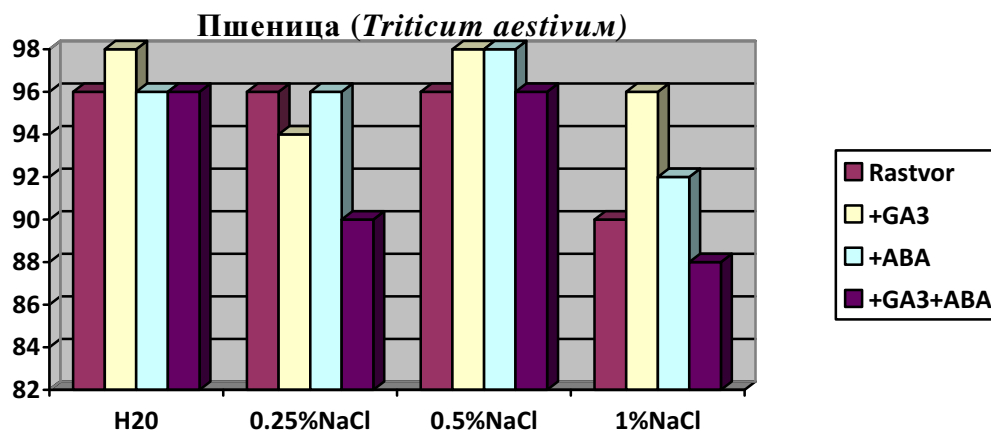


График 1 . Процент клијавости семена пшенице (*Triticum aestivum*) у зависности од концентрације NaCl и комбинације фитохормона

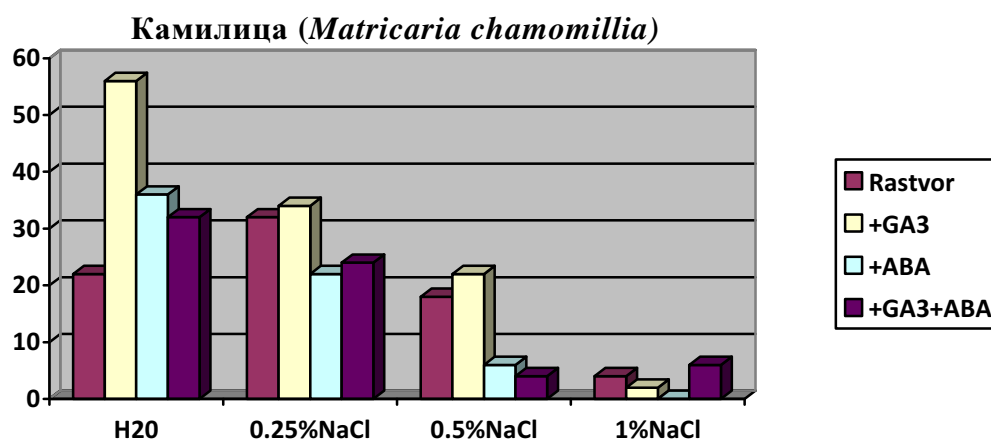


График 2 . Процент клијавости семена камилице (*Matricaria chamomilla*) у зависности од концентрације NaCl и комбинације фитохормона

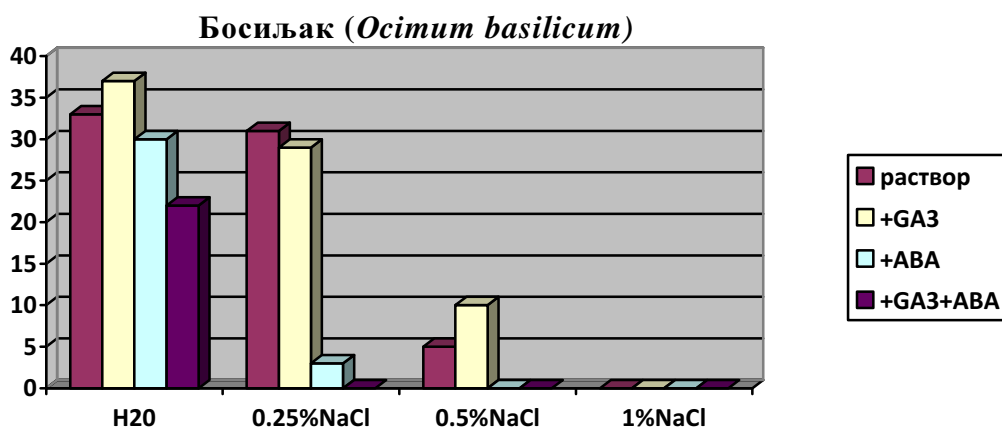


График 3 . Процент клијавости семена босиљка (*Ocimum basilicum*) у зависности од концентрације NaCl и комбинације фитохормона



### Пшеница (*Triticum aestivum*)

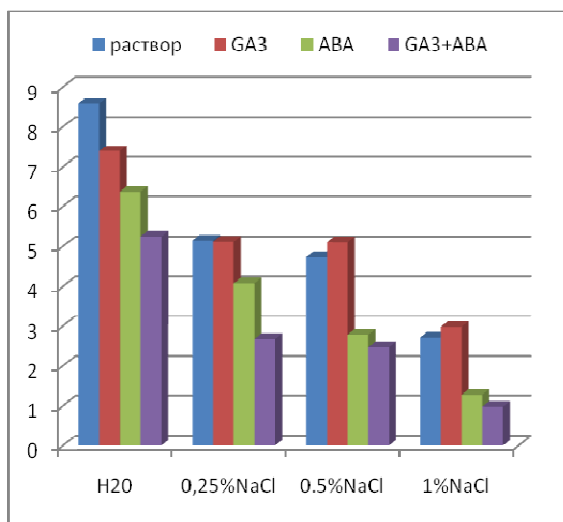


График 4. Просечне дужине коренка пшенице измерене након 3 дана

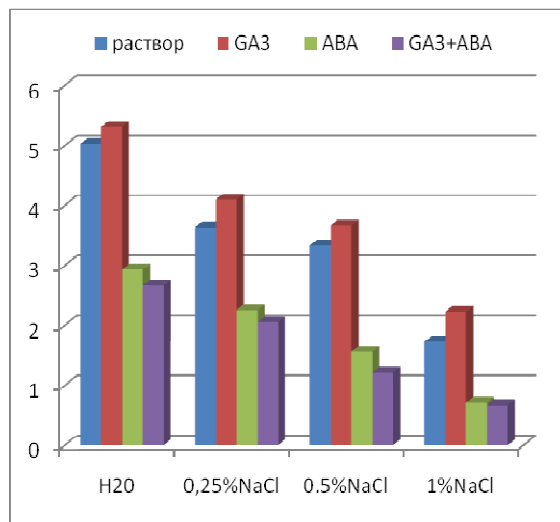


График 5. Просечне дужине хипокотила пшенице измерене након 3 дана

### Камилица (*Matricaria chamomilla*)

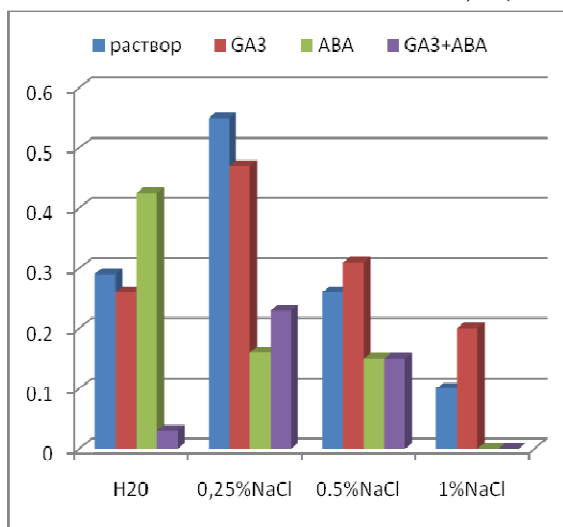


График 6. Просечне дужине коренка камилице измерене након 9 дана

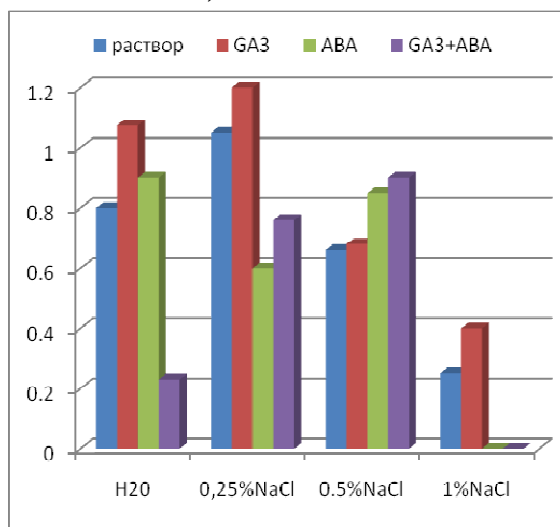


График 7. Просечне дужине хипокотила камилице измерене након 9 дана

### Босиљак (*Ocimum basilicum*)

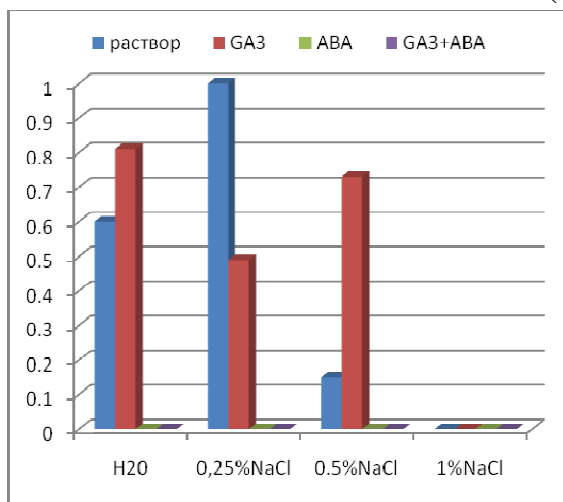


График 8. Просечне дужине коренка босиљка измерене након 9 дана

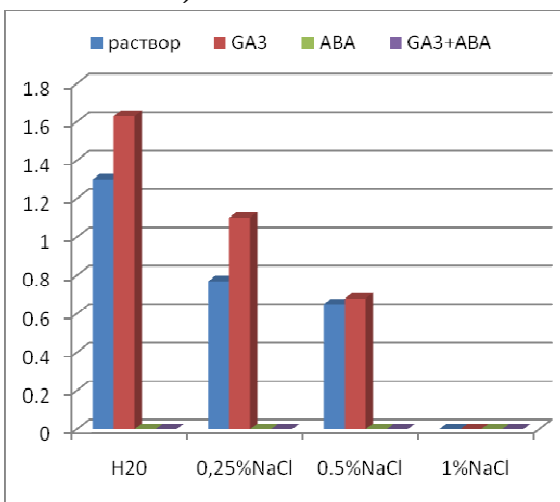


График 9. Просечне дужине хипокотила босиљка измерене након 9 дана

Резултати добијени израчунавањем процента клијавости указују да испитиване врсте нису једнако резистентне према стресу изазваном повишеном концентрацијом NaCl у подлози. Пшеница је најотпорнија, док је камилица на другом, а босиљак на трећем месту по осетљивости. У осам од дванаест комбинација, семена која су третирана гибберелином имала су највећи проценат клијавости. Код семена пшенице при повећању концентрације соли до 0.5% нема промене у проценту клијавости. Тек при повећању концентрације соли на 1%, проценат клијавости код семена пшенице опада. Код семена камилице и босиљка проценат клијавости почиње да опада са повећањем концентрације соли на 0.25%.

Са порастом концентрације NaCl у подлози израчунате просечне дужине клице се постепено смањују. Просечне дужине клице показују да је гибберелин успео да стимулише раст хипокотила у свим концентрацијама соли и тиме, у извесној мери неутралише токсичан ефекат. Насупрот стимулацији раста хипокотила, показало се да гибберелин у великом броју случајева инхибира раст корекнка. За апсцисинску киселину се показало да има инхибиторни ефекат. Гибберелин у комбинацији са апсцисинском киселином није успео да неутрализује инхибиторно дејство апсцисинске киселине већ га је знатно стимулисао.

Реакција на присуство стреса код биљака регулисана је различитим генетичким и епигенетичким механизмима, приликом чега је доказано да један део регулације генске експресије зависи од присуства и интензитета стреса који потиче из животне средине. Лабораторијским испитивањима утврђено је да се према одбрамбеном механизму биљке деле на отпорне и неотпорне, при чему је издржљивост отпорних врста последица способности да путем различитих механизма неутралишу штетне ефекте (Mirouze и Paszkowski, 2011).

Ефекат гибберелина у процесу клијању семена, посебно житарица, испитиван је експерименталним условима, при чему је поред осталог, утврђено да контролише синтезу  $\alpha$ -амилазе у алеуронском слоју житарица која доводи до хидролизе скроба у ендосперму. Такође, било је доказано да ослобађање ензима из алеуронског слоја у ендосперм зависи од гибберелина. Међутим, ефекат гибберелина на мобилизацију складиштеног материјала у ендосперму, вероватно није механизам који утиче на клијање, већ енергија која се ослобађа разлагањем скроба, а која се користи за појачане метаболичке процесе у семену. Настанком сахарозе припрема се и супстрат за дисање, чиме се обезбеђује одвијање једног од основних физиолошких процеса (Murphy и Briggs, 1973).

Истраживања новијег датума су потврдила важну улогу гибберелина у процесу клијања семена, преко мултиплог регулаторног механизма. Међутим, стимулаторни ефекат гибберелинске киселине на клијање семена није исти код свих житарица (Bell *и сар.* 1995).

Велики број истраживања потврђује чињеницу да је процес клијања семена под контролом хормона. Постоји више хипотеза које објашњавају улогу хормона у овом процесу, а најприхватљивија је она која истиче велику улогу гибберелина у процесу деактивације инхибитора клијања, присутних у семеном омотачу. По неким новијим истраживањима, модел деловања хормона у процесу клијања заснива се на антагонизму цитокинина и инхибитора, што би могло да буде неко од следећих истраживања.

Дефицијенција хормона у семену може да буде узрок инхибиције клијања, без обзира на количину присутних инхибитора. У случају високог нивоа инхибитора, до клијања ће доћи само ако се егзогено примене хормони стимулатори клијања. Присуство соли у подлози инхибиторно утиче на клијање семена, зато што у заслањеној средини долази до промене у доступности резервних материја семену, што онемогућава њихово клијање. Имајући у виду да је вода пресудан фактор за започињање процеса клијања, може се рећи да је главни негативни ефекат заслањености на клијање управо онемогућено усвајање воде. Повећана концентрација соли негативно утиче на раст и развој биљака на два начина. При негативном осмотском потенцијалу у спољашњој средини биљке не могу да усвајају воду (Khaјeh-Hossein *и сар.* 2003). Поред свих селективних механизма биљке не могу да спрече пасивно примање соли.

Повећана укупна концентрација соли инактивира многе ензиме и инхибира различите метаболичке процесе. Накупљање соли у међућелијском простору и у различитим деловима ћелија доводи до оштећења површине ћелијских мембрана, што се неповољно одражава на раст и развој биљака (Speer и Kaiser, 1991). Ово су уједно ефекти којима заслањена средина неповољно утиче и на клијавост семена.

Позитиван ефекат абсцисинске киселине као хормона важног у условима стреса, није испољен у процесу клијања семена испитиваних биљака у присуству NaCl, што указује да клијање семена није стадијум у коме би се третман овим хормоном применио у пракси, за разлику од осталих стадијума раста и развоја који се одвијају почев од клијања па до сазревања плодова и семена.

## ЗАКЉУЧАК

На основу добијених резултата, закључено је да испитиване биљне врсте нису једнако резистентне према стресу изазваном високим концентрацијама соли у подлози. Гиберелин има позитиван ефекат у неутрализацији негативног ефекта соли на клијање, раст и развој гајених биљака. Апсцисинска киселина, упркос томе што се код биљака синтетише као реакција на стрес, у овој фази развића нема никаквих значајних ефеката. Гиберелин у комбинацији са апсцисинком киселином у потпуности губи своје стимулативно дејство. Ови резултати могу помоћи у искоришћавању обрадивих површина са повећаном концентрацијом соли где се уз адекватан избор отпорних врста и уз третман са гиберелином може у великој мери смањити токсично дејство соли на клијање, раст и развој гајених биљака.

## ЗАХВАЛНОСТ

Желим да се захвалим ментору овог рада др Милану Станковић, доценту ПМФ-а у Крагујевцу, на пруженој помоћи током израде рада, кроз одабир теме и квалитетне литературе, сугестијама приликом вршења експеримента, писања рада и израде постера, као и нашој припреми за презентацију рада.

## ЛИТЕРАТУРА

1. M. Nešković, R. Konjević, Lj. Čulafić, *Fiziologija biljaka*, NNK-International, Beograd, 2003.
2. R.M. Sarić, *Fiziologija biljaka*, Naučna knjiga, Beograd, 1975.
3. T.T. Kozłowski, *Seed Biology: Importance, Development and Germination*, Academic Press, New York, 1972.
4. M. Khajeh-Hosseini, A.A. Powell, I.J. Bingham, *The interaction between salinity stress and seed vigor during germination of soyabean seeds*, *Seed Science and Technology*, 2003, **31**, 715-725.
5. M. Speer, W.M. Kaiser, *Ion relations of symplastic and apoplastic space in leaves from Spinacia oleracea L. and Pisum sativum L. under salinity*, *Plant Physiology*, 1991, **97(3)**, 990-997.
6. D.T. Bell, D.P. Rokich, C.J. McChesney, A. Julie, *Effects of Temperature, Light and Gibberellic Acid on the Germination of Seeds of 43 Species Native to Western Australia*, *Plummer Journal of Vegetation Science*, 1995, **6(6)**, 797-806.
7. M. Mirouze, J. Paszkowski, *Epigenetic contribution to stress adaptation in plants*. *Current Opinion in Plant Biology*, 2011, **14**, 1-8.
8. G. J. P. Murphy, D. E. Briggs, *Gibberellin estimation and biosynthesis in germinating Hordeum distichon*. *Phytochemistry*, 1973, **12**, 1299-1308.