



Pracownia studencka
Katedra Analizy Środowiska

Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych

Ćwiczenie nr 3

BADANIE WPŁYWU ZASOLENIA GLEBY NA KIEŁKOWANIE I ROZWÓJ SIEWEK POMIDORA JADALNEGO

Chemiczne zagrożenia środowiska

Gdańsk, 2017

1. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

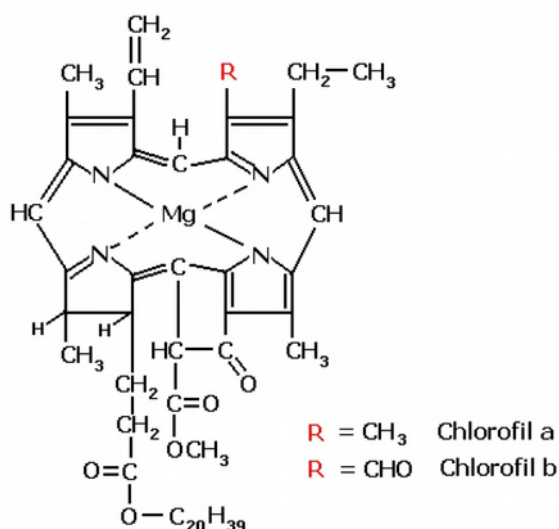
Stres abiotyczny (tzn. niezwiązany z działalnością organizmów), obejmujący przede wszystkim niedobory wody oraz zasolenie gleb, jest głównym powodem obniżania plonów we współczesnej produkcji rolnej [1]. Zasolenie gleby obejmuje w chwili obecnej blisko 20% całkowitej powierzchni uprawnej [2]; wartość ta jest nawet wyższa w przypadku gleb wymagających nawadniania. Problem ten dotyczy głównie ziem uprawnych w Azji oraz Ameryce Południowej, ale narasta także na innych kontynentach, włączając w to Europę. Zasolenie gleby powoduje szereg niekorzystnych efektów u roślin uprawnych, włączając w to:

- ograniczenie zdolności nasion do kiełkowania
- ograniczenie lub zatrzymanie wzrostu roślin, prowadzące do obniżenia biomasy
- zmniejszenie produkcji chlorofilu i ograniczenie fotosyntezy
- zaburzenie struktury chloroplastów
- ogólne zaburzenie metabolizmu roślin

Pomidor jadalny (*Solanum lycopersicum* L.) to jedno z najważniejszych warzyw we współczesnym rolnictwie, z bardzo szybko rosnącą skalą upraw. Jest rośliną umiarkowanie podatną na negatywne działanie zasolenia gleby, którego efektem jest przede wszystkim znaczny spadek plonów [3]. Obserwowano liczne reakcje roślin pomidora jadalnego na zasolenie gleby [4-9]:

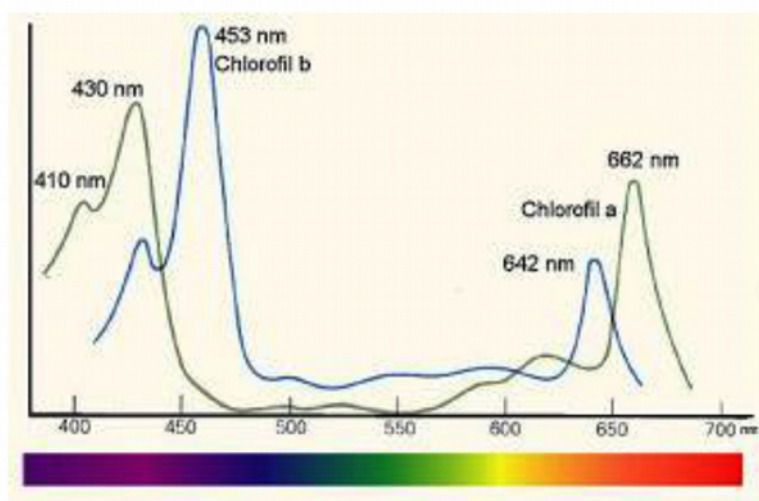
- obniżenie tempa i skuteczności kiełkowania nasion
- mniejszy pobór wody oraz spowolniony wzrost
- obniżenie intensywności procesu fotosyntezy

Wpływ negatywnych czynników, w tym zasolenia gleby, na intensywność procesu fotosyntezy wiąże się często z ograniczeniem produkcji barwników fotosyntetycznych, czyli chlorofilu. Notowane u roślin lądowych typy chlorofilu to głównie chlorofil a i b. Pierwszy z nich jest głównym fotoreceptorem w chloroplastach u większości roślin zielonych. Jest to związek pochodny tetrapirołu; cztery atomy azotu w pierścieniach pirolowych są związane wiązaniami koordynacyjnymi z atomem magnezu. Inną charakterystyczną cechą chlorofilu jest obecność fitolu, silnie hydrofobowego 20-węglowego alkoholu, przyłączonego wiązaniem estrowym do łańcucha alifatycznego jednego z pierścieni pirolowych. Chlorofil b różni się od chlorofilu a tym, że zawiera grupę formylową zamiast metylowej w jednym z pierścieni pirolowych. Struktury chemiczne opisywanych związków przedstawiono na **Rysunku 1**.



Rysunek 1. Struktura chlorofilu a i b.

Chlorofile są bardzo efektywnymi fotoreceptorami, ponieważ posiadają wiązania podwójne w układzie sprzężonym. Tego typu związki, zwane polienami, mają silne pasma absorpcji w zakresie światła widzialnego, które stanowi główną część promieniowania dochodzącego do powierzchni Ziemi. Molarne współczynniki absorpcji chlorofilu a i chlorofilu b są większe od $10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$, co oznacza, że należą do najwyższych, jakie wyliczono dla związków organicznych. Widma absorpcyjne chlorofilu a i b są różne. Promieniowanie słabo absorbowane przez chlorofil a przy długości fali 460 nm, jest silnie pochłaniane przez chlorofil b (**Rysunek 2**). Dwa rodzaje chlorofilu uzupełniają się zatem w pochłanianiu promieniowania słonecznego.



Rysunek 2. Widmo absorpcyjne chlorofilu a i b.

Celem niniejszego ćwiczenia jest określenie wpływu zasolenia gleby na tempo i skuteczność kiełkowania nasion pomidora jadalnego, wzrost siewek oraz zawartość chlorofilu w częściach zielonych roślin.

2. WYKONANIE ĆWICZENIA

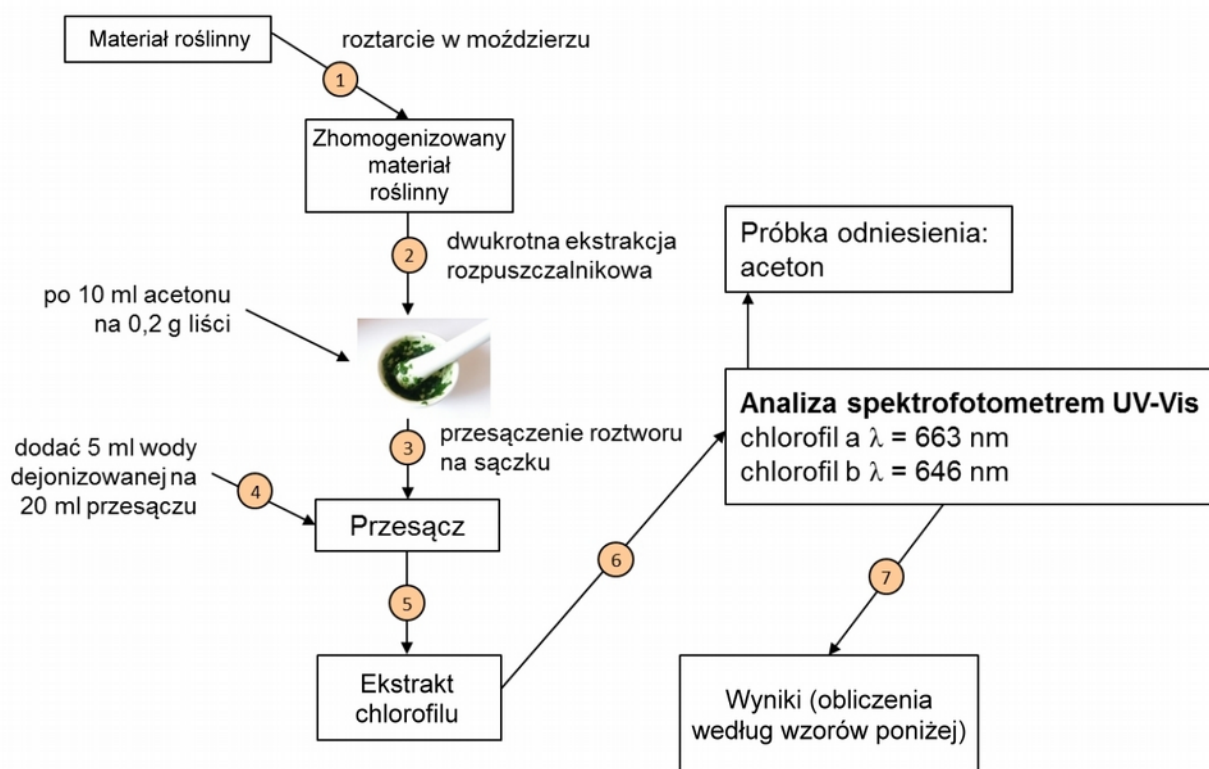
UWAGA! Ćwiczenie jest wykonywane na dwóch zajęciach, z dwu- lub trzytygodniową przerwą!!!

I. CZĘŚĆ PIERWSZA – PRZYGOTOWANIE EKSPERYMENTU

1. Przygotować po 1 dm³ (wystarczy dla całej grupy!) roztworu chlorku sodu w wodzie wodociągowej o stężeniu 0,05 mol dm⁻³ oraz 0,10 mol dm⁻³ (odpowiednio 2,9 g i 5,8 g NaCl na litr wody).
2. Odważyć próbkę około 60 g (± 1 g) gleby na folii aluminiowej. Glebę rozłożyć cienką warstwą na folii i umieścić na 90 minut w suszarce w temperaturze 120°C. Po ostygnięciu zważyć glebę w celu ustalenia zawartości wody.
3. Eksperyment jest prowadzony w każdej grupie laboratoryjnej w **trzech podgrupach**, każda grupa przygotowuje niezależny eksperyment w jednej doniczce o 24 komorach. Doniczka jest dzielona na trzy części po 8 komór: grupa kontrolna (woda wodociągowa) oraz dwie grupy poddane stresowi (roztwory soli o stężeniu 50 i 100 mM). Każdą z komór doniczki należy napełnić tą samą ilością (± 2 g) gleby tak, by jej lekko ubita warstwa znajdowała się około 1 cm poniżej krawędzi doniczki.
4. W każdej komorze umieścić jednakową liczbę (po 2) nasion wskazanych przez prowadzącego; nasiona powinny zostać umieszczone około 0,5 cm pod powierzchnią gleby, a powierzchnia lekko ubita palcami. Następnie, należy podlać każdą komorę 40 ml odpowiedniego roztworu: grupę kontrolną wodą wodociągową, grupy poddane stresowi roztworami NaCl o stężeniu 50 i 100 mM. Obliczyć zawartość NaCl na gram suchej masy gleby.
5. Znając zawartość wody w stosowanej glebie, obliczyć suchą masę gleby w pojedynczej komorze doniczki.

II. CZĘŚĆ DRUGA – OKREŚLENIE WYNIKÓW

1. Tempo kiełkowania nasion należy obserwować, począwszy od siódmego dnia od przygotowania eksperymentu, codziennie lub w odstępach dwudniowych, notując liczbę siewek w każdej z grup.
2. Po zakończeniu eksperymentu, w każdej grupie określić liczbę żywych siewek.
3. Wszystkie części nadziemne roślin z każdej grupy zebrać (OSOBNIE DLA KAŻDEGO STĘŻENIA SOLI ORAZ GRUPY KONTROLNEJ) i określić łączną świeżą masę materiału roślinnego w każdej grupie. Następnie, odważyć ok. 50% materiału i umieścić na folii aluminiowej w suszarce, w temperaturze 80°C na 60 minut. Po tym czasie, ponownie zważyć próbki materiału roślinnego na wadze analitycznej w celu określenia suchej masy oraz zawartości wody.
4. Pozostałą część materiału roślinnego z każdej grupy poddać ekstrakcji acetonem w celu wyizolowania chlorofilu tak, jak opisano na **Rysunku 3**.



Rysunek 3. Schemat ekstrakcji chlorofilu z materiału roślinnego.

5. Dokonać pomiaru absorbancji dla 1 ml każdego ekstraktu zgodnie ze wskazaniami prowadzącego, przy długościach fali 646 i 663 nm. Jako ślepą próbę zastosować czysty aceton. Zanotować wyniki.
6. Zanieczyszczoną glebę umieścić w pojemniku wskazanym przez prowadzącego. Dokładnie umyć doniczki i usunąć napisy metanolem!

3. OPRACOWANIE WYNIKÓW

UWAGA! Wyniki są opracowywane przez całą grupę, na podstawie wartości średnich, obliczonych dla trzech podgrup. W sprawozdaniu należy podać pojedyncze wartości, wartość średnią oraz odchylenie standardowe dla wszystkich wyznaczonych wielkości.

1. Na podstawie obserwacji, ocenić wpływ zasolenia gleby na tempo kiełkowania (mile widziany wykres). Oszacować czas, potrzebny do wykiełkowania 50% nasion w każdej grupie.
2. Określić, jak zasolenie gleby wpływa na świeżą oraz suchą masę części nadziemnych roślin.
3. Obliczyć zawartość chlorofilu całkowitego oraz chlorofilu a i b w materiale roślinnym (w mg/g suchej masy) na podstawie pomiarów spektrofotometrycznych. W tym celu zastosować równania zaproponowane dla ekstraktów w 80% acetonie przez Wellburna [10]:

$$C_a = 12,21 \times A_{663} - 2,81 \times A_{646}$$

$$C_b = 20,13 \times A_{646} - 5,03 \times A_{663}$$

gdzie: C_a – stężenie chlorofilu a w ekstrakcie ($\mu\text{g/ml}$), C_b – stężenie chlorofilu b w ekstrakcie ($\mu\text{g/ml}$); A_{663} – absorbancja przy długości fali 663 nm; A_{646} – absorbancja przy długości fali 646 nm

4. Znając całkowitą objętość ekstraktów (25 ml), stężenie obu typów chlorofilu w ekstrakcie, świeżą masę roślin użytych do ekstrakcji oraz zawartość wody w materiale roślinnym, obliczyć dla każdej grupy roślin zawartość chlorofilu a i b oraz ich sumy w mg/g suchej masy. Wyniki przedstawić w formie tabeli.

5. Przedyskutować uzyskane wyniki oraz ich rozrzut (odchylenia standardowe) w obrębie całej grupy laboratoryjnej.

4. SZKŁO I ODCZYNNIKI

- chlorek sodu NaCl
- aceton
- metanol cz.
- doniczki
- gleba, nasiona pomidora jadalnego
- kolba miarowa 1 dm³ (2 szt.)
- folia aluminiowa
- metalowa łyżka – 3 szt.
- cylinder miarowy 50 mL – 6 szt.
- pipeta 10 mL – 3 szt.
- pipeta 5 mL – 3 szt.
- moździerz z tłuczkiem – 3 szt.
- zlewka 50 mL – 9 szt.
- kolba miarowa 25 mL – 9 szt.
- lejek – 9 szt.
- sączone
- pompka do pipet
- ręczniki papierowe
- rękawiczki

5. LITERATURA

1. Vinocur, B., Altman, A., 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology*, **16**, 123–132.
2. Fageria, N.K., Stone, L.F., dos Santos, A.B., 2012. Breeding for salinity tolerance, W: Fritsche-Neto, R., Borém, A. (Ed.), *Plant Breeding for Abiotic Stress Tolerance*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 103–122.
3. Katerji, N., van Hoorn, J.W., Hamdy, A., Mastrorilli, M., 2000. Salt tolerance classification of crops according to soil salinity and to water stress day index. *Agricultural Water Management*, **43**, 99–109.

4. Cuartero, J., Fernández-Muñoz, R., 1999. Tomato and salinity. *Scientia Horticulturae*, **78**, 83–125.
5. Kaveh, H., Nemati, H., Farsi, M., Jartoodeh, S.V., 2011. How salinity affect germination and emergence of tomato lines. *Journal of Biological & Environmental Sciences*, **5**, 159–163.
6. Singh, J., Sastry, E.V.D., Singh, V., 2012. Effect of salinity on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) during seed germination stage. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, **18**, 45–50.
7. Shalhevet, J., Yaron, B., 1973. Effect of soil and water salinity on tomato growth. *Plant and Soil*, **39**, 285–292.
8. Sholi, N.J.Y., 2012. Effect of salt stress on seed germination, plant growth, photosynthesis and ion accumulation of four tomato cultivars. *American Journal of Plant Physiology*, **7**, 269–275.
9. Wang, X., Geng, S., Ri, Y.-J., Cao, D., Liu, J., Shi, D., Yang, C., 2011. Physiological responses and adaptive strategies of tomato plants to salt and alkali stresses. *Scientia Horticulturae*, **130**, 248–255.
10. Wellburn, A.R., 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, **144**, 307–313.