

UDK: 582.681:581.165.1(497.11)

Izvorni naučni rad *Original scientific paper*

**TESTIRANJE KLONOVA TOPOLA (*Populus spp.*) I VRBA (*Salix spp.*) ZA
FITOREMEDIJACIJU HERBICIDA KROZ ISPITIVANJE UTICAJA NA
NJIHOVE FIZIOLOŠKE PROCESE**

Andrej Pilipović¹, Saša Orlović¹, Branislav Trudić¹, Marina Katanić¹, Verica Vasić¹,
Marko Keber¹

Izvod: Biljke i njima pridruženi mikroorganizmi se mogu koristiti u prečišćavanju zemljišta zagađenog raznim vrstama kontaminanata i ta tehnologija se naziva fitoremedijaciju. Od drveća koja se koriste za ovu namenu, topole i vrbe predstavljaju najčešće ispitivane drvenaste vrste na severnoj hemisferi. Dosadašnja istraživanja kod nas su najčešće obuhvatala fitoremedijaciju teških metala, nutrijenata i naftnih ugljovodonika, pokazujući različit potencijal postojećih klonova za ovu namenu. Istraživanja prezentovana u ovom radu su obuhvatila ispitivanje potencijala različitih klonova topola i vrba za fitoremedijaciju zemljišta zagađenih perzistentnim herbicidima oksifluorfen (Goal) i flurohloridon (Racer 25-EC) kroz testiranje uticaja pomenutih herbicida na fiziološke i biohemijske procese kod navedenih vrsta

Ključne reči: Fitoremedijacija, herbicidi, topole, vrbe

**TESTING OF POPLAR (*Populus sp.*) AND WILLOW (*Salix sp.*) FOR HERBICIDE
PHYTOREMEDIATION THROUGH INVESTIGATION ON THE EFFECT ON THEIR
PHYSIOLOGICAL PARAMETERS**

Andrej Pilipović¹, Saša Orlović¹, Branislav Trudić¹, Marina Katanić¹, Verica Vasić¹, Marko
Keber¹

Abstract: Plants and their associated organisms can be used for environmental cleanup in the technology entitled phytoremediation. Amongst various number of trees, poplars and willows present most oftenly used tree species in the northern hemisphere. Up to date research in

¹ Dr Andrej Pilipović, naučni saradnik; dr Saša Orlović, redovan profesor, master biol. Branislav Trudić, istraživač saradnik, dr Marina Katnić, naučni saradnik, dr Verica Vasić, naučni saradnik, dr Marko Keber, naučni saradnik, Univerzitet u Novom Sadu, Institut za nizjsko šumarstvo i životnu sredinu, Novi Sad, Republika Srbija.

¹ Dr Andrej Pilipović, Research associate; dr Saša Orlović, Full professor, master biol. Branislav Trudić, Research assistant, dr Marina Katnić, Research associate, dr Verica Vasić, Research associate, dr Marko Keber, Research associate, University of Novi Sad, Institute of Lowland Forestry and Environment, Novi Sad, Republic of Serbia

Serbia mostly involved investigation of potential of different poplar and willow clones for heavy metals, nutrients and hydrocarbons phytoremediation. This paper presents investigation of the potential for phytoremediation of persistent herbicides Goal and Racer through testing of effects of these herbicide on physiological and biochemical parameters of mentioned species.

Keywords: phytoremediation, herbicides, poplars and willows

UVOD

Intenzivna poljoprivreda i razvoj industrije su doveli do zagađenja životne sredine. Prekomerna primena mineralnih đubriva i pesticida u cilju povećanja produktivnosti gajenih kultura je uzrokovala nagomilavanje kontaminanata u zemljištu, što je dovelo do degradacije najkvalitetnijih zemljišta i agroekosistema. Istraživanja su pokazala da biljke i njima pridruženi mikroorganizmi, koji se nalaze u zoni korenovog sistema, mogu da razgrade različite kontaminante organskog i neorganskog porekla. Ova zelena tehnologija se naziva fitoremedijacija i predstavlja prirodnu, neinvazivnu i nedestruktivnu tehniku prečišćavanja životne sredine. Najveći broj istraživanja je izvršen sa zeljastim biljkama, ali one zbog male biomase i plitkog korenovog sistema, koji ne dospeva u dublje slojeve zemljišta, nemaju visoku efikasnost.

Nasuprot zeljastim biljkama, spektar drvenastih vrsta koje se mogu primeniti u fitoremedijaciji je veoma uzan i najbolji rezultati su dobijeni istraživanjima sa topolama i vrbama zahvaljujući njihovom brzom rastu, razvijenom korenovom sistemu, koji prodire u dublje slojeve zemljišta do podzemne vode, visokom intenzitetu transpiracije i jednostavnoj vegetativnoj propagaciji (Chapell, 1997). Različita istraživanja su pokazala efikasnost topola i vrba u fitoremedijaciji nitrata, teških metala, natnih ugljovodonika i drugih organskih kontaminanata (Pilipović, 2005; Pilipović et al., 2005; Nikolić et al., 2009; Borišev et al., 2009; Pilipović et al., 2012). Za razliku od teških metala koji se ekstrahuju iz zemljišta i akumuliraju u biljkama, ili nitrata koje biljke lako usvajaju i koriste kao hranjiva, pesticidi, kao složena organska jedinjena, ne mogu lako biti usvojeni i metabolisani od strane biljaka. Njihova fitoremedijacija se odvija kroz više mehanizama fitoremedijacije kao što su rizodegradacija, u kojoj se oni razlažu putem pomoću mikroorganizama rizosfere, i fitodegradacija u kojoj se oni razlažu putem biljnih eksudata i kroz metabolizam biljaka (EPA, 2000).

Organska proizvodnja zdrave hrane je uslovljena upotreboru nezagadjenih, čistih zemljišta na kojima duži niz godina nije bilo primene pesticida i veštackih đubriva. U cilju skraćenja perioda do dobijanja čistog zemljišta, primena fitoremedijacije topolama i vrbama predstavlja idealnu alternativu i obezbeđuje trajnost prihoda kroz proizvodnju drvene biomase. Mnogi herbicidi koji se koriste u agronomiji, kao što su inhibitori fotosistema I i II, hloroacetamidni i fototoksični herbicidi deluju tako što dovode do pojačane produkcije kiseoničnih slobodnih radikala u biljkama. Mehanizam rezistentnosti pojedinih biljnih vrsta na ove herbicide je u vezi sa sposobnošću biljaka da sintetišu različite antioksidante koji imaju zaštitno dejstvo u uslovima oksidativnog stresa (Popović i Štajner, 2008).

Do sada je dosta ispitivan uticaj različitih herbicida i rezistentnost istih kod korovskih biljaka kao što su *Echinochloa crus-galli* L., *Chenopodium hybridum* L., *Amaranthus retroflexus* L., *Datura stramonium* L., *Setaria viridis* L. na herbicide. Njihova rezistentnost je takođe praćena ispitivanjem antioksidativnog potencijala ovih biljaka preko različitih screening parametara oksidativnog stresa (Popović i Štajner, 2008).

Cilj ovog istraživanja je bio da se ispita uticaj perzistentnih herbicida na fiziološke i biohemijske procese kod različitih klonova topola i vrba u cilju testiranja mogućnosti primene ispitivanih klonova za fitoremedijaciju herbicida.

MATERIJAL I METODE

Eksperiment je postavljen u vidu zemljanje kulture u kontrolisanim uslovima, sa temperaturom od 15-25°C, kontrolisanim zalivanjem i stalnom svetlošću. Reznice klonova topola *Populus x euramericana* cl. I-214 i *Populus deltoides* Bartr. cl. PE 19/66, kao i klonovi vrbe *Salix alba* L. cl. B-44 i *Salix alba* cl. 378 su posađeni u Mičerlihove sudove zapremine 5l, gde je u svaki sud posađeno po 4 reznice. Nakon sadnje reznica sudovi su tretirani odabranim herbicidima, dok je deo sudova ostavljen kao kontrola.

Odabir herbicida

Izabrani herbicidi oksifluorfen (Goal) i flurohloridon (Racer 25-EC) su herbicidi koji su primjenjeni u fazi posle setve a pre nicanja gajenih i korovskih biljaka. **Herbicid Racer** spade u grupu Piridazinona sa aktivnom materijom Flurohloridon, hemijskog naziva po IUPAC-u: (3RS,4RS;3RS,4SR)-3-hlor-4-hlormetil-1-(α , α , α -trifluor-mtoil)-2-pirolidinon. Flurohloridon je herbicid koji se usvaja korenom, stablom i koleoptilom i inhibira biosintezu karotenoida u delu fiteon desaturaze (DPS). Mnogi herbicidi koji inhibiraju sintezu karotenoida ispoljavaju efekat izbeljivanja ("bleaching" effect) na gajenim biljkama (slike 4,5, i 6). Razgradnja fluorhloridona u zemljištu je 9-70 dana. Prilikom tretiranja treba poštovati vodozaštitne zone i sprečiti kontaminaciju voda (vodotoka, bunara, jezera i izvorišta voda) tretirajući najmanje 20 m udaljeno od njih. **Herbicid Goal** spada u hemijsku grupu difeniletara sa aktivnom materijom Oksifluorfen, po Iupac nomenklaturi: 2chloro α , α , α -trifluoroptolyl 3ethoxy4nitrophenyl ether. Oksifluorfen je kontaktni herbicid koji se usvaja korenom, lišćem i stablom. Primarno se transportuje ksilemom i slabo se kreće u biljci. Primarno mesto delovanja je protoporfirinogen oksidaza (PPO), enzim za biosintezu hlorofila. Aktivnost mu se pojačava sa svetlošću. Listovi tolerantnih biljaka mogu pokazati znakove hloroze, naročito kod upotrebe viših doza herbicida. U biljkama se razlaže sporo, a u zemljištu se jako adsorbuje. Poluvreme razgradnje oksifluorfena u zemljištu iznosi 292 dana (aerobni uslovi) i 585 dana (anaerobni uslovi). Tretiranje zemljišta je obavljeno ispitivanim herbicidima. Herbicid flurohloridon je primjenjen u dozi 2 litra/ha odnosno 2 ml herbicida na 10 m² površine uz utrošak vode od 300 ml, preračunato na površinu Mičerlihovih sudova. Herbicid oksifluorfen je primjenjen u

dozi 1 litar/ha odnosno 1 ml herbicida na 10 m² površine uz utrošak vode od 300 ml, preračunato na površinu Mičerlihovih sudova. Herbicid flurohloridon je ispoljio prolazne simptome izbeljivanja "bleaching effect" na vrbi (Slika 1 i 2). Herbicid oksifluorfen nije ispoljio simptome fitotoksičnosti na topoli (Slika 3).



Slika 1 i 2. Simptomi izbeljivanja "bleaching effect" na vrbi posle primene herbicida flurohloridon (Racer 25-EC)
Pictures 1 and 2. Bleaching effect symptoms after application of herbicide Racer



Slika 3. Herbicid oksifluorfen (Goal) nije ispoljio simptome fitotoksičnosti na topoli
Picture 3. Herbicide Goal showed no phytotoxicity symptoms on poplars

Biohemski parametri

Odmah nakon uzorkovanja, uzorci lišća su pohranjeni na -20°C do momenta pravljenja ekstrakata. Za analize oksidativnog stresa, pripremljeni su vodeni ekstrakti u fosfatnom puferu. Nakon pripreme ekstrakata, izvršene su analize sledećih biohemijskih parametara: (I) ABTS RSC test - ABTS test je sproveden prema Miller i Rice-Evans, (1997); (II) NO RSC test-test praćenja inhibicije NO radikala je zasnovan na Griess-lllosvory reakciji; (III) sadržaja ukupnih fenola - je određen po metodi Singleton et al., (1999), koja se zasniva na reakciji fenola sa *Folin-Ciolcateu*-ovim reagensom (smeša Na₂WO₄, Na₂MoO₄, HCl, H₃PO₄ i LiSO₄); (IV) sadržaja flavonoida - Sadržaj flavonoida određen je po spektrofotometrijskoj metodi Chang et al., (2002), prilagođenoj za mikrotitar ploče i (V) DPPH test u kome je reakciona smeša bila sačinjena od 10 uL ekstrakta i 300 ul DPPH radikala koncentracije (400 mM). Nakon inkubacije, smanjenje apsorpcije za svaki uzorak je mereno pri 490 nm pomoću ThermoScientific spektrofotometra gde je askorbinska kiselina korišćena kao standard.

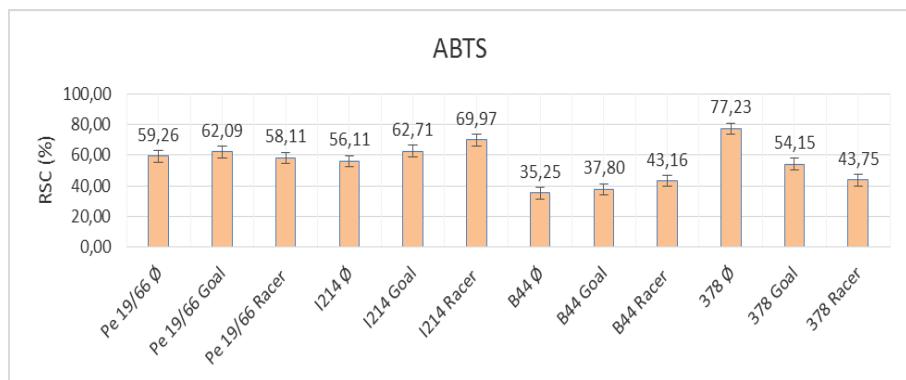
Fiziološki parametri

Istraživanja uticaja herbicida na fiziološke parametre su obuhvatila određivanje intenziteta razmene gasova kod ispitivanih klonova, određivanje sadržaja hlorofila i njegove fluorescencije. Merenja razmene gasova su vršena pomoću prenosnog aparata za merenje razmene gasova ADC LCPro+ (ADC Bioscientific) koji vrši merenje intenziteta fotosinteze biljaka, intenziteta transpiracije i stomatalne provodljivosti. Merenje sadržaja hlorofila je izvršeno pomoću uređaja Minolta SPAD meter koji meri obojenost listova i izraženo je SPAD jedinicama čija je vrednost u pozitivnoj korelaciji sa sadržajem pigmenata. Fluorescencija hlorofila, koja pokazuje stabilnost fotosistema 2 (PSII) u procesu fotosinteze, je na tretiranim biljkama merena pomoću prenosnog fluorimetra OptiScience OS-1. Sve metode merenja fizioloških parametara kod biljaka predstavljaju nedestruktivne metode i rađene su na istom listu kod svake ispitivane biljke.

REZULTATI I DISKUSIJA

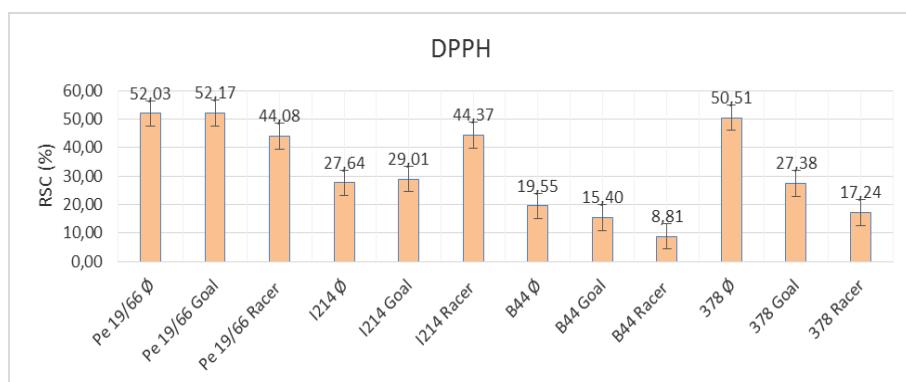
Biohemjni parametri

Grafikon 1: Prikaz rezultata za ABTS test ispitivanih klonova
Chart 1: Results of ABTS test of the investigated clones



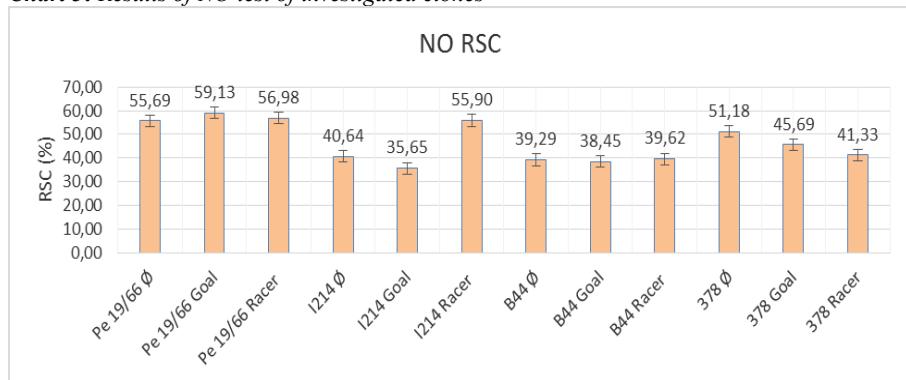
Preliminarni rezultati RSC vrednosti ABTS testa (grafikon 1) su ukazali na varijabilni odgovor klonova/vrsta na tretmane herbicidima. U pogledu dejstva herbicida Racer najveća povećanja su zabeležena kod klonova I-214 i B 44 (I-214: 56,11→69,97%; B 44: 35,25→43,16%), za oba herbicida, mada je povećanje pod uticajem Goal-a bilo manje izraženo. Kod klena PE 19/66 je zabeleženo neznatno smanjenje RSC vrednosti, dok je kod klena 378 smanjenje bilo RSC značenje (77,23→43,75%). Tretman herbicidom Goal je kod klonova PE 19/66, I-214 i B 44 uticao na manje povećanje RSC vrednosti nego herbicid Racer. Nasuprot ovim klonovima, kod klena 378 je zabeleženo značajno smanjenje RSC vrednosti (77,23→54,15%).

Grafikon 2: Prikaz rezultata za DPPH test ispitivanih klonova
Chart 2: Results of DPPH test of investigated clones



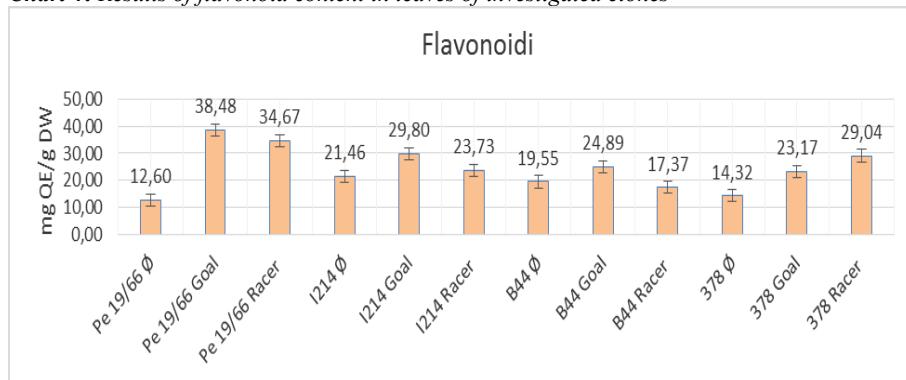
Praćenjem DPPH testa (grafikon 2.) registrovane su značajne i manje značajne promene smanjenja vrednosti RSC za tokom kod klonova Pe 19/66, 378 i B44. Manje značajna povećanja su registrovana u pojedinačnim merenjima tokom kod klena I-214 za tretman herbicida Goal (27,64→29,01%), dok je dejstvo herbicida Racer izazvalo veće povećanje RSC vrednosti (27,64→44,37%).

Grafikon 3: Prikaz rezultata za NO RSC test
Chart 3: Results of NO test of investigated clones



Preliminarni rezultati NO testa (grafikon 3.) su pokazali da nije došlo do značajnih promena u ispitivanju scavenger kapaciteta ispitivanih genotipova, osim kod klena I-214 herbicidom Racer (40,64→55,90%). Kod ostalih klonova su zabeležena minimalna smanjenja ili povećanja RSC vrednosti NO testa usled dejstva herbicida.

Grafikon 4: Prikaz rezultata za ukupni sadržaj flavonoida
Chart 4: Results of flavonoid content in leaves of investigated clones

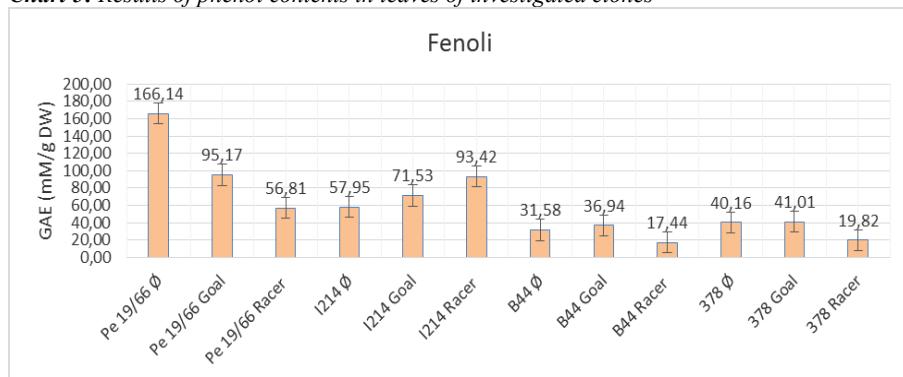


Praćenje koncentracije ukupnih flavonoida (grafikon 4.) je pokazalo da je došlo do naglog aktiviranja/sinteze flavonoida usled apliciranja ovih herbicida, te je registrovana njihova značajna uloga u odbrani od oksidativnog stresa. Klonovi I-214 i B 44 nisu pokazali značajne promene koncentracije flavonoida, dok je kod klonova PE 19/66 i 378 povećanje bilo veoma izraženo.

Do značajnog smanjenja sadržaja ukupnih fenola (grafikon 5.) je došlo kod sledećih klonova-378, i PE 19/66. Relativno značajne promene su registrovane kod klonova: I-214 i B44. Ovo ukazuje na aktiviranje fenolnog antikosidativnog sistema kod ovih biljaka usled apliciranih tretmana herbicida. Oba herbicida su na oba tretmana uticali na antioksidativni sistem biljaka.

Grafikon 5. Prikaz rezultata za ukupni sadržaj fenola u listovima ispitivanih klonova

Chart 5: Results of phenol contents in leaves of investigated clones

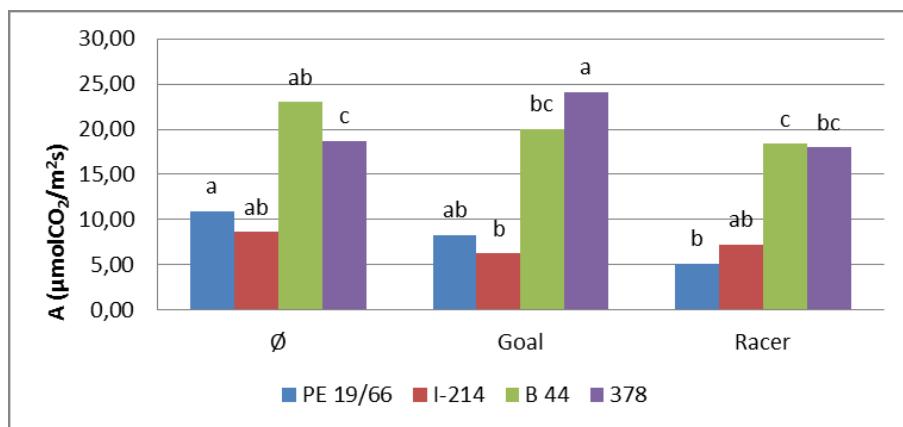


Fiziološki parametri

Rezultati merenja intenziteta fotosinteze (grafikon 6.) su pokazali uticaj herbicida na ispitivane klonove, mada razlike nisu kod svih klonova bile značajne. Signifikantno smanjenje intenziteta fotosinteze je zabeleženo u prisustvu herbicida Racer kod klena topole PE 19/66 i klona vrbe B-44. Kod biljaka vrbe klona 378 gajenih u zemljištu tretiranom herbicidom Goal je zabeleženo povećanje intenziteta fotosinteze, u poređenju sa kontrolnim biljkama.

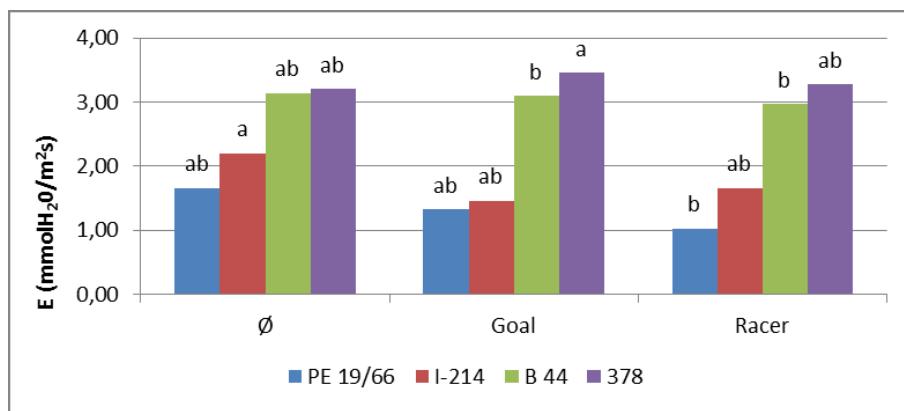
Grafikon 6. Intenzitet fotosinteze ispitivanih klonova topola i vrba

Chart 6: Net photosynthesis of investigated poplar and willow clones



Grafikon 7: Intenzitet transpiracije ispitivanih klonova topola i vrba

Chart 7: Transpiration of investigated poplar and willow clones



Nasuprot uticaju na fotosintezu, tretman sa izabranim herbicidima nije imao signifikantan uticaja na intenzitet transpiracije ispitivanih klonova topola i vrba (Grafikon 7), mada je kod klonova PE 19/66, I-214 i B 44 došlo do smanjenja transpiracije. Isti rezultati su dobijeni u pogledu uticaja prisustva herbicida na stomatalnu provodljivost ispitivanih klonova (Tabela 1). Iako nije bilo signifikantno, smanjenje stomatalne provodljivosti je zabeleženo kod klonova PE 19/66 i B 44.

Slika 4. Izgled biljaka topole klon PE 19/66 pod različitim tretmanima

Figure 4: Plants of clone PE 19/66 under different treatments



Tabela 1. Stomatalna provodljivost (gs), Sadržaj hlorofila (SPAD) i fluorescencija hlorofila (Fv/Fm) ispitivanih klonova

Table.1 Stomatal conductance (gs), chlorophyll content (SPAD) and chlorophyll fluorescence (Fv/Fm) of investigated clones

Klon Clone	Tretman Treatment	gs	SPAD		Fv/Fm	
PE19/66	Ø	0.137333	a	37.26667	ab	0.8215 a
	Goal	0.137333	a	33.43333	bc	0.81075 a
	Racer	0.04	a	33.7	bc	0.7945 a
I-214	Ø	0.125556	a	31.46667	c	0.78675 a
	Goal	0.116667	a	38.76667	a	0.7825 a
	Racer	0.143889	a	31.46667	c	0.7875 a
B 44	Ø	0.546667	a	30.93333	b	0.77875 a
	Goal	0.478889	a	37.76667	a	0.7985 a
	Racer	0.387639	a	32.6	ab	0.800667 a
378	Ø	0.434889	a	37.13333	a	0.79325 a
	Goal	0.557778	a	31.6	b	0.79375 a
	Racer	0.411111	a	32.53333	ab	0.78625 a

Uticaj herbicida na sadržaj hlorofila izražen preko SPAD vrednosti (Tabela 1) je bio zabeležen kod svih ispitivanih klonova topola i vrba. Herbicid Goal je prouzrokovao smanjenje sadržaja hlorofila PE 19/66 i 378, dok je kod klonova I-214 i B 44 zabeleženo povećanje u odnosu na kontrolu. Ispitivanja fluorescencije hlorofila (tabela 1) su pokazala da nije bilo značajnih razlika između ispitivanih klonova. Vrednosti su se kretnale u rasponu od 0,78-0,82 što predstavlja normalne vrednosti i ne ukazuje na poremećaj fotosistema II (PS II).

DISKUSIJA

Ispitivanje fitotoksičnosti, odnosno znaci fitotoksičnosti nam pomažu u izboru biljnih vrsta koje su u stanju da podnesu visoke nivoe kontaminacije i izdvajaju onih vrsta koje nisu sposobne da se prilagode postojećim uslovima (Kirk et al., 2002).

Samo mali broj literaturnih podataka je dostupan na temu ispitivanja uticaja herbicida Racer i Goal na fiziološke i biohemijske osobine kod biljaka. Do sada najveći broj ovih istraživanja bio je fokusiran na uticaj ovih herbicida na poljoprivredne kulture. Najveći broj ogleda postavljan je u vodenim kulturama jer je time znatno olakšana primena pomenutih herbicida u poređenju sa primenom na kulture gajene na zemljištu. Uticaj Racer herbicida je ispitivan na vrstama *Amaranthus spinosus*, *Physalis angulata*, *Oenothera laciniata*, *Ollugo verticillata*, *Slatki luk cvs. "Candy" i "Cimaron"*, *Allium cepa* (Weber i Shefler, 2008; Yüzbaşıoğlu et al., 2003). Uticaj Goal herbicida i njemu srodnih je ispitivan na vrstama *Allium cepa L.*, *Vicia faba L.*, *Oryza sativa L. cv. Nipponbare*, *Zea mays L.*, *Raphanus sativus L. cv. Hayabutori*, *Fagopyrum esculentum Moench. cv. Hitachakisoba*, *Pisum sativum*, *Ligustrum vulgare* (El-Ghamery et al., 2000; Yanagida et al., 1999; Klíčová et al., 2002). Iz navedenog se vidi da je

najveći interes za uticaj ovog herbicida na rast i razvoj, kao i na fitoremedijacijski potencijal praćen na zeljastim vrstama i to poljoprivrednim kulturama i sortama. Uticaj prisustva kontaminanata na biohemijske procese kod klonova topola i vrba su do sada uglavnom obuhvatala teške metale (Nikolić et al., 2008; Trudić et al., 2012; Trudić et al., 2013; Kebert et al., 2016) i pokazala su značajan uticaj prisustva teških metala kao i postojanje klonske specifičnosti, odnosno različitih reakcija ispitivanih klonova. Nasuprot tome, rezultati ispitivanja uticaja herbicida su skromni i uglavnom se odnose na transgene klonove topola (Gullner et al., 2000; Mellan et al., 2002). Dobijeni rezultati ispitvanja uticaja herbicida na biohemijske procese ispitivanih klonova topola i vrba su pokazali različit uticaj na pojedine ispitivane klonove, što je u skladu sa istraživanjima Kebert et al. (2011) gde su RSC vrednosti ispitivanja DPPH i FRAP testa pokazala zavisnost od uticaja prisustva različitih kontaminanata.

Prisustvo kontaminata u zemljištu može značajno da utiče na rast i razviće biljaka. Sama smanjena produktivnost biljaka predstavlja posledicu poremećaja metabolizma biljaka i fizioloških procesa u njima. Uticaj herbicida na fiziološke procese vezane za proces fotosinteze se uglavnom iskazuje kroz sprečavanje transporta elektrona odnosno blokadu samog procesa fotosinteze. Blokadom procesa fotosinteze dolazi do prekida sinteze ATP-a i NADPH u hloroplastu. Istraživanja sprovedena na topolama i vrbama su pokazala da različite vrste kontaminata poput teških metala (Pilipović et al., 2005; Nikolić et al., 2008; Borišev et al., 2009) i organskih jedinjenja (Pajević et al., 2009) mogu imati značajan uticaj na proces fotosinteze i ostale fiziološke procese poput aktivnosti nitrat reduktaze i akumulacije prolina. Dobijeni rezultati ispitivanja uticaja herbicida na proces fotosinteze u ispitivanim klonovima topola i vrba su delimično u skladu sa gore navedenim istraživanjima jer nije zabeležen njihov uniforman uticaj na sve ispitivane klonove.

Fluorescencije hlorofila, odnosno parametar Fv/Fm je pokazatelj najviše kvantne efikasnosti fotohemije PSII (Butler, 1978). Prema Björkman i Demming, (1987), ova vrednost se kreće od 0,800 i 0,860 kod zdravih biljaka. Prisustvo herbicida kod ispitivanih klonova topola i vrba uglavnom nije izazvalo smanjenje vrednosti. Imajući u vidu da je fluorescencija hlorofila korisno dijagnostičko sredstvo za procenu biljnog stresa i fotosinteze (Krause i Weis, 1991), dobijeni rezultati su ukazali na relativnu očuvanost PSII kod ispitivanih klonova, posebno ako se uzme u obzir njihova relativno visoka fotosintetička aktivnost u tretmanima. Ova pojava se takođe može objasniti činjenicom da izabrani herbicidi nemaju mehanizam direktnog uticaja na PS II i redukciju u tilakoidnoj membrani hloroplasta koja se odvija prilikom transfera elektrona iz PSII u PS I kao što to čini Atrazin. Imajući u vidu da je način uticaja ovih herbicida na biljke (sinteza karotenoida i razgradnja čelijske membrane) gotovo u direktnoj vezi sa asimilacionim procesom u biljkama, ostali pokazatelji procesa fotosinteze, su pokazali promenu usled prisustva herbicida. Uticaj prisustva herbicida na SPAD vrednosti ispitivanih klonova topola se može objasniti činjenicom da je prisustvo herbicida uticalo na redukciju rasta ispitivanih klonova, tako da je 5. list na kome je vršeno merenje, kod biljaka pod tretmanom spadao u kategoriju zrelog razvijenog

lista, dok je kod kontrolnih biljaka 5. list spadao u grupu mlađih svetlijih listova (Slika 4).

ZAKLJUČAK

Rezultati dobijeni u ovim istraživanjima predstavljaju početna istraživanja potencijala klonova topola i vrba za fitoremedijaciju herbicida kroz testiranje njihove fitotoksičnosti. Iako su ova istraživanja topola na samom početku, rezultati su pokazali da postoje razlike u potencijalu između ispitivanih vrsta i odabranih klonova.

Prisustvo herbicida je, pored uticaja na smanjenje produktivnosti pojedinih ispitivanih klonova, uticalo na promenu nekih njihovih biohemičkih parametara kod testiranih klonova. Najviše promena biohemičkih parametara je zabeleženo kod klonova I-214 i B 44. Fiziološki pokazatelji vezani za proces fotosinteze ispitivanih klonova su takođe različito reagovali na prisustvo herbicida. Kao i kod biohemičkih pokazatelia, rezultati ukazuju na kompleksnost faktora koji utiču na dobijene rezultate.

Da bi se jasnije mogli odabratи klonovi sa većim potencijalom za fitoremedijaciju herbicida, neophodna su daljnja istraživanja koja bi obuhvatila postavljanje mnogo kompleksnijih višegodišnjih ogleda sa različitim koncentracijama, različitom dužinom trajanja tretmana i različitim koncentracijama sa ciljem utvrđivanja korelacije između morfo-fizioloških podataka sa podacima dobijenim iz biohemičkih testovima pretrpljenog oksidativnog stresa, mikrobiološkim istraživanjima i praćenjem smanjenja koncentracije herbicida u zemljištu.

Iako su ova istraživanja u početnoj fazi i još uvek ne daju sasvim jasnu sliku za izbor klonova koji imaju potencijal za fitoremedijaciju herbicida, dobijeni rezultati ukazuju na dobro postavljenu hipotezu istraživanja i pokazuju pravac u kome bi se daljnja istraživanja trebala nastaviti i odvijati.

LITERATURA

- Borišev, M., Pajević, S., Nikolić, N., Pilipović, A., Krstić, B., Orlović, S. (2009): Phytoextraction of Cd, Ni, and Pb using four willow clones (*Salix spp.*). Polish Journal of Environmental Studies 18(4): 553-561
- Björkman O., Demming B.(1987): Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origin. *Planta* 170: 489-504.
- Butler, W. (1978): Energy distribution in the photochemical apparatus of photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology* 29: 345-378.
- Chappell, J. (1997): Phytoremediation of TCE using *Populus*, Status Report prepared for the U.S. EPA Technology Innovation Office under a National Network of Environmental Management Studies Fellowship Compiled June - August 1997

- Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., Chern, J.C. (2002): Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal.* 10: 178-182.
- EPA/600/R-99/107 (2000): Introduction to Phytoremediation. U.S. Environmental Protection Agency, National Risk Management Research Laboratory Office of Research and Development Cincinnati, Ohio 45268. February 2000
- Fazar, C. (2000): The Bioremediation and Phytoremediation of Pesticide-contaminated Sites. Prepared for U.S. Environmental Protection Agency, Washington DC 49 pp
- Gavrilescu (2005): Fate of Pesticides in the Environment and its Bioremediation. *Engineering in Life Sciences* 5(6): 497–526.
- Gullner, G., Komives, T., Rennenberg, H. (2000): Enhanced tolerance of transgenic poplar plants overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase towards chloroacetanilide herbicides. *Journal of Experimental Botany* 52 (358): 971-979.
- Keber, M., Trudić, B., Stojnić, S., Orlović, S., Štajner, D., Popović, B., Galić, Z. (2011): Estimation of Antioxidant Capacities of Poplar Clones Involved in Phytoremediation Processes. STREPPOW International Workshop. Proceedings. February 23-24, 2014, Andrevlje-Novi Sad, Serbia: 273-280.
- Kirk, J.L. (2005): Interactions between plants, contaminants and microorganisms during the phytoremediation of diesel contaminated soil. PhD thesis. University of Guelph. Canada. Abstrakt.
- Klíčová, Š., Šebánek, J., Hudeová, M., Vítková, H., Vlašínová, H. (2002): Rostlinná výroba 48(6): 255–260.
- Krause, G.H., Weis, E. (1991): Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 42: 313–349.
- Miller, N.J., Rice-Evans, C.A. (1997): Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS⁺ radical cation assay. *Free Radic Res.* 26(3): 195-199.
- Meilan, R., K.-H., Han, C., Ma, S.P., DiFazio, J.A., Eaton, E.A., Hoien, B.J., Stanton, R.P., Crockett, M.L., Taylor, R.R., James, J.S., Skinner, L., Jouanin, G., Pilate, S.H., Strauss (2002): R. Meilan, K.-H. Han, C. Ma, S.P. DiFazio, J.A. Eaton, E.A. Hoien, B.J. Stanton, The CP4 transgene provides high levels of tolerance to Roundup herbicide in field-grown hybrid poplars. *Can. J. For. Res.* 32: 967–976.
- Yanagida, M., Matsumoto, H., Kenji Usui ,J. (1999): Responses of Antioxidative Systems to Oxyfluorfen and Their Role in Herbicidal Tolerance of Plants. *Weed Sci. Tech.* 44(1): 67-76.
- Nikolić, N., Kojić, D., Pilipović, A., Pajević, S., Krstić, B., Borišev, M., Orlović, S., (2008): Responses of hybrid poplar to cadmium stress: photosynthetic characteristics, cadmium and proline accumulation, and antioxidant enzyme activity. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*. 50/2: 95-103.

- Pajević, S., Borišev, M., Nikolić, N., Krstić, B., Pilipović, A., Orlović, S. (2009): Phytoremediation capacity of poplar (*Populus spp.*) and willow (*Salix spp.*) clones in relation to photosynthesis. Archives of Biological Sciences 61(2): 239-247.
- Pilipović, A. (2005): Uloga topola (*Populus sp.*) u fitoremedijaciji voda zagađenih nitratima. Magistarska teza. Poljoprivredni fakultet Novi Sad.
- Pilipović, A., Nikolić, N., Orlović, S., Petrović, N., Krstić, B. (2005): Cadmium phytoextraction potential of polar clones (*Populus spp.*). Zeitschrift fur Naturforschung C Vol. 60 (3/4): 247-251.
- Pilipović, A., Orlović, S., Nikolić, N., Borišev, M., Krstić, B., Rončević, S. (2012): Growth and Plant Physiological Parameters as Markers for Selection of Poplar Clones for Crude Oil Phytoremediation. Šumarski List 136(5-6): 273-281
- Popović, B., Štajner, D. (2008): Oksidativni stres kod biljaka. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999): Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods Enzymol. 299: 152-178.
- Thalmann, A. (1968): Zur methodik der Bestimmung der Dehydrogenase activitat in boden Mittels Tripheniltetrazoliumchlorid (TTC), Landw. Forch. 21: 249-258.
- Trudić, B., Kebert, M., Popović, B.M., Štajner, D., Orlović, S., Galović, V. (2012): The level of oxidative stress in poplars due to heavy metal pollution in soil. Balt For 18:214–227.
- Trudić, B., Kebert, M., Popović, B., Štajner, D., Orlović, S., Galović, V., Pilipović, A. (2013): The effect of heavy metal pollution in soil on Serbian poplar clones, Šumarski list 137(5-6): 287–296.
- Weber, C.L. III, Shefler, J.W (2008): Vegetable weed control studies, January 2009.
- Wollum II, A.G. (1982): Cultural Methods for soil microorganisms, Methods of soil analysis-part 2, Chemical and Microbiological Properties, Pb. Madison, Wisconsin USA: 781- 801.
- Yanagida, M., Matsumoto, H., Usui, K. (1999): J. Weed Sci. Tech. 44(1): 67-76.
- Yang, C., Wang, M., Chen, H., Li, J. (2011): Responses of butachlor degradation and microbial properties in a riparian soil to the cultivation of three different plants. Journal of Environmental Sciences 23(9): 1437-1444.
- Yüzbaşıoglu, D., Ünal, F., Sancak, C., Kasap, R. (2003): Cytological effects of the herbicide race “flurochloridone” on *Allium cepa*. Caryological. 56: 97–105. doi: 10.1080/00087114.2003.10589312.