

Sveučilište u Zagrebu  
Agronomski fakultet

Bernardica Jelčić

**Ublažavajući učinak arbuskularne mikorize na  
stres izazvan nedostatkom fosfora kod pšenice**

Zagreb, 2017.

Ovaj rad je izrađen na Sveučilištu u Zagrebu, Agronomskom fakultetu, Zavodu za ishranu bilja, pod vodstvom doc. dr. sc. Borisa Lazarevića i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2016/2017.

## Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Fosfor u tlu	1
1.2. Usvajanje i asimilacija fosfora	1
1.3. Uloga fosfora u biljci	2
1.3.1. Uloga fosfora u fotosintezi	2
1.3.2. Fluorescencija klorofila kao mjera stresa kod biljaka	4
1.4. Mehanizmi prilagodbe biljke na nedostatak fosfora	5
1.5. Arbuskularna mikoriza	6
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	8
3. MATERIJALI I METODE	9
3.1. Biljni materijal	9
3.2. Priprema sjemena	9
3.3. <i>Pouch</i> sustav	10
3.4. Eksperimentalni dizajn i tretmani	12
3.5. Mjerenja	12
3.5.1. Analize morfoloških karakteristika korijena	12
3.5.2. Mjerenja fluorescencije klorofila	14
3.5.3. Određivanje suhe tvari i koncentracije fosfora	14
3.5.4. Statistička obrada podataka	14
4. REZULTATI	16
4.1. Rezultati analize morfoloških karakteristika korijena	16
4.2. Rezultati analize morfoloških karakteristika korijenovih dlačica	20
4.3. Rezultati analize koncentracije fosfora u biljnom materijalu	21
4.4. Rezultati analize mjerenja fluorescencije klorofila	25
5. RASPRAVA	28

5.1. Utjecaj arbuskularne mikorize na morfološke karakteristike korijena u uvjetima smanjene dostupnosti fosfora _____	28
5.2. Utjecaj arbuskularne mikorize na primanje fosfora i suhu tvar nadzemnih organa pšenice _____	29
5.3. Utjecaj arbuskularne mikorize na promjene fluorescencije klorofila u uvjetima nedostatka fosfora _____	30
6. ZAKLJUČCI _____	32
7. POPIS LITERATURE _____	33
8. SAŽETAK _____	36
9. SUMMARY _____	38
10. ŽIVOTOPIS AUTORICE _____	40

# 1. UVOD

## 1.1. Fosfor u tlu

Fosfor je, u usporedbi s drugim esencijalnim biljnim hranivima, najslabije pokretno i biljkama najmanje pristupačno hranivo u tlu (Manschadi i sur., 2013). Iako su tla generalno dobro opskrbljena fosforom, on se u velikoj mjeri nalazi u biljci nepristupačnim oblicima (Vance i sur., 2002; Schachtman i sur., 1998), budući da je anorganski fosfat koji biljke usvajaju slabo topiv u otopini tla (Lopez-Bucio i sur., 2003). Uzimajući u obzir navedeno, ovo je hranivo često jedan od glavnih ograničavajućih čimbenika za rast i razvoj biljke (Vance i sur., 2002; Schachtman i sur., 1998; Lynch, 2011; Li i sur., 2003).

Sadržaj fosfora u litosferi vrlo je promjenjiv (0,02-0,15%) (Vukadinović i Vukadinović, 2011), a smanjena dostupnost biljci uzrokovana je interakcijom fosfatnih aniona i kationa u otopini tla, te vezanjem za organsku tvar djelovanjem mikroorganizama (Raghothama, 2000). Pri kiseljoj reakciji tla fosfor se veže u netopive spojeve s kationima aluminijska i željeza (Vance i sur., 2002), dok u neutralnim i lužnatim tlima formira slabo topive kalcijeve fosfate (Vukadinović i Vukadinović, 2011).

## 1.2. Usvajanje i asimilacija fosfora

Biljke usvajaju fosfor isključivo u anionskom obliku i to kao  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  i  $\text{HPO}_4^{2-}$  (Vukadinović i Vukadinović, 2011). Riječ je o anionskim oblicima koji se u otopini tla nalaze u iznimno niskim koncentracijama (0,1-10  $\mu\text{M}$ ) (Vance i sur., 2002). Zbog jake sorpcije fosfata od strane adsorpcijskog kompleksa tla, primanje fosfora se odvija difuzijom (Lynch i Brown, 2001), tj. pasivnim transportom hraniva niz koncentracijski gradijent (Taiz i Zeiger, 2012). Koeficijent difuzije fosfatnih aniona izuzetno je nizak, te ih korijen biljke može apsorbirati samo iz volumena tla koji se nalazi u neposrednoj blizini njegove aktivne površine (Manschadi i sur., 2013).

Fosfor se simplastnim putem kreće od površine korijena do ksilema (Vance i sur., 2002) te se ksilemom translocira u nadzemni dio biljke (Marschner, 2012). Koncentracija fosfora u biljnim tkivima iznosi 0,05-0,50% (Vance i sur., 2002). U stanici se nalazi kao anorganski fosfat, ester ili anhidrid (Pevalek-Kozlina, 2003).

### 1.3. Uloga fosfora u biljci

Fosfor je jedno od najvažnijih biljnih makrohraniva te je neophodan za funkcioniranje brojnih metaboličkih procesa u stanici i biljci, a osobito za reakcije vezane uz prijenos energije i genetskog materijala (Rychter i Rao, 2005). Fosfor ima ulogu u važnim metaboličkim procesima koji uključuju sintezu ATP-a, sintezu nukleinskih kiselina, fotosintezu, glikolizu, stanično disanje, sintezu i stabilnost biomembrana, aktivaciju odnosno inaktivaciju enzima, redoks reakcije te fiksaciju dušika (Vance i sur., 2002). Pomoću metabolizma ATP-a, fosfor regulira fotosintetski transport elektrona (Taiz i Zeiger, 2012) te ostale metaboličke reakcije unutar kloroplasta i citosola (Marschner, 2012).

Marschner (2012) navodi da se simptomi stresa uzrokovani nedostatkom fosfora primarno javljaju na starijim organima biljke. Kod jače izraženog nedostatka, slabo se razvija korijenov sustav, cvjetanje i zrioba biljaka kasne, smanjena je tvorba proteina uz povišen sadržaj amida i nizak je sadržaj vitamina (Vukadinović i Vukadinović, 2011). Listovi mogu biti malformirani i sadržavati nekrotične mrlje (Pevalek-Kozlina, 2003), a mogu se pojaviti i crvenkaste ili purpurne nijanse uzrokovane povećanom sintezom antocijana, što signalizira duži nedostatak fosfora (Vukadinović i Vukadinović, 2011).

#### 1.3.1. Uloga fosfora u fotosintezi

Fotosinteza je primarni fiziološki proces u kojem  $\text{CO}_2$  zbog koncentracijskog gradijenta ulazi iz atmosfere kroz puči u mezofil lista gdje se uz pomoć fotokemijskih reakcija asimilira u organske spojeve (Rychter i Rao, 2005). Kod viših biljaka postoji samo jedan proces kojim se  $\text{CO}_2$  ugrađuje u organske spojeve, a to je ciklus redukcije ugljika ili Calvinov ciklus. Calvinovom ciklusu prethode svjetlosne reakcije u kojima se svjetlosna energija pohranjuje u obliku energijom bogatih molekula, ATP-a i NADPH, koje omogućuju odvijanje reakcija Calvinovog ciklusa (Taiz i Zeiger, 2012). Fosfor je esencijalan element za sintezu ATP-a te NADPH (Taiz i Zeiger, 2012). Nadalje, produkt vezivanja  $\text{CO}_2$  u Calvinovom ciklusu je trioza-fosfat koji nakon sinteze izlazi iz kloroplasta u citosol, gdje služi kao supstrat za sintezu saharoze. Pri sintezi saharoze iz trioza-fosfata, oslobađa se anorganski fosfat (Pi) koji se ponovno vraća u kloroplast. Izbacivanje trioza-fosfata iz kloroplasta i ubacivanje Pi u kloroplast predstavlja vezani transport (antiport) kojeg vrši membranski nosač (Pi-trioza-fosfat transportni protein) (Taiz i Zeiger, 2012). Bilo koji poremećaj u sintezi saharoze u

citosolu ili transportu trioze-fosfata iz, kao i Pi u kloroplast, dovodi do akumulacije asimilacijskog škroba u kloroplastu (Rychter i Rao, 2005). Razgradnja kloroplastnog škroba u izravnoj je vezi s opskrbom i potrebama za ugljikovim supstratima u stanici (Rychter i Rao, 2005).

Kao rezime ovih reakcija, Rychter i Rao (2005) navode da se ATP sintetiziran u svjetlosnim reakcijama koristi za pokretanje Calvinovog ciklusa u kojem se asimilira CO<sub>2</sub>. Za sintezu jedne molekule trioza-fosfata reduciraju se tri molekule CO<sub>2</sub>, za što je potrebno devet molekula Pi u obliku ATP-a. Osam molekula Pi oslobađa se u Calvinovom ciklusu te služi za ponovnu sintezu ATP-a, a jedna se Pi molekula ugrađuje u trioza-fosfat. Trioza-fosfat se izbacuje iz kloroplasta pri čemu u kloroplast kotransportom ulazi jedna molekula Pi oslobođena u sintezi saharoze u citosolu. Stoga sinteza saharoze u citosolu zapravo reciklira zalihu Pi. Za sintezu jedne molekule saharoze u kloroplast se mora unijeti osam molekula Pi. Iz opisanih reakcija jasno je da je adekvatna opskrba fosforom esencijalna za asimilaciju fotosintetskog ugljika kod biljaka.

Prema Taiz i Zeiger (2012), brzina fotosintetskih reakcija Calvinovog ciklusa može se regulirati na tri razine:

1. Karboksilacijskom učinkovitošću enzima Rubico (enzima koji veže CO<sub>2</sub> na molekulu ribuloza1,5-difosfata);
2. Brzinom regeneracije ribuloza1,5-difosfata kao supstrata za karboksilaciju;
3. Brzinom metaboliziranja primarnog produkta fotosinteze (trioza-fosfata).

Rychter i Rao (2005) kao moguće metaboličke procese u kojima nedostatak fosfora izaziva inhibiciju fotosinteze navode:

1. Inhibiciju fotofosforilacije (sintezu ATP-a), što dovodi do poremećaja tilakoidnih membrana i smanjenog transporta elektrona;
2. Smanjenje intenziteta regeneracije ribuloza1,5-difosfata, što dovodi do usporavanja Calvinovog ciklusa;
3. Smanjenje rasta pojedinih biljnih dijelova što dovodi do smanjenog kapaciteta izljeva u floemskom transportu, zbog čega se poput povratne sprege inhibira fotosinteza.

### 1.3.2. Fluorescencija klorofila kao mjera stresa kod biljaka

Fotosintetski aparat kod biljaka sastavljen je od dva fotosustava, fotosustava jedan (PSI) i fotosustava dva (PSII) (Taiz i Zeiger, 2012). Fotosintetski aparat zadužen je za primanje velike količine svjetlosne energije te njene pretvorbe u kemijsku energiju (Taiz i Zeiger, 2012). Apsorpcija fotona svjetlosti pobuđuje molekule klorofila, a ta se pobudna energija koristi za pokretanje fotokemijskih reakcija (svjetlosnih reakcija) fotosinteze (Taiz i Zeiger, 2012). Dio pobudne energije klorofila gubi se u obliku zagrijavanja (topline) te fluorescencije (emitiranja fotona od strane klorofila). Zapravo se ukupna energija fotona svjetlosti, odnosno ukupna pobudna energija klorofila raspoređuje na te tri reakcije (fotokemijska reakcija, fluorescencija i zagrijavanje) (Long i sur., 1994). Mjerenja tih procesa u različitim uvjetima omogućuje nam procjenu efikasnosti fotokemijskih reakcija, odnosno usporedbu količine energije koja se gubi na zagrijavanje te na fluorescenciju u odnosu na količinu energije koja se iskoristi u fotokemijskim reakcijama. Kada su biljke izložene stresu, dolazi do poremećaja u funkcioniranju fotosintetskog aparata, što pri visokom intenzitetu svjetla izaziva fotoinhibiciju. Na fotoinhibiciju osobito je osjetljiv PSII, dok je PSI mnogo stabilniji (Taiz i Zeiger, 2012).

Jedna od najčešćih nedestruktivnih metoda za mjerenje efikasnosti fotosintetskih procesa te za ocjenu fiziološkog stanja fotosustava je mjerenje fluorescencije klorofila (Sayed, 2003). Fluorescencija klorofila temelji se na emitiranju saturacijskog pulsa, tj. svjetlosne zrake visokog intenziteta te mjerenju maksimalnog kvantnog iskorištenja svjetlosti od strane PSII te nefotokemijskog gubitka energije (Schreiber, 2004).

Kad su sva reakcijska središta PSII potpuno otvorena (mogu brzo prenijeti svoju energiju primarnim akceptorima elektrona u tilakoidnim membranama), tada je fluorescencija minimalna ( $F_0$ ). Međutim, kad reakcijska središta nemaju čemu prepustiti svoju energiju, ona se zatvaraju, a fluorescencija je maksimalna ( $F_m$ ). Razlika između  $F_m$  i  $F_0$  je stoga varijabilna fluorescencija ( $F_v$ ). Kod biljaka adaptiranih na tamu, sva su reakcijska središta potpuno otvorena, te se kod slabog osvjetljenja mjeri  $F_0$ , a kod jakog saturacijskog pulsa se izaziva fotoinhibicija, odnosno zatvaranje reakcijskih središta, te se mjeri  $F_m$ . Maksimalna kvantna efikasnost PSII računa se prema formuli  $(F_m - F_0)/F_m$  (Quiles i sur., 2012).

Kod biljaka adaptiranih na svjetlo, reakcijska središta su samo djelomično otvorena, te je  $F_0$  viša u usporedbi s  $F_0$  biljaka adaptiranih na tamu, te se označava s  $F_s$ . Odnosno, minimalna fluorescencija ( $F_s$ ) koja se izmjeri zapravo je fluorescencija koju klorofil emitira pri



određenim okolišnim uvjetima. S druge strane, maksimalna fluorescencija biljaka prilagođenih na svjetlo ( $F_m'$ ) također je manja u odnosu na biljke prilagođene na tamu, zbog nefotokemijskog rasipanja energije, te se kvantna efikasnost PSII (Y(II)) kod na svjetlo adaptiranih biljaka računa kao  $(F_m' - F_s)/F_m'$  (Quiles i sur., 2012).

#### 1.4. Mehanizmi prilagodbe biljke na nedostatak fosfora

U uvjetima nedostatka fosfora biljke razvijaju određene mehanizme prilagodbe na nutritivni stres (Li i sur., 2003). Mehanizmi poboljšanja usvajanja fosfora temelje se na dvije glavne strategije: a) pojačano prorastanje tla i b) mobilizaciju fosfata iz teško topivih spojeva unutar rizosfere (Lynch, 1995; Lynch, 2011).

Kod pojačanog prorastanja tla, Bates i Lynch (2001) podrazumijevaju promjene karakteristika korijenovog sustava, poput duljine i gustoće korijenovih dlačica primarnog i lateralnog korijenja. Korijenove dlačice su bočna izbočenja rizoderme koja se razvijaju nekoliko milimetara iznad vrha korijena, na dijelu gdje je korijen prestao produžno rasti (Pevalek-Kozlina, 2003). Predstavljaju najaktivniji dio korijena u pogledu primanja hranjiva i vode, a mogu zauzimati i do 70% površine korijena (Lopez-Bucio i sur., 2003). Gustoća korijenovih dlačica koje prorastaju gornje slojeve tla smatra se najvažnijom karakteristikom za poboljšano usvajanje slabo pokretnih hraniva, poput fosfora (Manschadi i sur., 2013).

U uvjetima nedostatka fosfora *Arabidopsis thaliana* Heynh. povećava broj i duljinu korijenovih dlačica po jediničnoj dužini korijena (Ma i sur., 2001; Lopez-Bucio i sur., 2003). Kod genotipova graha (*Phaseolus vulgaris* L.) (Lynch, 1995; Ho i sur., 2005), kukuruza (*Zea mays* L.) i soje (*Glycine max* Merr.) (Lynch, 2011), utvrđena je povezanost morfoloških karakteristika korijena s efikasnošću usvajanja fosfora. Pri čemu su se efikasnijim pokazali genotipovi s plićim, jače razgranatim korijenom, većeg kuta grananja.

Nadalje, Ho i sur. (2005) navode da je kod genotipova s plićim korijenjem zabilježena veća koncentraciju fosfora u suhoj tvari nadzemnog dijela biljke što ukazuje na veću gustoću lateralnog korijenja ovih genotipova u površinskom sloju uzgojnog medija.

Strategija pojačane mobilizacije fosfata iz teško topivih oblika u tlu temelji se na pojačanoj sintezi i izlučivanju enzima poput fosfataze i fitaze, te aniona organskih kiselina poput citrata i malata (Raghothama, 2000).

Povećano grananje korijena (Manschadi i sur., 2013), te sinteza i izlučivanje eksudata (Vance i sur., 2002), zahtijevaju i povećanu translokaciju ugljikohidrata u korijen te predstavljaju veliki energetska trošak, što utječe na redukciju translokacije asimilata iz listova u stabljiku i reproduktivne organe (Manschadi i sur., 2013). S druge strane, povećanje duljine i broja korijenovih dlačica omogućuje poboljšano usvajanje fosfora uz minimalni metabolički trošak (Lynch, 2011).

Prilagodbe biljke na smanjenu dostupnost fosfora očituju se i kroz formiranje arbuskularnih mikoriznih asocijacija (Schachtman i sur., 1998), te formiranje simbioza s ostalim rizosfernim mikroorganizmima (Lynch, 1995).

### **1.5. Arbuskularna mikoriza**

Simbioza mikoriznih gljiva (mikrosimbionta) i korijenja viših biljaka (makrosimbionta) u rizosfernom području čini mikoriznu asocijaciju, a najzastupljeniji oblik navedene asocijacije je arbuskularna mikoriza (Smith i Read, 2008). Ovaj je oblik mikorize pronađen na više od 90% kopnenih biljaka (Schachtman i sur., 1998). Interakciju makro i mikrosimbionta karakterizira dvosmjerna izmjena esencijalnih hraniva, a primarno fosfata (Bücking i sur., 2012).

Arbuskularne mikorizne gljive koloniziraju korijenov sustav biljaka te, svojim utjecajem na pristupačnost hraniva iz uzgojnog medija, reguliraju njihov rast i razvoj (Smith i Read, 2008). Proces kolonizacije biljnog korijena mikoriznim gljivama započinje signalizacijom između simbionata koja rezultira ekspresijom gena ključnih za pokretanje infekcije korijena (Smith i Smith, 2011). Mikorizne gljive na površini korijena formiraju specifičnu strukturu, apresorij, iz kojeg se stvaraju infektivne hife koje rastu unutar korteksa korijena (Bücking i sur., 2012). Njihov rast može biti intercelularan (duž longitudinalne korijenove osi) i intracelularan (stvarajući arbuskule preko kojih se, transportnim proteinima, odvija dvosmjerna izmjena hraniva između makro i mikrosimbionta). Osim opisanog internog micelija, mikorizne gljive razvijaju i eksterni micelij koji ima iznimno važnu ulogu u usvajanju hraniva (Smith i Read, 2008).

Količina i oblik u kojem se fosfor u tlu nalazi određuju pristupačnost ovog esencijalnog hraniva biljci te su važni faktori u određivanju utjecaja arbuskularno mikoriznih gljiva na njegovo usvajanje i asimilaciju (Smith i Read, 2008).

Prema Bücking i sur. (2012), pozitivan utjecaj navedenih mikoriznih gljiva na ishranu biljke fosforom očituje se kroz:

1. Prorastanje velikog volumena tla eksternim micelijem koji akumulira granule polifosfata unutar vakuola hifa. Posredovanjem enzima polifosfataza, Pi se mobilizira te se translocira u interni micelij, zaobilazeći pritom biljni mehanizam usvajanja fosfatnih aniona korijenom;
2. Uski promjer hifa koji mikoriznim gljivama omogućuje pojačano prorastanje tla i usvajanje fosfora koji se nalazi izvan rizosfernog područja te je aktivnoj površini korijena nedostupan;
3. Sintezu i izlučivanje fosfataza te aniona organskih kiselina koji olakšavaju mobilizaciju fosfatnih aniona iz organskih spojeva.

Nadalje, Schachtman i sur. (1998) navode da arbuskularno mikorizne gljive imaju sposobnost učinkovitijeg iskorištavanja fosfata iz otopine tla u odnosu na druge mikroorganizme, budući da ih biljka opskrbljuje organskim ugljikom koji im služi kao primarni izvor energije. Isti autori navode da veća razgranjenost hifa, povećavajući aktivnu površinu korijena, može ublažavati nutritivni stres uzrokovan izuzetno niskim koeficijentom difuzije fosfatnih aniona.

Bates i Lynch (2001) navode da postoji negativan odnos između razvijanja finih korijenovih struktura i formiranja mikorize zbog regulacije metabolizma fotoasimilata. Stoga, formiranje ovakve simbioze često je povezano s razvojem kraćih korijenovih dlačica, budući da su i arbuskularne mikorize i korijenove dlačice korisne za usvajanje fosfora.

## **2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA**

Opći cilj rada je istražiti utjecaj arbuskularne mikorize na ublažavanje stresa izazvanog nedostatkom fosfora kod pšenice.

Specifični ciljevi rada su:

1. Opisati utjecaj arbuskularne mikorize na morfološke karakteristike korijena pšenice u uvjetima smanjene dostupnosti fosfora;
2. Utvrditi utjecaj arbuskularne mikorize na efikasnost usvajanja fosfora kod pšenice;
3. Procijeniti ublažavajući učinak arbuskularne mikorize na promjene fluorescencije klorofila u uvjetima nedostatka fosfora.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Biljni materijal**

Odabir sorte za ovo istraživanje temeljeno je na radu Kontek i Petar (2016), koji su izvršili *screening* 50 genotipova pšenice obzirom na efikasnost usvajanja fosfora. Prema Kontek i Petar (2016), jedna od najefikasnijih sorti u usvajanju fosfora bila je U1-Osječka šišulja.

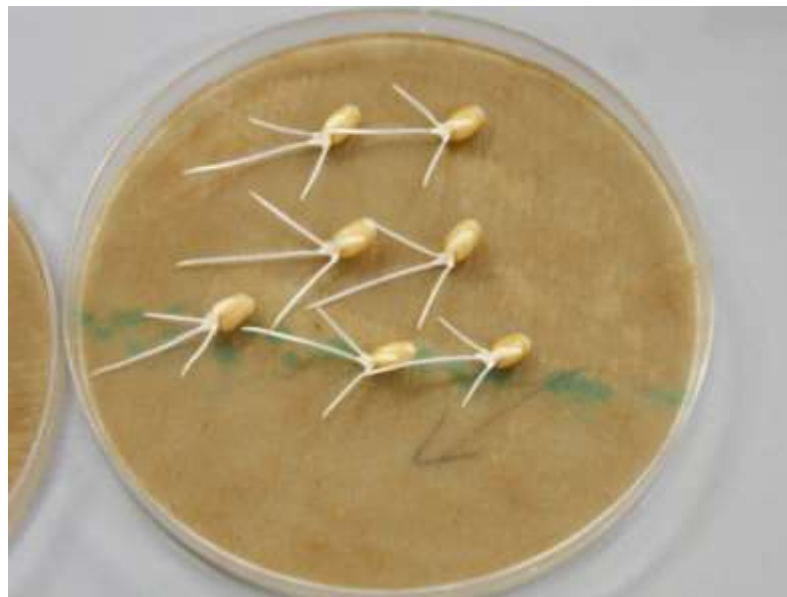
U1-Osječka šišulja nastala je križanjem talijanske sorte Carlotta Strampelli s kanadskom sortom Marquis. U1-Osječka šišulja je registrirana 1936. godine i puštena u proizvodnju. Zbog niza pozitivnih karakteristika koje joj se pripisuju (produktivnost, ranozrelost, otpornost na polijeganje), u praksi je nadmašila sve dotadašnje sorte pšenice. U proizvodnji se zadržala sve do 1958. kada započinje introdukcija talijanskih visokorodnih kultivara (Martinčić i Javor, 1996; Kozumplik i Martinić-Jerčić, 2000). Obzirom na dokazanu efikasnost u usvajanju fosfora, te na činjenicu da je ova sorta stvorena 1936. godine, oplemenjivačkim radom koji se odvijao u uvjetima uzgoja bez primjene mineralnih gnojiva, smatramo je pogodnim materijalom za navedeni pokus u kojem će se istražiti utjecaj arbuskularne mikorize na morfološke karakteristike korijena u uvjetima slabe i optimalne opskrbljenosti fosforom.

#### **3.2. Priprema sjemena**

Sjeme pšenice sorte U1-Osječka šišulja prosijano je kroz niz sita kako bi se dobila ujednačena frakcija sjemena promjera 2,5-3,0 mm. Izdvojeno sjeme površinski je sterilizirano u 70% (v/v) otopine etanola tijekom 30 sekundi, a zatim 5% (v/v) otopine natrijevog hipoklorita tijekom 10 minuta. Nakon sterilizacije sjeme je tri puta ispirano pod mlazom destilirane vode. Sterilizirano i isprano sjeme naklijavano je u petrijevim posudicama između dva konstantno vlažna klijalna papira (Regular Weight Seed Germination Paper, SD3,5, Anchor Paper Company, St Paul, Mn, US). Ukupno je korišteno 50 sjemenki, pri čemu je u pojedinu petrijevu posudu položeno 10 sjemena. Kako bi se ujednačilo klijanje, sjeme je inkubirano tijekom 5 dana pri 4 °C, a zatim je naklijavano tijekom 48 h pri 20 °C. Tijekom perioda inkubacije i naklijavanja petrijeve zdjelice su postavljene vertikalno kako bi klica prilikom formiranja korijena bila okrenuta prema dolje.

### 3.3. Pouch sustav

Nakon perioda klijanja, ujednačeno razvijeni klijanci s korjenčićima duljine 5-10 mm (Slika 1) presađeni su na tzv. *pouch* sustav. Metodologija *pouch* sustava poznata je i pod nazivom *rhizoslides* (Le Marie i sur., 2014), a prvi je put razvijena u svrhu proučavanja korijena graha (Bonser i sur., 1996) te kukuruza (Hund i sur., 2009). Pojedinačni *pouch* okvir sastavljen je od jedne ploče izrađene od ekstrudiranog akrilnog stakla („pleksiglas“) (dimenzija 400 × 250 × 3 mm; Prozirni namještaj d.o.o., Donja Zelina, Croatia), klijališnog papira jednakih dimenzija (Anchor Paper Company, St Paul, MN, US), te crne polythene folije također jednakih dimenzija (debljine 100 μm; MURAPLAST d.o.o., Kotoriba, Croatia) (Slika 2). Folijska i klijališna papir pričvršćuju se za ploču od ekstrudiranog stakla pomoću kvačica koje se postavljaju na gornju te bočne strane okvira. Pri tome ploča od akrilnog stakla služi kao potporanj za klijališni papir i rastuću biljku (korijen), klijališni papir služi za kapilarni uspon hranjive otopine te konstantno vlaženje korijenovog sustava, dok crna folija služi kao pokrov koji sprečava prodiranje svjetlosti do korijenovog sustava.



Slika 1. Ujednačeno razvijeni klijanci spremni za presađivanje



Slika 2. Presađivanje klijanaca na *pouch* sustav

Biljke presađene na *pouch* sustave postavljene su u plastične kade volumena 12 L ispunjene s 4 L Magnavaca hranjive otopine (Magnavaca i sur., 1987). Volumen od 4 L hranjive otopine dovoljan je da prekrije donji rub *pouch* sustava do visine od 3 cm te osigurava jednolično primanje otopine. Kemijski sastav Magnavaca hranjive otopine, nakon izračuna ionske aktivnosti pojedinog hranjiva u krajnjoj otopini pomoću GEOCHEM-EZ softvera (Shaff i sur., 2010) prikazan je tablicom 1.

Tablica 1. Kemijski sastav korištene Magnavaca hranjive otopine pri pH 6,0

Soli	$\mu\text{M L}^{-1}$
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	3,53
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1,30
KCl	0,58
$\text{K}_2\text{SO}_4$	0,58
$\text{KNO}_3$	0,58
$\text{Mg}(\text{NO}_3) \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,86
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,04
FeHEDTA	0,08
$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	9,10
$\text{H}_3\text{BO}_3$	24,97
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	2,29
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,63
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,87

### 3.4. Eksperimentalni dizajn i tretmani

Pokusi su postavljeni po slučajnom bloknom rasporedu. Tretmane su predstavljale dvije koncentracije fosfora u hranjivim otopinama: niska (P-) ( $1 \mu\text{M P L}^{-1}$ ) i visoka (P+) ( $45 \mu\text{M P L}^{-1}$ ), te dva tretmana inokulacije biljaka arbuskularnim mikoriznim (AM) gljivama vrste *Rhizophagus irregularis* (Symbiom LTD. Czech Republic): inokulirane (M) i ne inokulirane (NM) biljke. Inokulacija biljaka provedena je tijekom presađivanja klijanaca na *pouch* sustave primjenom suspenzije spora u destiliranoj vodi, pri čemu je na pojedinačni korijen aplicirano 500 spora u 10 mL destilirane vode, dok je na ne mikorizirane biljke primijenjeno samo 10 mL destilirane vode. U svakoj kombinaciji tretmana: niska koncentracija fosfora s inokuliranim biljkama (MP-), niska koncentracija fosfora s ne inokuliranim biljkama (NMP-), visoka koncentracija fosfora s inokuliranim biljkama (MP+) i visoka koncentracija fosfora s ne inokuliranim biljkama (NMP-) uzgajano je po 8 biljaka.

Biljke su uzgajane tijekom 20 dana, u komorama rasta na Agronomskom fakultetu u Zagrebu, pri  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fotosintetski aktivne radijacije (PAR), 12/12 h, i 20/15 °C duljine dan/noć te 75% relativne vlažnosti zraka, a svakih 5 dana promijenjena je hranjiva otopina.

### 3.5. Mjerenja

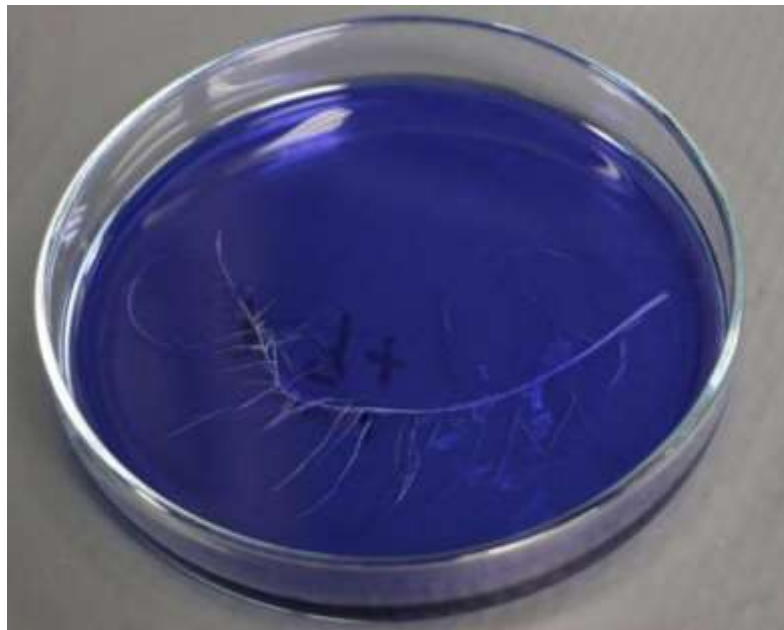
#### 3.5.1. Analize morfoloških karakteristika korijena

Tijekom uzgoja, korijenje biljaka je skenirano pomoću Epson perfection V700 skenera kojim je upravljano iz WinRhizo® softvera (WinRhizo 2015 Pro., Regent Instruments Canada Inc.). Korijenje je skenirano 5., 10. i 15. dan nakon presađivanja (DNP). Morfološke karakteristike korijenovog sustava analizirane su pomoću WinRhizo® softvera (WinRhizo 2015 Pro., Regent Instruments Canada Inc.). Pritom su analizirane sljedeće morfološke karakteristike korijena: kut grananja, širina, dubina, ukupna duljina te ukupna površina.

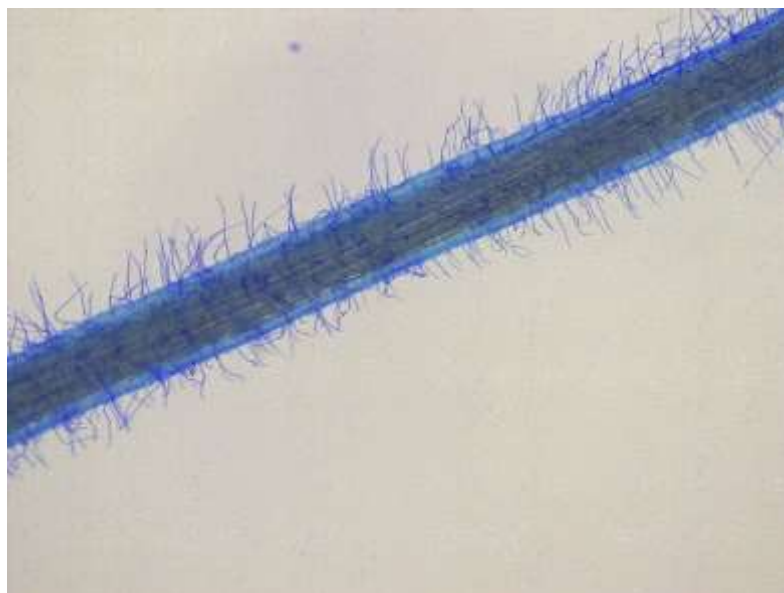
Na kraju pokusa sakupljeni su uzorci korijenja za analizu broja i dužine korijenovih dlačica. Uzorci korijena bojani su pomoću 0,05% otopine Toluidine blue boje tijekom 10 sekundi (Slika 3). Za analizu broja i dužine korijenovih dlačica, sa svakog obojenog korijena odrezana su tri korijenova vrha dužine 1 cm. Nakon bojenja uzorci su isprani u destiliranoj vodi i slikani pomoću Leica EZ4W stereomikroskopa (Leica Microsystems, Schweiz AG)



(Slika 4). Analiza brojnosti i dužine korijenovih dlačica provedena je pomoću WinRhizo® softvera.



Slika 3. Bojanje korijenovih dlačica



Slika 4. Slika obojanih korijenovih dlačica

### 3.5.2. Mjerenja fluorescencije klorofila

Na kraju pokusa (20 DNP) kao indikator stresa izmjerena je fluorescencija klorofila pomoću Plant stress kit (Opti-Sciences, Inc. Hudson USA). Mjerenja su obavljena kod biljaka adaptiranih na tamu (nakon 12 h perioda mraka/noći) te na svjetlost adaptiranih biljaka (nakon 3 h svjetla/dana). Na pojedinačnom listu izmjerene su tri vrijednosti od kojih je izračunata srednja vrijednost.

Kod biljaka adaptiranih na tamu izmjerena je maksimalna kvantna efikasnost PSII ( $F_m - F_0/F_m$ ), pri čemu je  $F_m$  vrijednost maksimalne fluorescencije, a  $F_0$  vrijednost minimalne fluorescencije. Mjerenje je obavljeno pri saturacijskom pulsu jačine  $3500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  u trajanju od 1 sekunde.

Kod biljaka adaptiranih na svjetlo izmjerena je efektivna kvantna efikasnost PSII ( $Y(\text{II})$ ) te relativni intenzitet transporta elektrona (ETR). Mjerenje je obavljeno pri saturacijskom pulsu jačine  $3500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  u trajanju od 1 sekunde. Relativni intenzitet transporta elektrona izračunat je prema formuli  $\text{ETR} = Y(\text{II}) \times \text{PAR} \times 0,84 \times 0,5$ .

Pri čemu je  $Y(\text{II})$  efektivna kvantna efikasnost PSII, PAR označava fotosintetski aktivnu radijaciju, 0,84 je koeficijent prosječne apsorpcije svjetlosti od strane lista, a 0,5 je koeficijent odnosa PSII i PSI (Schreiber i sur., 1994).

### 3.5.3. Određivanje suhe tvari i koncentracije fosfora

Na kraju pokusa nadzemni dijelovi biljke su uklonjeni te im je vaganjem određena svježa masa. Biljni materijal je osušen liofilizacijom te mu je vaganjem određena suha masa.

Liofilizirani biljni materijal razgrađen je u smjesi koncentriranih  $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$  (omjera 7:1) u mikrovalnoj pećnici (MILESTONE ETHOS ONE Microwave Digester), te je određena koncentracija fosfora u nadzemnim organima biljaka uzgojenih u svakom tretmanu, UV/VIS spektrofotometrom (Evolution 60S, Thermo scientific) (AOAC, 1995).

### 3.5.4. Statistička obrada podataka

Statističke analize podataka obavljene su u statističkom paketu SAS System for Win ver. 9.1.3 (Copyright 2002-2003 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.). Podaci su analizirani

analizom varijance (ANOVA), prema linearnom modelu (GLM). Srednje vrijednosti su uspoređivane Tukey's HSD testom, kada je F test bio signifikantan na razini  $p \leq 0,05$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1. Rezultati analize morfoloških karakteristika korijena

Tablicom 2 prikazani su rezultati analize varijance utjecaja tretmana fosforom, tretmana AM inokulacije te njihove interakcije (Fosfor×Mikoriza) na morfološke karakteristike korijena mjerene 5., 10. i 15. dana nakon presađivanja (DNP).

Tablica 2. Rezultati analize varijance istraživanih morfoloških karakteristika korijena pšenice uzgajane u tretmanima s niskom i visokom koncentracijom fosfora (Fosfor) i tretmanima inokulacije i ne inokulacije arbuskularnom mikorizom (Mikoriza) te njihove interakcije (Fosfor×Mikoriza), mjerenih 5., 10. i 15. dana nakon presađivanja (DNP).

Vrijeme mjerjenja (DNP)	Izvori varijabilnosti	n-1	Svojstvo				
			Kut grananja korijena	Dubina korijena	Širina korijena	Duljina korijena	Površina korijena
5	Fosfor	1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Mikoriza	1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Fosfor×Mikoriza	1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
10	Fosfor	1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Mikoriza	1	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.
	Fosfor×Mikoriza	1	n.s.	n.s.	n.s.	**	*
15	Fosfor	1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	Mikoriza	1	**	n.s.	**	**	**
	Fosfor×Mikoriza	1	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.

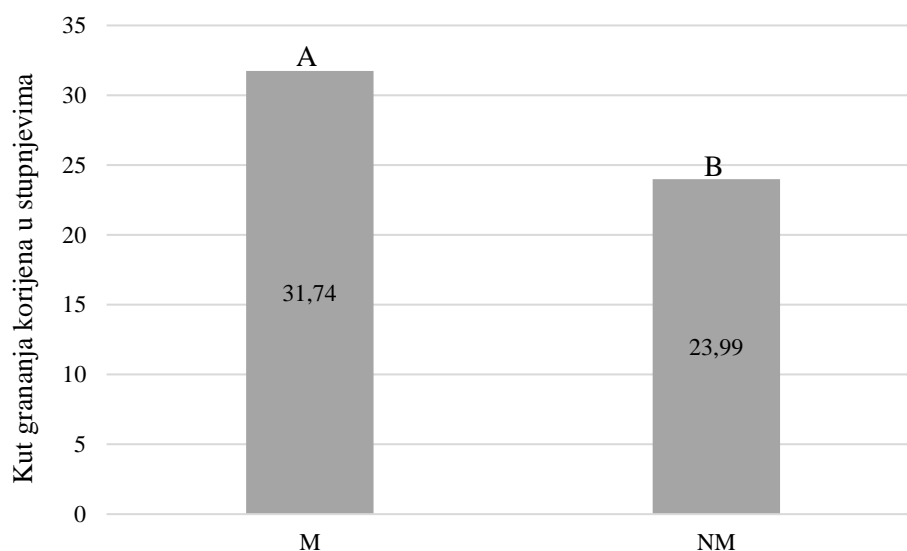
n-1: broj stupnjeva slobode izvora varijabilnosti; p: vjerojatnost prihvatanja nulte hipoteze da izvor varijabilnosti nema utjecaja na analiziranu karakteristiku; Razina signifikantnosti: \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , n.s. nije signifikantno.

Rezultati ANOVA-e pokazuju da su 5. DNP izostali statistički značajni utjecaji oba tretmana kao i njihove interakcije na analizirane morfološke karakteristike korijena. Nadalje, 10. DNP utvrđen je značajan utjecaj interakcije Fosfor×Mikoriza na ukupnu duljinu i ukupnu površinu korijena. Najizraženiji utjecaj tretmana AM inokulacije na morfološke karakteristike korijena utvrđen je 15. DNP, kada je utvrđen statistički značajan utjecaj na kut grananja, širinu, ukupnu duljinu i ukupnu površinu korijena, uz to je utvrđen i značajan utjecaj interakcije (Fosfor×Mikoriza) na ukupnu duljinu korijena.

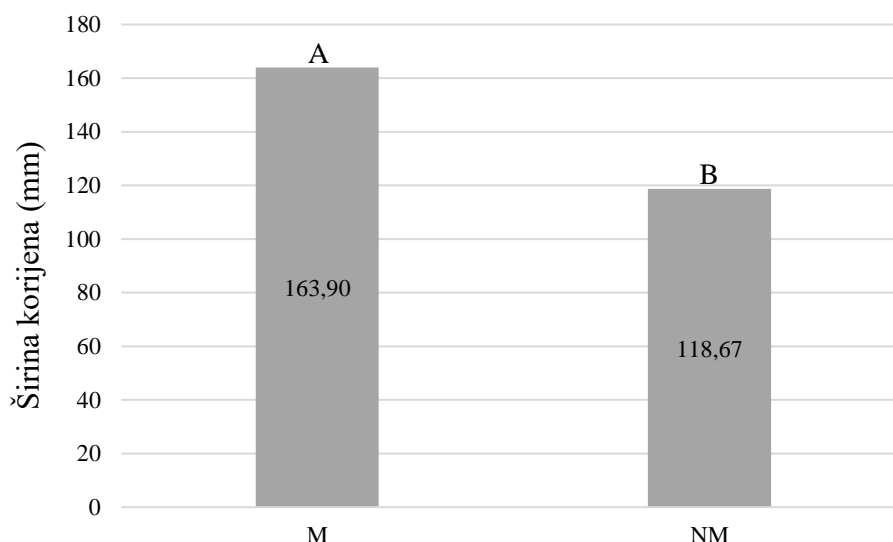
Obzirom da su najveće razlike morfoloških karakteristika korijena utvrđene 15. DNP, u nastavku će biti prikazani rezultati statistički značajnih utjecaja na morfološke karakteristike korijena u tom vremenu mjerenja.

Grafikonom 1 prikazane su srednje vrijednosti kuta grananja korijena AM inokuliranih i ne inokuliranih biljaka, mjerene 15. DNP. Značajno veći kut grananja korijena utvrđen je kod inokuliranih biljaka ( $31,74^\circ$ ) u odnosu na ne inokulirane biljke ( $23,99^\circ$ ).

Nadalje, 15. DNP inokulirane biljke razvile su prosječno širi korijen (163,90 mm) u odnosu na ne inokulirane biljke (118,67 mm) (Grafikon 2).



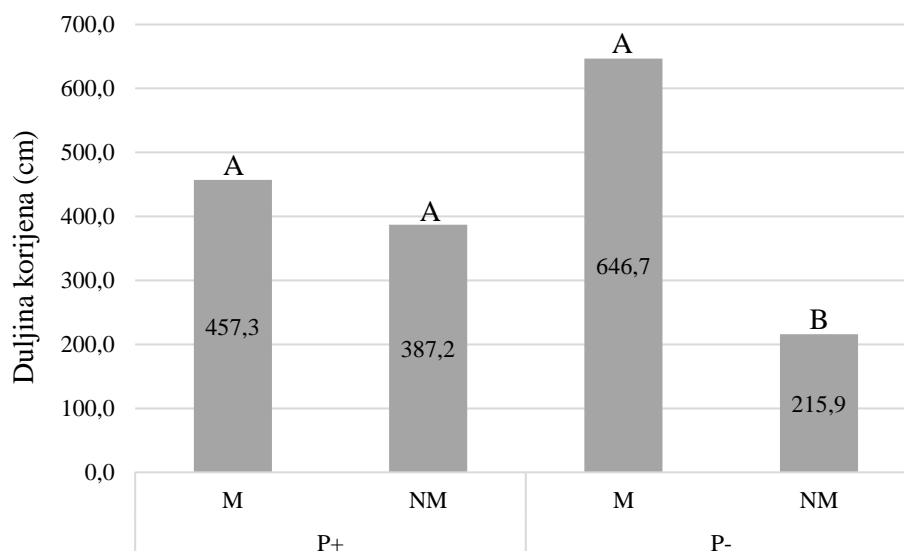
Grafikon 1. Srednje vrijednosti kuta grananja korijena AM inokuliranih (M) i ne inokuliranih biljaka (NM) uzgajanih tijekom 15 dana u tretmanima fosforom. Prema Tukey's HSD testu, različita slova pridružena histogramima grafikona označavaju statistički značajne razlike između tretmana.



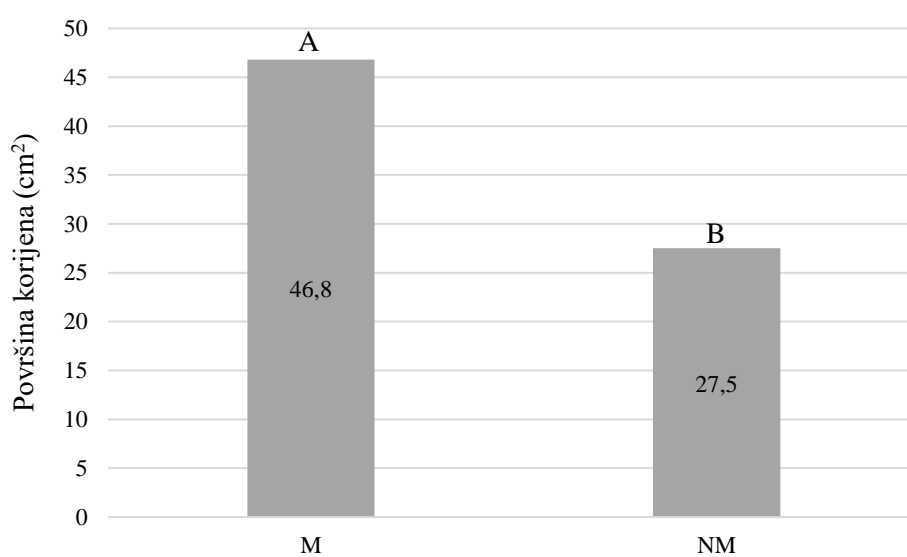
Grafikon 2. Srednje vrijednosti širine korijena AM inokuliranih (M) i ne inokuliranih biljaka (NM) uzgajanih tijekom 15 dana u tretmanima fosforom. Prema Tukey's HSD testu, različita slova pridružena histogramima označavaju statistički značajne razlike između tretmana.

Analizom varijance utvrđen je statistički značajan utjecaj interakcije Fosfor×Mikoriza na ukupnu duljinu korijena 15. DNP (Tablica 2). U tretmanu niske koncentracije fosfora (P-) inokulirane biljke su razvile korijen veće ukupne duljine (646,7 cm) u odnosu na ne inokulirane biljke (215,9 cm), dok u tretmanu visoke koncentracije fosfora (P+) nije utvrđena značajna razlika ukupne duljine korijena između AM inokuliranih (457,3 cm) i ne inokuliranih biljaka (387,2 cm).

Grafikonom 4 prikazane su srednje vrijednosti površine korijena AM inokuliranih i ne inokuliranih biljaka mjerene 15. DNP. Značajno veću površinu korijena razvile su inokulirane biljke (46,8 cm<sup>2</sup>) u odnosu na ne inokulirane biljke (27,5 cm<sup>2</sup>).



Grafikon 3. Srednje vrijednosti ukupne duljine korijena AM inokuliranih (M) i ne inokuliranih (NM) biljaka uzgajanih tijekom 15 dana pri visokoj (P+) i niskoj (P-) koncentraciji fosfora u hranjivim otopinama. Prema Tukey's HSD testu, različita slova pridružena histogramima označavaju statistički značajne razlike između tretmana AM inokulacije unutar pojedinačnog tretmana fosforom.



Grafikon 4. Srednje vrijednosti površine korijena AM inokuliranih (M) i ne inokuliranih biljaka (NM) uzgajanih tijekom 15 dana u tretmanima fosforom. Prema Tukey's HSD testu, različita slova pridružena histogramima označavaju statistički značajne razlike između tretmana.

## 4.2. Rezultati analize morfoloških karakteristika korijenovih dlačica

Rezultati analize varijance utjecaja tretmana fosforom, tretmana AM inokulacije te njihove interakcije (Fosfor×Mikoriza) na morfološke karakteristike korijenovih dlačica, mjerenih dvadesetog dana nakon presađivanja (20. DNP), prikazani su tablicom 3.

Tablica 3. Rezultati analize varijance istraživanih morfoloških karakteristika korijenovih dlačica pšenice uzgajane u tretmanima s niskom i visokom koncentracijom fosfora (Fosfor) i tretmanima inokulacije i ne inokulacije arbuskularnom mikorizom (Mikoriza) te njihove interakcije (Fosfor×Mikoriza).

Izvori varijabilnosti	n-1	Svojstvo	
		Broj korijenovih dlačica	Dužina korijenovih dlačica
Fosfor	1	n.s.	n.s.
Mikoriza	1	n.s.	n.s.
Fosfor×Mikoriza	1	n.s.	n.s.

n-1: broj stupnjeva slobode izvora varijabilnosti; p: vjerojatnost prihvatanja nulte hipoteze da izvor varijabilnosti nema utjecaja na analiziranu karakteristiku; Razina signifikantnosti: \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , n.s. nije signifikantno.

Rezultati ANOVA-e pokazuju da nema statistički značajnog utjecaja tretmana fosforom i AM inokulacije kao ni njihove interakcije na broj i dužinu korijenovih dlačica.

Inokulirane i ne inokulirane biljke zabilježile su ujednačen broj razvijenih korijenovih dlačica u oba tretmana fosforom (P+ i P-). Prosječan broj dlačica AM inokuliranih biljaka u tretmanu P+ iznosio je 65,6 dok je kod ne inokuliranih biljaka iznosio 65,1. Inokulirane biljke su u tretmanu P- razvile prosječno 61,4 korijenove dlačice dok su ne inokulirane biljke razvile 60,7 dlačica.

U uvjetima tretmana P+, AM inokulirane biljke razvile su korijenove dlačice prosječne dužine 0,53 mm dok su ne inokulirane u istim uvjetima razvile dlačice dužine 0,51 mm. Prosječna dužina korijenovih dlačica inokuliranih i ne inokuliranih biljaka u tretmanu P- bila je jednaka i iznosila je 0,55 mm.



### 4.3. Rezultati analize koncentracije fosfora u biljnom materijalu

Rezultati analize varijance utjecaja tretmana fosforom, tretmana AM inokulacije te njihove interakcije (Fosfor×Mikoriza) na koncentraciju fosfora (% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) te na apsolutnu količinu fosfora (mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) u nadzemnim organima biljke prikazani su u tablici 4.

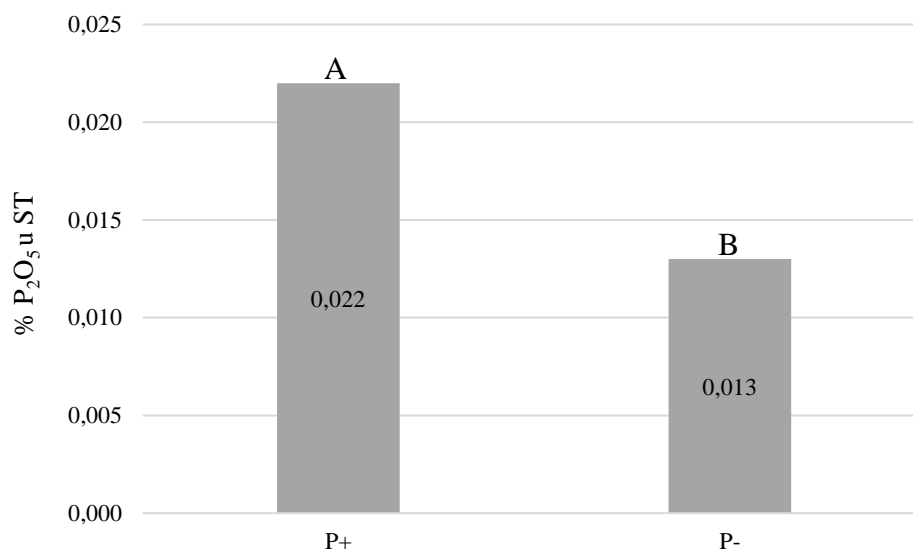
Tablica 4. Rezultati analize varijance suhe mase nadzemnih organa te koncentracije i apsolutne količine fosfora u nadzemnim organima pšenice uzgajane u tretmanima s niskom i visokom koncentracijom fosfora (Fosfor) i tretmanima inokulacije i ne inokulacije arbuskularnom mikorizom (Mikoriza) te njihove interakcije (Fosfor×Mikoriza).

Izvori varijabilnosti	n-1	Svojstvo		
		% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> u ST	mg P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Suha masa
Fosfor	1	***	**	**
Mikoriza	1	n.s.	n.s.	*
Fosfor×Mikoriza	1	n.s.	n.s.	n.s.

n-1: broj stupnjeva slobode izvora varijabilnosti; p: vjerojatnost prihvatanja nulte hipoteze da izvor varijabilnosti nema utjecaja na analiziranu karakteristiku; Razina signifikantnosti: \* p ≤ 0,05, \*\* p ≤ 0,01, \*\*\* p ≤ 0,001, n.s. nije signifikantno.

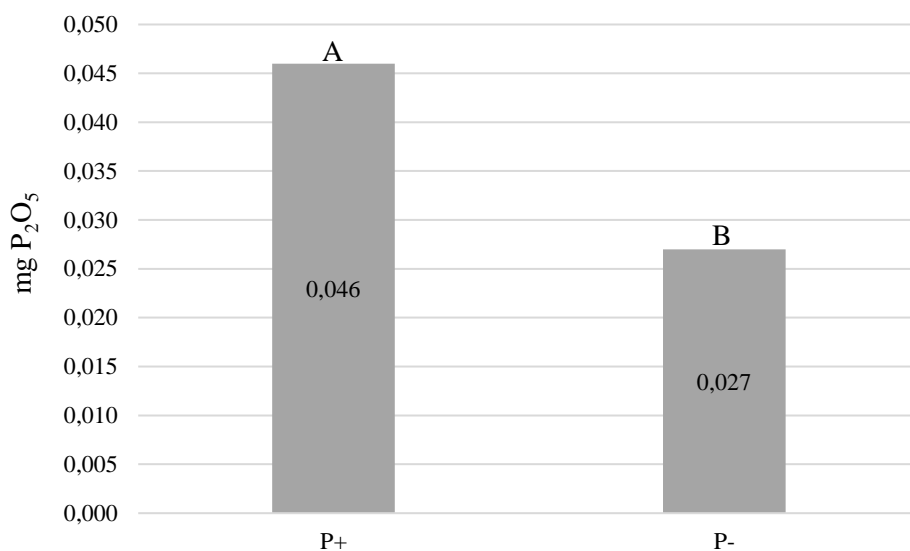
Rezultati ANOVA-e pokazuju značajan utjecaj tretmana različitih koncentracija fosfora na sva mjerena svojstva dok je AM inokulacija imala značajan utjecaj na suhu masu nadzemnih organa pšenice.

Grafikonom 5 prikazane su srednje vrijednosti koncentracije P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> u suhoj tvari nadzemnih organa (% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> u ST). Značajno veća koncentracija P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> utvrđena je u suhoj tvari biljaka uzgajanih u P+ tretmanu (0,022 %) u odnosu na biljke uzgajane u P- tretmanu (0,013 %).

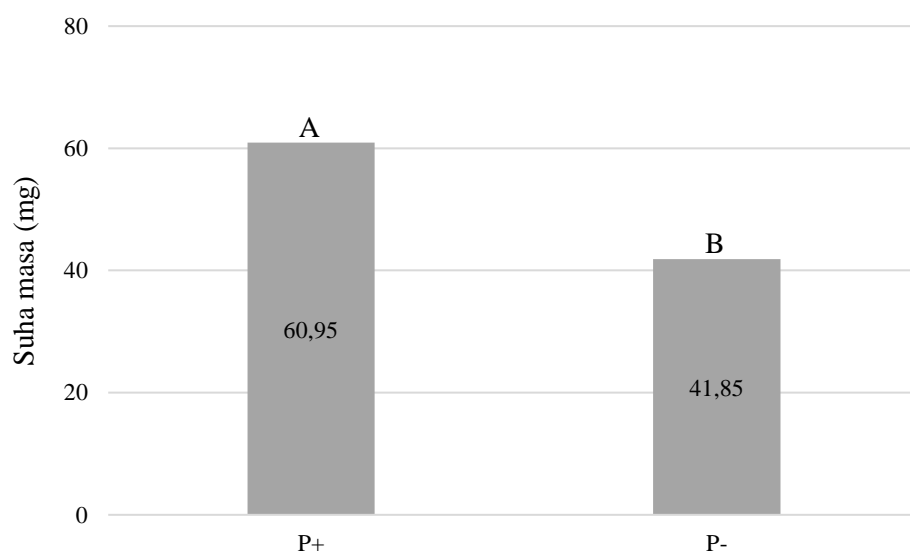


Grafikon 5. Srednje vrijednosti koncentracije fosfora u suhoj tvari biljnog materijala (% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> u ST) biljaka uzgajanih pri niskoj (P-) i visokoj (P+) koncentraciji fosfora u hranjivim otopinama. Prema Tukey's HSD testu, različita slova pridružena histogramima označavaju statistički značajne razlike između tretmana.

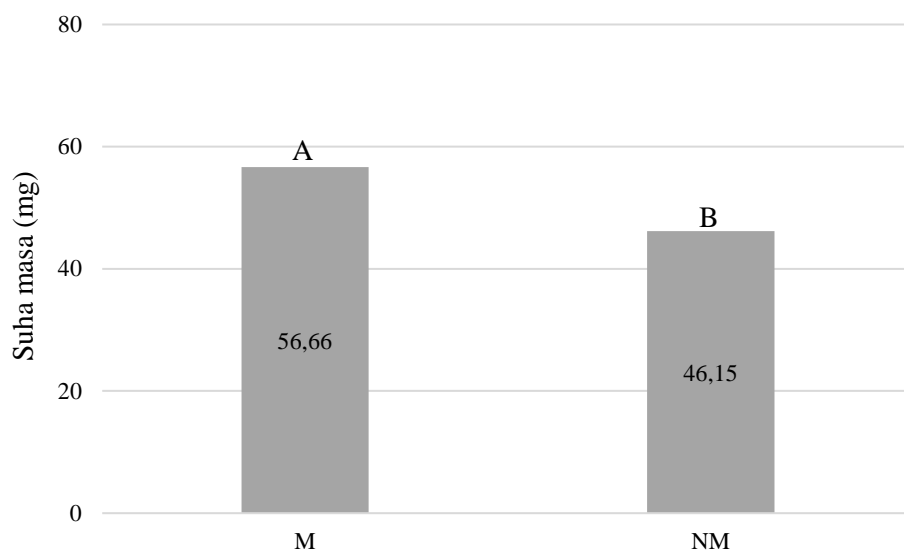
Srednje vrijednosti apsolutnih količina fosfora u suhoj tvari nadzemnih organa (mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) prikazane su grafikonom 6. Kod biljaka uzgajanih u P+ tretmanu utvrđena je značajno viša količina fosfora u suhoj tvari (0,046 mg) u odnosu na biljke uzgajane u P- tretmanu (0,027 mg).



Grafikon 6. Srednje vrijednosti koncentracije fosfora (mg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) biljaka uzgajanih pri niskoj (P-) i visokoj (P+) koncentraciji fosfora u hranjivim otopinama. Prema Tukey's HSD testu, različita slova pridružena histogramima označavaju statistički značajne razlike između tretmana.



Grafikon 7. Srednje vrijednosti suhe mase (mg) nadzemnih organa biljaka uzgajanih pri niskoj (P-) i visokoj (P+) koncentraciji fosfora u hranjivim otopinama. Prema Tukey's HSD testu, različita slova pridružena histogramima označavaju statistički značajne razlike između tretmana.



Grafikon 8. Srednje vrijednosti suhe mase (mg) nadzemnih organa AM inokuliranih (M) i ne inokuliranih biljaka (NM) uzgajanih tijekom 15 dana u tretmanima fosforom. Prema Tukey's HSD testu, različita slova pridružena histogramima označavaju statistički značajne razlike između tretmana.

Značajno veća suha masa nadzemnih organa utvrđena je kod biljaka uzgajanih u tretmanu P+ (60,95 mg) u odnosu na biljke tretmana P- (41,85 mg) (Grafikon 7). Također, značajno veća suha masa nadzemnih organa utvrđena je kod AM inokuliranih (56,67 mg) u odnosu na ne inokulirane biljke (46,15 mg) (Grafikon 8).

#### 4.4. Rezultati analize mjerenja fluorescencije klorofila

Tablicom 5 prikazani su rezultati analize varijance utjecaja tretmana fosforom, tretmana AM inokulacije te njihove interakcije (Fosfor×Mikoriza) na istraživane parametre fluorescencije klorofila, mjerene dvadesetog dana nakon presađivanja (20. DNP).

Tablica 5. Rezultati analize varijance istraživanih parametara fluorescencije klorofila pšenice uzgajane u tretmanima s niskom i visokom koncentracijom fosfora (Fosfor) i tretmanima inokulacije i ne inokulacije arbuskularnom mikorizom (Mikoriza) te njihove interakcije (Fosfor×Mikoriza).

Izvori varijabilnosti	n-1	Svojstvo		
		$(F_m-F_0)/F_m$	Y(II)	ETR
Fosfor	1	***	***	***
Mikoriza	1	n.s.	***	***
Fosfor×Mikoriza	1	n.s.	***	**

n-1: broj stupnjeva slobode izvora varijabilnosti; p: vjerojatnost prihvatanja nulte hipoteze da izvor varijabilnosti nema utjecaja na analiziranu karakteristiku; Razina signifikantnosti: \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , n.s. nije signifikantno.

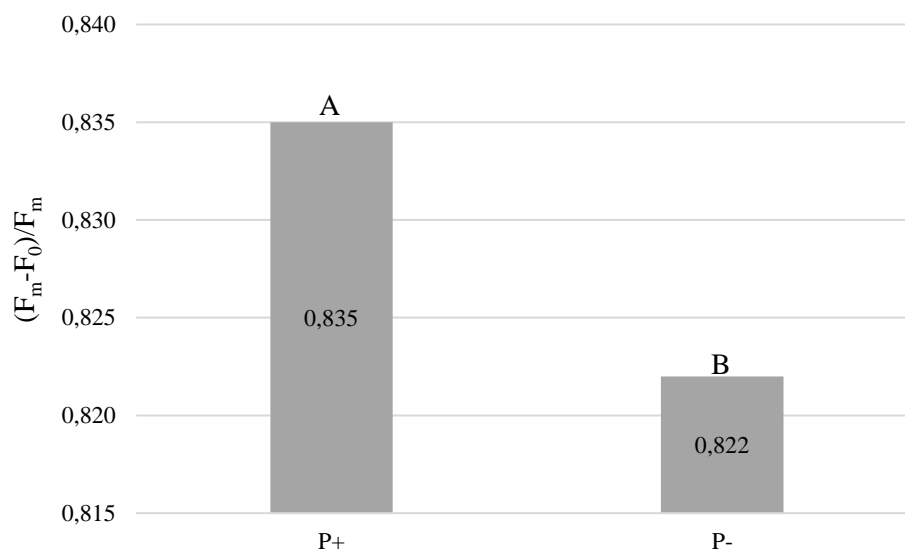
$(F_m-F_0)/F_m$ : maksimalna kvantna efikasnost PSII biljaka adaptiranih na tamu;

Y(II): efektivna kvantna efikasnost PSII biljaka adaptiranih na svjetlost;

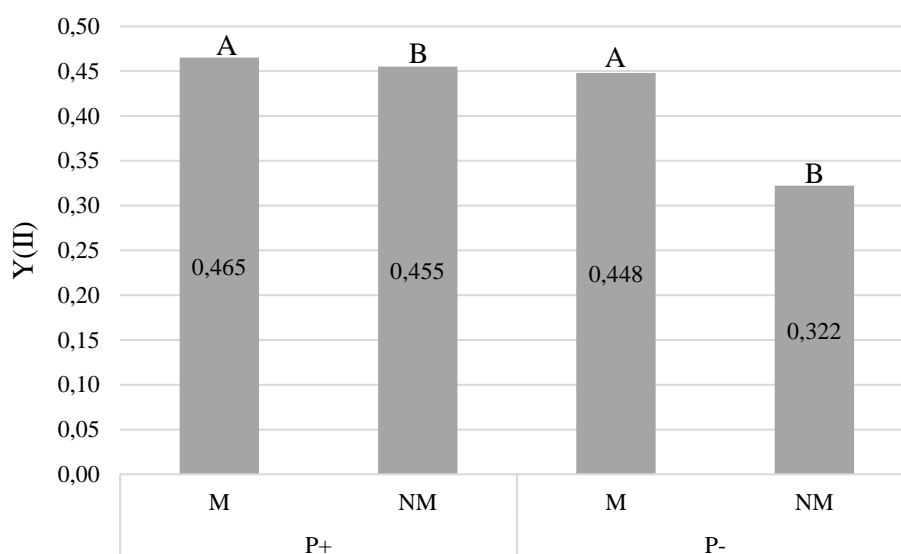
ETR: relativni intenzitet transporta elektrona biljaka adaptiranih na svjetlost.

Analizom varijance utvrđen je statistički značajan utjecaj tretmana fosforom na sva tri istraživana svojstva fluorescencije klorofila, dok su tretman AM inokulacije te interakcije Fosfor×Mikoriza značajno utjecali na efektivnu kvantnu efikasnost PSII (Y(II)) i relativni intenzitet transporta elektrona (ETR).

Grafikonom 9 prikazane su srednje vrijednosti  $(F_m-F_0)/F_m$  kod biljaka uzgajanih u tretmanima s visokom (P+) i niskom (P-) koncentracijom fosfora. Značajno veću maksimalnu kvantnu efikasnost PSII pokazale su biljke uzgajane u P+ (0,835) u odnosu na biljke uzgajane u P- tretmanu (0,822).



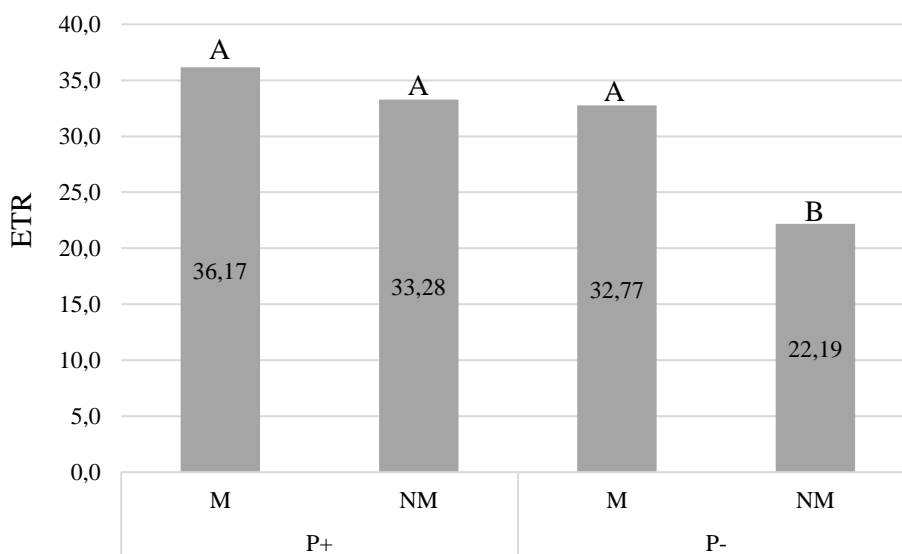
Grafikon 9. Srednje vrijednosti maksimalne kvantne efikasnosti PSII ((F<sub>m</sub>-F<sub>0</sub>)/F<sub>m</sub>) biljaka uzgajanih pri niskoj (P-) i visokoj (P+) koncentraciji fosfora u hranjivim otopinama. Prema Tukey's HSD testu, različita slova pridružena histogramima označavaju statistički značajne razlike između tretmana.



Grafikon 10. Srednje vrijednosti efektivne kvantne efikasnosti PSII (Y(II)) AM inokuliranih (M) i ne inokuliranih (NM) biljaka uzgajanih pri visokoj (P+) i niskoj (P-) koncentraciji fosfora u hranjivim otopinama. Prema Tukey's HSD testu, različita slova pridružena histogramima označavaju statistički značajne razlike između tretmana inokulacije unutar pojedinačnog tretmana fosforom.

Biljke tretmana P+ imale su prosječno veći Y(II) (0,460) u usporedbi s biljkama tretmana P- (0,385). Nadalje, AM inokulirane biljke (M) imale su prosječno veći Y(II) (0,456) u odnosu na ne inokulirane biljke (NM) (0,388). Međutim, utvrđena je i statistički značajna interakcije Fosfor×Mikoriza. Naime, u tretmanu P-, AM inokulirane biljke imale su veći Y(II) (0,448) u odnosu na ne inokulirane biljke (0,322), dok se Y(II) AM inokuliranih (0,465) i ne inokuliranih (0,455) biljaka nije razlikovao u tretmanu P+ (Grafikon 10).

Biljke tretmana P+ imale su prosječno veći ETR (34,72) u usporedbi s biljkama tretmana P- (27,48). Nadalje, AM inokulirane biljke (M) imale su prosječno veći ETR (34,47) u odnosu na ne inokulirane biljke (NM) (27,74). Međutim, utvrđena je i statistički značajna interakcije Fosfor×Mikoriza. Naime, u tretmanu P-, AM inokulirane biljke imale su veći ETR (32,77) u odnosu na ne inokulirane biljke (22,19), dok se ETR AM inokuliranih (36,17) i ne inokuliranih (33,28) biljaka nije razlikovao u tretmanu P+ (Grafikon 11).



Grafikon 11. Srednje vrijednosti relativnog intenziteta transporta elektrona (ETR) AM inokuliranih (M) i ne inokuliranih (NM) biljaka uzgajanih pri visokoj (P+) i niskoj (P-) koncentraciji fosfora u hranjivim otopinama. Prema Tukey's HSD testu, različita slova pridružena histogramima označavaju statistički značajne razlike između tretmana inokulacije unutar pojedinačnog tretmana fosforom.

## 5. RASPRAVA

### 5.1. Utjecaj arbuskularne mikorize na morfološke karakteristike korijena u uvjetima smanjene dostupnosti fosfora

Značajne promjene morfoloških karakteristika korijena između tretmana AM inokulacije utvrđene su tek 10. DNP, dok su izostale 5 DNP. Najizraženije promjene morfoloških karakteristika korijenovog sustava pod utjecajem AM inokulacije utvrđene su u zadnjem mjerenju, 15. DNP (Tablica 2), kada AM inokulirane biljke razvijaju značajno širi (Grafikon 2) i površinom veći (Grafikon 4) korijenov sustav, šireg kuta grananja (Grafikon 1) u odnosu na ne inokulirane biljke. Nadalje, značajan interakcijski utjecaj (Fosfor×Mikoriza) 15. DNP utvrđen je za ukupnu duljinu korijena. Veća ukupna duljina korijena utvrđena je kod AM inokuliranih u odnosu na ne inokulirane biljke u oba tretmana, no u tretmanu P-, ta je razlika bila statistički značajna. Ovi rezultati ukazuju na činjenicu da je za vidljive promjene morfoloških karakteristika korijena, pod utjecajem AM inokulacije, potrebno određeno vrijeme kako bi se uspostavila simbioza i kako bi njezin učinak došao do izražaja.

Atkinson i sur. (1994) navode da AM gljive mogu značajno promijeniti morfologiju korijenovog sustava, ponajprije utječući na povećanu razgranatost korijenovog sustava povećanjem broja lateralnih korijena, te povećanjem ukupne duljine korijenovog sustava. Navodi ovih autora potvrđeni su i ovim pokusom, kojim je utvrđeno značajno povećanje ukupne duljine, širine, površine i kuta grananja korijenovog sustava pod utjecajem AM inokulacije. Pritom je izostalo povećanje dubine korijenovog sustava (Tablica 2), kao i brojnosti i dužine korijenovih dlačica, što ukazuje da su se ostale morfološke karakteristike korijena promijenile zbog promjene u broju i dužini lateralnog korijenja.

Slično kao i u radu Kontek i Petar (2016), tretmani fosforom nisu značajno promijenili morfološke karakteristike korijenovog sustava U1-Osječke šišulje. Međutim, opisan statistički značajan interakcijski učinak Fosfor×Mikoriza na duljinu korijena ukazuje da koncentracija fosfora u hranjivoj otopini ili interna koncentracija fosfora u biljci ipak može modificirati ovo svojstvo korijenovog sustava.

Moguće objašnjenje pojačanog grananja korijenovog sustava i time izazvanih povećanja površine, ukupne duljine i kuta grananja leži u činjenici da biljke u uvjetima AM inokulacije pojačano luče strigolaktone (Parniske, 2008). Strigolaktoni su biljni hormoni koji potiču stvaranje simbiozne asocijacije između biljke i gljive (Parniske, 2008), ali imaju i dokazan učinak na pojačano grananje korijena (Smith, 2008).



## 5.2. Utjecaj arbuskularne mikorize na primanje fosfora i suhu tvar nadzemnih organa pšenice

Značajno veće koncentracije i apsolutne količine  $P_2O_5$  u nadzemnim organima pšenice, utvrđene su kod biljaka uzgajanih u  $P^+$  u odnosu na  $P^-$  tretmane (Grafikon 5 i 6), dok tretman AM inokulacijom nije imao značajan utjecaj na primanje fosfora (Tablica 3). Pozitivan učinak AM na primanje hraniva, osobito fosfora vrlo je dobro dokumentiran (Marschner, 2012; Fitter, 2006). Izostanak povećanja koncentracije, kao i apsolutne količine fosfora u nadzemnim organima pšenice, vjerojatno leži u eksperimentalnom dizajnu ovog pokusa. Naime, dokazano je da AM mijenja fizikalna i kemijska svojstva tla i povećava primanje fosfora iz teško topivih oblika (kompleksa s kalcijem, željezom ili aluminijem) (Marschner, 2012; Fitter, 2006), što nije bio slučaj u ovom pokusu zbog toga što takvi oblici fosfora nisu primijenjeni kao tretmani. Kod tretmana niske koncentracije fosfora korištena je koncentracija od  $1 \mu M P L^{-1}$  koja je bila jednako dostupna AM inokuliranim i ne inokuliranim biljkama, odnosno u pokus nije bio uključen tretman određenom koncentracijom fosfora u nekom od slabo pristupačnih oblika. Stoga, nije došlo do značajnog izražaja AM na primanje i translokaciju fosfora u nadzemne organe. S druge strane, visoka koncentracija fosfora ( $45 \mu M P L^{-1}$ ) predstavlja dovoljno visoku koncentraciju u kojoj AM učinak ne dolazi do izražaja. Međutim, ovakav rezultat zapravo je maskiran povećanim rastom korijenovog sustava (opisanog u prethodnom poglavlju). Naime, veći korijenov sustav kod AM inokuliranih biljaka, osobito veća ukupna duljina korijenovog sustava AM inokuliranih biljaka u tretmanu  $P^-$  ukazuje na činjenicu da je kod AM inokuliranih biljaka fosfor vjerojatno zadržan u korijenu, kako bi potaknuo jači razvoj korijena. Poznata je uloga fosfora u metaboličkim procesima, osobito u procesima disanja (Taiz i Zeiger, 2012). Atkinson i sur. (1994) navode da je kod biljaka AM inokuliranih biljaka zabilježen veći intenzitet disanja korijenja, koji povezuje s pojačanim metabolizmom korijena i povećanim usvajanjem hraniva. Upravo takav pojačani metabolizam korijena te veći korijenov sustav utvrđen kod AM inokuliranih biljaka zahtijeva veće količine fosfora koje omogućuju normalan metabolizam energije.

Nadalje, unatoč povećanju korijenovog sustava, što svakako predstavlja značajno trošenje asimilata za rast korijena, kod AM inokuliranih biljaka, utvrđena je veća suha masa u odnosu na ne inokulirane biljke (Grafikon x). Kao što navode Manschadi i sur. (2013), povećano grananje korijena zahtijeva i povećanu translokaciju ugljikohidrata u korijen te predstavljaju veliki energetska trošak, što utječe na smanjen rast nadzemnih organa. Obzirom na utvrđen

porast korijena i istovremeni porast suhe tvari nadzemnih organa kod AM inokuliranih biljaka, možemo zaključiti da je kod AM inokuliranih biljaka došlo do manjeg negativnog utjecaja nedostatka fosfora na redistribuciju asimilata i sintezu suhe tvari.

### **5.3. Utjecaj arbuskularne mikorize na promjene fluorescencije klorofila u uvjetima nedostatka fosfora**

Nedostatak fosfora utjecao je na smanjenje kvantne efikasnosti PSII kod biljaka adaptiranih na tamu, kao i kod biljaka adaptiranih na svjetlo, kod kojih je došlo i do smanjenja ETR (Tablica 5). Svi mjereni pokazatelji fluorescencije klorofila ukazuju da su biljke tretmana P- doživjele stres. Nadalje, kod AM inokuliranih biljaka izmjerene su veće vrijednosti Y(II) i ETR, što ukazuje na pozitivan učinak mikorize na svjetlosne reakcije fotosinteze. Međutim, statistički značajna interakcija Fosfor×Mikoriza ukazuje na činjenicu da su biljke AM inokulacijskih tretmana različito reagirale pri različitim koncentracijama fosfora u otopinama. Točnije, AM inokulirane biljke imale su veće izmjerene vrijednosti Y(II) i ETR u odnosu na ne inokulirane biljke u tretmanu P-, dok se izmjere ovih parametara nisu razlikovale između AM inokuliranih i ne inokuliranih biljaka u tretmanu P+. Ovi rezultati zajedno s rezultatima veće suhe mase nadzemnih organa ukazuju na ublažavajući učinak arbuskularne mikorize na stres izazvan nedostatkom fosfora, unatoč jednakim količinama fosfora utvrđenim u nadzemnim organima.

Izostanak ublažavajućeg učinka AM inokulacije na kvantnu efikasnost PSII kod biljaka adaptiranih na tamu, a s istovremenim ublažavajućim učinkom kod biljaka adaptiranih na svjetlo, ukazuje da AM zapravo djeluje na razini ne fotokemijskog rasipanja viška energije. Kako navode Quiles i sur. (2012), razlika u maksimalnom kvantnom iskorištenju svjetlosti PSII, kod biljaka adaptiranih na svjetlo (Y(II)) i biljaka adaptiranih na tamu ( $(F_m - F_0)/F_m$ ), zapravo leži u mogućnosti ne fotokemijskog rasipanja viška energije. Drugim riječima, stres izazvan nedostatkom fosfora izaziva jednaku razinu inhibicije svjetlosnih reakcija kod AM inokuliranih i ne inokuliranih biljaka kada je riječ o količini primarnih akceptora elektrona (plastokinona) i brzini njihovog primanja elektrona s PSII, na što ukazuje statistički značajno smanjenje  $(F_m - F_0)/F_m$  kod biljaka P- u odnosu na biljke P+. S druge strane, AM inokulacija, slično normalnoj opskrbljenosti fosforom, utječe na smanjenje ne fotokemijskog rasipanja energije, odnosno na smanjenje gubitaka energije u obliku zagrijavanja i fluorescencije klorofila.

Kada je riječ o utjecaju nedostatka fosfora na inhibiciju fotosinteze, Rychter i Rao (2005) kao jedno od mogućih objašnjenja navode: i) Inhibiciju fotofosforilacije (sintezu ATP-a), što dovodi do poremećaja tilakoidnih membrana i smanjenog transporta elektrona; ii) Smanjenje intenziteta regeneracije ribuloza 1,5-difosfata, što dovodi do usporavanja Calvinovog ciklusa; te iii) Smanjenje rasta pojedinih biljnih dijelova što dovodi do smanjenog kapaciteta izljeva u floemskom transportu, zbog čega se poput povratne sprege inhibira fotosinteza.

Obzirom da kod AM inokuliranih biljaka nije utvrđeno značajno povećanje ni koncentracije ni apsolutne količine fosfora u nadzemnim organima u odnosu na ne inokulirane biljke, malo je vjerojatno da je ublažavajući učinak AM inokulacije izazvan smanjenjem regeneracije ribuloza 1,5 difosfata. Nadalje, utvrđeno povećanje ETR kod AM inokuliranih biljaka u odnosu na ne inokulirane biljke u P- tretmanu ukazuje na moguću efikasniju sintezu ATP u svjetlosnim reakcijama. No isto tako, kao logičan zaključak nameće se da je pojačani rast korijenovog sustava, i uz to vezan pojačan metabolizam korijena uzrokovao povećanu potrebu za asimilatima, odnosno povećanje kapaciteta izljeva što neizravno povećava intenzitet fotosinteze. Takvom zaključku u prilog ide činjenica da AM inokulirano korijenje predstavlja pojačan izljev, osobito za saharozu kao glavnu transportirajući tvar u floemu (Hause i sur., 2002).

## 6. ZAKLJUČCI

Inokulacija korijena pšenice arbuskularnom mikorizom izazvala je značajne promjene morfologije korijenovog sustava pšenice, no nije imala utjecaj na broj i duljinu korijenovih dlačica. AM inokulirane biljke razvile su širi i površinom veći korijenov sustav, šireg kuta grananja u odnosu na ne inokulirane biljke neovisno o koncentraciji fosfora u hranjivim otopinama. Nadalje, AM inokulacija utjecala je i na povećanje ukupne duljine korijena kod biljaka uzgajanih pri niskoj koncentraciji fosfora.

Nedostatak fosfora u hranjivim otopinama uzrokovao je smanjenje koncentracije i apsolutne količine fosfora u nadzemnim organima pšenice, bez obzira na tretman AM inokulacije. Međutim, AM inokulirane biljke su pri obje koncentracije fosfora u hranjivim otopinama stvorile veću suhu masu nadzemnih organa, što ukazuje na bolje iskorištenje fosfora kod AM inokuliranih u odnosu na AM ne inokulirane biljke.

Nedostatak fosfora uzrokovao je smanjenu efikasnost PSII kod biljaka adaptiranih na svjetlo te biljaka adaptiranih na tamu. Kod biljaka adaptiranih na svjetlo, AM inokulacija ublažila je negativne učinke stresa nedostatka fosfora na ETR, kao i na kvantnu efikasnost PSII, vjerojatno zbog povećane potrebe za asimilatima od strane korijena.

Ovi rezultati ukazuju da u uvjetima nedostatka fosfora kod AM inokuliranih biljaka dolazi do efikasnije preraspodjele fosfora, koja stimulira pojačan rast i metabolizam korijena, pri čemu takav korijenov sustav predstavlja pojačan izljev u floemskom transportu i time neizravno stimulira proces fotosinteze, što u konačnici povećava efikasnost PSII i svjetlosnih reakcije fotosinteze.

## 7. POPIS LITERATURE

1. AOAC (1995). Official Methods of Analysis, 16th Edition. AOAC International, Washington.
2. Atkinson D., Berta G., Hooker J. E. (1994). Impact of mycorrhizal colonisation on root architecture, root longevity and the formation of growth regulators. In Gianazzi S., Schuepp, H. (ed), Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems, pp.89-99
3. Bates T. R., Lynch J. P. (2001). Root hairs confer a competitive advantage under low phosphorus availability. *Plant and Soil*, 236: 243-250.
4. Bonser A. M., Lynch J. P., Snapp S. (1996). Effect of phosphorus deficiency on growth angle of basal roots in *Phaseolus vulgaris*. *New Phytologist*, 132: 281-288.
5. Bücking H., Liepold E., Ambilwade P. (2012). The role of the mycorrhizal symbiosis in nutrient uptake of plants and the regulatory mechanisms underlying these transport processes. *Plant Science*. pp 107-138.
6. Fitter, A.H. (2006) What is the link between carbon and phosphorus fluxes in arbuscular mycorrhizas? A null hypothesis for symbiotic function. *New Phytologist*, 172 :3-6
7. Hause, B., Maier, W., Miersch, O., Kramell, R. & Strack, D. (2002). Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots. *Plant Physiology* 130: 1213–1220
8. Ho M. D., Rosas J. C., Brown, K. M., Lynch J. P. (2005). Root architectural tradeoffs for water and phosphorus acquisition. *Functional Plant Biology*, 32: 737-748.
9. Hund A., Trachsel S., Stamp P. (2009). Growth of axile and lateral roots of maize: I development of phenotyping platform. *Plant and Soil*, 325: 335-349.
10. Kontek M., Petar M. (2016). Morfološke karakteristike korijenovog sustava pšenice i njihova uloga u usvajanju fosfora/ Rad za rektorovu nagradu 2015/2016.
11. Kozumplik V., Martinić-Jerčić Z. (2000). Oplemenjivanje ratarskog i povrtnog bilja u Hrvatskoj. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 65: 129-141.
12. Le Marié C., Kirchgessner N., Marschall D., Walter A., Hund A. (2014). Rhizoslides: paper-based growth system for non-destructive, high throughput phenotyping of root development by means of image analysis. *Plant methods*, 10: 1-13.

13. Li C.-J., Pang X., Zhang F.-S. (2003). Comparison on responses of different phosphorus-efficient wheat varieties to phosphorus-deficiency stress. *Acta Botanica Sinica* 45: 936-943.
14. Long S.P., Humphries S., Falkowski P.G. (1994). Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 45: 633-662.
15. Lopez-Bucio J., Cruz-Razmirez A., Herrera-Estrella L. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 280-287.
16. Lynch J. P. (1995). Root architecture and plant productivity. *Plant Physiology*, 109: 7-13.
17. Lynch J. P. (2011). Root phenes for enhanced soil exploration and phosphorus acquisition: Tools for future crops. *Plant Physiology*, 156: 1041-1049.
18. Lynch J. P., Brown K. M. (2001). Topsoil foraging-an architectural adaptation of plants to low phosphorus availability. *Plant and Soil* 237: 225-237.
19. Ma Z., Bielenberg D.G., Brown K. M., Lynch J. P. (2001). Regulation of root hair density by phosphorus availability in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment* 24: 459-467.
20. Magnavaca R., Gardner C. O., Clark R. B. (1987). Evaluation of inbred maize lines for aluminium tolerance in nutrient solution. In *Genetic Aspects of Plant Mineral Nutrition*. Martinus Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands, pp 255-265.
21. Manschadi A. M., Manske G. G. B., Vlek P. L. G. (2013). Root architecture and resource acquisition: Wheat as a model plant. In: Eshel A., Beeckman T. (ed), *Plant Roots: The Hidden Half*, 4th edition. Taylor and Francis Group, LLC, pp 22: 1-13.
22. Marschner, H. (2012). *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants* 3rd edition, Edited by Petra Marschner. Elsevier, Academic Press., London, UK, pp. 85-133; pp 158-165
23. Martinčić J., Javor P. (1996). Pšenica (*Triticum aestivum* L.). Martinčić J., Kozumplik V. (ed.), *Oplemenjivanje bilja*. pp 117-155.
24. Quiles M.J., Ibáñez H., Muñoz R. (2012). Using Chlorophyll Fluorescence Imaging for Early Assessment of Photosynthesis Tolerance to Drought, Heat and High Illumination. In: Najafpour M.M. (ed), *Artificial Photosynthesis*. InTech Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia. pp 207-218.

25. Parniske M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews* 6: 763 – 775.
26. Raghothama K. G. (2000). Phosphorus acquisition; plant in the driver's seat! *Trends in Plant Science* 5: 412-413.
27. Rychter A. M., Rao I. M. (2005). Role of Phosphorus. In Pessaraki M. (ed). *Photosynthetic Carbon Metabolism. Handbook of Photosynthesis, Second Edition.* CRC Press. eBook ISBN: 978-1-4200-2787-7.
28. Sayed O.H. (2003). Chlorophyll fluorescence as a tool in cereal crop research. *Photosynthetica*, 41: 321-30.
29. Schachtman D. P., Reid R. J., Ayling S. M. (1998). Phosphorus uptake by plants: From soil to cell. *Plant Physiology*, 116: 447-453.
30. Schreiber U. (2004). Pulse-Amplitude (PAM) fluorometry and saturation pulse method. In: Papageorgiou G. (ed), *Chlorophyll a fluorescence. A signature of photosynthesis.* Dordrecht: Springer; 279-319.
31. Schreiber, U., Bilge, W., Neubauer, C. (1994). Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: Schulze, E.D., Caldwell, M.M. (ed.), *Ecophysiology of Photosynthesis.* Springer-Verlag, Berlin pp 49-70.
32. Shaff J. E., Schultz B. A., Craft E. J., Clark R. T., Kochian L. V. (2010). GEOCHEM-EZ: a chemical speciation program with greater power and flexibility. *Plant and Soil* 330: 207-214.
33. Smith S. E., Read D. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis* 3rd Edition. Elsevier Ltd. Academic Press.
34. Smith S. E., Smith F. A. (2011). Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: New paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual Review of Plant Biology*. 62: 227-250.
35. Taiz L., Zeiger E. (2012). *Plant Physiology* 5th edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland USA.
36. Vance C.P., Uhde-Stone C., Allan D.L. (2002). Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist* 157: 423-447.
37. Vukadinović V., Vukadinović V. (2011). Ishrana bilja. III izmijenjeno i dopunjeno izdanje. Osijek. pp 186-192.

## 8. SAŽETAK

Bernardica Jelčić

### Ublažavajući učinak arbuskularne mikorize na stres izazvan nedostatkom fosfora kod pšenice

Najznačajnije prilagodbe biljaka na nedostatak fosfora uključuju promjene morfoloških karakteristika korijena i uspostavu arbuskularne mikorize (AM). Utjecaj AM gljiva na usvajanje fosfora dobro je poznat, međutim vrlo je malo poznato o njihovom utjecaju na morfološke karakteristike korijenovog sustava u uvjetima nedostatka fosfora, te njihov mogući ublažavajući učinak na stres izazvan nedostatkom fosfora.

Ciljevi ovog istraživanja bili su: i) opisati utjecaj AM na morfološke karakteristike korijena pšenice (*Triticum aestivum*, L.) u uvjetima smanjene dostupnosti fosfora; ii) utvrditi utjecaj AM na efikasnost usvajanja fosfora kod pšenice; iii) procijeniti ublažavajući učinak AM na promjene fluorescencije klorofila u uvjetima nedostatka fosfora, te utvrditi ukupni ublažavajući učinak AM na nedostatak fosfora kod pšenice.

Pokus je postavljen u *pouch* sustavima. Biljke pšenice, sorte U1-Osječka šišulja, uzgajane su u Magnavaca hranjivoj otopini tijekom 20 dana. Tretmane su predstavljale dvije koncentracije fosfora u hranjivim otopinama: niska (P-) ( $1 \mu\text{M P L}^{-1}$ ) i visoka (P+) ( $45 \mu\text{M P L}^{-1}$ ), te dva tretmana inokulacije biljaka AM gljivama vrste *Rhizophagus irregularis*: inokulirane (M) i ne inokulirane (NM) biljke. Morfološke karakteristike korijenovog sustava određivane su pomoću WinRhizo Pro softvera 5., 10. i 15. DNP. Na kraju pokusa, 20 DNP, izmjereni su parametri fluorescencije klorofila, koji su uključivali: maksimalnu kvantnu efikasnost PSII kod biljaka adaptiranih na tamu ( $F_m - F_0 / F_m$ ), efektivnu kvantnu efikasnost PSII (Y(II)), te relativni intenzitet transporta elektrona (ETR) kod biljaka adaptiranih na svjetlo. Biljke su podijeljene na nadzemne i podzemne organe, pri čemu je u nadzemnim organima utvrđena suha masa te koncentracija i apsolutna količina fosfora, dok je korijenje obojano radi utvrđivanja broja i dužine korijenovih dlačica.

AM inokulirane biljke razvile su širi i površinom veći korijenov sustav, šireg kuta grananja u odnosu na ne inokulirane biljke, neovisno o koncentraciji fosfora. AM inokulacija utjecala je i na povećanje ukupne duljine korijena kod biljaka uzgajanih pri niskoj koncentraciji fosfora. AM inokulirane biljke su pri obje koncentracije fosfora u hranjivim otopinama stvorile veću suhu masu nadzemnih organa.



Nedostatak fosfora uzrokovao je smanjenu efikasnost PSII kod biljaka adaptiranih na svjetlo te kod biljaka adaptiranih na tamu. Kod biljaka adaptiranih na svjetlo, AM inokulacija ublažila je negativne učinke stresa nedostatka fosfora na ETR te Y(II).

Ovi rezultati ukazuju da u uvjetima nedostatka fosfora kod AM inokuliranih biljaka dolazi do efikasnije preraspodjele fosfora, promjene rasta korijenovog sustava koji predstavlja povećani izljev asimilata i neizravno potiče fotosintezu te na taj način ublažava stres izazvan nedostatkom fosfora.

**Ključne riječi:** arbuskularno mikorizne gljive, koncentracija fosfora, morfologija korijena, fluorescencija klorofila

## 9. SUMMARY

Bernardica Jelčić

### **Mitigation of phosphorus deficiency stress by arbuscular mycorrhizae in wheat**

The most significant plant adaptations to the low phosphorus (P) availability include changes of the root morphological traits and the formation of arbuscular mycorrhizae (AM). The influence of AM fungus on the phosphorus acquisition is well known. Yet little is known about their influence on the root morphological traits in conditions of low phosphorus availability as well as their possible mitigating effect on phosphorus deficiency stress.

Aims of this study were: i) description of the influence of AM on the root morphological traits of wheat (*Triticum aestivum*, L.) in conditions of low phosphorus availability; ii) to determine the influence of AM on the P acquisition efficiency; iii) to evaluate the mitigating effect of AM on changes in chlorophyll fluorescence caused by P deficiency and determine the overall mitigating effect of AM on the wheat P deficiency.

The experiment was conducted in *pouch* systems. Wheat plants, U1-Osječka šišulja variety, were grown in Magnavaca's nutrient solution for 20 days. Treatments were represented as low and high phosphorus concentrations in nutrient solutions (1 and 45  $\mu\text{M P L}^{-1}$ , respectively) and as two treatments of inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi (*Rhizophagus irregularis*): inoculated (M) and non-inoculated (NM) plants. Root morphological traits were determined using WinRhizo Pro software 5<sup>th</sup>, 10<sup>th</sup> and 15<sup>th</sup> days after planting (DAP). Chlorophyll fluorescence parameters were measured at 20 DAP, and included maximum quantum yield of PSII in dark-adapted plants ( $(F_m - F_0)/F_m$ ), and effective quantum yield of PSII (Y(II)) and electron transport rate (ETR), measured in plants adapted to light. At the end of the experiment plants were divided into root and shoot, where the dry mass and P concentration, including absolute P content in the shoot were determined. The roots were dyed to determine the number and length of root hairs.

AM inoculated plants developed broader root systems with a wider growth angle and larger surface area compared to non-inoculated plants regardless of phosphorus concentration treatment. AM inoculation also increased the total root length in plants grown at low phosphorus concentrations. Dry mass of AM inoculated plants increased at both P treatments.

Phosphorus deficiency reduced quantum yields of PSII in plants adapted to light and dark adapted plants. In plants adapted to light, AM inoculation mitigated the negative effects of P stress on ETR and Y(II).

These results indicate that phosphorus deficiency in AM inoculated plants results in a more efficient redistribution of P within the plant. In addition, changes in the root system growth increased sink capacity for the assimilate translocation, which in turn stimulates photosynthesis, thus alleviates the stress caused by phosphorus deficiency.

**Key words:** AM fungi, phosphorus concentration, root morphology, chlorophyll fluorescence

## 10. ŽIVOTOPIS AUTORICE

**Bernardica Jelčić** rođena je 3. lipnja 1993. godine u Metkoviću. Osnovnu školu pohađa u Metkoviću (OŠ don Mihovila Pavlinovića) te nakon završetka upisuje XVI. gimnaziju u Zagrebu. Akademske godine 2012./2013. upisuje Agronomski fakultet u Zagrebu, preddiplomski studij Agroekologija. Preddiplomski studij završava 2015. godine obranivši završni rad na temu „Broj nodijalnih korijena klijanaca graha (*Phaseolus vulgaris* L.) kao pokazatelj budućih morfoloških karakteristika korijena“ te stječe naziv sveučilišne prvostupnice inženjerke agroekologije. Trenutno je studentica druge godine diplomskog studija Agroekologija, usmjerenje Agroekologija na Agronomskom fakultetu u Zagrebu.