

EFEKAT TEŠKIH METALA (Cd, Fe, Ni, Zn) NA KLIJANJE SEMENA *ROBINIA PSEUDOACACIA* L.

Gorica Đelić¹, Marija Marković², Snežana Branković¹, Duško Brković³,
Gordana Vićentijević-Marković⁴, Goran Marković³

Izvod: Matični supstrat je prirodni izvor teških metala u zemljištu. Ubrzanim tehnološkim razvojem antropogeni izvori teških metala su postali značajni zagađivači zemljišta. *Robinia pseudoacacia* L., invazivna vrsta flore Srbije, tolerantna je vrsta prema brojnim ekološkim faktorima što joj omogućava da sve više širi svoj areal. Prvi uslov prirodnog širenja populacija bagrema na različitim zemljištima je mogućnost klijanja semena. U radu smo ispitali sposobnost klijanja semena i rast korenka *R. pseudoacacia* L. u uslovima stresa izazvanim različitim koncentracijama teških metala Cd, Ni, Fe, Zn. Rezultati su pokazali da semena imaju izvesnu stopu tolerantnosti na ispitivane metale u koncentracijama 1 mol/m³, 0,1 mol/m³ i 0,01 mol/m³ svih ispitivanih metala.

Ključne reči: *Robinia pseudoacacia* L., klijanje, teški metali

Uvod

Prisustvo teških metala je jedan od značajnijih vidova zagađenja spoljašnje sredine. Rezistentnost vrsta na toksične supstance je genetički determinisana. Zahvaljujući rezistentnosti neke biljke koriste se za obnavljanje i renaturalizaciju degradiranih prostora. Istraživanja upotrebe drvenastih vrsta u rekultivaciji jalovišta rudnika u Boru (Dožić S. i sar., 2010.) pokazala su da na takvom staništu najbolje preživljavanje, rast i fiziološku vitalnost imaju bagrem, jasen i javor.

Semena *Robinia pseudoacacia* L. mogu da kličaju u prisustvu soli NaCl i Na₂CO₃ koncentracije 10 mol/m³. To ukazuje da je ova vrsta u izvesnom stepenu tolerantna na stres izazvan solima, pa može da opstane i na zaslanjenim zemljištima (Đelić, G. i sar., 2012.).

U našem radu ispitali smo sposobnost klijanja semena bagrema u uslovima stresa izazvanog dejstvom različitih koncentracija teških metala. Ispitivana je klijavost semena vrste *Robinia pseudoacacia* L. u različitim koncentracijama FeCl₂, CdCl₂, NiCl₂, ZnCl₂ i određivana je letalna doza ovih metala za proces klijanja. Istovremeno je vršeno merenje dužine korenka pri različitim koncentracijama ispitivanih teških metala da bi se utvrdila tolerantnost na njih.

¹Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno-matematički fakultet Kragujevac, Radoja Domanovića 12, Kragujevac, Srbija (gdjelic@kg.ac.rs);

²Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za biologiju i ekologiju, Višegradska 33, Niš, Serbia;

³Univerzitet u Kragujevcu, Agronomski fakultet u Čačku, Cara Dušana 34, Čačak, Srbija;

⁴Gimnazija „Takovski Ustanak“, Miloša Velikog 11, Gornji Milanovac, Srbija.

Materijal i metode rada

Za ispitivanje uticaja različitih koncentracija FeCl_2 , CdCl_2 , NiCl_2 , ZnCl_2 na klijanje semena i porast korenka vrste *Robinia pseudoacacia* L, semena su prikupljena u Ovčarsko - kablarskoj klisuri (Zapadna Srbija, 43° 91' 623'' N, 20° 21' 920'' E).

U cilju pripreme semena i uklanjanja dormancije najpre je izvršeno potapanje semena u vodu čija je temperatura 100°C, tri puta po 20 sekundi. Nakon toga postavljeno je po 20 semena u 6 petri kutija na čijem je dnu postavljen filter papir i natopljen sa po 5ml rastvora FeCl_2 koncentracije: 100 mol/m³ (prva petri kutija); 10 mol/m³ (druga petri kutija); 1 mol/m³ (treća petri kutija); 0,1 mol/m³ (četvrta petri kutija); 0,01 mol/m³ (peta petri kutija) i u šestoj kutiji korišćena je destilovana voda (kontrola). Na isti način postavljen je ogled gde je uzrok stresa klijanja semena i rasta korenka rastvor CdCl_2 , NiCl_2 , ZnCl_2 koncentracije 100 mol/m³, 10 mol/m³, 1 mol/m³, 0,1 mol/m³, 0,01 mol/m³. Sve petri kutije su ostavljene na temperaturi od 25°C. Klijanje je praćeno deset dana. Izvršena su tri ponavljanja. Da bi se odredio stepen toksičnosti korišćenih metala vršeno je određivanje procenta klijalih semena i merena dužina korenka.

Rezultati su prikazani tabelarno. Dužine korenka su predstavljene kao srednje vrednosti i podvrgnute statističkoj analizi varijanse. Značajnost razlika je testirana primenom LSD testa na P 0,05 i 0,01.

Rezultati istraživanja i diskusija

Najveći procenat klijavosti semena bagrema postiže se u prirodnim uslovima ranom prolećnom setvom (Yücedağ, C., Cemal, G. H., 2011.). Da bi se otklonila dormancija i omogućilo brže klijanje semena, Aktas A. (2003) predlaže da se seme potopi u ključalu vodu u trajanju od 5 minuta, a zatim da seme bude na sobnoj temperaturi 9 minuta. Basbağ M, Ayzit D. (2010.) su u svojim istraživanjima pokazali da se dormancija semena bagrema uspešno otklanja tako što se seme drži u vodi temperature 90°C u trajanju od 30 minuta.

U našem eksperimentu dormancija semena je otklonjena tako što je seme potapano tri puta po 20 sekundi u ključalu vodu. Nakon toga je postavljen ogled. Semena su počela da klijaju drugi dan (nakon 48 sati) od postavljanja eksperimenta. Na ovaj način klijavost je bila 90% u kontroli (destilovana voda).

Analiza rezultata procenta klijalih semena bagrema izloženih različitim koncentracijama teških metala pokazuje da je procenat klijavosti u obrnutoj srazmeri sa koncentracijom rastvora teških. Letalna koncentracija svih ispitivanih metala je 100 mol/m³ (Tabela 1). Procenat klijalih semena bagrema u rastvorima ZnCl_2 , NiCl_2 , CdCl_2 koncentracije 10 mol/m³ ispitivanih metala je manja od 50%. Cd je u ovoj koncentraciji izuzetno toksičan, jer je klijavost u odnosu na kontrolu manja za 80%, u odnosu na Fe za 39%, Zn za 30%, a Ni za 15%.

U koncentraciji 1 mol/m³ klijavost u rastvorima ispitivanih metala je veća od 50%, ali je značajno smanjena u odnosu na kontrolu i to u rastvoru Fe i Cd za 35%, Zn za 30%, Ni za 25%. Dobijeni rezultati procenta klijavosti semena *R. pseudoacacia* L. ukazuju da semena bagrema mogu da klijaju i u uslovima prisutnih teških metala, što

ukazuje na veliku plastičnost ove vrsta kao invazivne čiji se areal rasprostranjenja sve više širi.

Procenat klijalnih semena u rastvorima teških metala koncentracije 0.1mol/m^3 smanjena je za 20% - 23,5% u odnosu na kontrolu što ukazuje da i pri ovoj koncentraciji svi ispitivani metali dovode do inhibicije procesa klijanja u značajnom procentu. Izvestan toksičan efekat Cd, Fe, Zn je konstatovan i u rastvoru najslabije korišćene koncentracije (0.01mol/m^3). Procenat klijalnih semena manji je u odnosu na kontrolu za 10% (Zn) tj. 15% (Cd i Fe).

Na osnovu analize toksičnog efekta na procenat klijalnih semena u rastvorima ZnCl_2 , NiCl_2 , FeCl_2 , CdCl_2 , metale možemo da poredamo u niz: $\text{Cd} > \text{Zn} > \text{Fe} > \text{Ni}$.

Tabela 1. % klijalnih semena *Robinia pseudoacacia* L. u rastvorima ZnCl_2 , NiCl_2 , FeCl_2 , CdCl_2 i destilovanoj vodi

Table 1. The % of germinated *Robinia pseudoacacia* L. seeds in solutions of ZnCl_2 , NiCl_2 , FeCl_2 , CdCl_2 and control

Rastvor solutions / koncentracija concentration	NiCl_2	ZnCl_2	FeCl_2	CdCl_2
100mol/m^3	0	0	0	0
10mol/m^3	25	40	49	10
1mol/m^3	65	50	55	55
0.1mol/m^3	72,5	50	67,5	65
0.01mol/m^3	90	65	75	75
Destilovana voda distilled water	90	90	90	90

Stepen toksičnosti teških metala (ZnCl_2 , NiCl_2 , FeCl_2 , CdCl_2) je određivan i na osnovu rasta primarnog korenka klice bagrema. U uslovima stresa izazvanog prisustvom teških metala dolazi do usporenja ili potpune inhibicije rasta korenka.

Cd je izuzetno toksičan teški metal. Nije esencijalan, ali ga biljke usvajaju (Porębska, G., Ostrowska, A., 1999.). Kadmijum usvojen iz hranljive podloge uglavnom se zadržava u korenu. Visoke koncentracije kadmijuma u biljkama inhibiraju disanje i transport elektrona u procesu oksidativne fosforilacije, inhibiraju metabolizam usled interakcija sa cinkom, izazivaju hlorozu i time smanjuju intezitet fotosinteze.

Povećana količina elemenata mineralne ishrane biljaka, čak onih koji su esencijalni, dovodi do fitotoksičnosti. Zn je metal koji je biljkama potreban jer ima biogenu funkciju i može da ima stimulatívno dejstvo na rast klice ako deluje u koncentraciji manjoj od 10ppm (Gracanin, M., Ilijanic, Lj., 1977.). U slučaju kada je njegova koncentracija u spoljašnjoj sredini visoka, taloži se u korenu (Broadley, RM., i sar., 2007.). Nikl je esencijalni element potreban za rast biljaka i resorpciju gvožđa, ulazi u sastav enzima značajnih za odvijanje životnih procesa (Chen, C., i sar., 2009.). U slučaju nedostatka Ni kod biljaka dolazi do nekroze listova (Eskew, L.D i sar., 1984.). Visoke koncentracije nikla inhibiraju apsorpciju Fe, Zn. Toksičnost nikla kod biljaka se objašnjava time što nikl u biljci može da dođe u interakciju sa esencijlnim elementima

ili pak da izazove oksidativni stres (Chen, C., i sar., 2009.). Nikl remeti Krebsov ciklus. I gvožđe je esencijalni nutritijen. Neophodan je za sintezu hlorofila, metabolizam azota, disanje, fotosintezu. Međutim, u većim količinama gvožđe ima toksični efekat što se manifestuje usporenim rastom korena (Connoly, L.E., Guerinot, M.L. 2002.).

Najjače inhibitorno dejstvo na rast korenka ima kadmijum (Tabela 2). U koncentraciji 10 mol/m³ korenak je imao dužinu od 0,3mm što je u odnosu na kontrolu kraće za 6.3 mm (tj 93%), u odnosu na NiCl₂ kraće za 0,5 mm (tj 62%), u odnosu na FeCl₂ kraće za 0,9 (tj 75%) i u odnosu na ZnCl₂ kraće za 1,6 mm (tj 81%). Kadmijum u koncentracijama 1mol/m³, 0,1mol/m³ ima najjače toksično dejstvo koje se ogleda u najmanjem porastu korenka klice bagrema (Tabela 2).

Tabela 2. Dužina korenka (mm) klice *Robinia pseudoacacia* L. u rastvorima NiCl₂, ZnCl₂, FeCl₂, CdCl₂ i destilovanoj vodi
 Table 2. Radicle length (mm) of *R. pseudoacacia* L. germs in solutions of NiCl₂, ZnCl₂, FeCl₂, CdCl₂ and distilled water

Rastvor solutions / koncentracija concentration	NiCl ₂	ZnCl ₂	FeCl ₂	CdCl ₂
100mol/m ³	0	0	0	0
10mol/m ³	0.8 (0.4-1.1)	1,6 (0.3-3.2)	1,2 (0,2-3)	0,3 (0,3-0,5)
1 mol/m ³	4,7 (0.5-8)	5 (1.3-8)	3,1 (0.5-9)	1,7 (0,3-4)
0.1mol/m ³	6,1 (0.5-12)	5,1 (1.2-10)	4,6 (0.3-10)	4,1 (0,3-9,3)
0.01mol/m ³	6,2 (2-12,2)	5,7 (0.6-10.5)	4,8 (0.3-8.5)	5,5 (0,3-10,3)
Destilovana voda distilled water	6.6	6.6	6.6	6.6
LSD 0.05 0.01	A- Koncentracije concentration	B- Teški metali heavy metal	Interakcije – interactions A x B	
	2.709	2.467	7.045	
	3.602	3.630	9.257	

Cd i Fe u koncentraciji 1mol/m³ pokazuju izrazitu toksičnost. Dužina korenka smanjena je za 73% u rastvoru Cd i 53% u rastvoru Fe, u odnosu na kontrolu. U ovoj koncentraciji meristemsko tkivo korenčića oseljivo je i na Ni jer je dužina manja za 1,9 mm (tj. 29%) i na Zn gde je dužina korenka manja za 1,6 mm (tj. 24%) u odnosu na kontrolu. U rastvorima koncentracije 0.1 mol/m³ korenak je kraći za 2,5 mm (tj 38%) u rastvoru Cd, za 2 mm (tj. 30,3%) u rastvoru Fe, za 1,5 mm (tj. 22,7%) u rastvoru Zn i za 0,5 mm (tj. 7,5%) u rastvoru Ni u odnosu na kontrolu.

Najslabiji toksični efekat ispitivanih rastvora teških metala na porast korenka klice bagrema konstatovan je u najslabije korišćenju koncentraciji (0,01 mol/m³). U ovoj koncentraciji Fe ima najjači efekat u odnosu na ostale metale, jer je dužina korenka u

rastvoru FeCl_2 smanjena za 1,8 mm (tj. za 27%) u odnosu na kontrolu, za 14% u odnosu na CdCl_2 , za 16% u odnosu ZnCl_2 i za 29% u odnosu na NiCl_2 .

Na osnovu analize dužine korenka ispitivane metale možemo da poredamo u niz:

$\text{Cd} > \text{Fe} > \text{Zn} > \text{Ni}$.

Jači toksični efekat ispitivanih teških metala se ispoljava na porast korenka nego na procenat klijalih semena. U koncentraciji 10 mol/m^3 smanjenje dužine korenka u rastvoru CdCl_2 je za 95,4% u odnosu na kontrolu, a smanjenje procenta klijavosti je za 80% (Tabela 1). U koncentraciji 10 mol/m^3 smanjenje dužine korenka u rastvoru NiCl_2 je za 87% u odnosu na kontrolu, a smanjenje procenta klijavosti je za 65%; u rastvoru FeCl_2 za 81% u odnosu na kontrolu, a smanjenje procenta klijavosti je za 51%; u rastvoru ZnCl_2 za 75% u odnosu na kontrolu, a smanjenje procenta klijavosti je za 50% (Tabela 1). Sa smanjenjem koncentracije razlike su manje. Ovi rezultati navode da je za analizu stepena toksičnosti ispitivanih metala nešto značajniji pokazatelj porast korenka nego procenat klijavosti.

Analiza varijanse dvofaktorijalnog ogleada i testiranje značajnosti razlika LSD testom za nivo rizika P 0,05 i 0,01 ukazuje da postoje statistički značajne razlike za sve korišćene koncentracije ispitivanih metala (osim za Ni u koncentraciji $0,01 \text{ mol/m}^3$ i $0,1 \text{ mol/m}^3$) u poređenju sa kontrolom. Konstatovane su i statistički značajne razlike između različitih koncentracija, između različitih metala i inercije teških metala i koncentracije (Tabela 2).

Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata možemo zaključiti da toksični efekat teških metala (Cd, Fe, Ni, Zn) na klijanje i porast korenka semena *R. pseudoacacia* L. zavisi od metala i od koncentracije. Letalna koncentracija korišćenih teških metala je 100 mol/m^3 , a koncentracija 10 mol/m^3 je subletalna, jer je klijavost manja od 50%.

S obzirom da je klijavost veća od 50% u rastvorima koncentracije 1 mol/m^3 i slabijim, možemo zaključiti da je na te koncentracije teških metala vrsta *Robinia pseudoacacia* L. u izvesnom stepenu tolerantna. To ukazuje na mogućnost primene bagrema u fitoremedijaciji zemljišta koja sadrži ove metale.

Literatura

- Aktas A, (2003): Yalancı Akasya'nın (*Robinia pseudoacacia* L.) Tohum-Fidan Özellikleri Arasındaki İlişkiler İle Fidanlıkta Yetistirme Tekniği Üzerine Araştırmalar. Master Thesis, SDÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, 104 pp.
- Basbağ, M., Ayzit, D. (2010): The Effects of Different Temperatures And Duration Which Applied on Black Locust (*Robinia pseudoacacia* L.) and Honeylocust (*Gleditsia triacanthos* L.) Seed Germination Rates.III. Ulusal Karadeniz Ormancılık Kongresi, 2: 759-765.
- Broadley, RM., White, J W., Hammond, PJ, Zelko, I., Lux, A. (2007): Zinc in plants, New Phytologist Volume 173, Issue 4, 677-702.
- Chen, C., Huang, D., Liu, J. (2009): Functions and Toxicity of Nickel in Plants: Recent Advances and Future Prospects, Clean 37 (4–5), 304 – 313.

- Connolly, L.E., Guerinot, M.L.(2002): Iron stress in plants, *Genome Biol.* 2002; 3(8): reviews 1024.1– reviews 1024.4.
- Djelic, G., Stajic, J., Stankovic, M., Stefanovic, M. (2012): Uperedni efekti delovanja soli natrijuma (NaCl, Na₂CO₂) na klijanje semena vrste *Robinia pseudoacacia* L., XVII Savetovanje o biotehnologiji, Zbornik radova, 254-258.
- Dožić, S., Đukić, M., Bogdanović, G., Stanojlović, R., Lukić, S., Đunisijević-Bojović, D. (2010): New approach to the reclamation of the old flotation tailings in Bor. *Bulletin of the Faculty of Forestry* 101, 35-48.
- Eskew, L.D., Welch, M.R., Wendell, A.N., (1984): Nickel in Higher Plants Further Evidence For an Essential Role, *Plant Physiol.* 76, 691-693.
- Gracanin, M., Ilijanic, Lj. (1977): Uvod u ekologiju biljaka, Školska knjiga, Zagreb.
- Porębska, G., Ostrowska, A. (1999): Heavy Metal Accumulation in Wild Plants: Implications for Phytoremediation, *Polish Journal of Environmental Studies* Vol. 8, No. 6, 433-442.
- Yücedağ, C., Cemal, G. H. (2011): The effect of sowing time on germination of twenty two Leguminosae species, *African Journal of Agricultural Research* Vol. 6(16), pp. 3809-3816.

THE EFFECT OF HEAVY METALS (CD, FE, NI, ZN) ON GERMINATION OF *ROBINIA PSEUDOACACIA* L. SEEDS

Gorica Đelić¹, Marija Marković², Snežana Branković¹, Duško Brković³, Gordana Vićentijević-Marković⁴, Goran Marković³

Abstract

In our study we researched the inhibitory effect of different concentrations of heavy metals (Cd, Fe, Ni, Zn) on germination and growth on *Robinia pseudoacacia* L. radicle. The results showed that the percentage of seed germination and growth of radicle is inversely correlated with the concentration of the investigated metals. The strongest inhibitory effect has cadmium and the weakest effect has nickel. *Robinia pseudoacacia* L. is tolerant, to some degree on the concentration of heavy metals of 1 mol /m³, 0.1 mol /m³ and 0.01 mol /m³.

Key words: *Robinia pseudoacacia* L., germination, heavy metals

¹University of Kragujevac, Faculty of Science Kragujevac, Radoja Domanovića 12, Kragujevac, Serbia (gdjelic@kg.ac.rs);

²University of Nis, Faculty of Science, Višegradska 33, Niš, Serbia;

³University of Kragujevac, Faculty of Agronomy Čačak, Cara Dušana 34, Čačak, Serbia;

⁴"Takovski Ustanak", Grammar School, Gornji Milanovac, Serbia.