

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Jelena D. Stanković

**Ekofiziološki odgovor mahovina *Atrichum undulatum* (Hedw.) P. Beauv. i *Hypnum cupressiforme* Hedw. na stres izazvan metalima u uslovima *in vitro***

Doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Jelena D. Stanković

**Ecophysiological response of mosses  
*Atrichum undulatum* (Hedw.) P. Beauv. and  
*Hypnum cupressiforme* Hedw. to metal-  
induced stress in *in vitro* conditions**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

**MENTORI:**

.....  
**dr Aneta Sabovljević**, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

.....  
**dr Marko Sabovljević**, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

**ČLANOVI KOMISIJE:**

.....  
**dr Milorad Vujičić**, vanredni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

.....  
**dr Ksenija Jakovljević**, viši naučni saradnik,  
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

.....  
**dr Ilinka Pećinar**, vanredni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

**Datum odbrane:** \_\_\_\_\_

## Izjave zahvalnosti

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u Institutu za botaniku i Botaničkoj bašti "Jevremovac", na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu u okviru projekta osnovnih istraživanja "Fiziološka, hemijska i molekularna analiza diverziteta retkih biljnih vrsta u cilju *ex situ* zaštite i produkcije biološki aktivnih jedinjenja", Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (OI173024). Deo analiza urađen je u laboratorijama Katedre za botaniku i fiziologiju biljaka na Biotehničkom fakultetu Univerziteta u Ljubljani, Jožef Stefan Institutu Univerziteta u Ljubljani, Laboratoriji za svetlosnu mikroskopiju i Ramanovu spektroskopiju Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu, kao i u Odseku za nauku o živim sistemima Instituta za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu.

Duboku zahvalnost dugujem svojim mentorima, dr Aneti Sabovljević i dr Marku Sabovljeviću, za ukazanu priliku da budem deo jedne od najproduktivnijih grupa za proučavanje briofita, za strpljivo uvođenje u specifičnosti sveta mahovina, preneseno znanje, dobronamerne savete, stručno usmeravanje tokom celog procesa odabira teme, pisanja radova i izrade disertacije, ali i za podsticaje i podršku da se razvijam kao samostalni istraživač. Neizmerno hvala na podršci i razumevanju za sve druge važne stvari u mom životu koje su se paralelno odvijale sa izradom ove doktorske disertacije, a koje bi bile mnogo teže ostvarive bez vaše podrške.

Posebno sam zahvalna kolegi, dr Miloradu Vujičiću, na pomoći oko eksperimenata i praktičnim savetima pri radu u laboratoriji, na nesebičnom deljenju svojih iskustava u proučavanju briofita, konstruktivnim sugestijama tokom pisanja i oblikovanja teze, motivišućim razgovorima i pozitivnoj energiji, kao i na dostupnosti u svim trenucima kada mi je bila potrebna bilo koja vrsta stručne pomoći.

Veliku zahvalnost dugujem dr Katarini Vogel-Mikuš za gostoprimstvo na Katedri za botaniku i fiziologiju biljaka na Biotehničkom fakultetu Univerziteta u Ljubljani, za ukazano poverenje i mogućnost da neke od najsavremenijih tehnika za analizu sadržaja i distribucije hemijskih elemenata u biljnim tkivima koristim u svom istraživanju čime je nemerljivo doprinela kvalitetu ovog istraživanja.

Neizmernu zahvalnost dugujem dr Pauli Pongrac na ogromnoj posvećenosti, strpljenju, pozitivnoj energiji i vremenu koje je izdvojila pomažući mi da što bolje razumem i savladam proces obrade i tumačenja podataka dobijenih mikro-PIXE tehnikom. Hvala na znanju koje je nesebično podelila sa mnom, ali pre svega na svesrdnoj podršci koju mi je pružila u toku izrade ove disertacije i ohrabrenju za nove podvige.

Izuzetno sam zahvalna dr Ilinki Pećinar na pomoći oko Ramanove spektroskopije, obrade spektara, multivarijacione analize i tumačenja dobijenih rezultata, a pre svega na divnoj saradnji, punoj podršci, razumevanja i praktičnih saveta.

Veliko hvala dr Kseniji Jakovljević na posvećenosti, uloženom trudu, uvek konstruktivnim sugestijama i velikoj pomoći prilikom oblikovanja doktorske teze.

Koleginici Bojani Živanović, hvala na angažovanju i nesebičnoj pomoći pri analizama antioksidativnih enzima.

Veliku zahvalnost upućujem Desi Terziji na pomoći prilikom održavanja kultura u trenucima kada mi je ta pomoć bila najpotrebnija, kao i na svim lepim rečima i savetima.

Koleginici dr Mariji Ćosić, hvala na lepoj saradnji u svim zajedničkim poduhvatima, na pozitivnoj atmosferi u kancelariji, na iskrenim razgovorima, zanimljivim naučnim diskusijama, pomoći u laboratorijskom radu, i relaksirajućim šetnjama Baštom. Hvala Bojani Jadranin i Jovani Pantović na pozitivnoj energiji i lepom druženju na vežbama i u Bašti.

Svim profesorima Katedre za fiziologiju biljaka veliko hvala na poverenju, podršci, savetima i srdačnosti koju su mi upućivali prethodnih godina.



Posebnu zahvalnost dugujem dr Danijeli Mišić na angažovanju na svom projektu i poverenju koje mi je ukazala.

Dragoj posadi “četverca bez kormilara”, zahvalna sam na izuzetnoj prilici da zajedno veslamo, na razumevanju, saosećajnosti i sveukupnoj pozitivnoj energiji, na svim zajednički prevaziđenim preprekama, a najviše na bliskosti koja nam ostaje i onda kada se trke završe.

Neizmerno hvala svim prijateljima koji su uz mene sve ove godine i veruju u uspeh, čak i kada ja ne verujem.

Božu i Smilji, hvala na безусловnoj podršci i razumevanju. Bez njihove pomoći ovaj poduhvat bi bio znatno teži.

Svojoj porodici - mami Slađani, tati Draganu, bratu Nikoli, sinu Milijanu i suprugu Nikoli - sigurnoj luci i kompasu mog života, koja čini da svaka plovidba deluje moguće, a svaka oluja savladivo, hvala na bezgraničnoj ljubavi, strpljenju, razumevanju, poverenju i podršci u svakom trenutku. Mojim momcima, Nidžu, Nikoli i Milijanu, hvala što postojite! Vi ste moja najveća snaga, oslonac, izvor sreće i najbolji saputnici na svakom putovanju!

Svojim roditeljima, koji su mi otvorili vrata ka svetu nauke, pokazali da je konstantno učenje način života i da nauka nije sredstvo već cilj, posvećujem ovu doktorsku disertaciju.

## **Ekofiziološki odgovor mahovina *Atrichum undulatum* (Hedw.) P. Beauv. i *Hypnum cupressiforme* Hedw. na stres izazvan metalima u uslovima *in vitro***

### **Sažetak**

Mahovine predstavljaju organizme sa višedecenijskom primenom u monitoringu zagađenja vazdušne i vodene sredine metalima. Uprkos ovome, jako mali broj istraživanja bavio se sposobnošću mahovina da usvajaju metale iz podloge na kojoj rastu i efektima povišenih koncentracija metala u podlozi na rastenje i razviće ovih biljaka.

U ovom istraživanju, kod dve vrste mahovina različitih formi rasta, akrokarpne vrste *Atrichum undulatum* i pleurokarpne vrste *Hypnum cupressiforme*, testirana je sposobnost usvajanja i translokacije cinka, bakra ili kadmijuma u gametoforima gajenim na podlogama sa dodatkom različitih koncentracija (0, 200, 700  $\mu\text{M}$ ) acetatnih soli ovih metala. Osim toga, ispitan je i efekat različite dužine stresa (kratkotrajni i dugotrajni) metalima na morfogenetske, fiziološke i biohemijske parametre dve vrste mahovina. Istraživanje je vršeno u akseničnim *in vitro* laboratorijskim uslovima.

Obe vrste mahovina imaju sposobnost usvajanja metala iz podloge i translokacije duž longitudinalne ose izdanka, ali efikasnost ovih procesa zavisi od vrste metala i vrste mahovine. Obrasci akumulacije metala razlikuju se u apikalnim i bazalnim delovima gametofora, specifični su za vrstu mahovine i vrstu metala ali zavise i od primenjenih koncentracija metala u hranljivim podlogama. Kombinovano dejstvo faktora značajno je uticalo na vrednosti različitih parametara odgovora mahovina na stres izazvan metalima.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju da dve ispitivane vrste mahovina imaju drugačije strategije alokacije resursa prilikom odgovora na povećane koncentracije metala u podlozi – *H. cupressiforme* dominantno ulaže u produkciju novih izdanaka, dok *A. undulatum* energiju primarno koristi za sintezu i aktivnost komponenti antioksidativne zaštite.

**Ključne reči:** cink, bakar, kadmijum, interakcije faktora, mape distribucije elemenata, *Atrichum undulatum*, *Hypnum cupressiforme*

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Fiziologija biljaka

**UDK broj:**

# **Ecophysiological response of mosses *Atrichum undulatum* (Hedw.) P. Beauv. and *Hypnum cupressiforme* Hedw. to metal-induced stress in *in vitro* conditions**

## **Abstract**

Mosses are long-established biomonitors of air and water trace metal pollution. There is a lack of knowledge about the relations of these plants with the metals from the substratum.

Here, two growth form mosses, acrocarpous *Atrichum undulatum* and pleurocarpous *Hypnum cupressiforme* were tested regarding their competence to accumulate and translocate metals from the substratum to the upper parts of the gametophores. Plants were grown on solid media supplied with different concentrations (0, 200, 700  $\mu\text{M}$ ) of zinc-, copper- or cadmium-acetate and the effects of these factors and different exposure times on morphogenetic, physiological and biochemical parameters were also investigated. The study was conducted in the controlled axenic laboratory conditions.

Both moss species absorb metals and translocate them along the longitudinal stem axis, but the efficiencies of these processes are dependent on the moss and the metal species. The pattern of individual metal distribution is different in apical and basal parts of the gametophores and specific to moss species, metal, and is also affected by the applied concentration of the acetate salts. Significant interaction effects of factors on investigated parameters of moss response to metal stress are detected.

The results indicate that the two moss species use different strategies regarding energy allocation in response to elevated metal concentrations in the substrate. *H. cupressiforme* predominantly invests energy in the production of new shoots, while in *A. undulatum*, the energy is directed mainly into the synthesis and activation of various components of antioxidative protection.

**Key words:** zinc, copper, cadmium, interaction effects, element distribution maps, *Atrichum undulatum*, *Hypnum cupressiforme*

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfield:** Plant physiology

**UDK number:**

## Lista skraćenica

$\cdot\text{OH}$	hidroksil radikal	
$^1\text{O}_2$	singletni kiseonik	
$^3\text{Chl}$	tripletni hlorofil	
$^3\text{O}_2$	tripletni kiseonik	
ABC	transporteri (eng. ATP-binding cassette)	
APX	askorbat peroksidaza	
Asc	askorbinska kiselina	
BSA	goveđi serum albumin (eng. bovine serum albumin)	
CA	karboanhidraza	
CAT	katalaza	
CAXs	transporteri (eng. cation/proton exchangers)	
CCDs	detektori (eng. charge coupled devices)	
CDFs	transporteri (eng. cation diffusion facilitators)	
Chl*	ekscitovani hlorofil	
COX	citohrom oksidaza	
DHAR	dehidroaskorbat reduktaza	
DPPH	2, 2-difenil-1-pikrilhidrazil	
EDTA	etilendiamintetrasirćetna kiselina	
EDX	energetski disperzivna mikroanaliza X-zraka (eng. Energy- Dispersive microanalysis - EDX)	X-ray
ET	rekacije prenosa elektrona	
FCR	Folin-Ciocalteu reagens	
GAE	ekvivalent galne kiseline	
GPX	gvajakol peroksidaza	
GR	glutation reduktaza	
GRX	glutaredoksin	
GSH	glutation	
$\text{H}_2\text{O}_2$	vodonik peroksid	
HAT	reakcije prenosa atoma vodonika (eng. hydrogen atom transfer reactions)	
HPLC	tečna hromatografija pod visokim pritiskom (eng. high-performance liquid chromatography)	
ICP-AES	induktivno spregnuta plazma atomsko-emisiona spektroskopija	
LAC	lakaze	
LOD	limit detekcije – LOD	
LOO·	lipidni peroksil radikal	
LOOH	lipidni hidroperoksid	
LOX	lipoksigenaze	
MDA	malondialdehid	
MDAR	monodehidroaskorbat reduktaze	
MDHA	monodehidroaskorbat	
MDL	minimalni limit detekcije	
MT	metalotionein	
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat	
NRAM	transporteri (eng. Natural Resistance Associated Macrophage Proteins)	
NTR	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat tioredoksin	reduktaza
TRX	tioredoksin	
$\text{O}_2^{\cdot-}$	superoksid radikal	
PC	fitohelatin	
PC	glavna komponenta	
PIXE	protonski indukovana emisija X zraka (eng. proton-induced X-ray emission)	

PMSF	fenilmetilsulfonilfluorid
POD	peroksidaze klase III
POX	peroksidaze klase III
PPO	polifenol oksidaze
PRX	peroksiredoksin
PSI	fotosistem I
PSII	fotosistem II
PVP	polivinil pirolidon
RCF	relativna centrifugalna sila
ROS	reaktivne kiseonične vrste
RuBisCo	ribulozo-1,5-bisfosfatne karboksilaze-oksigenaze
SBP	supstrat vezujući protein (eng. substrate-binding protein, SBP)
SEM	skenirajuća elektronska mikroskopija
SOD	superoksid dismutaza
STIM	skenirajuća transmisiona jonska mikroskopija
$t_{1/2}$	vreme poluraspada
TBA	tiobarbiturna kiselina
TCA	trihlorsirćetna kiselina
TE	ekvivalent troloksa
TYR	tirozinaze
UV	ultraljubičasti deo elektromagnetnog spektra
XRF	fluorescencija rendgenskih zraka (eng. X-ray fluorescence)
ZIP	transporteri (eng. Zinc Regulated Transporter-Iron Regulated Transporter-like proteins; ZRT-IRT-like Proteins)

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Biologija mahovina .....	1
1.1.1. Osobine životne istorije, životni ciklus i razviće mahovina .....	1
1.1.2. Morfologija gametofora mahovina i forme rasta .....	6
1.1.2.1. Morfologija izdanka i grananje kod mahovina .....	6
1.1.2.2. Morfologija filoida mahovina .....	8
1.1.2.3. Morfologija rizoida mahovina .....	9
1.1.3. Anatomska građa gametofora mahovina .....	9
1.1.3.1. Anatomska građa grana i izdanaka .....	9
1.1.3.2. Anatomska građa filoida mahovina .....	11
1.1.4. Ekofiziologija mahovina .....	11
1.1.5. Filogenetski odnosi briofita i klasifikacija mahovina .....	13
1.1.6. Biologija ispitivanih vrsta .....	15
1.1.6.1. Biologija vrste <i>Atrichum undulatum</i> (Hedw.) P. Beauv. ....	15
1.1.6.2. Biologija vrste <i>Hypnum cupressiforme</i> Hedw. ....	17
1.2. Metali u životnoj sredini .....	19
1.2.1. Klasifikacija metala .....	20
1.2.2. Hemijske karakteristike bakra, cinka i kadmijuma i uloga kod biljaka .....	21
1.3. Bioakumulacioni kapacitet mahovina za metale .....	24
1.3.1. Faktori koji utiču na apsorpciju i distribuciju metala unutar mahovina .....	26
1.4. Uloga mahovina u monitoringu zagađenja životne sredine metalima .....	28
1.5. Toksični efekti metala kod biljaka .....	29
1.5.1. Toksični efekti povišenih koncentracija metala na mahovine .....	36
1.6. Održavanje homeostaze i mehanizmi zaštite od toksičnih efekata metala kod biljaka .....	38
1.6.1. Homeostaza metala u biljkama i kontrola akumulacije .....	38
1.6.2. Mehanizmi antioksidativne zaštite biljaka .....	41
1.6.3. Održavanje homeostaze i mehanizmi zaštite od toksičnog dejstva metala kod mahovina .....	44
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	46
3. MATERIJAL I METODE .....	47
3.1. Odabir vrsta .....	47
3.2. Biljni materijal i uslovi gajenja .....	47
3.3. Dizajn eksperimenta .....	50

3.4. Morfogenetske analize .....	52
3.5. Biohemijske analize .....	52
3.5.1. Analiza sadržaja fotosintetičkih pigmenata UV/VIS spektrofotometrijom.....	52
3.5.2. Određivanje koncentracije vodonik-peroksida.....	52
3.5.3. Određivanje stepena lipidne peroksidacije.....	53
3.5.4. Ekstrakcija ukupnih proteina.....	53
3.5.4.1. Određivanje koncentracije ukupnih proteina .....	54
3.5.4.2. Određivanje aktivnosti peroksidaza klase III .....	54
3.5.5. Karakterizacija ukupnog antioksidativnog kapaciteta mahovina.....	55
3.5.5.1. Folin-Ciocalteu metoda .....	55
3.5.5.2. DPPH test .....	56
3.6. Ramanova spektroskopija .....	56
3.7. Tehnike bazirane na fluorescenciji rendgenskih zraka .....	59
3.7.1. Energetski disperzivna mikroanaliza rendgenskih zraka .....	60
3.7.2. XRF spektrometrija .....	61
3.7.3. Mikro-protonski indukovana emisija X zraka ( $\mu$ PIXE).....	62
3.8. Statistička obrada podataka.....	66
4. REZULTATI.....	67
4.1. Uticaj Zn-acetata, Cu-acetata i Cd-acetata na parametre morfogeneze mahovina <i>H. cupressiforme</i> i <i>A. undulatum</i> u kulturi <i>in vitro</i> .....	67
4.2. Uticaj Zn-acetata, Cu-acetata i Cd-acetata na koncentraciju fotosintetičkih pigmenata kod mahovina <i>H. cupressiforme</i> i <i>A. undulatum</i> u kulturi <i>in vitro</i> .....	75
4.2.1. Koncentracija hlorofila <i>a</i> i <i>b</i> .....	75
4.2.2. Koncentracija ukupnih karotenoida.....	79
4.3. Marker oksidativnog stresa kod mahovina <i>H. cupressiforme</i> i <i>A. undulatum</i> gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-acetata ili Cu-acetata u uslovima dugotrajnog stresa u kulturi <i>in vitro</i> 80	
4.3.1. Koncentracija $H_2O_2$ .....	80
4.3.2. Koncentracija malondialdehida (MDA).....	83
4.4. Aktivnost POD kod biljaka <i>A. undulatum</i> gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-acetata i Cu-acetata u uslovima dugotrajnog i kratkotrajnog stresa u kulturi <i>in vitro</i> .....	85
4.5. Antioksidativni kapacitet mahovina <i>H. cupressiforme</i> i <i>A. undulatum</i> gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-acetata ili Cu-acetata u kulturi <i>in vitro</i> .....	87
4.5.1. Koncentracija ukupnih fenolnih jedinjenja.....	87
4.5.2. Efikasnost uklanjanja DPPH radikala .....	91
4.6. Koncentracija odabranih hemijskih elemenata kod biljaka <i>H. cupressiforme</i> gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-, Cu- i Cd-acetata u uslovima dugotrajnog stresa u kulturi <i>in vitro</i> .	93

4.7. Koncentracija i distribucija elemenata u poprečnim preseccima gametofora vrsta <i>A. undulatum</i> i <i>H. cupressiforme</i> .....	95
4.7.1. Koncentracija i distribucija elemenata u poprečnim preseccima gametofora vrste <i>H. cupressiforme</i> gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-acetata, Cu-acetata i Cd-acetata u kulturi <i>in vitro</i> .....	96
4.7.2. Koncentracija i distribucija elemenata u poprečnim preseccima gametofora vrste <i>A. undulatum</i> gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-acetata i Cu-acetata u kulturi <i>in vitro</i> .....	112
4.8. Ramanova spektroskopija filoida mahovina <i>H. cupressiforme</i> i <i>A. undulatum</i> gajenih na podlogama sa dodatkom različitih koncentracija Zn-acetata i Cu-acetata u kulturi <i>in vitro</i> .....	119
5. DISKUSIJA .....	130
5.1. Uticaj Zn-acetata, Cu-acetata i Cd-acetata na morfogenezu mahovina <i>H. cupressiforme</i> i <i>A. undulatum</i> u kulturi <i>in vitro</i> .....	130
5.2. Uticaj Zn-acetata, Cu-acetata i Cd-acetata na koncentraciju fotosintetičkih pigmenata kod mahovina <i>H. cupressiforme</i> i <i>A. undulatum</i> u kulturi <i>in vitro</i> .....	132
5.3. Markeri oksidativnog stresa kod mahovina <i>H. cupressiforme</i> i <i>A. undulatum</i> pod uticajem Zn-acetata i Cu-acetata u podlozi .....	135
5.3.1. Koncentracija H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	135
5.3.2. Koncentracija MDA .....	137
5.4. Aktivnost POD .....	138
5.5. Neenzimske komponente antioksidativne zaštite .....	139
5.6. Ukupna koncentracija odabranih hemijskih elemenata kod biljaka <i>H. cupressiforme</i> gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-acetata, Cu-acetata i Cd-acetata u kulturi <i>in vitro</i> u uslovima dugotrajnog stresa .....	141
5.7. Koncentracija i distribucija odabranih elemenata u poprečnim preseccima gametofora mahovina <i>H. cupressiforme</i> i <i>A. undulatum</i> izlaganih različitim koncentracijama metala u podlozi .....	144
5.7.1. Sadržaj i distribucija odabranih elemenata u poprečnim preseccima kauloida biljaka <i>H. cupressiforme</i> gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-acetata, Cu-acetata i Cd-acetata u kulturi <i>in vitro</i> u uslovima dugotrajnog stresa .....	144
5.7.2. Sadržaj i distribucija odabranih elemenata u poprečnim preseccima gametofora <i>A. undulatum</i> gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-acetata i Cu-acetata u kulturi <i>in vitro</i> u uslovima dugotrajnog i kratkotrajnog stresa .....	147
5.8. Ramanova spektroskopija filoida mahovina <i>H. cupressiforme</i> i <i>A. undulatum</i> gajenih na podlogama sa dodatkom različitih koncentracija Zn-acetata i Cu-acetata u kulturi <i>in vitro</i> .....	148
6. ZAKLJUČCI .....	152
7. LITERATURA .....	154



## 1. UVOD

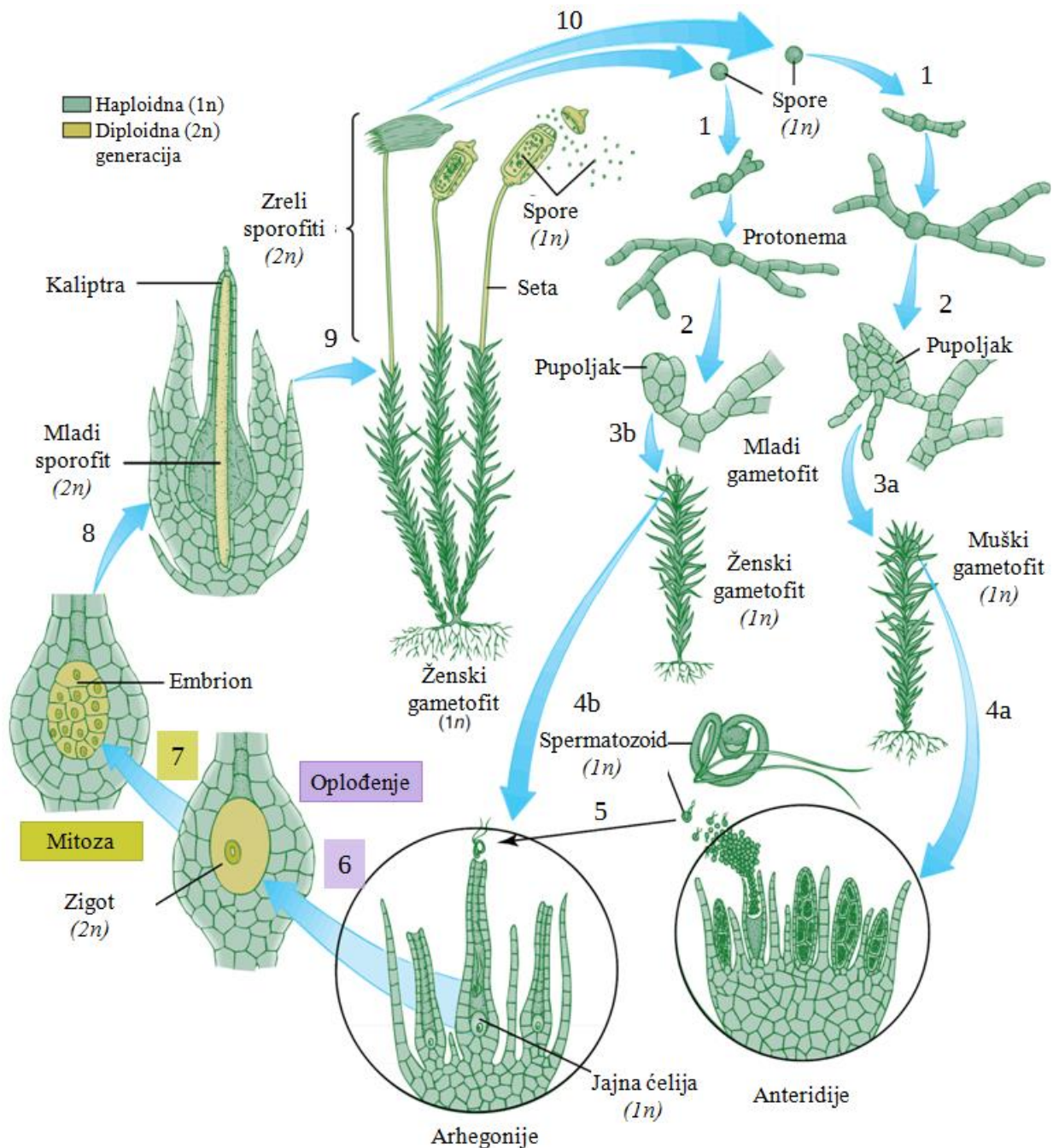
### 1.1. Biologija mahovina

#### 1.1.1. Osobine životne istorije, životni ciklus i razviće mahovina

Mahovine (razdeo Bryophyta) su među prvim biljkama koje su uspešno kolonizovale kopno i zajedno sa rožnjačama (razdeo Anthocerotophyta) i jetrenjačama (razdeo Hepatophyta) čine grupu nevaskularnih biljaka podcarstva Bryobiotina čiji se pripadnici tradicionalno nazivaju briofite (Mauseth, 2014; Budke *et al.*, 2018; Sabovljević & Sabovljević, 2020). Traheofite (vaskularne biljke) i briofite formiraju grupu savremenih kopnenih biljaka, čije je zajedničko svojstvo životni ciklus koji se sastoji od dve naizmenične višecelijske heteromorfne generacije, diploidnog sporofita, koji se razvija iz zigota i produkuje spore, i haploidnog gametofita, koji nosi seksualne organe (Goffinet & Buck, 2012; Mauseth, 2014). Poput ostalih embriofita, poseduju embrion ili fazu u životnom ciklusu u toku koje je sporofit povezan sa gametofitom od koga direktno zavisi, što je univerzalno svojstvo kopnenih biljaka (Ligrone *et al.*, 2000). Međutim, briofite u odnosu na druge kopnene biljke izdvajaju specifične osobine životne istorije koje su vezane za razvoj i odnos dve generacije životnog ciklusa (Shaw & Renzaglia, 2004).

Kod traheofita, embrionalna faza je relativno kratka i sporofit koji nastaje iz nje ubrzo nastavlja svoje razviće nezavisno od gametofita uspostavljajući direktan kontakt sa supstratom (Ligrone *et al.*, 2000). Kao odrasle biljke njihovi sporofiti su razgranati i mogu proizvoditi veliki broj sporangija. Gametofit traheofita je jako redukovano do nivoa od svega nekoliko ćelija, bez sposobnosti da samostalno živi ili vrši fotosintezu, pri čemu je ženski gametofit zatvoren u megaspori i u potpunosti postao zavistan od diploidne faze (Goffinet & Buck, 2012; Mauseth, 2014). Nasuprot ovome, kod briofita gametofit predstavlja dominantnu vegetativnu generaciju, sa sporofitima koji su matrotrofni i monosporangijatni (Crandall-Stotler & Bartholomew-Began, 2007; Sabovljević & Sabovljević, 2020). Osim toga, sporofiti briofita se gotovo nikada ne granaju, ne formiraju listove ili slične strukture i imaju determinantan rast (Crandall-Stotler & Bartholomew-Began, 2007; Mauseth, 2014).

Gametofit mahovina je u odnosu na sporofit dugoživeći i predstavlja trajnu fotosintetički aktivnu fazu životnog ciklusa sa ulogom u usvajanju mineralnih materija iz okruženja, rasteњу i razmnožavanju, i produkciji novih biljaka putem seksualnih ili aseksualnih procesa. Njega karakterišu raznovrsnost i složenost koji se ne mogu sresti kod traheofita (Shaw & Renzaglia, 2004; Crandall-Stotler & Bartholomew-Began, 2007). Gametofit mahovina čine dva razvojna stadijuma, filamentozna protonema (juvenilni stadijum) i listasti gametofit (gametofor) (Pressel *et al.*, 2008). Za razliku od drugih briofita, koje formiraju samo jedan gametofor po klijalnoj spori, mahovine karakteriše filamentozna (končasta) protonema koja ima sposobnost grananja i produkcije brojnih pupoljaka iz kojih će se razviti veći broj genetički identičnih gametofora (Goffinet & Buck, 2012; Budke *et al.*, 2018). Osim končaste, kod vrsta klase Sphagnopsida, sreće se i taloidna forma protoneme, te je adekvatnije nazivati je protalijum. Kod mahovina ona predstavlja primarni produkt klijanja haploidne spore i početak njihovog životnog ciklusa (Slika 1). Kod većine vrsta klijanje je ezgosporno - nakon oslobađanja spora iz kapsule, najpre dolazi do bubrenja protoplasta i pucanja zida spore, a tek kasnije do prvih ćelijskih deoba i nastanka protoneme (Crandall-Stotler & Bartholomew-Began, 2007). Rast protoneme mahovina zasniva se na usmerenoj jednodimenzionoj ekspanziji njene apikalne ćelije (de Keijzer *et al.*, 2021). Međutim, za razliku od filamenata drugih biljaka koji se takođe odlikuju apikalnim rasteњem i jednoćelijski su (npr. protoneme jetrenjača, polenove cevi traheofita) protonema mahovina je višecelijska struktura (Pressel *et al.*, 2008). Unutar protoneme dolazi do specijalizacije ćelija iz kojih se mogu razviti tri tipa filamenata - hloronema, kaulonema i rizoidi, takođe karakteristični samo za ovu grupu briofita (Goffinet & Buck, 2012). Koji tip filamenata će se u datom trenutku razvijati zavisi od vrste, uslova spoljašnje sredine, kao i od razvojne faze. Osim toga, u zavisnosti od sredinskih faktora, kao što je dostupnost mineralnih elemenata (npr. kalijuma), pojedine vrste mogu menjati formu protoneme iz končaste u taloidnu i obratno (Glime, 2017).

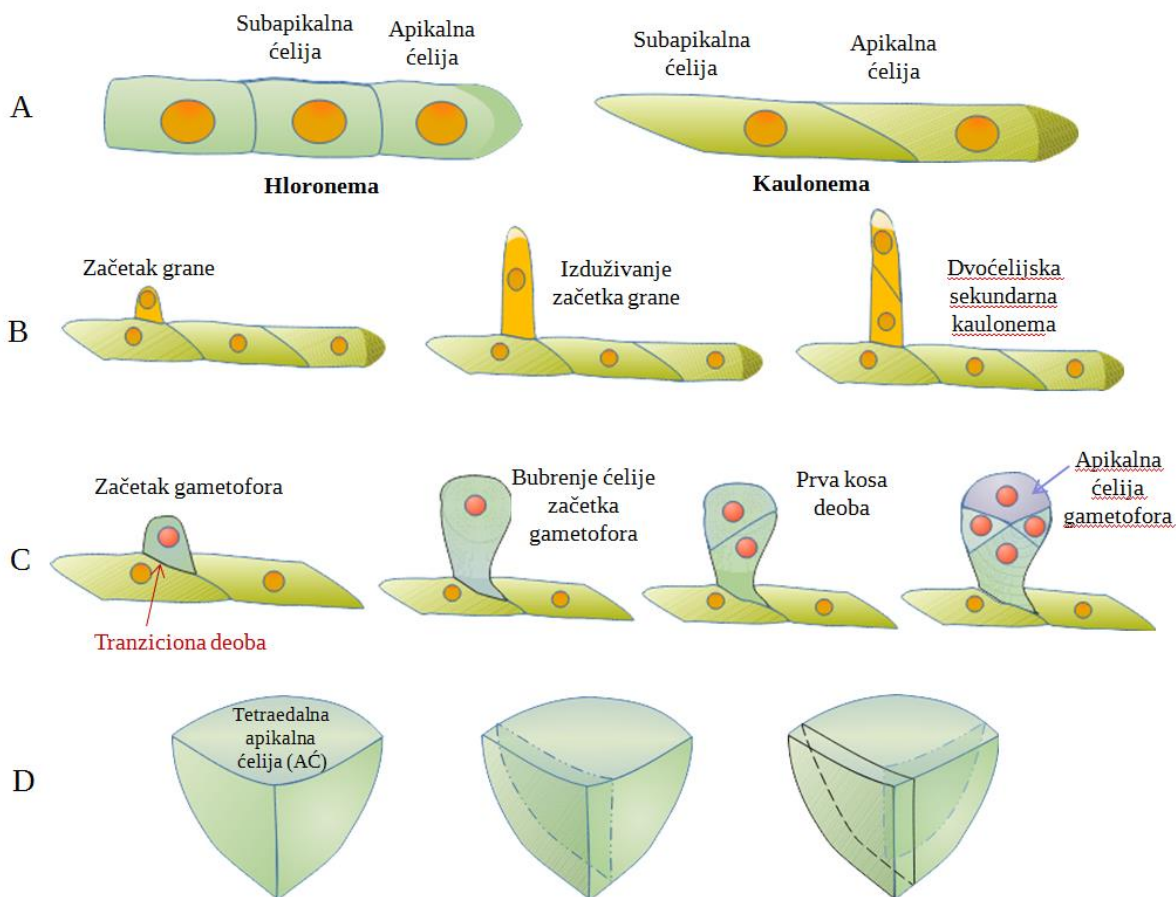


**Slika 1.** Životni ciklus mahovina. 1- klijanje spore i rast protoneme; 2 - formiranje pupoljka gametofora; 3 - razviće muškog i ženskog gametofora; 4 - sazrevanje anteridija i arhegonija; 5 - oslobađanje spermatozoida i hemotaksično kretanje ka jajnoj ćeliji; 6 - oplođenje i nastanak diploidnog zigota; 7 - razviće embriona unutar arhegonije; 8 - razviće mladog sporofita zaštićenog epigonijumom; 9 - razviće zrelog sporofita; 10 - rasejavanje haploidnih spora iz čahure sporofita (Modifikovano prema Mauseth, 2014).

Iako se generalno smatraju strukturama koje proizvode samo zrele gametofore, rizoidi se po svojim citološkim karakteristikama značajno preklapaju sa kaulonomom i kod nekih vrsta mahovina predstavljaju prvu strukturu koja se razvija po klijanju spore (Pressel *et al.*, 2008; Glime, 2017).

Hloronema se najčešće prva razvija nakon klijanja spore i predstavlja primarno mesto fotosinteze, sa ćelijama koje citološki liče na fotosintetičke ćelije listastih izdanaka (Pressel *et al.*, 2008; Goffinet & Buck, 2012). Sve ćelije hloroneme, uključujući vršnu, imaju istu građu (Slika 2A). One su kratke, sa poprečnim zidovima normalnim na osu rasta i sa krupnom centralnom

vakuolom oko koje se nalaze brojni okrugli hloroplasti i druge organele (Pressel *et al.*, 2008; Glime, 2017). Hloronemu karakteriše nepravilno grananje filamenata, čiji rast može biti kako horizontalan, tako i uspravan (Glime, 2017; Coudert *et al.*, 2019). Jedra ćelija primarne hloroneme su uvek haploidna, a individualne ćelije imaju sposobnost regeneracije nove protoneme ili dediferencijacije u loptaste ćelije iz kojih se kasnije može ponovo razviti protonema. Stoga, osim uloge u asimilaciji, hloronema ima i funkciju u aseksulanoj propagaciji formiranjem različitih tipova vegetativnih propagula (Pressel *et al.*, 2008). Nakon klijanja spore, primarna hloronema se najčešće radialno širi deobama i obnovom apikalne ćelije, koja nakon nekoliko ciklusa deobe može steći identitet apikalne ćelije kauloneme i nastaviti produkciju kaulonemalnih filamenata (Coudert *et al.*, 2019; Moody, 2019). Promena identiteta iz hloroneme u kaulonemu kontrolisana je auksinom i setom konzerviranih transkripcionih faktora (de Keijzer *et al.*, 2021).



**Slika 2.** Šematski prikaz razvića gametofita mahovina. A - izgled primarne protoneme i kauloneme (jednodimenzionalno rastenje gametofita); B – formiranje sekundarne protoneme (dvodimenzionalno rastenje gametofita) C – formiranje meristemskog pupoljka gametofora sa tetraedalnom apikalnom ćelijom (tranzicija 2D u 3D rastenje gametofita); D – tetraedalna apikalna ćelija (prve 3D formativne deobe).

Kaulonema predstavlja drugi stadijum u razviću protoneme i nije prisutna kod svih mahovina. Za razliku od hloroneme, predstavlja isključivo horizontalni sistem filamenata crvenkastobraon boje. Karakterišu je izdužene ćelije, sa kosim poprečnim zidovima i manjim brojem sitnih, nejednako raspoređenih vretenastih hloroplasta (Glime, 2017). Apikalne ćelije kauloneme su citološki sličnije ćelijama koje učestvuju u vršnom rastenju filamentoznih struktura kod drugih biljaka, poput polenove cevi ili korenskih dlačica, nego hloronemalnim. Jedro je centralno pozicionirano sa citoplazmatičnom kapom prema vrhu ćelije, u kojoj se nalaze endoplazmatični retikulum, diktiozomi, brojne mitohondrije i amiloplasti sa ulogom u detekciji gravitacije. Iza jedra apikalne ćelije nalazi se krupna vakuola. Nakon mitoze, formiranjem kosog poprečnog zida nastaje subapikalna ćelija sa velikim brojem vakuola. Kaulonema ima značajno

bržu stopu rasta i ćelijskih deoba u poređenju sa hloronemom, verovatno zbog toga što je aparat koji omogućava njen vršni rast visoko specijalizovan (Pressel *et al.*, 2008; Coudert *et al.*, 2019). Diferencirane ćelije kauloneme u pogledu organizacije citoplazme jako liče na ćelije koje transportuju hranljive materije u odraslim gametofitima mahovina (Pressel *et al.*, 2008; Glime, 2017). Dominantna endoplazmatična mikrotubularna mreža i ekstenzivni endomembranski domeni, uz gubitak vakuole u toku diferencijacije ukazuju na njihovu ulogu u prenosu supstanci (Pressel *et al.*, 2008). Nakon formiranja kauloneme, dalji razvoj protoneme se bazira na grananju filamenata (Slika 2B). Tada dolazi do uspostavljanja nove ose rasta u odnosu na postojeći filament, što omogućava njeno prostiranje u dve dimenzije (de Keijzer *et al.*, 2021). Bočne grane nastaju na karakterističnom rastojanju od apikalne ćelije, najčešće između druge i pete subapikalne ćelije, u zavisnosti od tipa filameta (Pressel *et al.*, 2008). Kod hloroneme prve bočne grane nastaju deobom druge ćelije, dok formiranje bočnih filamenata kod kauloneme počinje sa trećom ili četvrtom subapikalnom ćelijom. Od pete subapikalne ćelije, većina ćelija ulazi u deobe koje dovode do nastanka bočnih konaca (Coudert *et al.*, 2019). Ovaj proces uključuje migraciju jedara iz citoplazme u ispupčenje u bočnom ćelijskom zidu koje predstavlja mesto gde će se razviti pupoljak. Nakon asimetrične deobe, nastaje začetak grane sa gustom citoplazmom, dok se jedro u originalnom filamentu vraća na centralni položaj u perifernoj citoplazmi, koja je ispunjena brojnim vakuolama i raštrkanim hloroplastima (Pressel *et al.*, 2008). Dalji rast bočnog filameta odvija se rastom njegove vršne ćelije koja funkcioniše kao sekundarna apikalna ćelija protoneme (de Keijzer *et al.*, 2021).

Svaka protonema može formirati zeleni film preko supstrata prečnika nekoliko centrimetara (Crandall-Stotler & Bartholomew-Began, 2007). Konci protoneme, najčešće kauloneme, mogu sadržati male okrugle ćelije, tmeme (apscisione ćelije), koje omogućavaju odvajanje delova protoneme i njenu dalju disperziju i vegetativno razmnožavanje (Pressel *et al.*, 2008; Sabovljević *et al.*, 2014). Kod većine mahovina, ovaj stadijum je kratkoživeći, međutim, kod nekih vrsta može predstavljati trajnu vegetativnu fazu biljke (Crandall-Stotler & Bartholomew-Began, 2007; Sabovljević *et al.*, 2014). Sa rastom protoneme, u određenim ćelijama, najčešće kauloneme, dolazi do pokretanja regulatornih mehanizama koji dovode do njihove asimetrične deobe i nastanka začetaka gametofora na mestu grananja parentalnog konca (Slika 2C). Ova deoba se naziva "tranziciona" jer označava početak tranzicije dvodimenzionalnog rasta juvenilne faze gametofita u trodimenzionalni rast, karakterističan za odrasli gametofit. Nakon ove deobe, začetak gametofora bubri i preko nekoliko sukcesivnih deoba dovodi do stvaranja meristemskog pupoljka sa tetraedalnom apikalnom ćelijom iz koje će deobama paralelnim njenim trima lateralnim stranama (Slika 2D) razvijati adultni gametofit (Sabovljević *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2020). Iako su krupniji od sporofita, odrasli gametofiti mahovina su male, najčešće visegodišnje biljke, sačinjene od sistema razgranatih ili nerazgranatih izdanaka nalik stablu (kauloida), sa spiralno organizovanim filoidima (Crandall-Stotler & Bartholomew-Began, 2007; Sabovljević *et al.*, 2014). Filoidi predstavljaju strukture sa drugačijom anatomijom, ali sličnim funkcijama listovima angiospermi. Na bazalnim delovima kauloida nalaze se rizoidi, koji imaju ulogu u pričvršćivanju za supstrat i izuzetno slabo doprinose usvajanju vode i mineralnih materija (Sabovljević *et al.*, 2014). Odrasli izdanci se retko sreću kao pojedinačne biljke, već svaka pojedinačna protonema produkuje veliki broj gametofora koji u prirodi čine kolonije nalik tepisima ili jastučićima. Njihova međusobna zbijenost usporava gubitak i pomaže zadržavanje vode, koja je neophodna za proces oplodjenja i razmnožavanja mahovina (Crandall-Stotler & Bartholomew-Began, 2007; Budke *et al.*, 2018).

Tranzicija iz dvodimenzionalnog u trodimenzionalni rast predstavlja evolucionu novinu kopnenih biljaka, koja je doprinela uspešnijoj kolonizaciji kopna, s tim što se kod mahovina i angiospermi dešava različitom dinamikom. Kod angiospermi do nje dolazi jako rano u toku embriogeneze i bilo kakvo narušavanje 3D rasta može biti letalno (Moody, 2019). Kod mahovina, dvodimenzionalno rastenje, bazirano na rastu vršne ćelije, može trajati neograničeno dugo, i posebno je značajno jer omogućava istraživanje okoline i kolonizaciju supstrata, pre nego što dođe do razvića odraslih gametofita (Menand *et al.*, 2007).

Kontinuirani rast adultnog gametofita dovodi do stvaranja grupe uspravnih ili položenih izdanaka, na kojima se formiraju muški (mikrogametangije) i ženski (megagametangije) reproduktivni organi. Kod mahovina, mikrogametangije se nazivaju anteridije, a megagametangije arhegonije. U zavisnosti od vrste, one mogu biti raspoređene duž kauloida u aksilama nemodifikovanih filoida, ili alternativno, biti u grupama na vrhovima izdanaka. U slučaju kada su gametangije grupisane, uz njih se najčešće javljaju i sterilni filamenti, parafize, pri čemu je cela grupa okružena posebno diferenciranim filoidima u obliku čašice. Ovi filoidi se kod anteridija nazivaju perigonalni, a kod arhegonija perihecijalni listići i imaju prvenstveno zaštitnu ulogu. U zavisnosti od toga da li se mikro- i megagametangije razvijaju na istom gametofitu ili na razlitim biljkama, mahovine se dele na jednodome (monoične) i dvodome (dioične) (Crandall-Stotler & Bartholomew-Began, 2007; Mauseth, 2014).

Anteridije su izdužene, jajolike ili cilindrične strukture, sa spoljašnjim sterilnim slojem ćelija i unutrašnjom masom od koje nastaju biflagelatni spermatozoidi sa sposobnošću kretanja u prisustvu vode (Crandall-Stotler & Bartholomew-Began, 2007; Mauseth, 2014). Oslobođanje spermatozoida ograničeno je na apeks anteridije, gde se nalaze specijalizovane operkularne ćelije, čijim bubrenjem i pucanjem nastaje otvor tj. operkulum kroz koji spermatozoidi izlaze (Goffinet *et al.*, 2009). Voda je esencijalna za reprodukciju i proces oplodjenja mahovina, jer omogućava da spermatozoidi putem kiše, a privučeni hemijskim supstancama iz arhegonije, dospeju do jajne ćelije i izvrše oplodjenje (Budke *et al.*, 2018). Arhegonije su flašolikog oblika i sastoje se od suženog vratnog regiona, u kome se pre fertilizacije formira kanal za prolazak spermatozoida, i proširenog trbušastog regiona u kojem se nalazi jedna jajna ćelija čijim oplodjenjem nastaje diploidni zigot (Glime, 2017). Transferzalnom mitotičkom deobom zigota, nastaju bazalna ćelija iz koje će se kasnije razviti stopalo sporofita, i apikalna ćelija koja će dati buduću čahuru, koja predstavlja sporangiju (Mauseth, 2014). Mahovine su generalno monosporangijatne, što znači da svaki sporofit proizvodi samo jednu sporangiju. U toku ranog razvića, ceo sporofit je obavijen haploidnim zaštitnim omotačem poreklom od zida arhegonije i okolnih ćelija gametofita, koji se naziva epigonijum. Između njegove baze i stopala sporofita, formira se placentalna zona preko koje se odvija transport supstanci iz gametofita u sporofit (Crandall-Stotler & Bartholomew-Began, 2007). Kod većine vrsta, radom interkalarnog meristema ispod buduće sporangije dolazi do formiranja sete (pedicela, drške) i izduživanja embriona, što dovodi do raskidanja epigonijuma na dva dela. Donji deo se naziva vaginula i on nastavlja da okružuje bazalni deo sete i stopalo, dok gornji deo pokriva čahuru i naziva se kaliptra. Kod vrsta čiji sporofiti nemaju setu, do pucanja epigonijuma dolazi usled rasta sporangije. Sazrevanje čahure i sporogeneza, često otpočinju tek nakon spadanja kaliptre sa vrha sporofita (Haig, 2013). Diferencijacijom ćelija unutar čahure nastaje sterilna centralna kolumela okružena sporogenim ćelijama, koje sinhrono podležu mejotičkim deobama i proizvode haploidne spore (Budke *et al.*, 2018).

Sporofiti mahovina su inicijalno zeleni i imaju mogućnost vršenja fotosinteze, ali nisu sposobni da izvrše fiksaciju dovoljne količine ugljenika da podrže čitavo svoje rastenje i sporogenezu, te su bar delimično zavisni od gametofita u pogledu ishrane (Crandall-Stotler & Bartholomew-Began, 2007; Budke *et al.*, 2018). Pošto ne uspostavljaju direktnu vezu sa supstratom, mineralne supstance usvajaju samo iz gametofora sa kojima su u vezi (Ligrone *et al.*, 2000; Mauseth, 2014). Nakon mejoze, zreli sporofiti se suše i na kraju dolazi do oslobođanja spora pucanjem ili propadanjem spoljašnjeg sloja čahure ili češće, posredstvom otvora na vrhu sporangije, nastalog odvajanjem strukture nalik poklopcu koja se naziva operkulum (Sabovljević *et al.*, 2014). Otvor sporangije oivičen je prstenom spljoštenih ćelija (anulusom) na kome se mogu nalaziti zupčasti izrastaji-peristomalni zupci, koji formiraju peristom i koji higroskopskim pokretima mogu dodatno olakšati rasipanje spora iz čahure (Goffinet *et al.*, 2009). U poređenju sa jetrenjačama i rožnjačama, sporofiti mahovina relativno dugo opstaju i mogu se naći pričvršćeni za maternalne gametofite mesecima nakon fertilizacije, omogućavajući rasprašivanje spora dugo nakon što sam sporofit odumre (Budke *et al.*, 2018). U povoljnim uslovima spoljašnje sredine, koji podrazumevaju odgovarajuću temperaturu, količinu svetlosti, kao i prisustvo vode i nutrijenata,



spore klijaju u haploidnu protonemu, čime životni ciklus mahovina biva upotpunjen (Goffinet *et al.*, 2009).

Pored seksualne reprodukcije, kod mahovina je široko rasprostranjeno i aseksualno tj. vegetativno razmnožavanje dijasporama. Dijaspore kod različitih vrsta mogu predstavljati filoidi, rizoidi ili grane sa sposobnošću apscisije, kao i specijalizovane vegetativne reproduktivne strukture – rasplodna telašca. Rasplodna telašca obuhvataju geme, strukture koje su sačinjene od nediferenciranih ćelija, i propagule, male pupoljke ili biljčice koje se lako odvajaju od izdanka na kome su razvijeni (Crandall-Stotler & Bartholomew-Began, 2007). Vegetative dijaspore se mogu razviti na bilo kom vegetativnom delu gametofita, pri čemu do razvoja može doći još u fazi protoneme. Kod nekih vrsta, apscisija razvijenih dijaspora odvija se posredstvom specijalizovanih ćelija tmema (Goffinet & Buck, 2012). U kulturi *in vitro*, većina vrsta mahovina ima sposobnost produkcije bar dva tipa dijaspora. Osim toga, njihovo *in vitro* umnožavanje putem fragmenata je relativno jednostavno, čime je olakšana *ex situ* konzervacija retkih i ugroženih vrsta. Ipak, u prirodi, programirana fragmentacija je retka i ograničena na apscisiju vrhova ili celih specijalizovanih filoida ili grana sa slabo razvijenim filoidima. Neke vrste, najčešće akrokarpne mahovine, u zemlji formiraju višegodišnje tuberozne strukture koje se razvijaju na rizoidima i takođe imaju ulogu u vegetativnom razmnožavanju (Vanderpoorten & Goffinet, 2009).

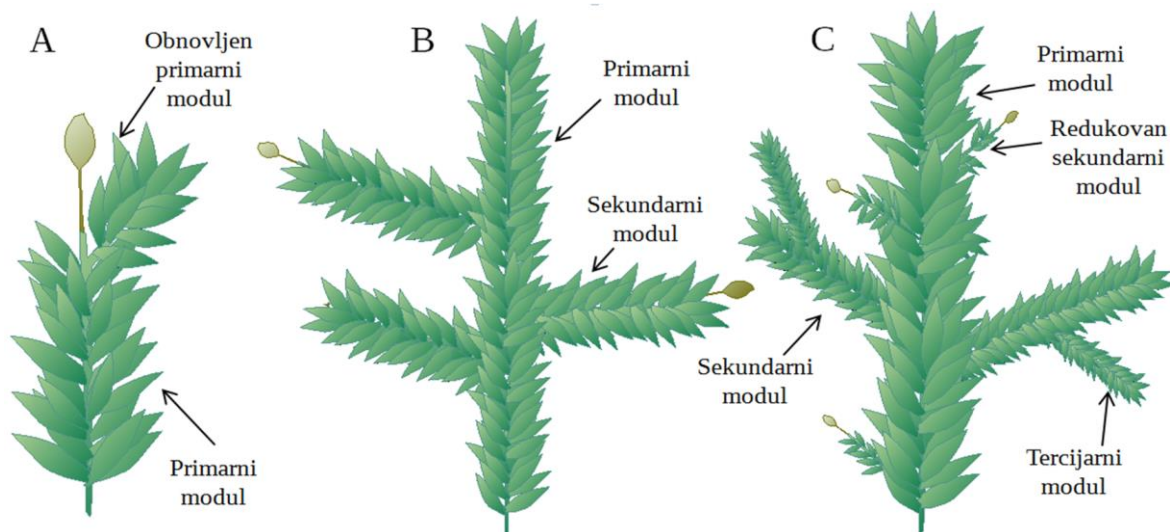
### **1.1.2. Morfologija gametofora mahovina i forme rasta**

#### **1.1.2.1. Morfologija izdanka i grananje kod mahovina**

Iako dele osnovne karakteristike životne istorije, mahovine pokazuju značajnu raznovrsnost u morfološkoj i anatomskoj organizaciji sporofita i gametofita (Crandall-Stotler & Bartholomew-Began, 2007). Nijedan makroskopski karakter mahovina, čak ni oni koji se smatraju dijagnostičkim, poput višecelijskih rizoida, nije prisutan i konzervisan kod svih vrsta. Gametofori koji se generalno sastoje iz obliha kauloida koji nose filoide i za supstrat su pričvršćeni rizoidima, imaju suštinski modularnu građu - sačinjeni su od većeg broja modula, pri čemu se novi moduli razvijaju iz inicijala bočnih grana (Goffinet & Buck, 2012). Svaki modul sastavljen je iz segmenata (metamera) raspoređenih duž iste ose rasta. Individualni segmenti predstavljaju grupe ćelija poreklom od pojedinačnih derivata nastalih deobom apikalne meristemske ćelije (Goffinet *et al.*, 2009). Svaki od njih sadrži unutrašnje (kortikalne) i spoljašnje (epidermalne) ćelije među kojima nakon nekoliko sukcesivnih deoba može nastati po jedan začetak filoida i bočne grane (lateralnog modula). Inicijalno mesto razvića grane najpre je pozicionirano bazalno u odnosu na začetak filoida istog segmenta. Međutim, usled ćelijskih deoba i izduživanja epidermalnih ćelija između ova dva začetka, dolazi do izmeštanja inicijalnog mesta formiranja bočne grane u aksilu filoida susedne donje metamere. Grane formirane na ovaj način su heteroaksilarne (Coudert *et al.*, 2017). Nakon formiranja, apikalna ćelija grane može direktno ući u fazu dormancije, čime se postiže odlaganje grananja, može produkovati pupoljke ili može razviti primordije grana. Pupiljci predstavljaju juvenilne module koji nakon razvića filoida ulaze u fazu dormancije. S druge strane, primordija može nastaviti razviće i direktno dati novi modul (granu) ili nakon kratke serije deoba ući u fazu dormancije pre formiranja ikakvih filoida (gola primordija). Različiti unutrašnji i spoljašnji faktori mogu prekinuti dormanciju i omogućiti dalji razvoj grana (Goffinet *et al.*, 2009; Coudert *et al.*, 2017).

Morfološki izgled adultnih gametofita mahovina rezultat je razvića serije apikalnih ćelija, od kojih je svaka odgovorna za formiranje individualnih modula (Newton, 2007). Iako svaka metamera ima potencijal da razvije novi modul, neke mahovine ostaju nerazgranate dok druge imaju specifične obrasce grananja, što je u direktnoj vezi sa pozicijom sporofita (perihecijalnih filoida) na gametoforu i uslovima sredine u kojoj se biljaka razvija (Goffinet *et al.*, 2009; Huttunen *et al.*, 2018). S obzirom na to da novonastale grane potiču iz inicijalnih ćelija koje se nalaze u epidermisu metamera postojećeg modula, grananje mahovina nikada nije dihotomo, a velika raznovrsnost morfološke građe adultnih gametofita, između ostalog, posledica je isključivo lateralnog načina grananja mahovina (Goffinet & Buck, 2012; Coudert *et al.*, 2017).

Na osnovu obrazaca grananja i pozicije perihecijalnih filoida i sporofita, mahovine se mogu podeliti u tri grupe. Vrste koje perihecijalne filoide formiraju terminalno na primarnom modulu nazivaju se akrokarpne. Gametofori ovih mahovina generalno rastu uspravno (ortotropno) i najčešće ne razvijaju bočne grane (ili do toga retko dolazi) zbog dormancije inicijala lateralnih modula (Goffinet *et al.*, 2009; Glime, 2017). Pošto formiranje gametangija na vršnom delu primarnog kauloida dovodi do gubljenja meristemske apikalne ćelije kod akrokarpnih vrsta, njegovo rastenje je determinantno. Ipak, nestanak ove ćelije najčešće dovodi do oslobađanja od apikalne dominacije i do aktivacije dormantnih inicijala grana koji se nalaze odmah ispod apeksa glavnog izdanka. Posledično, dolazi do simpodijalnog grananja i razvijaju se tzv. subfloralne inovacije koje preuzimaju ulogu izdanka i karakterišu se istom morfologijom kao i primarni kauloid (Slika 3A) (Crandall-Stotler & Bartholomew-Began, 2007; Vanderpoorten & Goffinet, 2009). Na ovaj način, kod akrokarpnih vrsta omogućeno je očuvanje i prenos funkcija između dva sukcesivna modula koji su iste hijerarhije, kao i razviće višegodišnjeg vegetativnog tela i učestvovanje u više od jednog ciklusa polne reprodukcije (Goffinet *et al.*, 2009). Mahovine koje perihecijalne listiće i sporofite proizvode na vrhovima lateralnih grana, dele se na pleurokarpne i kladokarpne, u zavisnosti od razvijenosti grana koje nose ove organe (Slika 3B i 3C) (Crandall-Stotler & Bartholomew-Began, 2007). Za obe grupe karakteristično je monopodijalno grananje koje dovodi do akumulacije sukcesivnih grana različite hijerarhije koje se na osnovu svoje generalne morfologije često razlikuju i grupišu u različite klase. Primarni moduli formiraju glavnu osu gametofora, najčešće su duži i širi od grana nastalih njihovim grananjem i zbog izmeštanja reproduktivnih organa na bočne grane imaju indetermantno rastenje. Grane višeg reda nastaju grananjem već postojećih, pri čemu se kod većine mahovina grananje zaustavlja sa produkcijom tercijarnih grana (Vanderpoorten & Goffinet, 2009; Coudert *et al.*, 2017).



**Slika 3.** Forme rasta i tipovi grananja kod mahovina. A – akrokarpna vrsta sa simpodijalnim grananjem; B – kladokarpna vrsta sa monopodijalnim grananjem i produkcijom sekundarnih grana; C – pleurokarpna vrsta sa monopodijalnim grananjem i produkcijom sekundarnih i tercijarnih grana, kao i specijalizovanih grana sa organima za seksualnu reprodukciju.

Monopodijalnim grananjem, omogućena je specijalizacija i funkcionalna diferencijacija sukcesivnih bočnih grana, pri čemu primarni modul ima ulogu, pre svega, da obezbedi višegodišnji vegetativni rast, a lateralni su odgovorni za fiksaciju ugljenika i razvoj reproduktivnih organa (Goffinet & Buck, 2012). Pleurokarpne i kladokarpne mahovine generalno karakterišu položeni (plagiotropni) izdanci sa jako razvijenim sekundarnim i tercijarnim granama. Kod pleurokarpnih mahovina, perihecijalni filoidi i arhegonije se razvijaju na vrhovima veoma kratkih grana koje liče na pupoljke i koje su morfološki različite od vegetativnih grana. Longitudinalno izduživanje ovih modula onemogućeno je jer produkovanje gametangija dovodi do prestanka primarne funkcije njihove meristemske apikalne ćelije. Zbog ovoga, kod pleurokarpnih mahovina nakon razvića

sporofita, deluje da su oni raštrkani duž primarnog modula gametofora. Kladokarpne mahovine proizvode perihecijalne filoide na vrhovima neizmenjenih bočnih grana, koje su osim u terminalnom delu, morfološki iste kao i vegetativne grane. Za razliku od pleurokarpnih vrsta, kod kladokarpnih i grane sa perihecijalnim listićima imaju sposobnost produkcije novih bočnih grana (Crandall-Stotler & Bartholomew-Began, 2007). Iako je razvoj gametangija na bočnim granama karakterističan za ove dve grupe mahovina, i lateralni moduli akrokarpnih vrsta koje su jednodome takođe mogu obustaviti svoj vegetativni rast i formirati grupu gametangija koja je komplementarna onoj formiranoj na apeksu glavnog izdanka. Kod nekih vrsta, osim uloge u seksualnoj reprodukciji, bočne grane mogu funkcionisati i kao propagule za aseksualnu reprodukciju, pri čemu takvi moduli imaju redukovane filoide (Vanderpoorten & Goffinet, 2009).

Strukturna organizacija individualnih izdanaka i pravac njihovog rastežanja definiše se kao forma rasta mahovina. Ona je genetički determinisana i u direktnoj vezi sa obrascima grananja i pozicijom sporofita na gametoforu, zbog čega se podela na akrokarpne i pleurokarpne vrste tradicionalno koristi da opiše i formu rasta koja karakteriše određenu vrstu, pri čemu su akrokarpne mahovine povezane sa ortotropnim, a pleurokarpne sa plagiotropnim rastom (Glime, 2017; Huttunen *et al.*, 2018).

Evolutivno gledano, akrokarpija među mahovinama se smatra predačkim svojstvom. S druge strane, pleurokarpija predstavlja evolutivnu inovaciju koja je omogućila diverzifikaciju u obrascima grananja i formama rasta, razdvajanjem grana koji učestvuju u vegetativnom rastu i seksualnoj reprodukciji (Coudert *et al.*, 2017). Smatra se da je upravo pojava pleurokarpije omogućila brzu i intenzivnu radijaciju grupe Hypnanae, najbrojnije u okviru klase Bryopsida i jedine kod koje je plurokarpija univerzalno svojstvo. Sve ostale grupe mahovina su delimično ili u potpunosti sačinjene od akrokarpnih vrsta (Liu *et al.*, 2019). Kladokarpne mahovine se sreću u malim grupama u okviru pleurokarpnih i akrokarpnih taksona i u nekim slučajevima se smatraju prelaznim formama između akro- i pleurokarpije (Newton, 2007).

### **1.1.2.2. Morfologija filoida mahovina**

Bez obzira na tip grananja, svi moduli vegetativnog tela mahovina imaju u ulogu u fotosintezi i imaju potencijal da razviju filoide (Vanderpoorten & Goffinet, 2009). Filoidi mahovina su sedeći, celom osnovom naležu na kauloid i uglavnom su spiralno raspoređeni, u dva ili više redova, sa vrhovima koji štrče radijalno od izdanka. Razvijaju se iz površinskih začetaka filoida koji su prisutni na svakoj od metamera, pri čemu je razmak između dva susedna filoida određen izduživanjem epidermalnih ćelija. Stome nisu prisutne, a kutikula, ukoliko je razvijena je tanka i nema ulogu zaštite od gubitka vode. Kod nekih mahovina, baza filoida je priljubljena i obuhvata kauloid, čime je omogućena dodatna čvrstoća i kapilarni prostori koji su neophodni za eksterno provođenje vode (Goffinet *et al.*, 2009). Filoidi su najčešće nedeljeni, pri čemu oblik varira između elipsoidnog i jezičastog, mada se kod nekih vrsta mogu sresti i deljeni filoidi sastavljeni od dugačkih režnjeva. Laminu filoida najčešće čini jedan ili više slojeva ćelija, pri čemu je kod mnogih pripadnika klase Bryopsida duž središnje ose od baze ka vrhu kauloida razvijeno središnje rebro (kosta) sačinjeno od više slojeva ćelija. Kosta ima potpunu ulogu, ali može i olakšavati transport vode i asimilata u i iz filoida. Kod većine vrsta kosta je nerazgranata, međutim kod pleurokarpnih mahovina i retkih akrokarpa, kosta je dvostruka i u obliku slova "V". S druge strane, za brojne akrokarpne vrste karakteristična je dobro razvijena široka kosta. Sredinski uslovi takođe mogu uticati na razvijenost središnjeg rebra, pri čemu razviće kostatnih mahovina u vodenim medijumima dovodi do odsustva koste, što dodatno ukazuje na njenu ulogu u transportu vode i nutrijenata (Goffinet *et al.*, 2009; Vanderpoorten & Goffinet, 2009). U slučaju mahovina sa uspravnim rastom, adaksijalna površina filoida (okrenuta osi modula) je izložena svetlosti, sa abaksijalnom stranom usmerenom na dole, ka supstratu. Kod mahovina koje rastu plagiotropno abaksijalna strana filoida je izložena svetlosti, dok je adaksijalna strana okrenuta ka supstratu. Zbog ovoga, adaksijalna strana filoida se često definiše kao ventralna, a abaksijalna kao dorzalna. U nekim slučajevima površine ove dve strane filoida se jasno razlikuju (Crandall-Stotler & Bartholomew-Began, 2007).



Raspored filoida duž izdanka najčešće je ravnomeran, međutim kod nekih mahovina ne dolazi do izduživanja apikalnih metamera, te filoidi u tom regionu bivaju grupisani, formirajući rozete. Filoidi duž jednog modula izdanka mogu biti morfološki isti ili formirati heteroplastične serije, u kojima juvenilni filoidi najčešće nemaju morfološke modifikacije razvijene kod starijih filoida. U zavisnosti od vrste, kao i položaja duž modula, filoidi mogu posedovati različite lateralne projekcije u vidu nazubljenja sa vrha ili bočnih strana. Osim toga, filoidi modula različite hijerarhije, koji su tipični za izdanke pleurokarpnih vrsta, mogu varirati u izgledu i veličini, te se ta pojava naziva anizofilija (Vanderpoorten & Goffinet, 2009).

Mnoge pleurokarpne vrste, pored filoida, duž kauloida formiraju blago razgranate fotosintetički aktivne izrasline epidermisa - parafilije, koje mogu pospešiti transport vode preko površine izdanka - ektohidrično. Osim parafilija, kod mahovina se može sresti još jedan tip malih fotosintetičkih izraštaja epidermisa, pseudoparafilije, koje se nalaze isključivo oko primordija grana, gde imaju zaštitnu ulogu (Vanderpoorten & Goffinet, 2009). U aksilama mladih filoida, mogu se naći epidermalni izraštaji u vidu dlaka, koji su kod nekih akrokarpnih vrsta trajno prisutni, ali su fiziološki aktivni i sekretuju sluz jedino blizu apseksa izdanka. Sa starenjem lista ovi izraštaji najčešće nestaju (Crandall-Stotler & Bartholomew-Began, 2007).

### **1.1.2.3. Morfologija rizoida mahovina**

Većina mahovina razvija končaste, višćelijske rizode koji omogućavaju pričvršćivanje gametofora za supstrat. Rizoidi su najčešće tigmotropni, bele do braonkastocrvene boje, sa površinom koja može biti glatka ili pokrivena papilama. U nekim slučajevima, pleurokarpne vrste koje u prirodi ne razvijaju rizode, u uslovima kulture *in vitro* mogu pokrenuti njihovo razviće (Vanderpoorten & Goffinet, 2009). Kod akrokarpnih mahovina, rizoidi se razvijaju najčešće samo pri bazi izdanka. Kod vrsta koje imaju plagiotropan rast, rizoidi se mogu razvijati na bilo kom delu gametofora gde izdanak dolazi u kontakt sa supstratom. U zavisnosti od tipa ćelija iz kojih se razvijaju i izgleda samih rizoida, mogu se podeliti na dve grupe. Mikronematalni rizoidi se razvijaju iz epidermalnih ćelija kauloida i najčešće su slabo razgranati i tanki. Makronematalni rizoidi su deblji, jako razgranati i nalaze se isključivo oko dormantnih inicijala grana, gde imaju ulogu u njihovoj zaštiti. Kod nekih vrsta, rizoidi se mogu razviti i iz specijalizovanih apikalnih ćelija filoida koje se nazivaju nematogene. Iako je primarna uloga rizoida u pričvršćivanju, oni mogu pojačati kretanje vode duž spoljašnje površine izdanka, ili kod vrsta koje rastu uspravno formirati guste ali rastresite omotače oko izdanka (tomentum) koji su esencijalni za eksterno provođenje ili zadržavanje vode. Osim toga, kod nekih mahovina rizoidi mogu funkcionisati i kao aseksualne propagule, koje omogućavaju širenje kolonije preko supstrata (Crandall-Stotler & Bartholomew-Began, 2007; Goffinet & Buck, 2012).

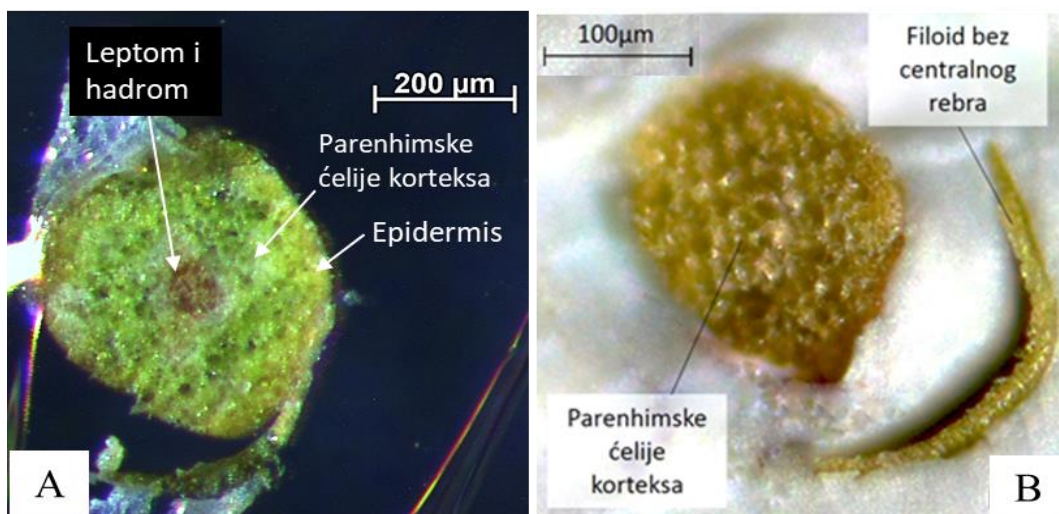
Za mahovine je karakteristično da različite populacije ili čak individualne biljke iste vrste ispoljavaju veliki stepen morfološke varijabilnosti, koja često može biti u vezi sa anatomskim promenama. Gajenje u uslovima *in vitro* pokazalo je da mahovine karakteriše velika plastičnost u pogledu morfoloških karakteristika, pri čemu se promene najčešće zapažaju u gustini grana i filoida, obliku listića, dužini i debljini koste, kao i u obliku i veličini ćelija (Vanderpoorten & Goffinet, 2009).

### **1.1.3. Anatomska građa gametofora mahovina**

#### **1.1.3.1. Anatomska građa grana i izdanaka**

U anatomskom smislu, izdanci i grane mahovina imaju relativno jednostavnu građu, pri čemu klasa Polytrichopsida ispoljava najveći stepen unutrašnje diferencijacije. Na spoljašnjoj površini poprečnog preseka kauloida nalazi se kutikulozno pokriveni epidermis, sa jednim ili više slojeva epidermalnih ćelija bez stoma. Ove ćelije su generalno spljoštene, sa izrazito zadebljalim pigmentisanim zidovima u odnosu na lumen ćelije. S druge strane, kod nekih vrsta epidermis se sastoji od tankozidnih ćelija nabubrelog izgleda, koje formiraju takozvani hijalodermis i mogu imati ulogu u eksternom provođenju vode. Ispod epidermisa, nalazi se korteks sačinjen od zaobljenih

parenhimskih ćelija, koje su krupnije od epidermalnih, i izduženih prozenhimskih ćelija, stereida, sa zadebljalim impregiranim zidovima (Slika 4).



**Slika 4.** Poprečni presek kauloida i filoida dve vrste mahovina gajenih u kulturi *in vitro*. A – Građa gametofora *Atrichum undulatum* (Hedw.) P. Beauv. (Polytrichaceae) na poprečnom preseku. U različitim delovima korteksa, ćelije su različito diferencirane. B - Građa gametofora *Hypnum cupressiforme* Hedw. (Hypnaceae) na poprečnom preseku. Ćelije korteksa odlikuju se uniformnim izgledom, bez diferenciranog centralnog provodnog snopa.

Korteks može imati potpornu ulogu ili ulogu u skladištenju rezervnih materija, kao što su skrob i lipidi. Osim toga, ćelije korteksa mogu učestvovati i u fotosintezi, s tim da je ona najčešće ograničena na spoljašnje slojeve kauloida ili mlađe delove izdanka. Kod nekih vrsta u središnjem delu korteksa, duž longitudinalne ose, nalaze se jako izdužene specijalizovane ćelije, hidroide, koje same ili zajedno sa stereidama grade strukturu nalik centralnom provodnom snopu - hadrom. Za razliku od stereida, koje kada su zrele poseduju protoplast, hidroide u toku specijalizacije gube ćelijski sadržaj usled dejstva kiselice fosfataze (Goffinet *et al.*, 2009; Vanderpoorten & Goffinet, 2009; Glime, 2017). Hidroide nisu razvijene kod pripadnika klasa Sphagnopsida, Andreaeopsida, i Andreaebryopsida. Prisustvo strukture nalik centralnom provodnom snopu smatra se prepoznatljivom karakteristikom klase Polytrichopsida, kod koje su hidroide najbolje razvijene, dok u okviru klase Bryopsida, hidroide su redukovane ili potpuno odsustvuju, uglavnom kod grupa koje su kasnije divergirale (Ligrone *et al.*, 2000; Goffinet *et al.*, 2009).

Diferencijacija hidroida se dešava jako brzo i podrazumeva intenzivno izduživanje ćelija, čiji terminalni zidovi postaju jako iskošeni, naslanjajući se jedni na druge duž longitudinalne ose. Ovi zidovi su vrlo permeabilni i kod nekih vrsta sastoje se od rezidua celuloze nastalih procesom hidrolize primarnog zida. Longitudinalni zidovi mogu ispoljavati specifičnu slojevitost sa različitom orijentacijom celuloznih mikrofibrila između različitih slojeva, što ukazuje na strukturnu ulogu ovih slojeva u hidroidima. Kod pripadnika reda Polytrichales, u toku razvića dolazi do depozicije novog materijala duž longitudinalnih zidova, što dovodi do uništavanja plazmodezmi između hidroida i susednih kortikalnih ćelija, a završetak diferencijacije hidroida obeležen je i gubitkom citoplazmatičnog sadržaja. Zidovi zrelih hidroida kod klasa Polytrichopsida i Bryopsida ne poseduju pore i mogu biti impregnirani polifenolnim supstancama nalik ligninu, ali za razliku od traheida vaskularnih biljaka, nikad ne sadrže lignin. Prisustvo ovih polimera u zrelih lateralnim zidovima smanjuje njihovu permeabilnost za vodu i pospešuje transport vode kroz hidrolizovane terminalne zidove (Scheirer, 1978, 1980; Ligrone *et al.*, 2000; Goffinet *et al.*, 2009; Glime, 2017).

Pored hidroida, neke mahovine poseduju i specijalizovane ćelije koje omogućavaju transport simplastom supstanci sintetisanih fotosintezom između različitih metamera ili modula gametofora, koje se nazivaju provodne ćelije parenhima. Ove ćelije su izdužene, sa blago kosim terminalnim zidovima. U odnosu na parenhimske ćelije korteksa izdvaja ih odsustvo krupne vakuole,

polarizacija citoplazme sa većinom organela u delu ćelije okrenutom vrhu modula, kao i prisustvo brojnih plazmodezmi u terminalnim zidovima, sa dezmotubulama koje formiraju medijalno proširenje i u konitnuitetu su sa tubulama endoplazmatičnih retikuluma ćelija koje ih okružuju. U odnosu na sve ostale mahovine, specijalizovane ćelije za provođenje asimilata kod vrsta reda Polytrichales poseduju najveći stepen specijalizacije i tipično se nazivaju leptoidi (Ligrone *et al.*, 2000; Goffinet *et al.*, 2009; Glime, 2017). Jedro potpuno diferenciranih leptoida degeneriše i postaje neaktivno, dok se preostali protoplazmatični sadržaj zadržava, uključujući plastide, mitohondrije, vezikule i lipidne kapi. Na terminalnim tankim zidovima leptoida nalaze se brojne pore, dok su longitudinalni zidovi nejednako zadebljali, sa većim brojem lamela i bez pora (Stevenson, 1974; Scheirer, 1978, 1980). Kod ovih mahovina, leptoidi su u izdanku raspoređene između izduženih parenhimskih ćelija, formirajući prsten oko hadroma koji se naziva leptom (Ligrone *et al.*, 2000; Goffinet *et al.*, 2009; Glime, 2017).

### 1.1.3.2. Anatomska građa filoida mahovina

Za razliku od filoida mahovina koje su evolutivno starije od klase Oedipodiopsida i nemaju razvijeno središnje rebro, mnogi taksoni klase Bryopsida imaju filoide sa razvijenom kostom. Na poprečnom preseku ovih mahovina, u regionu van središnjeg rebra, lamina filoida može biti jednoslojna do višeslojna, pri čemu slojevitost može biti uniformna ili varirati između različitih delova filoida. Takođe, u zavisnosti od vrste, kosta filoida može sadržati različito diferencirane ćelije, te na poprečnom preseku takav filoid ima heterogeni izgled, dok je kod drugih vrsta kosta homogena. Kod vrsta sa heterogenom kostom, središnje rebro može sadržati hidroide i ćelije koje provode asimilate, prekrivene trakama stereida sa jedne ili obe strane, dok se na površini koste nalaze laminalne ćelije. Ćelije filoida koje imaju ulogu u provođenju supstanci sintetisanih u fotosintezi su manje specijalizovane od leptoida i često se nazivaju ćelije vodilje. Zajednička osobina svih pleurokarpnih mahovina su filoidi koji imaju homogenu kostu (Goffinet *et al.*, 2009). Kod vrsta familije Polytrichaceae duž koste sa adaksijalne strane nalaze se lamele sačinjene od hlarenhimskih ćelija čija je primarna uloga fotosintetička (Paolillo & Reighard, 1967). Margine lamela ispunjene su voskom koji sprečava ulazak vode u prostore između lamela i time povećava površinu preko koje se odvija razmena gasova (Goffinet *et al.*, 2009; Glime, 2017).

Ćelije lamine filoida na osnovu svog oblika se najčešće klasifikuju kao parenhimske (zaobljene, pravougaone ili heksagonalne) i prozenhimske (izdužene i međusobno ispreprepletane) (Petschinger *et al.*, 2021). Često, one se razlikuju morfološki između juvenilnih i zrelih listova, ali i u zavisnosti od pozicije duž lamine istog filoida. Bazalne i marginalne ćelije se mogu isticati drugačijom morfologijom u odnosu na središnje i distalne ćelije. Ćelije pozicionirane bazalno su često izdužene i pravougaone ili veće u odnosu na ostale ćelije filoida. Kod mnogih vrsta, dolazi do modifikacije marginalnih ćelija koje formiraju specifičnu granicu, sačinjenu od dva ili više slojeva ćelija, što doprinosi strukturnoj potpori filoida ili translokaciji vode do vrha filoida. Ostatak lamine čine fotosintetičke ćelije, čiji oblik je specifičan za vrstu. Kod mnogih akrokarpnih mahovina bazalne ćelije su pravougaonog oblika, dok su ćelije bliže vrhu kraće i izodijametrične. Kod pleurokarpnih vrsta, s druge strane, ćelije su jako izdužene i gotovo linerane. Osim toga, ćelije baze filoida brojnih pleurokarpnih vrsta mogu formirati grupe zbijenih kvadratastih tankozidnih ćelija koje imaju ulogu u brznoj apsorpciji viška vode, što može biti ključno za odlaganje dehidracije filoida, ali i omogućiti promenu njihovog položaja dalje od kauloida, usled povećanja turgora u ovim ćelijama. Na ćelijama filoida nekih vrsta mogu se nalaziti i različiti tipovi ispupčenja u vidu papila i mamila. Papile predstavljaju čvrste izraštaje ćelijskog zida, dok su mamile izbočine ćelijskog lumena iznad površine ćelija. Njihova funkcija ogleda se u održavanju hidratisanosti kroz formiranje tankog vodenog filma na površini filoida. Ćelije filoida takođe mogu imati zadebljale zidove koji sadrže plazmodezme (Goffinet *et al.*, 2009; Vanderpoorten & Goffinet, 2009).

### 1.1.4. Ekofiziologija mahovina

Briofite su prisutne na svim kontinentima, i nastanjuju širok spektar supstrata koji uključuju zemljište, kamenje, koru drveća, ostatke biljaka i životinja, pa čak i kutikulu listova. Briofite jedino

ne rastu u morima i okeanima. Iako je većina vrsta specijalizovana za određene ekološke niše, mahovine mogu imati široku ekološku amplitudu. Dostupnost vode predstavlja jedan od ključnih faktora koji utiče na njihovu rasprostranjenost (Vanderpoorten & Goffinet, 2009). Obrasci adaptacija mahovina i vaskularnih biljaka koji su im u toku evolucije omogućili uspešnu kolonizaciju kopna razlikuju se. Traheofite spadaju u homeohidrične biljke, što znači da poseduju mehanizme koji im omogućavaju da u uslovima ograničene dostupnosti vode vodni potencijal tkiva održavaju relativno stabilnim, a ćelije ostaju metabolički aktivne, čak i ako su u stanju vodnog stresa. Ovo neminovno uslovljava uzajamno ograničavanje procesa fotosinteze i održavanja vodnog balansa, s obzirom na to da faktori (prisustvo kutikule i otvorenost stoma) koji smanjuju odavanje vode istovremeno utiču na smanjenje asimilacije CO<sub>2</sub>. Za razliku od traheofita, mahovine generalno spadaju u poikilohidrične biljke koje u uslovima smanjene dostupnosti vode imaju sposobnost uspostavljanja ekvilibrijuma sa spoljašnjom sredinom u pogledu vodnog potencijala, uz istovremeni prelazak ćelija u metabolički neaktivno stanje. Kod mahovina, metabolička aktivnost u stanju vodnog stresa predstavlja samo kratkotrajno prelazno stanje. Kada voda postane ponovo dostupna, ove biljke brzo uspostavljaju normalni metabolizam i nastavljaju aktivno rastenje i proces fotosinteze (Proctor, 1982, 2011; Marschall, 2017).

Razlike između vaskularnih biljaka i mahovina u pogledu adaptacija vezanih za vodu ogledaju se i u načinu usvajanja i provođenja vode. Vaskularne biljke usvajaju vodu korenima i putem specijalizovanih provodnih tkiva provode je do nadzemnih delova biljke. Otvaranje i zatvaranje stoma regulišu proces odavanja vode, uz relativno hidrofobnu kutikulu koja sprečava gubitak vode sa površine biljke. Ovakav vid transporta, gde se voda usvaja iz supstrata i transportuje kroz unutrašnjost izdanka putem posebno diferenciranih provodnih snopova, naziva se endohidričan (Proctor, 1982; Huttunen *et al.*, 2018). Voda koju sadrže mahovine sačinjena je od tri komponente - simplastne vode (u protoplastu), apoplastne vode (u šupljinama ćelijskog zida) i spoljašnje kapilarne vode. Udeo svake od ovih komponenti zavisi od vrste mahovine (Proctor, 2000). Generalno, transport vode iz jednog dela mahovine u drugi moguć je posredstvom struktura unutar izdanka nalik provodnim snopovima, putem apoplasta, međućelijskim transportom (*eng.* "cell to cell transport") i kretanjem kroz spoljašnje kapilarne prostore.

Manji broj vrsta mahovina je endohidričan (vrste roda *Polytrichum* i *Mnium*) sa hidroidama i leptoidama, koje omogućavaju efikasnu unutrašnju translokaciju vode duž longitudinalne ose (Glime, 2017). Dominantno endohidrične vrste najčešće imaju ortotropan rast i voskaste površine koje odbijaju vodu i karakteristične su za familije Polytrichaceae i Mniaceae. Tipično rastu na vlažnim i rastresitim supstratima koji su bogati hranljivim materijama, u šumama, močvarama i na travnatom zemljištu (Proctor, 1982). Kod većine mahovina, fiziološki važna slobodna voda nalazi se oko biljke, pri čemu neke vrste imaju sposobnost da zadrže i do deset puta veću količinu spoljašnje vode u odnosu na njihovu suhu masu (Proctor, 2011). Vrste kod kojih količina spoljašnje kapilarne vode prevazilazi vodu sadržanu u unutrašnjim delovima biljke, nazivaju se ektohidrične. To za posledicu ima da je dominantan vid transporta kod ovih vrsta spoljašnji. Osim toga, prisustvo relativno velike količine spoljašnje vode omogućava da se promene u vodnom potencijalu unutar ćelija mahovina održavaju u uskom opsegu, uz neometano metaboličko funkcionisanje ćelija, na račun variranja sadržaja spoljašnje kapilarne vodene komponente (Proctor, 2000; Marschall, 2017). Kod ektohidričnih vrsta usvajanje (ali i gubitak) vode vrše se celom površinom izdanka, a dalje kretanje unutar biljke je relativno difuzno. Ove mahovine često rastu na nepropustljivim supstratima kao što su kora drveća ili kamenje, blago pričvršćene za podlogu, oslanjajući se na vodu koju skladište nakon kiše ili rose. Tipični predstavnici ektohidričnih vrsta sreću se u familijama Grimmiaceae, Orthotrichaceae i Hypnaceae (Proctor, 1982). Osim mahovina koje su dominantno endo- ili ektohidrične, brojne vrste se odlikuju sposobnošću da vežu veliku količinu spoljašnje vode, dok je provođenje iste pretežno unutrašnje. One, kao i druge vrste sa intermedijernim svojstvima u odnosu na usvajanje vode, nazivaju se miksohidrične. Udeo različitih puteva transporta vode razlikuje se kod različitih mahovina, ali zavisi i od dela biljke kroz koji se vrši transport. Nakon apsorpcije, kod većine vrsta voda će se kroz korteks kauloida i laminu filoida u

velikoj meri kretati apoplastnim putem ili međućelijskim transportom (Proctor, 1982). Smatra se da osobine vezane za usvajanje, skladištenje i transport vode kod mahovina objašnjavaju do 50% morfološke varijabilnosti između individualnih vrsta. Ektohidričan transport i skladištenje vode potpomognuti su brojnim morfološkim strukturama poput lamela na filoidima kod predstavnika Polytrichaceae, različitih ornamentacija u vidu papila, mamila i udubljenja ćelijskih zidova ćelija filoida, parafilijama, tomentumom, aksilarnim dlakama i diferenciranim bazalnim ćelijama filoida (Huttunen *et al.*, 2018).

S obzirom na to da većina vrsta mahovina raste gregarno, u grupama, a ne kao izolovane jedinice, životne forme se mogu smatrati funkcionalnim jedinicama ovih biljaka, koje značajno utiču na zadržavanje i ektohidrično provođenje vode, kao i na difuziju gasova i proces fotosinteze. Životne forme se odnose na obrazac rasta i predstavljaju rezultat kombinovanog uticaja formi rasta i sredinskih faktora (Glime, 2017; Huttunen *et al.*, 2018). Većina vrsta mahovina formira jednu od tri osnovne životne forme - "busenove" (izdanci rastu radijalno iz centrane tačke), "tepihe" (položeni ili puzajući izdanci pleurokarpnih vrsta) ili "jastučice" (uspravni rast izdanaka akrokarpnih individua). U zavisnosti od razlika u grananju modula različite hijerarhije (mono- ili simpodijalno), polarnosti razvića grana (bazi- ili akropetalno), pravca rasta (orto- ili plagiotropno), kao i gustine grananja, svaka od ovih formi može se dodatno podeliti u podforme. Akrokarpne vrste najčešće formiraju male busenove i jastučice, sastavljene od uspravnih gametofora koji su nerazgranati, dok su pleurokarpne i kladokarpne vrste najčešće plagiotropne, jako razgranate i formiraju prostrane tepihe (Mägdefrau, 1982; Vanderpoorten & Goffinet, 2009; Glime, 2017; Huttunen *et al.*, 2018).

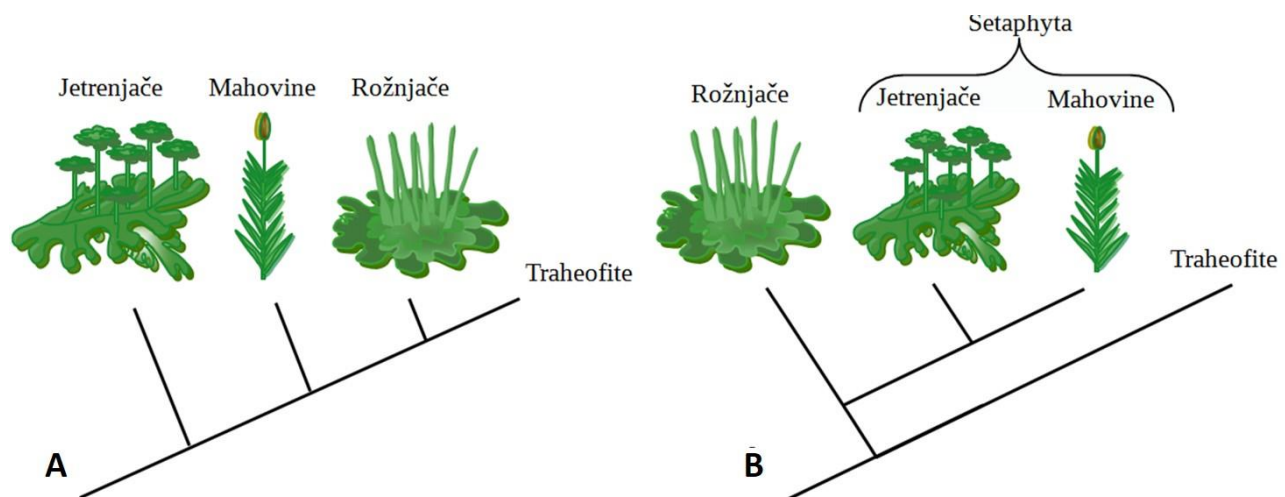
Različite životne forme imaju različitu efikasnost u očuvanju vode. Kompaktni jastučici i tepisi su životne forme koje se najsporije isušuju (Proctor *et al.*, 2007). Osim toga, različite životne forme karakterišu se različitim fotosintetičkim kapacitetom. Mahovine se generalno smatraju biljkama zasenčenih staništa, čiji je svetlosni užitak nizak. Čak i na staništima gde su direktno izložene svetlosti, mahovine tipično poseduju nizak odnos hlorofila *a:b*. Ovakva prilagođenost fotosintetičkog aparata je logična s obzirom na to da su kao poikilohidrične biljke u sušnim sunčanim uslovima uglavnom metabolički neaktivne. Većina njihove fotosintetičke aktivnosti odvija se po relativno oblačnom ili kišovitom vremenu (Proctor, 2011). S druge strane, brojne linije akrokarpnih mahovina koje su rano divergirale kolonizuju suva staništa sa visokim intenzitetom svetlosti, koja se karakterišu odsustvom druge vegetacije, rastući u vidu kompaktnih jastučica. Smatra se da je efekat zasenčenja, koji karakteriše mahovine sa uspravnim rastom, jedan od faktora koji doprinosi njihovom uspešnom opstanku u ovim uslovima. Nasuprot ovome, plagiotropni rast karakterističan za pleurokarpe može intenzivirati isparavanje i izložiti biljke oštećenjima u uslovima povišene osvetljenosti, ali će u zasenčenim staništima sa niskim intenzitetom svetlosti favorizovati razviće ovih vrsta usled efikasnijeg iskorišćenja svetlosti u poređenju sa akrokarpnim vrstama (Vanderpoorten & Goffinet, 2009; Huttunen *et al.*, 2018).

Veličina tela biljaka je jako važan faktor koji utiče na ekofiziološke adaptacije biljaka. Mahovine generalno imaju znatno manju veličinu tela u poređenju sa vaskularnim biljkama, te je kod mahovina odnos između površine i zapremine jako veliki. Odavanje vode sa relativno velike površine u odnosu na zapreminu dovodi do brzog isušivanja. Ovo, između ostalog, znači da mahovine kao relativno sitne biljke ne bi bile u stanju da produkuju dovoljno veliki korenov sistem koji bi omogućio snabdevanje vodom iz dubljih slojeva zemljišta u periodima dugih suša, kao što je to slučaj sa homeohidričnim biljkama. Zbog ovoga, razvoj tolerancije prema isušivanju, poikilohidričnosti i ektohidričnosti kod mnogih predstavnika ove grupe biljaka smatra se optimalnom strategijom u odnosu na toleranciju prema suši, homeohidričnost i endohidričnost traheofita (Proctor *et al.*, 2007).

### **1.1.5. Filogenetski odnosi briofita i klasifikacija mahovina**

Iako je široko prihvaćeno da sve kopnene biljke potiču od zajedničkog akvatičnog pretka, kao i da traheofite predstavljaju monofiletsku grupu, filogenetska pozicija mahovina u odnosu na druge kopnene biljke, kao ni odnosi između pojedinačnih grupa nevaskularnih biljaka i traheofita ni

danas nisu sa sigurnošću okarakterisani (Sousa *et al.*, 2020a). Prema jednoj od hipoteza, nevaskularne biljke predstavljaju parafiletsku grupu, gde jetrenjače, mahovine i rožnjače čine sukcesivne sestrinske linije koje vode do traheofita, pri čemu mahovine imaju intermedijernu poziciju u filogenetskom stablu embriofita (Slika 5A) (Goffinet *et al.*, 2009; Vanderpoorten & Goffinet, 2009; Frangedakis *et al.*, 2021). Iako je godinama unazad smatrano da ova hipoteza najbolje objašnjava filogeniju savremenih grupa biljaka, najskorija saznanja bazirana na filogenomskim i morfološkim studijama ukazuju na drugačiju prirodu filogenetskih odnosa među ovim grupama i podržavaju hipotezu o monofiletskom poreklu nevaskularnih biljaka. Prema toj hipotezi (Slika 5B), mahovine i jetrenjače čine monofiletsku grupu, nazvanu setafite (Setaphyta), koja zajedno sa rožnjačama formira veću monofiletsku grupu briofita koja je evoluirala od zajedničkog pretka sa traheofitama (Renzaglia *et al.*, 2018; Sousa *et al.*, 2020b; Frangedakis *et al.*, 2021). Briofite sa oko 26000 opisanih vrsta predstavljaju drugu po brojnosti grupu kopnenih biljaka, čija je jedinstvena evolutivna istorija počela pre više od 400 miliona godina. Njihovu diverzifikaciju karakterišu velike transformacije obe generacije životnog ciklusa. One obuhvataju višestruke evolutivne novine vezane za strukture koje učestvuju u rasipanju spora, kao i optimizaciju razvića tako da podrži istovremeno rastenje gametofita i sporofita. Osim toga, smatra se da je opstanku i raznovrsnosti savremenih vrsta doprinelo i njihovo generalno svojstvo otpornosti na dehidrataciju i desikaciju, koje je pratilo procese višestruke radijacije.



**Slika 5.** Šematski prikaz hipoteza o filogenetskoj poziciji mahovina u odnosu na druge kopnene biljke. A - Jetrenjače, mahovine i rožnjače kao sukcesivne sestrinske linije koje vode do traheofita; B - Monofiletska grupa briofita, sa rožnjačama kao sestrinskom linijom grupi Setaphyta, koja uključuje mahovine i jetrenjače.

Iako molekularni podaci imaju značajnu ulogu u identifikaciji filogenetskih odnosa među različitim grupama mahovina, savremena sistematika se i dalje u velikoj meri zasniva na morfološkim karakteristikama, sa posebnim akcentom na složenost peristoma i položaj reproduktivnih organa (Goffinet *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2019).

Na osnovu morfoloških karakteristika mahovine su svrstane u pet superklasa. Prve četiri superklase sadrže samo po jednu klasu, i one obuhvataju linije koje su rano divergirale u toku evolucije, i za koje je karakteristično odsustvo peristoma (eperistomatne mahovine) kao pleziomorfne karakteristike mahovina. Njih čine klase Takakiopsida, Sphagnopsida, Andreaopsida, i Andreaebryopsida. Superklasu V sačinjavaju mahovine čija je zajednička osobina prisustvo peristoma na čahuri sporofita, osim kod klase Oedipodiopsida, za koju se smatra da ima intermedijernu filogenetsku poziciju između eperistomatnih i peristomatnih mahovina. Pored ove, superklasa V obuhvata klase Tetrarhopsida i Polytrichopsida, sa mahovinama čiji peristomalni zupci su izgrađeni od izdužnih celih ćelija sa ravnomerno zadebljalim zidovima, kao i klasu Bryopsida, kod koje zupci predstavljaju ostatke periklinalnih ćelijskih zidova, dok su ostali zidovi i njihovi delovi resorbovani pre sazrevanja čahure. Klasa Bryopsida, koja obuhvata najveći broj vrsta



mahovina, podeljena je u šest subklasa, od kojih su Bryidae, Dicranidae i Funaridae najbrojnije. Usled pojave čestih redukcija ili specijalizovanih morfologija, evolucionni trendovi i sukcesija transformacionih događaja vezanih za morfološke karaktere među vrstama koje su rano divergirale u okviru grupe Bryopsida, još uvek nisu razjašnjeni. Osim toga, poreklo i diverzifikacija nadreda Hypnanae, u okviru klase Bryopsida, koji se smatra da pokriva oko 50% ukupne morfološke raznovrsnosti svih mahovina, još uvek su sporni (Goffinet *et al.*, 2009; Huttunen *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2019).

### 1.1.6. Biologija ispitivanih vrsta

Za ovo istraživanje odabrane su dve evolutivno i filogenetski udaljene vrste mahovina, različite morfoanatomije i životnih formi, sa pretpostavkom da će i aspekti ekofiziološkog odgovora na metale biti drugačiji. Vrste ispitivane u ovom istraživanju su *A. undulatum* i *H. cupressiforme*.

#### 1.1.6.1. Biologija vrste *Atrichum undulatum* (Hedw.) P. Beauv.

Vrsta *Atrichum undulatum* pripada rodu *Atrichum*, familije Polytrichaceae, reda Polytrichales, klase Polytrichopsida u okviru superklase koju čine peristomatne mahovine (Goffinet *et al.*, 2009). Ova mahovina predstavlja jednu od najkrupnijih i najupadljivijih akrokarpnih vrsta. Rasprostranjena je širom Evrope, Severne Amerike i Azije, gde najčešće naseljava zasenčena mesta u okviru prizemnog sprata niskih šuma, ali može se naći i u zasadima četinara, pored puta, na pašnjacima, neobrađenim ili polu-obrađenim travnjacima, obalama reka i stenovitim liticama. Nije prisutna jedino na izrazito kiselim i krečnjačkim podlogama (Atherton *et al.*, 2010). *Atrichum undulatum* jako dobro toleriše isušivanje zahvaljujući brojnim citološkim, biohemijskim i fiziološkim modifikacijama koje spečavaju ćelijska oštećenja u toku dehidraciono-rehidracionih ciklusa (Hu *et al.*, 2016).

Gametofori *A. undulatum* imaju uspravan rast, najčešće su nerazgranati i u prirodi dostižu visinu do 7cm (Slika 6).

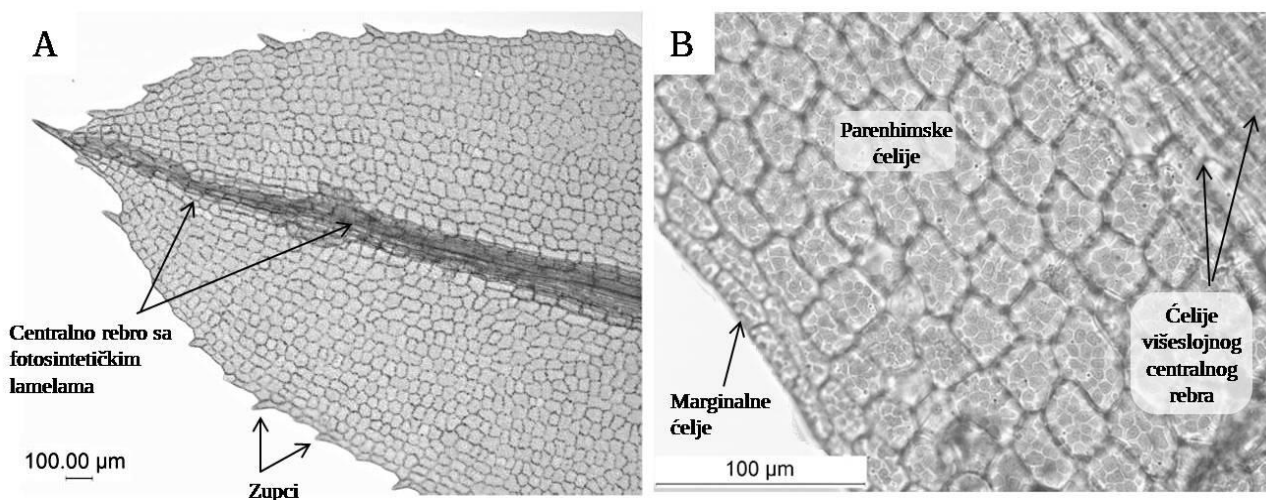


**Slika 6.** *Atrichum undulatum* u prirodi i kulturi *in vitro*. A - Mahovina *A. undulatum* u prirodi; B - Gametofor *A. undulatum* gajen u kulturi *in vitro* sa izraženim granjem.

Na gametoforima se nalaze dugi uski šiljasti filoidi dužine do 1 cm, koji posmatrani transverzalno izgledaju talasasto (undulirano) kada su hidratizirani, dok u sušnim uslovima bivaju jako naborani. Undulirani izgled filoida karakterističan je za dobro razvijene filoide, dok mladi i

slabije razvijeni najčešće nemaju talasasti izgled. Karakteristična životna forma *A. undulatum* su rastresiti busenovi, čija boja varira u zavisnosti od svetlostnih uslova, krećući se od žućkaste u osunčanim do tamnozeleno u zasenčenim staništima (Atherton *et al.*, 2010). Sporofit se sastoji od crvenkaste sete duge između 2 - 4 cm i cilindrične, zakrivljene čahure dužine 3-4 mm, na čijem vrhu se nalazi kljunasti operkulum slične dužine. Peristomalnih zubaca ima 32, a otvor kapsule nakon skidanja poklopca prekriven je membranom, epifragmom, za koju su zupci i pričvršćeni. Spore se oslobađaju kroz prostor između peristomalnih zubaca (Vanderpoorten & Goffinet, 2009; Atherton *et al.*, 2010). Karakteristika spora *A. undulatum* je velika otpornost na desikaciju i niske temperature (During, 1979).

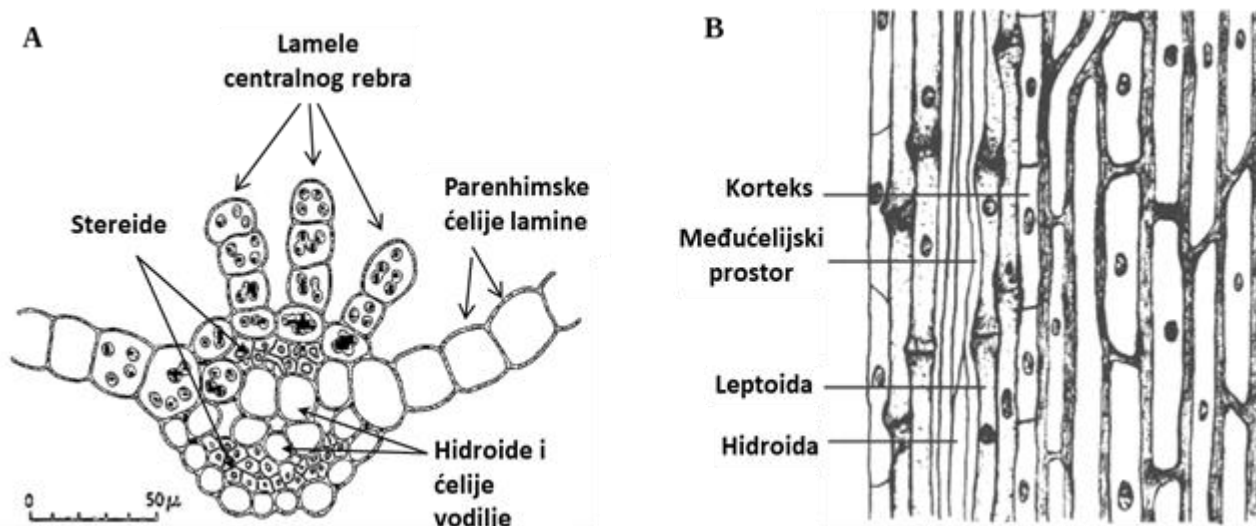
Na poprečnom preseku, filoidi imaju relativno široku laminu sa dobro diferenciranim regionom centralnog rebra. Ventralna strana filoida je hrapava, sa kostom koja se pruža do samog vrha i brojnim sitnim parnim zupcima duž margina (Slika 7), počevši gotovo od baze filoida (Atherton *et al.*, 2010). Sa adaksijalne strane, širina koste je najčešće 4-6 površinskih ćelija lamine, koje su na ovom delu filoida zadebljale. Sa njih se normalno na ravan lamine pružaju fotosintetički aktivne lamele, čija je visina najčešće 1-4 ćelije (Slika 8A). Ove lamele odaju utisak tamnih traka koje se prostiru longitudinalno od baze do vrha filoida, s tim da na određenim rastojanjima duž longitudinalne ose, češće bliže vrhu, može doći do prekida lamela. Na tim mestima, uočavaju se udubljenja u kojima su prisutne samo površinske ćelije lamine i ostatak centralnog rebra. Ispod površinskog sloja laminalnih ćelija ventralne i dorzalne strane koste, nalaze se grupe stereida koje sa gornje i donje strane okružuju centralnu grupu krupnijih ćelija koje predstavljaju hidroide i ćelije vodilje. Ka vrhu filoida, broj lamela se takođe najčešće smanjuje na jednu ili dve, pri čemu u tim regionima na adaksijalnoj strani može biti više slojeva ćelija lamine koje pokrivaju stereide (Gemmell, 1953). Na površini filoida ove vrste nije uočljiv epikutikularni vosak, ali svojstvo odbijanja vode ukazuje na postojanje voskastog sloja bez specifične ornamentacije (Clayton-Greene *et al.*, 1985).



**Slika 7.** Izgled filoida *A. undulatum* gajenog u kulturi *in vitro*. A - Lamina filoida sa kostom čija se širina smanjuje ka vrhu. Na obodu lamine nalaze se zupčasti izraštaji. B - Izgled individualnih ćelija lamine: Marginalne ćelije su izdužene i spljoštene u odnosu na ostatak lamine u regionu van koste. U kostalnom delu uočava se veći broj slojeva jako izduženih spljoštenih ćelija (stereide, hidroide i ćelije vodilje).

Kauloidi *A. undulatum* imaju obrazac diferencijacije ćelija tipičan za pripadnike familije Polytrichaceae, sa epidermisom na površini, korteksom sačinjenim od parenhimskih i sklerenhimskih ćelija i centralnim cilindrom sačinjenim iz dva dela - spoljašnjeg leptoma i unutrašnjeg hadroma (Slika 8B; Glime, 2017). Lateralni zidovi ćelija leptoma kauloida roda *Atrichum* su zadebljali i sadrže difuzni mikrofibrilarni unutrašnji sloj, dok ćelije vodilje filoida ne poseduju ovakva zadebljanja (Scheirer, 1990).





**Slika 8.** Šematski prikaz različito diferenciranih ćelija filoida i kauloida *A. undulatum*. A - Šematski prikaz longitudinalnog preseka filoida (Modifikovano prema Gemzell, 1953); B - Šematski prikaz poprečnog preseka kauloida (Modifikovano prema Glime, 2017).

*Atrichum undulatum* je jedna od prvih mahovina kod kojih je okarakterisan broj hromozoma, što je kasnije omogućilo otkriće postojanja intraspecijske poliploidije i definisanje tri citotipa sa  $n = 7, 14$  i  $21$  hromozoma. Ipak, kod jedinki različitih citotipova na morfološkom nivou nije moguće uočiti razlike, čak ni u veličini pojedinačnih ćelija, što je često karakteristično za jedinke sa različitim stepenom ploidije. Pokazano je da zastupljenost različitih citotipova zavisi od klimatskih uslova, pri čemu su triploidi najrasprostranjenije i najzastupljenije populacije u oblastima koje imaju ekstremnije klimatske parametre (Abderrahman & Smith, 1982). Različiti citotipovi razlikuju se po tome da li su biljke jednodome ili dvodome. U slučaju diploidnog i triploidnog citotipa, u populacijama se javljaju i jednodome i dvodome biljke. Međutim, u slučaju haploidnog citotipa, produkcija reproduktivnih organa različitog pola odvija se na odvojenim gametoforima (Jesson *et al.*, 2011). Vrstu *A. undulatum* karakteriše visok stepen unutar- i međuvrsne hibridizacije, te je poreklo diploida i triploida generalno teško ustanoviti (Perley & Jesson, 2015).

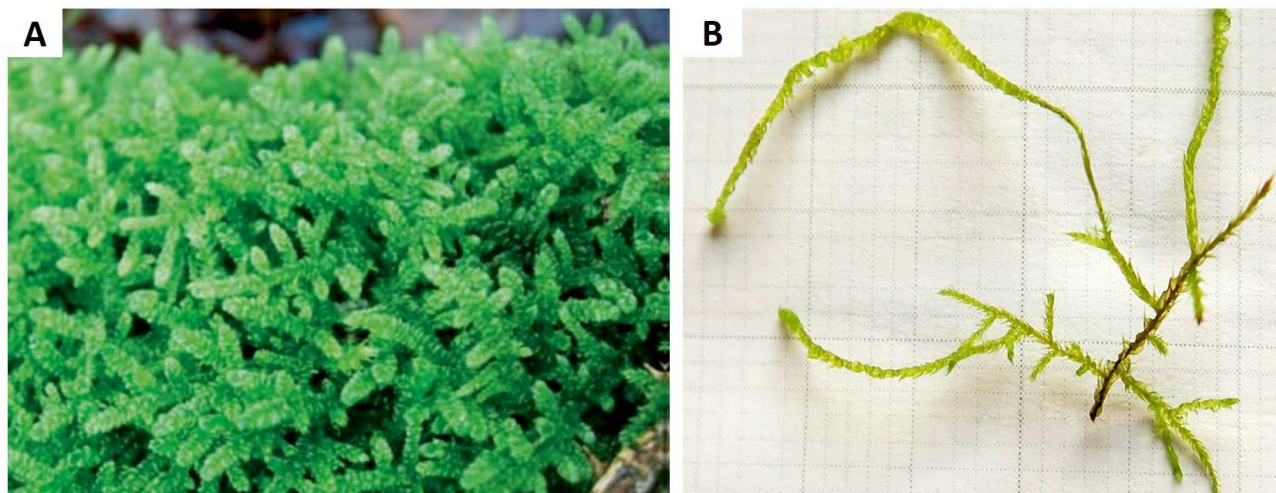
U laboratorijskim uslovima, filoidi *A. undulatum* imaju sposobnost produkcije protoneme, pupoljaka i regeneracije novih biljaka, ali prema nekim autorima (Gemzell 1953), samo kada su odvojeni od maternalnih gametofora. To praktično znači da su sposobni za dediferencijaciju. Njihovo razviće započinje iz površinskih ćelija centralnog rebra, u predelu gde se uočavaju prekidi lamela i karakteristični su za deo filoida bliži vrhu. Osim toga, gametofori gajeni u laboratorijskim uslovima na hranljivom medijumu često produkuju različit broj bočnih grana, što nije tipično za ovu mahovinu u prirodnim staništima (De Forest Heald, 1898; Gemzell, 1953).

Analiza 23 vrste briofita pokazala je da *A. undulatum* ima sličan akumulacioni kapacitet za metale u poređenju sa pleurokarpnim vrstama koje su generalno preporučene za upotrebu u monitoringu zagađenja životne sredine ovim elementima (Gorelova *et al.* 2016). S druge strane, Govindaparyari *et al.* (2010) opisuju ovu vrstu kao osetljivu na aerozagađenje, te je stoga klasifikuju kao dobrog bioindikatora.

### 1.1.6.2. Biologija vrste *Hypnum cupressiforme* Hedw.

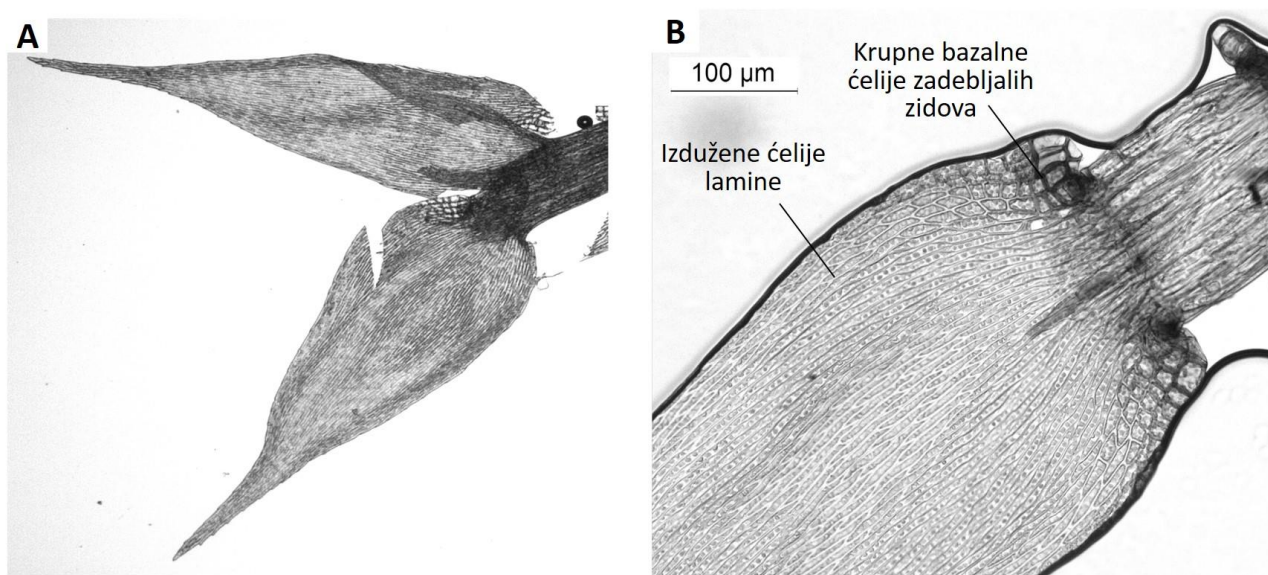
Vrsta *Hypnum cupressiforme* je pripadnik roda *Hypnum*, familije Hypnaceae, reda Hypnales, klase Bryopsida u okviru superklase koju čine peristomatne mahovine. Prisutna je na svim kontinentima izuzev Antarktiku, pri čemu naseljava širok spektar staništa uključujući stabla drvenastih vrsta, pašnjake, stene, zidove, trotoare i razne druge kisele i blago bazne podloge, i odlikuje se relativnom tolerancijom na zagađenje životne sredine (Vujičić *et al.*, 2011). Mozemo je

smatrati ubikvitistom. *Hypnum cupressiforme* je diočna mahovina čije se dimenzije gametofora kreću od 2-10 cm, sa puzećim izdancima, koji formiraju glatke i guste pokrivače preko podloga na kojima rastu. Izdanci su pleurokarpni i karakterišu se produkcijom brojnih sekundarnih modula koji su najčešće kraći i tanji u odnosu na primarni izdanak (Slika 9). Kauloidi su pokriveni filoidima koji se preklapaju, zbog čega izdanak morfološki nalikuje stablu čempresa, te otuda dolazi naziv vrste (Ignatov & Hedenäs, 2007; Vujičić *et al.*, 2011).



**Slika 9.** *Hypnum cupressiforme* u prirodi i kulturi *in vitro*. A - Izgled mahovine *H. cupressiforme* u prirodi (Vujičić *et al.*, 2011); B - Gametofor mahovine *H. cupressiforme* gajen u kulturi *in vitro*.

Filoidi su dugački između 1 i 2 mm, konkavni su i pri vrhovima se sužavaju. Na granama su manji i uži od onih na primarnom modulu, a kosta odsustvuje ili je jako kratka i udvojena (Slika 10 A). Oko primordija grana kod ove vrste razvijaju se pseudoparafilije koje imaju zaštitnu ulogu. Izdanci su zeleni ili braonkaste boje u starijim delovima (Ignatov & Hedenäs, 2007; Atherton *et al.*, 2010).



**Slika 10.** Morfološki izgled filoida mahovine *H. cupressiforme* gajene u kulturi *in vitro*. A – Odsečak kauloida sa filoidima bez diferenciranog centralnog rebra. B- Čelije različite morfologije lamine filoida *H. cupressiforme*.

Na poprečnom preseku, korteks kauloida *H. cupressiforme* sastoji se iz dva ili više slojeva epidermalnih ćelija sa zadebljalim zidovima, sa slabo diferenciranim hadromom i bez hijalodermisa. Pri osnovi filoida nalaze se dobro diferencirane kompaktne bazalne ćelije (Slika 10

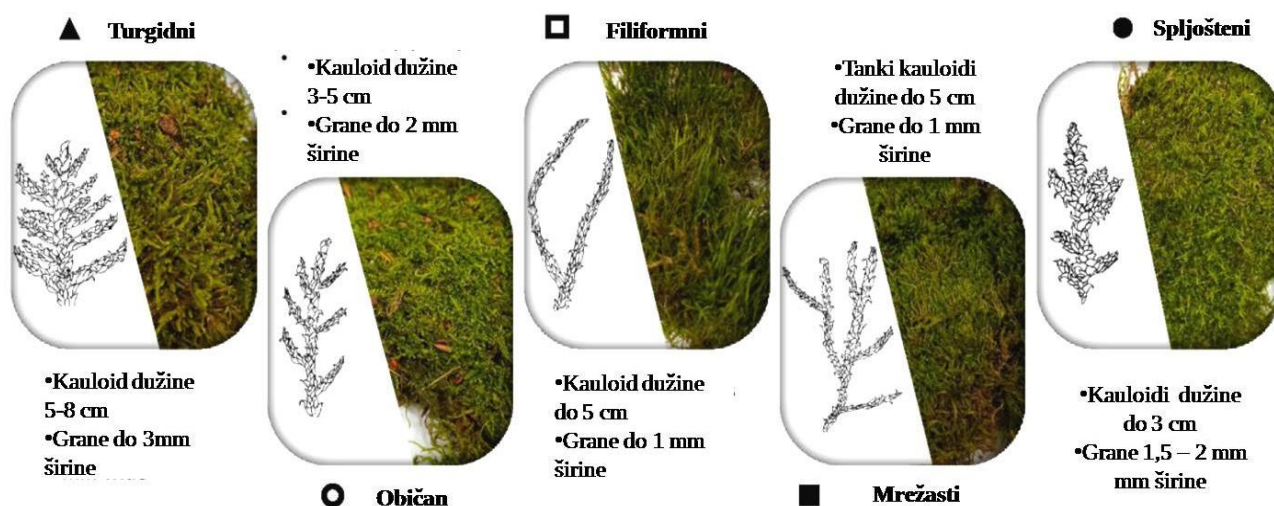


B), dok su u središnjem i vršnom delu lamine ćelije izdužene i uniformno raspoređene (Blockeel & Stevenson, 2006).

Sporofit je građen od crvenkasto-braon drške dužine 1-2,5 cm na kojoj se nalazi cilindrična, blago zakrivljena čahura veličine 1,7-2,4 mm, u kojoj se nalaze spore. Na vrhu čahure nalazi se kljunoliki operkulum dužine 0,6-0,9 mm (Vujičić *et al.*, 2011).

Na evropskom kontinentu, *H. cupressiforme* odlikuje velika morfološka raznovrsnost, koja je posledica genetičke diverzifikacije populacija koje su se nezavisno razvijale u izolovanim refugijumima više hiljada godina tokom ledenih doba Pleistocena. Na osnovu prostornog rasporeda, veličine grana i izdanka, kao i veličine pokrivača koji formira i razmaka jedinki u njemu, *H. cupressiforme* se može klasifikovati u veći broj morfotipova od kojih su neki prikazani na Slici 11 (Pyszko *et al.*, 2021).

*Hypnum cupressiforme* je jedna od najčešće korišćenih vrsta za biomonitoring zagađenja vazduha toksičnim metalima (Galsomiès *et al.*, 2003; Carballeira *et al.*, 2008; Boquete *et al.*, 2016; Nickel & Schröder 2017; Schröder & Nickel, 2019). Iako se češće sreće u hladnijim i borealnim staništima, ova epifitska vrsta je otpornija na desikaciju i zagađenje u poređenju sa drugim pleurokarpnim mahovinama, zbog čega je prisutna u širokom spektru klimata i životnih sredina (Lee & Stewart, 1971; Zechmeister, 1998; Vujičić *et al.*, 2011; Izquieta-Rojano *et al.*, 2018). S druge strane, u sušnim oblastima njen rast je ograničen, naglašavajući potrebu za alternativnom vrstom koja može biti korišćena za studije zagađenja životne sredine u ovim staništima (Izquieta-Rojano *et al.*, 2016).



**Slika 11.** Klasifikacija morfotipova *H. cupressiforme* (Modifikovano prema Pyszko *et al.*, 2021).

## 1.2. Metali u životnoj sredini

Metali čine oko 75% svih poznatih hemijskih elemenata (Sparks, 2005). Oni predstavljaju prirodne konstituente Zemljine kore, u kojoj se dominantno nalaze u stabilnim, nerastvorljivim oblicima. Odatle, prirodnim procesima male količine mogu dospeti u zemljišta, vode i atmosferu u nestabilnijim, solubilnim formama, gde se cirkulišući kroz biogeoheimijske cikluse održavaju u relativno konstantnim koncentracijama i doprinose normalnom funkcionisanju biosfere (Vogel-Mikuš *et al.*, 2012; Stanković *et al.*, 2018). Metali i drugi elementi koji se u prirodi normalno nalaze u malim koncentracijama nazivaju se elementi u tragovima ili mikroelementi i za njih je karakteristično da ne prelaze koncentraciju od 0,1% mase određenog uzorka. U bioheimijskim i biomedicinskim istraživanjima, mikroelementom se smatra metal koji čini manje od 0,01% mase organizma. Neki mikroelementi, iako u jako malim koncentracijama, neophodni su za normalno razviće i uspešno kompletiranje životnog ciklusa živih bića i tada se nazivaju esencijalnim mikroelementima. Oni u određenom organizmu ostvaruju direktne i specifične efekte u procesima uključenim u rastenje i metabolizam, koje nijedan drugi element ne može postići ukoliko se nađe na

njihovom mestu (Adriano, 1986). Kod biljaka esencijalnim elementima smatraju se elementi čija koncentracija je ispod 100mg/kg suve mase biljke, i obuhvataju bor (B), hlor (Cl), bakar (Cu), gvožđe (Fe), mangan (Mn), molibden (Mo), nikl (Ni) i cink (Zn) (Ulery, 2005). Kako bi zadovoljile ove potrebe, biljke su razvile precizno kontrolisane homeostatske mehanizme koji uključuju mobilizaciju, usvajanje i redistribuciju esencijalnih metala unutar biljke, kao i njihov unutarćelijski promet i skladištenje (Hänsch & Mendel, 2009). Osim fiziološki značajnih elemenata, biljke mogu akumulirati i mikroelemente koji nisu esencijalni za biljni organizam, poput kadmijuma i olova (Williams & Mills, 2005).

Antropogenim delovanjem, količine pojedinih mikroelemenata u životnoj sredini, uključujući mikroelemente, povećane su do nivoa koji mogu biti jako toksični po organizme u njoj u zavisnosti od koncentracije metala i osetljivosti datog organizma (Lin & Aarts, 2012). Osim toga, čovekove aktivnosti dovele su do uvođenja i oslobađanja novih vrsta metala, koji ranije nisu bili prisutni u rastvorljivim oblicima, a koji su štetni čak i u jako niskim koncentracijama (Vogel-Mikuš *et al.*, 2012). Uklanjanje nekih metala nakon što dospeju u životnu srednu je jako teško, uz posledičnu bioakumulaciju i biomagnifikaciju kroz lance ishrane (Stanković *et al.*, 2018). Sve ovo stvorilo je potrebu za kontinuiranim istraživanjem i praćenjem prisustva, koncentracija i toksičnosti različitih metala u životnoj sredini, kao i njihovog uticaja na ekosisteme i pojedinačne organizme.

### 1.2.1. Klasifikacija metala

Metali se generalno klasifikuju na osnovu različitih fizičkih i hemijskih kriterijuma poput gustine, atomskog broja, težine i stepena toksičnosti (Sparks, 2005). Međutim, sa aspekta uticaja na biološke sisteme, naročito važne su podele koje uzimaju u obzir elektronsku strukturu, redukciono-oksidaciona svojstva, kao i preferencije jona metala da se vezuju za određene funkcionalne grupe unutar bioloških molekula i formiraju ligand-metal komplekse (Nieboer & Richardson, 1980; Reilly, 2004). Na osnovu elektronske konfiguracije, metali se mogu svrstati u reprezentativne (osnovne) ili tranzicione (prelazne) grupe (Reilly, 2004). Reprezentativni metali sve svoje valentne elektrone sadrže u okviru jednog elektronskog nivoa i u zavisnosti od broja valentnih elektrona mogu imati jedno (jedan ili dva valentna elektrona) ili dva (tri i više valentnih elektrona) oksidaciona stanja. Primeri reprezentativnih metala sa jednim oksidacionim stanjem su natrijum ( $^{+}$ ) i kalcijum ( $^{2+}$ ), dok u one sa dva oksidaciona stanja spadaju elementi poput olova ( $^{2+}$ ,  $^{4+}$ ) i bizmuta ( $^{3+}$ ,  $^{5+}$ ). Cink i kadmijum se sreću samo u ( $^{2+}$ ) oksidacionom stanju, te takođe spadaju u reprezentativne metale sa jednim oksidacionim stanjem (Reilly, 2004). S druge strane, prelazni metali, kao što su mangan ili bakar, karakterišu se postojanjem valentnih elektrona u više od jednog energetskog nivoa i mogu imati čitav spektar oksidacionih stanja. Prema IUPAC-u, svaki element koji kao neutralan ili u obliku jona ima nekompletni d-podnivo predstavlja tranzicioni metal. Iako cink prema definiciji ne pripada ovoj grupi, zbog sličnosti sa tranzicionim metalima u interakcijama sa biološkim sistemima, i ovaj element se često svrstava u kategoriju tranzicionih (de Bolster, 1997; Reilly, 2004; Clayton *et al.*, 2011).

Posebno je značajna podela metala na osnovu preferencije njihovih katjona da formiraju komplekse sa određenim ligandima i stabilnosti nastalih metal-ligand kompleksa, a koja u osnovi ima činjenicu da se metali u interakciji sa biološkim sistemima ponašaju kao Luisove kiseline (Nieboer & Richardson, 1980; Duffus, 2002). Luisovom kiselinom smatra se svaka hemijska vrsta koja ima neto pozitivno naelektrisanje i ponaša se kao primalac elektrona. U skladu sa ovim, svi metali svrstani su u tri grupe (Nieboer & Richardson, 1980; Duffus, 2002). Metali koji najstabilnije komplekse grade sa ligandima u kojima kiseonik ima ulogu donora elektrona sačinjavaju grupu A i obuhvataju alkalne i zemno-alkalne metale, lantanoide i aktinoide. Veze koje ovi metali grade su pretežno jonske, zbog čega su ovi elementi relativno mobilni i lako izmenljivi u biološkim sistemima, gde neki od njih imaju ulogu makroelemenata, poput natrijuma, magnezijuma, kalijuma i kalcijuma. Grupu B čine metali sa izraženim afinitetom prema ligandima koji sadrže azot ili sumpor (Tabela 1), sa kojima formiraju jake kovalentne komplekse iz kojih se teško izmeštaju. Zbog ovoga, elementi B grupe su relativno nepokretni i imaju tendenciju akumulacije u biološkim sistemima usled ireverzibilnog vezivanja za ove atome. Graničnu grupu čine metali koji formiraju

stabilne komplekse sa svim kategorijama liganada, s tim da u slučaju metala sa više oksidacionih stanja, različite jonske forme istog elementa mogu imati različit afinitet prema istom ligandu i svrstavati se u različite grupe. Prema ovoj podeli, bakar u  $\text{Cu}^+$  oksidacionom stanju pripada B grupi, dok kao  $\text{Cu}^{2+}$  poseduje karakteristike granične grupe. Osim toga, iako je redoks inertan element, pozicija kadmijuma u odnosu na graničnu i B grupu često nije jasno definisana. S obzirom na to da  $\text{H}^+$  prema Luisovoj klasifikaciji takođe predstavlja kiselinu, uloga pH u vezivanju metala za određeni ligand u biološkom sistemu je jako bitna jer međusobno mogu kompetirati za ista vezujuća mesta (Nieboer & Richardson, 1980; Duffus, 2002).

**Tabela 1.** Ligandi u biološkim sistemima. Simbol R predstavlja alkil-radikal poput  $\text{CH}_3$ - i  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ -.  $\text{RNH}_2$  može predstavljati amin poput  $\text{CH}_3\text{NH}_2$ . U nekim slučajevima R može simbolizovati aromatični deo poput fenilnog prstena (modifikovano prema Nieboer & Richardson, 1980).

Ligandi za koje se pretežno vezuju katjoni grupe A	Ligandi za koje se pretežno vezuju katjoni grupe B	Drugi značajni ligandi
$\text{F}^-$ , $\text{O}_2^-$ , $\text{OH}^-$ , $\text{H}_2\text{O}$ , $\text{CO}_3^{2-}$ , $\text{SO}_4^{2-}$ , $\text{ROSO}_3^-$ , $\text{NO}_3^-$	$\text{H}^+$ , $\text{I}^-$ , $\text{R}^-$ , $\text{CN}^-$ , $\text{CO}$ , $\text{S}^{2-}$ , $\text{RS}^-$ , $\text{R}_2\text{S}$ , $\text{R}_3\text{As}$	$\text{Cl}^-$ , $\text{Br}^-$ , $\text{N}_3^-$ , $\text{NO}_2^-$ , $\text{SO}_3^{2-}$ , $\text{NH}_3$ , $\text{N}_2$ , $\text{RNH}_2$
$\text{HPO}_4^{2-}$ , $-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}^-$		$\text{R}_2\text{NH}$ , $\text{R}_3\text{N}$ , $=\text{N}-$ , $-\text{CO}-\text{N}-\text{R}$
$\text{ROH}$ , $\text{RCO}$ , $-\text{C}-$ , $\text{ROR}$		$\text{O}_2$ , $\text{O}_2^-$ , $\text{O}_2^{2-}$

Metali čiji toksični efekti su najčešće razmatrani u studijama zaštite životne sredine su mikroelementi koji se nalaze u graničnoj i grupi B. Katjoni svrstani u grupu B nisu normalno prisutni u živim bićima i njihov toksični efekat je izraženiji u odnosu na one koji imaju karakter granične grupe. S druge strane, neki od mikroelemenata granične grupe, predstavljaju esencijalne mikroelemente u biljnoj fiziologiji, gde učestvuju kao kofaktori ili aktivatori enzima, učestvuju u redoks reakcijama i prenosu elektrona ili imaju strukturne uloge u metabolizmu nukleinskih kiselina (Stanković *et al.*, 2018).

### 1.2.2. Hemijske karakteristike bakra, cinka i kadmijuma i uloga kod biljaka

Bakar i cink spadaju u esencijalne mikroelemente biljaka, te deficit ali i povećane koncentracije ovih metala utiču na fiziološke procese i mogu značajno inhibirati rastenje i razviće biljaka. Kadmijum se, s druge strane, smatra neesencijalnim elementom za biljke i pri povišenim koncentracijama može biti toksičan usled nefunkcionalnog vezivanja za biološke ligande drugih esencijalnih dvovalentnih metala (Yruela, 2005; Küpper & Andresen, 2016).

Bakar predstavlja tranzicioni metal, koji ima ulogu kofaktora brojnih enzima uključenih u respiraciju, fotosintezu, recepciju etilena, detoksifikaciju slobodnih radikala, metabolizam reaktivnih kiseoničnih vrsta, kao i u remodelovanje ćelijskog zida biljaka. Funkcija bakra u ovim procesima zasniva se na činjenici da u fiziološkim uslovima može postojati u dva oksidaciona stanja, oksidovanom,  $\text{Cu}^{2+}$  i redukovanom,  $\text{Cu}^+$ , koja su međusobno izmenjiva. Zbog ovoga, bakar se u biohemijskim reakcijama može ponašati kao redukujući ili oksidujućii agens, omogućavajući enzimima koji ga sadrže da učestvuju u prenosu elektrona ili katalizovanju redoks reakcija u kojima učestvuje kiseonik (Burkhead *et al.*, 2009; Migocka, 2015; Andresen *et al.*, 2018). Koncentracija bakra u biljkama najčešće varira od 1-20  $\mu\text{g/g}$  suve mase, u zavisnosti od uslova rastenja, faze

razvića i biljne vrste, pri čemu, zbog svoje reaktivnosti, gotovo da nema slobodnih jona ovog metala u citosolu ćelija, već se oni nalaze u kompleksima sa bakar-vezujućim proteinima/šaperonima, koji sprečavaju neselektivne štetne reakcije i u kompleksima sa enzimima čiju aktivnost regulišu (Hänsch & Mendel, 2009). Bakar kod svih biljaka, uključujući mahovine, učestvuje u fotosintezi kao sastavni deo plastocijanina koji omogućava fotosintetički transport elektrona između citohroma *f* (citohrom *b6f* kompleksa) i reakcionog centra fotosistema I (PSI) (Kirkby, 2005; Andresen *et al.*, 2018). Osim toga, bakar omogućava detoksifikaciju reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. reactive oxygen species, ROS) koje nastaju u toku fotosinteze i disanja, jer se nalazi u aktivnom centru Cu/Zn-superoksid dismutaza (Cu/Zn-SOD), čija se ekspresija kod biljaka povećava svaki put kada se poveća produkcija ROS (Andresen *et al.*, 2018). Većina drugih enzima koji sadrže bakar, poput citohrom oksidaze (COX), terminalnog akceptora elektrona u respiratornom lancu, reaguju sa kiseonikom redukujući ga do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Osim nje, bakar omogućava aktivnost brojnih oksidaza biljaka (askorbat oksidaza, amino oksidaza, polifenol oksidaza) koje su uključene u rast ćelija i remodelovanje ćelijskog zida, kao i u metabolizam fenolnih supstanci (Kirkby, 2005; Burkhead *et al.*, 2009; Hänsch & Mendel, 2009). Polifenol oksidaze predstavljaju bakar-vezujuće enzime koji vrše oksidaciju polifenolnih supstanci biljaka u odgovarajuće kinone, u prisustvu molekulskog kiseonika i u zavisnosti od supstrata dele se na *o*-difenol oksidaze (PPO), lakaze (LAC) i tirozinaze (TYR). Prve dve grupe oksidaza su široko rasprostranjenje kod biljaka, uključujući mahovine, dok su tirozinaze detektovane kod malog broja vrsta biljaka (Richter *et al.*, 2012). Osim ovih funkcija, uloga bakra kod biljaka ogleda se i u izgradnji receptora za etilen (Kirkby, 2005; Burkhead *et al.*, 2009; Hänsch & Mendel, 2009). Nedostatak bakra manifestuje se najpre u mladim listovima kroz pojavu hloroza, a kasnije se na nivou cele biljke uočava zakržljalogost i pojava bledezelenih listova koji lako venu (Hänsch & Mendel, 2009).

Imajući u vidu redoks-aktivnu prirodu bakra, pri koncentracijama višim od fiziološki optimalnih, Cu<sup>+</sup> i Cu<sup>2+</sup> mogu katalizovati stvaranje visoko toksičnih hidrosil radikala i posledično dovesti do oštećenja makromolekula u ćelijama. Osim toga, kao metal granične grupe, bakar je jako reaktivan sa tiolima, koje može oksidovati ili dovesti do izmeštanja drugih esencijalnih metala u proteinima, narušavajući njihovu strukturu (Burkhead *et al.*, 2009; Hänsch & Mendel, 2009; Migocka, 2015). Visoke koncentracije bakra kod biljaka ometaju važne fiziološke procese, kao što su fotosinteza i respiracija, uzrokuju pojavu hloroza i nekroza i dovode do inhibicije rasta i razvića na nivou celog organizma (Yruela, 2005). Zbog ovoga, održavanje precizne homeostaze bakra je esencijalno za opstanak i ispravno funkcionisanje biljnih ćelija (Burkhead *et al.*, 2009; Hänsch & Mendel, 2009; Migocka, 2015).

Cink je nakon gvožđa drugi po zastupljenosti tranzicioni metal u organizmima. Biljke usvajaju cink u Zn<sup>2+</sup> formi, koja predstavlja jedino biološki značajno oksidaciono stanje cinka, zbog koga je cink redoks inertan metal (Kirkby, 2005; Andresen *et al.*, 2018). Ovaj katjon se često smatra nisko toksičnim za biljke, posebno zbog odsustva redoks aktivnosti i činjenice da njegove koncentracije u ćelijama variraju u opsegu od visokih mikromolarnih do milimolarnih. Međutim, ukoliko se slobodni joni Zn<sup>2+</sup> nađu u jako niskim mikromolarnim koncentracijama u ćeliji, mogu imati letalan efekat, zbog čega je precizna kontrola prometa cinka jako bitna (Blindauer & Schmid, 2010). Cink se kod biljaka najčešće nalazi u opsegu koncentracija od 15 do 50 µg/g suve mase (Hänsch & Mendel, 2009). Ovaj metal je jaka Luisova kiselina, koja je među mikroelementima slabija jedino od katjona bakra, te kao takva ima veliki afinitet i prema slabim bazama kao što su sulfidni ligandi, i prema jakim bazama, poput amino, karboksilatnih i hidrosilnih liganada. Koordinaciona geometrija jona cinka je znatno fleksibilnija od većine drugih tranzicionih katjona, zbog čega cink često katalizuje reakcije u toku kojih ligandi mogu zauzimati različite koordinacione forme oko ovog katjona, bez potrebe za njihovim izmenjivanjem. Pošto je cink jedini među tranzicionim metalima koji lako stupa u tetraedarnu koordinacionu geometriju, specifičnost određenih liganada prema njemu može biti dodatno povećana, kao u slučaju Zn-domena. U poređenju sa drugim mikroelementima, cink znatno brže vrši izmenu liganada, što mu omogućava da funkcioniše kao efikasan signalni jon ili signalni modulator. S druge strane, imajući u vidu

činjenicu da se vezuje sa velikim afinitetom i da je redoks-inertan, u ćelijama često ima strukturnu ulogu u proteinima ili protein-protein interakcijama (Krämer & Clemens, 2005).

Smatra se da preko 1200 proteina biljaka sadrži, vezuje ili transportuje cink, pri čemu veliki broj ovih proteina su transkripcioni faktori i proteini sa Zn-domenima (eng. Zn-finger), koji regulišu DNK transkripciju, obradu RNK i translaciju. U cink zavisne proteine spadaju sve DNK- i RNK-polimeraze, histon deacetilaze, faktori koji učestvuju u splajsovanju i enzimi za editovanje RNK u mitohondrijama i hloroplastima (Hänsch & Mendel, 2009). Među najznačajnije cink-zavisne enzime viših biljaka spadaju karboanhidraze (CA), koje učestvuju u interkonverziji  $\text{CO}_2$  u  $\text{HCO}_3^-$  omogućavajući njegovu fiksaciju od strane ribulozo-1,5-bisfosfatne karboksilaze-oksigenaze (RuBisCo). Postoje tri evolutivno različite familije ovih enzima kod biljaka -  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ , pri čemu je  $\alpha$ CA lokalizovana u stromi hloroplasta, najzastupljenija kod C3 biljaka, gde se veruje da spadaju i mahovine. Iako se strukturno razlikuju, zajednička osobina sve tri grupe ovih enzima je da poseduju cink u aktivnom mestu (DiMario *et al.*, 2017; Andresen *et al.*, 2018). Drugu značajnu grupu enzima za koje je cink esencijalan u katalitičkom centru su fosfataze, koje su ključne za usvajanje i ishranu biljaka fosforom (Andresen *et al.*, 2018). Fosfataze katalizuju hidrolizu fosfatnih estara oslobađajući neorganski fosfor. Neki od ovih enzima prisutni su intracelularno, u vakuolama, a neki se sintetišu i sekretuju van ćelije, na površinu ćelijske membrane, gde omogućavaju usvajanje fosfora iz organskih izvora u uslovima povećane potrebe za fosforom ili njegove smanjene dostupnosti. Pokazano je da 12 ispitanih vrsta mahovina poseduju fosfomoneoesteraze koje se mogu eksprimirati na površini mahovine, dok su fosfodiesteraze bile specifične za određene vrste i uslove (Turner *et al.*, 2001; Whitton *et al.*, 2005).

Cink ima značajnu ulogu u održavanju integriteta ćelijskih membrana, jer vrši stabilizaciju njihove strukture vezivanjem za -SH grupe i neophodan je za sintezu masnih kiselina lipida membrana. Osim toga, učestvuje i u zaštiti lipida i proteina od oksidacije uzrokovane superoksid radikalima, jer predstavlja strukturnu komponentu SOD enzima, koja mu omogućava aktivnost u širokom opsegu pH, i doprinosi dodatnom određivanju specifičnosti prema supstratu (Kirkby, 2005; Andresen *et al.*, 2018).

Kadmijum je metal čiji jon je hemijski sličan esencijalnim dvovalentnim katjonima i stoga može kompetirati sa njima za unos u biljke istim mehanizmima koje koriste mikro- i makroelementi. S druge strane, kod većine biljaka homeostatski mehanizmi nisu u stanju da saniraju povećane koncentracije jona ovih metala, što dovodi do ispoljavanja njihovih toksičnih efekata (Krämer & Clemens, 2005). Kadmijum pripada IIb grupi elemenata periodnog sistema i u vodenim rastvorima ima stabilno oksidaciono stanje  $\text{Cd}^{2+}$ , koje ujedno predstavlja i biodostupnu formu ovog metala. Spada u jako retke elemente i njegova koncentracija u litosferi je oko 0,1 mg/kg gde se najčešće nalazi u vidu sulfida i sulfosoli, pošto je jako tiofilan element. Sklonost ovog metala da formira hloro-komplekse u slanim sredinama čini ga manje dostupnim za rastvaranje što objašnjava smanjenu akumulaciju kadmijuma u sredinama kao što su estuari (Hasanuzzaman & Fujita, 2013). S druge strane, adsorpcija kadmijuma od strane supstrata smanjuje se sa snižavanjem pH vrednosti koje dovodi do veće količine slobodnog kadmijuma, a posledično i do pojačanog usvajanja od strane biljaka (Bolan *et al.*, 2005).

Kadmijum poseduje popunjenu d-elektronsku ljusku i hemizam sličan cinku u pogledu fleksibilnosti u koordinaciji sa ligandima, pri čemu kadmijum ima malo veću dužinu veza gradeći potencijalno veći broj koordinantnih kompleksa u odnosu na cink. S druge strane, kao i cink, kadmijum je redoks inertan katjon. Kao slabija Luisova kiselina u odnosu na cink, formira komplekse manje stabilnosti sa ligandima koji sadrže kiseonik i azot, pokazujući veći afinitet prema ligandima koji sadrže sumpor. Izražena tiofilnost kadmijuma predstavlja možda i najvažniju njegovu karakteristiku za analizu intracelularnih efekata koje ostvaruje, jer je unutrašnjost ćelije znatno bogatija sumpornim donorima u odnosu na ekstracelularnu sredinu. Zbog ovoga, kadmijum se u unutrašnjosti ćelije vezuje znatno jače nego cink, pri čemu je povećani afinitet naročito izražen u koordinacionim sferama sa višestrukim cisteinskim ligandima koje su karakteristične za metal-vezujuće proteine kao što su metalotioneini (MT). U kompleksima u kojima se koordinacija



ostvaruje isključivo preko sumpornih donora koncentracija kadmijuma neophodna za efektivnu kompeticiju sa cinkom je čak hiljadu puta manja u odnosu na koncentraciju cinka. Osim kompeticije sa cinkom, u slučaju liganada gde su prisutni kiseonik i azot kao atomi donori elektrona, kadmijum se vezuje 6-9 puta jače u odnosu na magnezijum i kalcijum, te uspešno kompetira za vezivna mesta ovih elemenata u ćeliji čak i pri znatno nižim koncentracijama od njihovih. Međutim, kompeticija kalcijuma i kadmijuma u biološkim sistemima najčešće nije izražena zbog velikog afiniteta kadmijuma za sulfatne ligande, za koje se kalcijum ne vezuje, što dovodi do „ublažavanja“ efekata u kompeticiji za kalcijum-vezujuće ligande. Kadmijum je neesencijalni element, te u biološkim sistemima ne postoji poseban sistem koji je uključen u održavanje njegove homeostaze, već može interagovati sa molekulima koji su uključeni u kontrolu esencijalnih tranzicionih metala. S obzirom na to da su sumporni donori poreklom od tiola uključeni u regulisanje intracelularne koncentracije cinka, imajući u vidu tiofilnost kadmijuma, pri istim koncentracijama količine slobodnog kadmijuma u citoplazmi su očekivano znatno manje u odnosu na cink (Maret & Moulis, 2013).

Kako bi se u potpunosti ispitala toksičnost nekog metala po dati organizam neophodno je izučiti njegovu toksikodinamiku (tipovi negativnih efekata, kada i gde se ispoljavaju) i njegovu toksikokinetiku (koji su mehanizmi usvajanja, distribucije, metabolizma i izlučivanja metala od strane datog biološkog sistema) (Wolterbeek & Verburg, 2001).

### **1.3. Bioakumulacioni kapacitet mahovina za metale**

Metali do mahovina mogu dospeti rastvoreni u vidu katjona u vodi koja okružuje biljku ili u vidu suvih čestica, koje su zadržane zahvaljujući različitim morfološkim strukturama i udubljenjima na površini biljke, te fizičko-hemijskim silama. Suve čestice u prisustvu vlage mogu biti rastvorene i dalje imati istu sudbinu kao metali koji su se za mahovinu inicijalno vezali u formi katjona. U toku bioakumulacije mogu se razdvojiti tri faze - brzo pasivno vezivanje jona metala za spoljašnje površine ćelija procesom izmene jona, faza mirovanja u kojoj je došlo do zasićenja vanćelijskih vezujućih mesta, i finalno, faza u kojoj dolazi do postepenog sporog linearnog povećanja ukupne koncentracije metala u biljci, koja reflektuje unutarćelijsko usvajanje katjona (Tessier & Boisvert, 1999; Sun *et al.*, 2007). Kao posledica ovih procesa, ukupni sadržaj metala u mahovini u svakom trenutku može se podeliti na tri frakcije na osnovu lokalizacije elemenata - vanćelijsku (katjoni reverzibilno vezani za negativno naelektrisane grupe u ćelijskom zidu ili spoljašnjem sloju plazmaleme), međućelijsku (u matriksu oko ćelija ili u vidu depozita na njihovoj površini) i unutarćelijsku (u različitim kompartmentima protoplazme u rastvorljivoj ili nerastvorljivoj formi) (Brown & Brümelis, 1996; Vázquez *et al.*, 1999).

Vanćelijska akumulacija metala predstavlja prvi korak u usvajanju, koji se zasniva na interakciji između negativno naelektrisanih liganada prisutnih na površini ćelije i pozitivno naelektrisanih jona metala (Tessier & Boisvert, 1999). Ćelijski zidovi mahovina poseduju brojne slobodne funkcionalne grupe koje se u hemijskom smislu ponašaju kao slabe Luisove baze i kao takve, u jonizovanom stanju, imaju negativno naelektrisanje. U kontaktu sa ovim grupama, joni metala lako istiskuju protone i mogu biti zadržani na njihovom mestu gradeći ligand-metal komplekse. Već vezani katjoni, takođe mogu biti izmešteni ukoliko se ćelija nađe u okruženju sa katjonima većeg afiniteta prema istom vezujućem mestu, zbog čega se ova mesta nazivaju katjon-izmenjivačka (Tyagi *et al.*, 2007). Da bi do izmene jona došlo, neophodno je da se mahovine nađu u vlažnom okruženju gde su elementi u svom jonskom obliku. U ovakvim uslovima, proces vezivanja katjona je jako brz i do potpune saturacije katjon-izmenjivačkih mesta može doći za svega nekoliko minuta (González & Pokrovsky, 2014). Ovaj proces je isključivo fizičko-hemijske prirode i nije metabolički regulisan (Tessier & Boisvert, 1999).

Količina vezanog metala u vanćelijskoj frakciji zavisice od njegove koncentracije u sredini, forme u kojoj se nalazi, afiniteta za vezujuća mesta, ukupnog broja vezujućih mesta, postojeće koncentracije u mahovini, trajanja izloženosti metalu, kao i od pH okruženja (Tessier & Boisvert, 1999; Aničić *et al.*, 2009; González & Pokrovsky, 2014). Afinitet za vezivanje određen je prirodom



elemenata koji kompetiraju za izmenjivačko mesto (u rastvoru, ali i već vezanih) i prirodom vezujućih mesta koja predstavljaju specifičnost vrste, a zavise i od faze razvića, starosti datog segmenta i uslova u kojima se biljka razvija. Metal prisutan u maloj koncentraciji u okruženju, ali sa većim afinitetom za određeno vezujuće mesto će češće biti fiksiran nego jon manjeg afiniteta, a veće koncentracije. Generalno, monovalentni katjoni imaju manji kapacitet za vezivanje za ligande u odnosu na dvovalentne. S druge strane, dvovalentni katjoni tranzicionih metala će najstabilnije veze formirati sa ligandima koji sadrže sumpor ili azot, dok će manje stabilni biti kompleksi formirani sa kiseonikom kao donatorom (Nieboer & Richardson, 1980; Brown & Bates, 1990; Tessier & Boisvert, 1999). Osim kompeticije sa drugim jonima metala, i pH sredine iz koje mahovina usvaja katjone utiče na efikasnost vezivanja katjona usled kompeticije protona i katjona za ista vezujuća mesta. Generalno, maksimalni kapacitet usvajanja jona kao što su  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  i  $\text{Cd}^{2+}$  kod mahovina postiže se pri pH=5 (Martins *et al.*, 2004).

Mahovine karakteriše jedan od najviših adsorpcionih kapaciteta za metale među biološkim sorbentima, pri čemu sposobnost vanćelijskog vezivanja katjona često određuje i sposobnost ukupne akumulacije nekog metala (Brown & Bates, 1990; Lobachevska *et al.*, 2019). Ukupan broj mesta za izmenjivanje katjona na površini ćelije predstavlja katjon-izmenjivački kapacitet (eng. cation exchange capacity, CEC) i definiše se kao maksimalni broj (molova) bazičnih katjona po gramu suve mase koje dato tkivo ima sposobnost da veže, izmenjujući protone, pod uslovom da su na početku procesa vezivanja sva izmenjivačka mesta bila okupirana isključivo protonima (Soudzilovskaia *et al.*, 2010). Broj izmenjivačkih mesta mahovine je species-specifičan, ali kao i u slučaju prirode liganada, određen je i starošću tkiva, razvojnom fazom i uslovima rasta (Brown & Bates, 1990; Wells *et al.*, 1995).

U istraživanju adsorpcionih svojstava mahovina rodova *Hypnum* i *Sphagnum*, kao i vrsta *Pseudoscleropodium purum* (Hedw.) M. Fleisch i *Brachytecium rutabulum* (Hedw.) Schimp. u odnosu na metale granične i B grupe, González & Pokrovsky (2014) su zaključili da dominantne grupe uključene u vezivanje metala pri visokim koncentracijama u okruženju predstavljaju karboksilna i fosforil grupa, dok pri manjim koncentracijama i ekstremnim uslovima pH, amino i sulfhidrilne grupe mogu biti presudne za vezivanje. Prema nekim autorima, karboksilne grupe poliuronskih kiselina (pretežno galakturonske) i hidrosilne grupe hemiceluloze i celuloze (u manjoj meri) čine 70-90% CEC mahovina. Preostala jono-izmenjivačka mesta (10-30%), koja su uključena u vezivanje metala nalaze se u proteinskoj frakciji ćelijskog zida i spoljašnjeg sloja plazmaleme u vidu grupa koje sadrže kiseonik, azot i sumpor (hidrosilna, amino i sulfhidrilna) (Lobachevska *et al.*, 2019). Osim toga, fenolne komponente ćelijskog zida mogu značajno uticati na CEC i prema nekim istraživanjima čine 25% ukupnog katjon-izmenjivačkog kapaciteta (Tipping *et al.*, 2008; Aničić *et al.*, 2009). Dominantno prisustvo fosforilnih i karboksilnih grupa u ćelijskim zidovima mahovina i afinitet metala granične i B grupe prema njima, može biti razlog zbog čega su obrasci adsorpcije istih metala kod različitih mahovina često isti ili jako slični, imajući u vidu čisto fizičko-hemijsku prirodu vezivanja u ovoj frakciji (Nieboer & Richardson, 1980; Vázquez *et al.* 1999; González & Pokrovsky, 2014; Varela *et al.*, 2015). S druge strane, izmenjeni uslovi gajenja jedne vrste mogu dovesti do promene u ukupnom afinitetu za istu tip katjona usled izmene odnosa i broja vezujućih mesta određenog tipa (Wells & Brown, 1987).

Nakon vezivanja za katjon-izmenjivačka mesta i postizanja saturacije, dalja akumulacija metala od strane mahovine moguća je zahvaljujući unutarćelijskom transportu ovih katjona. Ovaj proces je znatno sporiji, akumulacija se dešava približno linearno i zahteva prisustvo specifičnih transportera kojima je potrebna energija poreklom od ATP-a za transport katjona (Brown & Bates, 1990; Tessier & Boisvert, 1999). Ovi transporteri prisutni su na plazmalemi i membranama različitih organela unutar ćelije, gde omogućavaju promet esencijalnih elemenata i održavanje njihove homeostaze. Međutim, nisu svi potpuno specifični za jednu vrstu metala, te katjoni sličnih hemijskih osobina mogu koristiti iste transportne puteve, što omogućava prolazak i neesencijalnim metalima u unutarćelijske prostore. Intracelularni transport metala može koristiti energiju koja je direktno nastala hidrolizom ATP-a (primarni aktivni transport) ili energiju koju transporter dobija

simportom ili antiportom protona niz elektrohemijski gradijent (sekundarni aktivni transport), koji omogućava hidrolizu ATP-a, H<sup>+</sup>-ATP-azama i stvaranja protonske motorne sile. U retkim slučajevima katjoni mogu ući u ćeliju niz elektrohemijski gradijent, međutim, i ovaj transport je kontrolisan specifičnim proteinima prenosiocima.

Pokazano je da kao i u slučaju vanćelijske akumulacije, i unutarćelijski transport ispoljava saturacionu kinetiku, koja zavisi od afiniteta metala prema specifičnim nosačima i prirode jona, ali i permeabilnosti plazmaleme, koja se može drastično menjati u prisustvu toksičnih koncentracija katjona (Brown & Bates, 1990; Tessier & Boisvert, 1999; Fernández *et al.*, 2006; Basile *et al.*, 2012). Osim toga, različiti kapacitet među vrstama može biti posledica većeg kapaciteta za neutralizaciju metala (vakuolizacijom ili formiranjem unutarćelijskih kompleksa). U istraživanju Vázquez *et al.* (1999), kod *Fontinalis antipyretica* Hedw. i *F. polyphyllus* Wils. kapacitet unutarćelijskog usvajanja individualnih metala pratio je isti obrazac, ukazujući na to da je pretežno kontrolisan afinitetom transmembranskih molekula prema katjonima. U slučaju esencijalnih metala, ovaj afinitet je u skladu sa fiziološkim potrebama biljaka za konkretne metale (Vázquez *et al.*, 1999). U istraživanju koje su sprovedi Basile *et al.* (2012) na *Scorpiurum circinatum* (Brid.) Fleisch. & Loeske pokazano je da intracelularne koncentracije mikroelemenata sa esencijalnom ulogom, poput Zn i Cu, ostaju relativno nepromenjene bez obzira na ekstraćelijsku koncentraciju, dok je akumulacija elemenata poput olova i kadmijuma, koji nemaju metaboličku ulogu u mahovinama, rasla proporcionalno primenjenoj koncentraciji metala. Slične rezultate dobili su i Fernández *et al.* (2013) u ispitivanju veze između primenjene koncentracije kadmijuma i unutarćelijske koncentracije kod *P. purum*. Elementi koji su lokalizovani unutar ćelija imaju neposredan uticaj na metabolizam, te iako njihov sadržaj unutar ćelije može biti svega 5% njihovog ukupnog sadržaja, ova frakcija može imati presudan uticaj na fiziologiju i vitalnost celog organizma (Basile *et al.*, 2012). Zbog toga, u slučaju esencijalnih metala, postojeće intracelularne koncentracije mogu uticati na to da li će do transporta u ćeliju doći ili ne, usled postojanja homeostatskih mehanizama koji kontrolišu njihovu unutarćelijsku koncentraciju. S druge strane, elementi koji nisu uključeni u normalne fiziološke procese, poput kadmijuma, mogu se transportovati u unutrašnjost ćelija putem nespecifičnih transportera i usled odsustva homeostatskih mehanizma akumulirati u toksičnim količinama unutar ćelije jako brzo (Brown & Bates, 1990; Andresen *et al.*, 2018).

### 1.3.1. Faktori koji utiču na adsorpciju i distribuciju metala unutar mahovina

Brojni fizički, hemijski, biološki faktori mogu uticati na sposobnost određene mahovine da akumulira specifični metal, kao i na distribuciju ovog elementa unutar biljke (Salemaa *et al.*, 2004; Sassmann *et al.*, 2015a). Osim količine i vrste metala, na usvajanje utiče i njegova biodostupnost i mobilnost u supstratu, koji su u vezi sa hemijskim sastavom (pre svega pH) i količinom organske materije i makroelemenata u podlozi (Kłos *et al.*, 2012). Osnovni biološki faktori koji utiču na akumulaciju obuhvataju rasteње (stopa rasta, starost i faza razvika biljke), sinergističke ili antagonističke efekte elemenata i njihov biološki poluzivot, morfološke karakteristike vrste (odnos površina/zapremina, prisustvo morfoloških struktura koje utiču na zadržavanje vode i rastvorenih minerala, hidrofilnost površinskih slojeva biljke, oblik filoida, forma rasta i životna forma) i katjon-izmenjivački kapacitet (Tessier & Boisvert, 1999; Zechmeister *et al.*, 2003; Castello, 2007; Sun *et al.*, 2007; Carballeira *et al.*, 2008; González & Pokrovsky, 2014; Varela *et al.*, 2015).

Ukupan sadržaj metala u mahovinama predstavlja rezultat balansa između adsorpcije i desorpcije elementa, pri čemu vreme ekspozicije ovim elementima može uticati na svaki od ovih procesa. Predugačak period može dovesti do saturacije svih vezujućih mesta ili dovesti do desorpcije (Aničić *et al.*, 2009). U prirodnim uslovima do desorpcije može doći usled ispiranja čestica zarobljenih na površini biljke kišom, curenja jona usled precipitacije niske pH, izmenjivanja određenih katjona katjonima većeg afiniteta, oštećenja ćelija usled starosti ili stresa izazvanog sredinskim faktorima, kao i usled gubitka ostarelih delova (Čeburnis & Valiulis, 1999; Couto *et al.*, 2004; Castello, 2007; Aničić *et al.*, 2009). U nekim istraživanjima, pokazano je i da vrste koje imaju veći adsorpcioni kapacitet istovremeno imaju manji desorpcioni kapacitet (Sun *et al.*, 2007). Studije na većem broju mahovina i metala pokazale su da u slučaju svake od vrsta postoji koncentracioni

limit za akumulaciju metala, koji je species-specifičan i zavisi od tipa metala (Basile *et al.* 2012; González & Pokrovsky, 2014; Sassmann *et al.*, 2015b). Manja koncentracija fiziološki aktivnog elementa u odnosu na metale bez poznate fiziološke uloge u mahovinama smatra se posledicom homeostatskih mehanizama koji kontrolišu njegov sadržaj u okviru granica potrebnih za optimalno funkcionisanje biljke (González & Pokrovsky, 2014; Sassmann *et al.*, 2015a). Ovi mehanizmi sprečavaju akumulaciju metala u slobodnoj reaktivnoj formi u ćelijama i obezbeđuju adekvatno snabdevanje metaloproteina odgovarajućim esencijalnim mikroelementima (Yruela, 2005). Manja akumulacija jednog esencijalnog metala u odnosu na drugi može biti rezultat njegove veće toksičnosti u uslovima povećane koncentracije, manje dostupnosti za usvajanje u datom supstratu, ili većeg afiniteta prema vezujućim mestima u okviru iste vrste mahovine (González & Pokrovsky, 2014; Sassmann *et al.*, 2015b).

U istoj biljci, u odnosu na starost različitih delova, obrasci ukupnog sadržaja metala mogu se značajno razlikovati. Osim toga, raspodela svakog individualnog metala između unutarćelijske i vanćelijske frakcije može se razlikovati u individualnim segmentima (Brown & Brūmelis, 1996). U istraživanju Vázquez *et al.* (1999) kod dve vrste vodenih mahovina, pokazano je da na relativnu raspodelu između unutarćelijske i spoljašnje frakcije metala prevashodno utiče vrsta mahovine, a manje tip katjona kome je izložena. S druge strane, maksimalna koncentracija jednog katjona koju je moguće dostići u vanćelijskoj frakciji bila je slična među vrstama, ali različita za svaki pojedinačni katjon - najveća za  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Cd}^{2+}$  a najmanja za  $\text{Zn}^{2+}$ .

Intenzitet rasteња biljke značajno utiče na akumulaciju metala u različitim segmentima. Odnos ćelijskog zida i citoplazme veći je kod mladih ćelija zbog čega one imaju veću specifičnu površinu za apsorpciju. Dodatno, procesi aktivne apsorpcije katjona efikasniji su i brži u mlađim ćelijama (Boquete *et al.*, 2014a). S druge strane, mlađi segmenti gametofora su kraće vreme izloženi dejstvu metala i zbog velike brzine stvaranja novih ćelija karakteriše ih takozvani efekat razblaživanja – koncentracija metala kojima su izloženi opada sa udaljenošću od vršnih delova biljke (Tessier & Boisvert, 1999; Castello, 2007). Stariji delovi biljke, s druge strane, poseduju veći CEC, jer ćelije u njima zbog sazrevanja imaju smanjen stepen metilacije galakturonskih kiselina ćelijskog zida, te time i veći broj katjon-vezujućih mesta (Boquete *et al.*, 2014a). Zbog ovih osobina, različit udeo starih i mladih ćelija u mahovini može rezultovati u značajno različitim obrascima akumulacije bakra, cinka i kadmijuma u različitim delovima iste mahovine (Boquete *et al.*, 2014a). Vršni delovi mahovina koji aktivno rastu često sadrže najveće količine citoplazmatskih elementa kao što je kalijum, dok se sadržaj elemenata koji se vezuju za ćelijske zidove, poput kalcijuma ili metala granične i B grupe, može povećavati sa starošću tkiva (Brown & Bates, 1990). S druge strane, Boquete *et al.* (2014a) su pokazali da u slučaju kadmijuma, bakra i cinka kod mahovine *P. purum* ne postoji preferencija za akumulaciju u starijim delovima, već da je akumulacija u različitim delovima biljke odraz fizičko-hemijskih karakteristika metala i karakteristika samog tkiva (Boquete *et al.*, 2014a).

Uprkos tradicionalnom pogledu da endohidrične vrste nutrijente dominantno usvajaju iz atmosferskih depozicija i da je zbog nerazvijenog unutrašnjeg provodnog sistema kretanje minerala od baze ka vrhu izdanka ograničeno, pokazano je da se nakon ograničenog perioda izlaganja baze izvoru metala, povišene koncentracije ovih elemenata mogu detektovati i u novoformiranim apikalim segmentima mahovina, intra- i ekstracelularno, čak i nakon prestanka izlaganja (Brown & Bates, 1990; Brown & Brūmelis, 1996; Brūmelis & Brown, 1997; Kłos *et al.*, 2012). U studiji Brūmelis & Brown (1997), efikasnost i proporcija transportovanih jona ka vrhovima gametofora *Hylocomium splendens* (Hedw.) Schimp. bila je najveća u slučaju  $\text{K}^+$ , praćena  $\text{Mg}^{2+}$  i  $\text{Ca}^{2+}$ , dok je  $\text{Zn}^{2+}$  u najmanjoj meri transportovan ka vrhu, odražavajući obrnut odnos afiniteta za vezivanje ovih metala u ćelijskom zidu i efikasnosti prenosa istih katjona od baze ka vrhu biljke. U toku procesa usvajanja i translokacije kroz biljku, metali se u značajnoj meri vezuju za ćelijske zidove. Kod vaskularnih biljaka, transport metala duž izdanaka vrši se ksilemom, pri čemu je translokacija moguća zahvaljujući transpiracionom toku, osim u slučaju mladih biljaka gde korenov pritisak ima značajnu ulogu. Translokacija je u slučaju nekih katjona potpomognuta izmenom katjona na

negativno naelektrisanim ćelijskim zidovima. Međutim, ovo dovodi do odvajanja metala od transpiracionog toka i potencijalno narušavanja kretanja metala u vršne delove izdanka. Iz ksilema je takođe moguća transferzalna translokacija u susedne ćelije izdanka. Transport katjona kroz ksilem vaskularnih biljaka se bar delimično vrši u formi kompleksa, pri čemu cink najčešće gradi komplekse sa organskim kiselinama, bakar formira komplekse sa amino kiselinama, dok kadmijum može biti transportovan kao dvovalentni jon (Greger, 1999). Moguće je da kod endohidričnih vrsta mahovina sa dobro razvijenim hidroidama, mehanizmi translokacije prate slične principe.

Kompletno upoznavanje usvajanja, transporta, lokalizacije i specijacije metala u mahovinama je ključno za razumevanje metaboličnih puteva metala, kao i fizioloških mehanizma toksičnosti i otpornosti ovih biljaka na mikroelemente (Vogel-Mikuš *et al.*, 2008, 2012). Kvalitativna karakterizacija distribucije metala moguća je upotrebom histoemijskih metoda ili autoradiografijom, međutim ove metode nude ograničenu prostornu rezoluciju. Metode za kvantitativnu karakterizaciju distribucije su znatno kompleksnije i najčešće obuhvataju mikroanalitičke tehnike koje se zasnivaju na emisiji X-zraka karakterističnih za date vrste metala, pobuđenih fotonima (mikro-XRF, sinhrotronsko zračenje) ili naelektrisanim česticama (protoni, elektroni ili čestice veće mase) (Ohnuki *et al.*, 2002; Vogel-Mikuš *et al.*, 2008).

#### 1.4. Uloga mahovina u monitoringu zagađenja životne sredine metalima

Usled nedostatka korenovog sistema i dobro razvijene kutikule, usvajanje vode, nutrijenata, ali i toksičnih supstanci kod većine mahovina odvija se celom površinom vegetativnog tela (Zechmeister *et al.*, 2007). Osim toga, mahovine imaju izraženu sposobnost za izmenu katjona i znatno veći broj negativno naelektrisanih grupa sposobnih da vežu metalne jone u poređenju sa drugim biološkim sistemima, što zajedno sa velikim odnosom površine i zapremine za rezultat ima veću efikasnost u akumulaciji metala u poređenju sa drugim organizmima (Little & Martin, 1974; Büscher *et al.*, 1990, González & Pokrovsky, 2014). Iako su ove osobine razlog njihove velike uspešnosti opstanka na staništima sa ograničenom količinom hranljivih materija, one mogu biti odgovorne i za veliku osetljivost nekih vrsta na atmosfersko zagađenje, jer se polutanti kod njih akumuliraju intenzivnije i ostavaruju direktniji toksični efekat nego u slučaju vaskularnih biljaka (Goffinet *et al.*, 2009; Zvereva & Kozlov 2011). Prelazak iz vodene u kopnenu sredinu je mahovinama, kao jednim od prvih kopnenih biljaka, nametnuo snažne selekzione pritiske koji su pored poikilohidričnosti doveli i do razvoja specifičnih mehanizama tolerancije i korišćenja nekih jona metala kojih je u terestrijalnim sistemima bilo znatno više. To je istovremeno uslovalo i razvoj mehanizama zaštite od povećanih koncentracija ovih elemenata na kopnu (Degola *et al.*, 2014). Zbog ovoga, brojni predstavnici današnjih mahovina su uspešni kolonizatori metalima jako zagađenih staništa i često ih akumuliraju u vrlo visokim koncentracijama bez vidljivih posledica po rastenje i razviće (Shaw, *et al.*, 1989; Sassmann *et al.*, 2010; Nomura & Hasezawa, 2011; Zvereva & Kozlov 2011). Uz to, smatra se da su neke vrste, poput *Mielichhoferia mielichhoferiana* (Funck.) Loeske, *Dryptodon atratus* (Mielichh.) Limpr., *Scopelophila ligulata* (Spruce) Spruce i *S. cataractae* (Mitt.) Broth. ograničene na rastenje na staništima koja su bogata metalima (Brooks, 1971; Shaw, 1987; Boquete *et al.*, 2021). Takve vrste se nazivaju obligatne metalofite. Za razliku od njih, postoje i fakultativne metalofite koje naseljavaju kako metaliferna, tako i staništa čija je podloga siromašna metalima.

Zbog ovih morfoloških i fizioloških karakteristika, kao i široke geografske rasprostranjenosti, mahovine se koriste kao značajni biološki sistemi za praćenje sredinskog zagađenja metalima još od 1968. godine (Zechmeister *et al.* 2003). Dodatno, mnoge vrste mahovina su fiziološki aktivne i u toku zime te je kontinuirano usvajanje metala iz okruženja moguće u toku cele godine (Petschinger *et al.*, 2021). U istraživanjima gde se mahovine koriste kao sistemi biomonitoringa, najčešće se koriste ektohidrične vrste poput *Pleurozium schreberi* (Willd. ex Brid.) Mitt., *H. splendens*, *H. cupressiforme* i *P. purum* dok su endohidrične vrste retke (Berg *et al.*, 1995; Berg & Steinnes, 1997; Zechmeister, 1998; Reimann *et al.*, 2006; Fernández *et al.*, 2009; Holy *et al.*, 2009; González-Miqueo *et al.*, 2010; Boquete *et al.*, 2014a; Urošević *et al.*, 2017). Smatra se da je kod ektohidričnih vrsta unos mineralnih materija uglavnom iz atmosfere, dok je uloga supstrata

zanemarljiva. Ipak, neki autori smatraju da je značajno usvajanje iz supstrata i unutrašnje provođenje metala zastupljeno i u slučaju ektohidričnih vrsta (Kłos *et al.*, 2012).

Informacije o vrsti i količini metala prisutnih u životnoj sredini mogu se dobiti merenjem i analizom sadržaja akumuliranih metala u mahovinama u toku nekog vremenskog perioda (Wolterbeek, 2002). S druge strane, analize sadržaja metala u mahovinama najčešće ne daju apsolutne vrednosti koncentracije elemenata emitovanih u sredinu u toku određenog vremenskog perioda, te je u cilju dobijanja što preciznijih informacija, neophodno što bolje okarakterisati vezu između koncentracija metala u sredini i onih detektovanih u mahovinama. Jedan od značajnih faktora koji može uticati na pouzdanost dobijenih rezultata je toksični efekat metala koji može usloviti izmenu metabolizma i aktivaciju mehanizama koji sprečavaju dalje usvajanje jona od strane biljke, narušavajući očekivanu korelaciju između očekivanih koncentracija u prirodi i u mahovini (Berg & Steinnes 1997; Boquete *et al.*, 2014a). Alternativno, informacije o tipu metala i stepenu zagađenja, kao i o njegovom uticaju na organizme u datoj sredini, moguće je dobiti praćenjem promena u mahovinama na biohemijskom, morfološkom i fiziološkom nivou, kao i promena u populacionoj dinamici i distribuciji uz prethodnu karakterizaciju veze doza-efekat (Wolterbeek, 2002; Zechmeister, 2007; Mahapatra *et al.*, 2019).

Iako upotreba mahovina u studijama zagađenja životne sredine metalima ima relativno dugu istoriju, manji je broj istraživanja čiji je fokus bio uticaj metala na različite parametre rasteanja i razvića samih mahovina, njihova distribucija u biljkama ili mehanizmi tolerancije na stres izazvan metalima (Shakya *et al.*, 2008; Varela *et al.*, 2013; Boquete *et al.*, 2014a; Sabovljević *et al.*, 2018a). Osim toga, mali je broj studija koje ispituju mehanizme usvajanja, akumulaciju i efekte metala na mahovine u akseničnim i potpuno kontrolisanim laboratorijskim uslovima, eliminišući potencijalne antagonističke ili sinergističke efekte drugih faktora prisutnih u spoljašnjoj sredini (Sassmann *et al.* 2015a, b; Ares *et al.*, 2018; Sabovljević *et al.*, 2018 a, b).

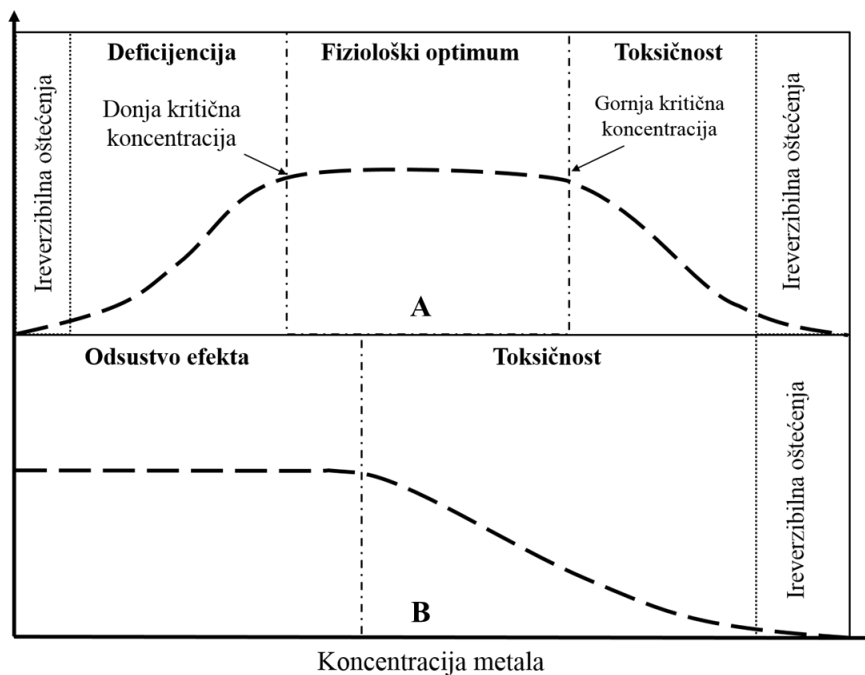
### **1.5. Toksični efekti metala kod biljaka**

Metali u tragovima prisutni kod biljaka, uključujući mahovine, mogu se podeliti na esencijalne i neesencijalne, u odnosu na značaj koji imaju za rasteanje i razviće date biljke. Esencijalni metali mogu ispoljiti štetan uticaj na razviće na dva načina, u slučaju deficijencije i u slučaju kada ih ima više od fiziološkog optimuma (Slika 12).

U nedostatku esencijalnog metala, biljke mogu imati usporen rast i smanjen prinos mase. Sa povećanjem dostupnosti i usvajanja esencijalnog metala intenzivira se i rast i razviće biljke do postizanja maksimalne vrednosti. Dalje povećanje koncentracije ne dovodi do novih efekata u određenom opsegu iznad koncentracije pri kojoj se postiže najintenzivnije rasteanje. Međutim, povećanjem količine metala u biljci i probijanjem tog opsega, dolazi do ponovnog usporavanja rasteanja i ispoljavanja toksičnosti, koja na kraju može imati i letalan efekat.

U slučaju neesencijalnih metala, štetan efekat odsustva metala u biljci ne postoji, niti pri dodavanju ovih elemenata dolazi do poboljšanja u rasteanju i prinosu biljaka. Kod ovih elemenata, nakon određene kritične koncentracije, organizam počinje da pokazuje simptome toksičnosti, koji postaju izraženiji sa porastom koncentracije do pojave ireverzibilnih oštećenja i uginuća. Koncentracija metala pri kojoj dolazi do uginuća biljke predstavlja letalnu koncentraciju, dok se koncentracije pri kojima nema ispoljenih toksičnih simptoma nazivaju „koncentracije bez efekta“. Između ovih koncentracija nalaze se subletalne koncentracije, pri kojima se ispoljavaju različiti nivoi toksičnosti, ali biljke su i dalje vijabilne (Shaw *et al.*, 2004; Alloway, 2012).

Bez obzira na to da li predstavlja esencijalni ili neesencijalni element za biljku, svaki metal u zavisnosti od hemijskih karakteristika, osetljivosti biljne vrste i primenjene doze (trajanje izlaganja u kombinaciji sa koncentracijom) može imati toksične efekte na dati organizam (Baker & Walker 1989; Lin & Aarts, 2012). Opšti mehanizmi toksičnosti povišenih koncentracija esencijalnih i neesencijalnih jona metala kod mahovina prikazani su na Slici 13.

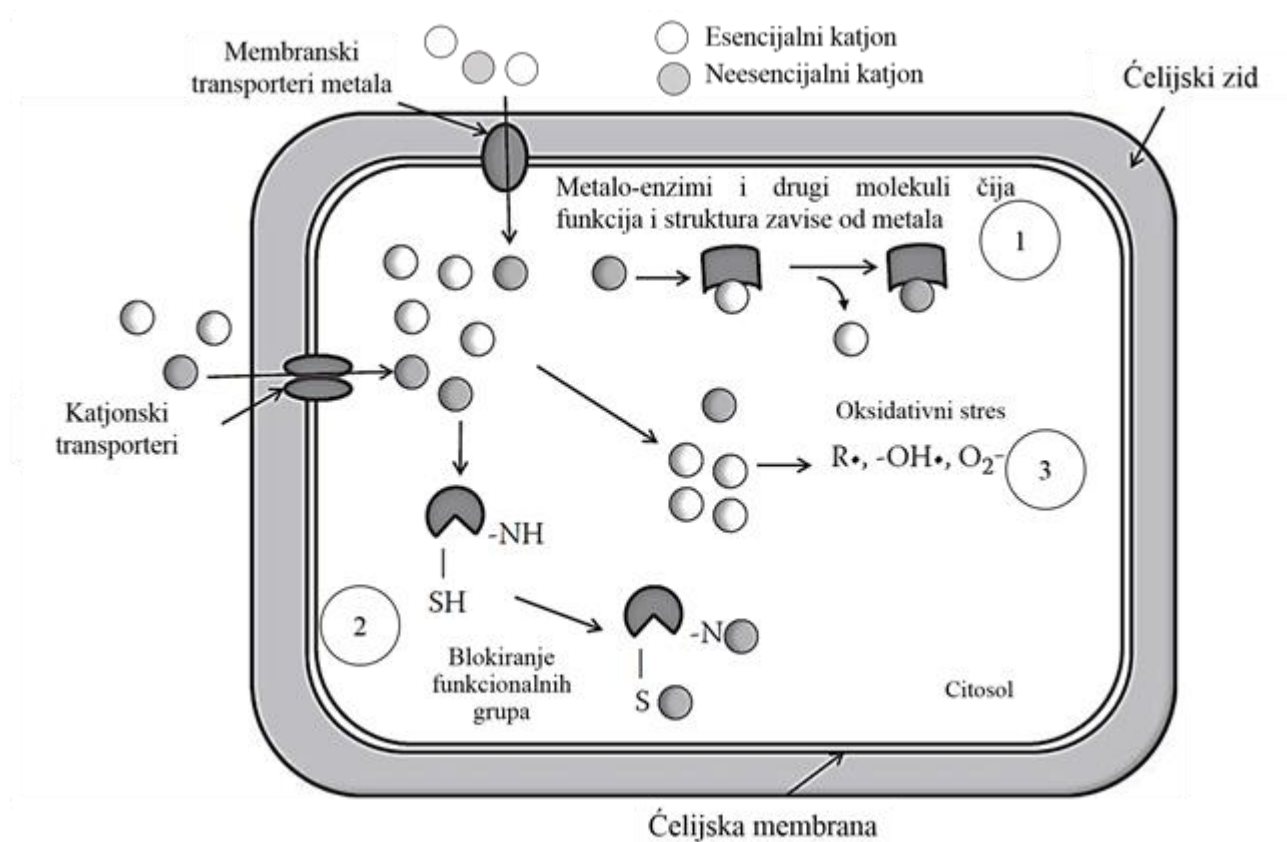


**Slika 12.** Šematski prikaz efekata esencijalnih (A) i neesencijalnih (B) metala na mahovine. A - Koncentracije metala ispod donje kritične koncentracije dovode do suboptimalnog razvića. Plato predstavlja rastenje i razviće koji se odvijaju pri optimalnom opsegu koncentracija. Širok plato predstavlja generalno niski potencijal za toksičnost (npr. cink), dok uzak plato predstavlja postojanje male razlike između koncentracija koje su korisne i onih koje su štetne po biljku (npr. bakar). Količine metala koje prelaze gornju kritičnu koncentraciju dovode do subletalnih toksičnih efekata koji utiču na smanjenje i deformaciju rastinja i razvića biljaka u različitom stepenu. Iznad određene (letalne) koncentracije, dolazi do ireverzibilnih oštećenja i uginuća biljke.

Toksični efekti povišene koncentracije metala kod biljaka generalno se manifestuju u vidu smanjene stope rastinja, hloroze, nekroze, smanjenog vodnog potencijala, izmenjenog funkcionisanja membrana, efluksa katjona, inhibicije fotosinteze, izmenjenog metabolizma, izmenjene aktivnosti esencijalnih enzima i drugo. Osim ovoga, jedan od ključnih efekata toksičnih koncentracija metala na nivou ćelije je povećana produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta (Hasanuzzaman & Fujita, 2013). Brojni enzimi sadrže metale i izmeštanje ili zamena ovih katjona drugim metalima koji imaju slična fizičko-hemijska svojstva dovodi do inhibicije enzima i neadekvatnog funkcionisanja, bez obzira na sličnost supstituisanog i jona na njegovom mestu. Mehanizam izmeštanja se zasniva na istim principima na osnovu kojih su metalni katjoni klasifikovani u grupu A, grupu B i graničnu grupu prema preferenciji da grade komplekse sa različitim tipovima liganada u zavisnosti od toga da li sadrže O, S ili N. Ovo takođe objašnjava zbog čega se kod različitih organizama mogu uočiti slični obrasci toksičnosti jona metala.

Metali B grupe nisu normalno komponente nijednog proteina u ćelijama, ali zbog velikog afiniteta prema grupama koje sadrže azot (npr. u lizinu ili imidazolnom bočnom lancu histidina) i -SH grupama (npr. u cisteinu) lako izmeštaju elemente granične grupe u katalitički aktivnim mestima enzima. Generalno, toksični efekti katjona B grupe su izraženiji u poređenju sa efektima metala granične grupe, dok su metali A grupe najmanje toksični. Metali granične grupe često istiskuju druge metale iste ili A grupe koji su normalno prisutni u ćeliji (Shaw *et al.*, 2004; Vogel-Mikuš *et al.*, 2012). Zbog ovakvog delovanja, česta meta toksičnosti kadmijuma u biljnim ćelijama su cink-vezujući ili cink-zavisni molekuli, u kojima zbog hemijske sličnosti kadmijum može istisnuti cink. S obzirom na to da cink često ima strukturnu ulogu u konformaciji enzima, kao u slučaju Cu/Zn-SOD, supstitucija kadmijumom dovodi do nefunkcionalnosti enzima usled narušavanja konformacije. Dodatno, zbog hemijske sličnosti, usvajanje i distribucija kadmijuma u biljnim ćelijama može se vršiti posredstvom istih transportera koje koriste joni cinka. Ovo dalje može

dovesti do smanjenog usvajanja drugih esencijalnih elemenata, uzrokujući deficijenciju mikronutrijenata ili narušavanje normalnih puteva distribucije metala. Transport kadmijuma u ćeliju može biti posredovan i kanalima za kalcijum ili  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  transporterima (Bellini *et al.*, 2021).



**Slika 13.** Šematski prikaz glavnih mehanizama toksičnog delovanja metala u biljkama. Metali inače prisutni u tragovima u povišenim koncentracijama mogu: 1) Dovedi do zamene esencijalnih metala u metaloenzimima i drugim molekulima koji zahtevaju njihovo prisustvo za pravilno funkcionisanje i zauzimanje ispravne strukture; 2) Interagovati sa esencijalnim funkcionalnim grupama (-SH, -NH, -OH, -COOH) strukturnih proteina i enzima i blokirati ih; 3) Dovedi do oksidativnog stresa u ćelijama formiranjem reaktivnih kiseoničnih vrsta (Modifikovano prema Vogel-Mikuš *et al.*, 2012).

U optimalnim fiziološkim uslovima u biljnim ćelijama dolazi do relativno male produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta, koje se održavaju u niskim koncentracijama, vršeći ulogu sekundarnih glasnika u brojnim procesima, uključujući razvoj tolerancije prema sredinskim stresovima. Osim toga, ROS funkcionišu i u odbrani biljaka od patogena (Mittler, 2002; Sharma *et al.*, 2012). Održavanje redoks homeostaze podrazumeva uspostavljanje balansa između produkcije i uklanjanja reaktivnih kiseoničnih vrsta dejstvom mehanizama antioksidativne zaštite (Sharma *et al.*, 2012). U osnovnom stanju, kiseonik se nalazi u tripletnom obliku ( $^3\text{O}_2$ ), sa dva nesparena elektrona paralelnih spinova u dve odvojene orbitale, zbog čega je paramagnetičan i nema afinitet prema organskim molekulima, osim ukoliko je aktiviran. U toku različitih fizioloških procesa u biljnim ćelijama, dolazi do aktivacije kiseonika i geneze ROS kao nus-produkata aerobnog metabolizma posredstvom dva mehanizma:

1. Apsorpcijom dovoljne energije da dovede do promene spina jednog od nesparenih elektrona i generiše kiseonik u singletnom stanju ( $^1\text{O}_2$ ). Ova aktivacija značajno povećava oksidacioni kapacitet kiseonika, te  $^1\text{O}_2$  može da interaguje u dvoelektronskim reakcijama transfera;

2. Postepenom jednovalentnom redukcijom tripletnog kiseonika izlaganjem visokoj energiji ili reakcijama transfera elektrona, pri čemu nastaju redom – superoksid radikal ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), vodonik

peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), hidroksil radikal ( $\cdot\text{OH}$ ) i finalno, voda potpunom redukcijom kiseonika (Dumanović *et al.*, 2021).

Primarna mesta produkcije ROS u biljnim ćelijama su hloroplasti, mitohondrije i peroksizomi, ali i bilo koji drugi ćelijski kompartment sa molekulima koji imaju dovoljno redoks potencijala da doniraju ili pobude elektron tripletnom kiseoniku. Povećana koncentracija metala, kao i brojni drugi sredinski stresovi, mogu dovesti do akumulacije reaktivnih kiseoničnih vrsta u ćelijama i stanja oksidativnog stresa (Shaw *et al.*, 2004; Ahmad *et al.*, 2008; Vogel-Mikuš *et al.*, 2012; Mittler, 2017). Prema savremenoj definiciji, oksidativni stres predstavlja „disbalans između oksidanata i antioksidanata u korist oksidanata, što vodi narušavanju redoks signalizacije i kontrole, i/ili oštećenjima molekula“ (Sies, 2018). U zavisnosti od intenziteta, oksidativni stres se klasifikuje kao fiziološki (eustres) i suprafiziološki stres. Eustres ima ulogu u redoks signalizaciji i regulaciji, sa specifičnim metama u ćeliji, i nastaje u uslovima niske izloženosti ćelija i organizma faktorima koji dovode do produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta. Suprafiziološki oksidativni stres nastaje kao posledica visoke izloženosti faktorima koji uzrokuju proizvodnju ROS, vodeći narušavanju redoks signalizacije i kontrole, i potencijalno oštećenju nespecifičnih meta unutar ćelija (Sies, 2018). U toku oksidativnog stresa, reaktivne kiseonične vrste interaguju sa biomolekulima i dovode do peroksidacije lipida, oksidacije proteina, oštećenja nukleinskih kiselina i hlorofila, inhibicije enzima, aktivacije puta programirane ćelijske smrti i posledično smrti ćelija (Michalak, 2006; Sharma *et al.*, 2012; Hasanuzzaman & Fujita, 2013; Dumanović *et al.*, 2021). Tkiva izložena oksidativnom stresu generalno se odlikuju povećanim koncentracijama karbonilovanih proteina i malondialdehida, kao i povećanom produkcijom etilena (Schützendübel & Polle, 2002).

Različite ROS forme se odlikuju različitim poluživotom i različitom selektivnošću meta, pri čemu toksičnost neke forme ne mora korelirati sa njenom reaktivnošću (Tabela 2). Često manja reaktivnost i produženo vreme poluraspada ( $t_{1/2}$ ) određenim ROS formama omogućava da difuzijom dospeju do osetljivih mesta u ćeliji i selektivno interaguju sa biomolekulima daleko od mesta svoje geneze. Drugi, usled velike reaktivnosti, jako brzo i neselektivno reaguju sa bilo kojim biomolekulom koji se nalazi u njihovom bliskom okruženju (Dumanović *et al.*, 2021).

**Oksidativni stres izazavan metalima.** Prilikom usvajanja i transporta metala između različitih kompartmenata u ćeliji, neminovno dolazi do produkcije ROS koja može biti posledica: direktne redoks aktivnosti (transferom elektrona u jednoelektronskim reakcijama), mesto-specifičnih efekata na metabolizam u različitim delovima ćelije, inaktivacije/smanjenja aktivnosti enzima antioksidativne zaštite ili smanjenja količine antioksidanata male molekulske mase (Michalak, 2006; Hasanuzzaman & Fujita, 2013; Rai *et al.*, 2016). Osim toga metal-zavisna aktivacija NADPH oksidaze koja je lokalizovana na plazmalemi dodatno može stimulisati nastanak reaktivnih kiseoničnih vrsta. Ovaj enzim koristi citoplazmatski NADPH kao donor elektrona katalizujući apoplastni molekularni kiseonik do  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , od koga dalje može nastati  $\text{H}_2\text{O}_2$  spontano ili posredstvom enzima superoksid dismutaze. Osim toga, reaktivne kiseonične vrste u apoplastu mogu biti produkovane i posredstvom peroksidaza klase III koje su vezane za ćelijski zid. Iako su ovi enzimi inače uključeni u uklanjanje  $\text{H}_2\text{O}_2$ , one takođe mogu dovesti do produkcije  $\text{H}_2\text{O}_2$  u prisustvu jakih reduktanata kao što je bakar (Cuypers *et al.*, 2016).

Metali koji u biološkim sistemima dovode do oksidativnog stresa mogu se podeliti na redoks aktivne (Fe, Cu, Cr, Co) i redoks inertne (Cd, Pb, Zn, Ni, Al). Oni sa nižim redoks potencijalom od potencijala bioloških molekula ne učestvuju u biološkim redoks reakcijama. Iako su redoks inertni, metali poput cinka i kadmijuma mogu interakcijama sa sistemima antioksidativne zaštite i narušavanjem elektron transportnog lanca hloroplasta i mitohondrija, indirektno dovesti do oslobađanja i akumulacije ROS. Osim toga, zajedno sa redoks aktivnim metalima, mogu pokrenuti i enzimski specifičnu lipidnu peroksidaciju metal-zavisnom aktivacijom enzima lipoksigenaze (LOX) i dodatno doprineti produkciji ROS (Shaw *et al.*, 2004; Hasanuzzaman & Fujita, 2013; Gill, 2014).

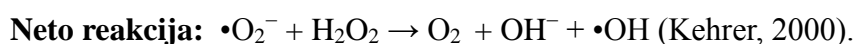
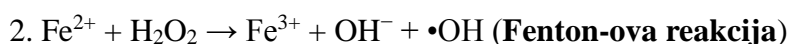
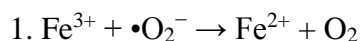


**Tabela 2.** Osobine i reaktivnost različitih tipova ROS u biljnoj ćeliji (Mittler, 2017)

ROS	$t_{1/2}$	Distanca difuzije	Način delovanja	Mesto nastanka	Način uklanjanja
Superoksid ( $O_2^{\bullet-}$ )	1-4 $\mu$ s	30 nm	Reakcija sa Fe-S proteinima, dismutacija u $H_2O_2$	Apoplast, hloroplasti, mitohondrije, peroksizomi, elektron transportni lanci	SOD, flavonoidi, askorbat...
Hidroksil radikal ( $OH^{\bullet}$ )	1ns	1 nm	Ekstremna reaktivnost sa svim biomolekulima uključujući DNK, RNK, lipide i proteine	Gvožđe i $H_2O_2$ (Fenton reakcija)	Flavonoidi, prolin, šećeri, askorbat...
Vodonik peroksid ( $H_2O_2$ )	>1 ms	>1 $\mu$ m	Reakcija sa proteinima (ostaci cisteina i metionina), reakcija sa hemproteinima, reakcija sa DNK	Peroksizomi, hloroplasti, mitohondrije, citosol, apoplast	APX, CAT, GPX, PER, PRX, askorbat, glutation...
Singlet kiseonik ( $^1O_2$ )	1-4 $\mu$ s	30 nm	Oksidacija lipida, proteina (ostaci Trp, His, Tyr, Met i Cys), i ostaci guanina u DNK	Membrane, hloroplasti, jedro	Karotenoidi i $\alpha$ -tokoferol

Redoks aktivni metali, poput bakra i gvožđa, su direktno uključeni u redoks reakcije u ćeliji i posredstvom Haber-Weiss i Fenton reakcija mogu dovesti do stvaranja visoko toksičnog  $\bullet OH$  od superoksid radikala i vodonik peroksida. Produkcija hidroksil radikala na ovaj način dalje može dovesti do procesa neenzimske lipidne peroksidacije (Schützendübel & Polle, 2002; Hasanuzzaman & Fujita, 2013). U osnovi štetnog efekta ROS u ovom procesu, nalazi se njihova sposobnost da pokrenu autooksidativnu lančanu reakciju nezasićenih masnih kiselina u lipidima ćelijskih membrana.

#### Haber-Weiss reakcija:



Hidroksil radikal je najreaktivniji oksidant koji neselektivno oksiduje DNK, amino kiseline, lipide, proteine, metale i šećere, vodeći velikim oštećenjima i genetičkoj nestabilnosti ćelija. Usled reakcije  $\bullet OH$  sa nezasićenim masnim kiselinama u biološkim membranama dolazi do lipidne peroksidacije i posledične destrukcije membrana koja može dovesti do ćelijske smrti (Ahmad *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2012; Dumanović *et al.*, 2021).

Lipidna peroksidacija se često smatra odrazom nivoa oksidativnog stresa koji biljka u datom trenutku trpi. Do peroksidacije masnih kiselina može doći neenzimskim ili enzimskim putem, pri čemu u oba slučaja kao nus-produkti nastaju lipidni hidroperoksidi. Neenzimsku lipidnu peroksidaciju direktno pokreću joni tranzicionih metala ili ROS formirani u različitim ćelijskim kompartmentima, naročito superoksid radikal i hidroksil radikal (Shaw *et al.*, 2004; Skórzyńska-Polit, 2007; Gaschler & Stockwell, 2017). Enzimsku lipidnu peroksidaciju pokreću enzimi lipoksigenaze (LOX). LOX predstavljaju oksido-reduktaze sa gvožđem ili manganom kao kofaktorom, koje katalizuju dioksidaciju dugog lanca masnih kiselina koje sadrže cis, cis,-1,4-pentadiensku strukturu, poput linoleične i alfa-linolenične kiseline (Shaw *et al.*, 2004; Skórzyńska-Polit, 2007; Viswanath *et al.*, 2020). U oba slučaja, proces peroksidacije započinje oduzimanjem atoma vodonika metilenskoj grupi ( $-CH_2-$ ) nezasićenih masnih kiselina lipida, dejstvom radikala

kao što je  $\bullet\text{OH}$ . Ovo je olakšano prisustvom dvogubih veza, koje dovode do slabljenja veze C-H kod ugljenika koji su susedni onima koji učestvuju u dvogubim vezama. Oduzimanjem vodonika nastaje ugljenik sa nesprenim elektronom ( $-\dot{\text{C}}\text{H}_2-$ ), lipidni radikal, koji teži da molekulskim rearanžmanima postigne stabilizaciju. Tom prilikom nastaje konjugovani dien, koji može reagovati sa molekulskim kiseonikom, koji je diradikal. Kao rezultat ove reakcije, nastaje lipidni peroksil radikal ( $\text{LOO}\cdot$ ,  $\text{R-OO}\cdot$ ) (Kehrer, 2000; Shaw *et al.*, 2004). Peroksil radikali nastali kao intermedijeri u toku enzimske lipidne peroksidacije bivaju transformisani unutar enzimskog kompleksa u odgovarajuće anjone ( $\text{LOO}^-$ ) gubeći svoju reaktivnost. S druge strane, peroksil radikal koji je nastao u neenzimskim reakcijama ne biva inaktivisan. On dalje može preuzeti vodonik iz nove nezasićene masne kiseline, stvarajući sa njim lipidni hidroperoksid ( $\text{ROOH}$ ), uz istovremenu transformaciju nove nezasićene masne kiseline u novi lipidni peroksil radikal. Na ovaj način dolazi do lančane reakcije peroksidacije. Lipidni hidroperoksidi, koji su nus-produkti ovih reakcija, su nestabilni i mogu se raspasti dajući brojne produkte, kao što je malondialdehid (MDA), ili mogu biti redukovani dajući stabilnije alkoholne oblike (Kehrer, 2000; Shaw *et al.*, 2004; Skórzyńska-Polit, 2007). Količina prisutnog MDA u tkivu, koji je citotoksični produkt, smatra se pokazateljem statusa lipidne peroksidacije u ćeliji, odnosno nivoa oksidativnog stresa (Shaw *et al.*, 2004; Bellini *et al.*, 2021).

Osim oksidativnih oštećenja lipida direktnim delovanjem ROS, nastali aldehidni produkti u toku procesa lipidne peroksidacije su jako reaktivni i mogu dovesti do oksidativnih modifikacija proteina u vidu njihove karbonilacije (Romero-Puertas *et al.*, 2002; Grimsrud *et al.*, 2008). Osim ovoga, u prisustvu redoks aktivnih metala može doći do direktne oksidacije proteina. Naime, vezivanje ovakvih metala za katjon vezujuća mesta na proteinu, može dovesti do nastanka radikalskih vrsta u reakciji sa kiseonikom ili vodonik peroksidom, koje dovode do oksidacije amino-kiselinskih rezidua u blizini katjon vezujućeg mesta. Ukoliko ovi proteini imaju enzimsku ulogu, reakcija dovodi do uništavanja katjon vezujućeg mesta i inaktivacije proteina (Levine *et al.*, 1990). Prisustvo reaktivnih karbonilnih grupa u proteinima smatra se dobrim pokazateljem stepena oksidativnog stresa izazvanog sredinskim faktorima (Mano, 2012). Izmenjeni proteini mogu imati promenjenu hidrofobnost i formirati agregate ili rezultovati u formiranju peptidnih fragmenata. Smatra se da ovako modifikovani proteini predstavljaju metu proteaza koje vode degradaciji i smanjenom sadržaju proteina u uslovima oksidativnog stresa (Romero-Puertas *et al.*, 2002).

U normalnim fiziološkim uslovima, proces fotosinteze predstavlja naročito važan izvor ROS kod biljaka, zbog konstantne produkcije molekulskog kiseonika na kompleksu za razvijanje kiseonika fotosistema II (PSII) (Dumanović *et al.*, 2021). U toku apsorpcije svetlosti, hlorofili mogu preći u tripletno stanje u kom poseduju dovoljno energije da ukoliko dođe do interakcije sa molekulskim kiseonikom dovedu do stvaranja  $^1\text{O}_2$ . Singlet kiseonik zatim može dovesti do direktne oksidacije proteina, nezasićenih masnih kiselina, DNK i smatra se najvažnijim uzrokom gubitka PSII u uslovima povišenog intenziteta svetlosti gde dovodi do oksidacije D1 proteina ovog fotosistema (Foyer & Shigeoka, 2011; Sharma *et al.*, 2012). Kao posledica povišene koncentracije metala, u hloroplastima može doći do povećane akumulacije ROS direktnim delovanjem redoks aktivnih metala na molekulski kiseonik ili interakcijom sa već formiranim reaktivnim vrstama. Osim toga, nefunkcionalnim vezivanjem za različite biomolekule kadmijum, bakar i cink mogu dovesti do učestalih neciljanih prenosa elektrona na molekulski kiseonik ili inhibirati funkciju komponenti antioksidativnog sistema i na taj način povećati produkciju ROS (Zengin & Kirbag 2007; Küpper & Andresen 2016; Bellini *et al.*, 2020, 2021). Metali mogu dovesti do inhibicije PSII i povećati produkciju  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , koji direktno ili preko hidroksil radikala može pokrenuti peroksidaciju lipida, za koju je pokazano da je medijator toksičnosti metala u brojnim fiziološkim procesima biljnih ćelija (Rai *et al.*, 2016). Osim ovoga, usled smanjenja fiksacije ugljen-dioksida u uslovima stresa izazvanog metalima, dolazi do smanjene redukcije ugljenika u Kalvinovom ciklusu i smanjenja količine oksidovanog  $\text{NADP}^+$  kao krajnjeg akceptora elektrona u fotosintezi. Posledično, zbog nemogućnosti transporta elektrona na  $\text{NADP}^+$ , elektroni sa fotosistema I (PSI) mogu preći na molekulski kiseonik dovodeći do monovalentne redukcije tripletnog kiseonika, i nastanka  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , u

procesu koji se zove Melerova reakcija. S obzirom na njegovu reaktivnost sa proteinima koji sadrže Fe-S klastere, vrlo brzo nakon formiranja superoksid radikala, enzim superoksid dismutaza prevodi ovu reaktivnu vrstu u vodonik peroksid, kako bi se sprečila akumulacija  $O_2^{\cdot-}$  i oštećenja i inaktivacija proteina (Ahmad *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2012; Dumanović *et al.*, 2021).

Vodonik-peroksid je neophodan za normalno razviće biljnih ćelija, gde osim uloge sekundarnog glasnika služi kao supstrat peroksidazama klase III, omogućavajući oksidaciju fenolnih susptanci i formiranje njihovih polimera u ćelijskim zidovima. S druge strane, pri povišenim koncentracijama može imati jako toksičan efekat. Direktnom oksidacijom metioninskih ( $-SCH_3$ ) i cisteinskih ( $-SH$ ) ostataka,  $H_2O_2$  može dovesti do inaktivacije različitih enzima. Alternativno, prolaskom kroz membrane i reagovanjem sa  $Fe^{2+}$  ili  $Cu^+$  jonima može dovesti do formiranja još toksičnijih reaktivnih vrsta, poput  $\cdot OH$  (Dumanović *et al.*, 2021). Osim oštećenja izazvanih posredstvom  $\cdot OH$ , vodonik peroksid već pri niskim koncentracijama uzrokuje inhibiciju fotosinteze usled oksidacije enzima uključenih u Kalvinov ciklus (Foyer & Shigeoka, 2011). Do nastanka vodonik peroksida u biljkama, osim kroz opisane procese, dolazi u peroksizomima u toku oksidacije masnih kiselina i procesa fotorespiracije. Dodatno,  $H_2O_2$  nastaje i u mitohondrijama usled „curenja“ elektrona na  $O_2$  sa elektron transportnog lanca, gde nastaje dismutacijom superoksid radikala. Pod uticajem toksičnih količina metala u ćelijama, ovi procesi bivaju znatno intenzivirani, zbog čega dolazi do povećane akumulacije  $H_2O_2$  (Ahmad *et al.*, 2008; Cuypers *et al.*, 2016).

**Efekat metala na fotosintezu.** Apsorpcija svetlosti posredstvom hlorofila *a* i *b* (chl *a* i chl *b*) i karotenoida, predstavlja prvi korak fotohemijske faze fotosinteze koja se odvija u tilakoidima hloroplasta biljaka (Souri *et al.*, 2019). Ovi pigmenti organizovni su u antena komplekse koji omogućavaju usmereni prenos apsorbovane svetlosne energije do reakcionih centara fotosistema I i II i pokretanje fotosintetičkog transporta elektrona, koji dalje vodi oksidaciji vode, stvaranju protonske motorne sile, sintezi ATP-a i redukcije NADP<sup>+</sup>. Zajedno sa ATP-om, NADPH ima ulogu u pokretanju metaboličkih reakcija u stromi hloroplasta, kao što je fiksacija  $CO_2$  u Kalvin-Bensonovom ciklusu (Johnson & Wientjes, 2020).

Fotosinteza se smatra primarnom metom toksičnosti elemenata kao što su kadmijum, bakar i cink kod biljaka (Andresen *et al.*, 2018). U odgovoru na povećane koncentracije ovih metala, kod brojnih biljnih vrsta primećeno je da dolazi do smanjenja količine fotosintetičkih pigmenata, pre svega hlorofila (Rai *et al.*, 2016; Souri *et al.*, 2019). To za posledicu ima deformaciju hloroplasta, smanjenja fotosintetske efikasnosti i opšti poremećaj metabolizma, što može rezultovati vidljivom hlorozom ili nekrozom biljnog tkiva (Rai *et al.*, 2016). Fotosistem II obično pokazuje veću osetljivost na toksična dejstva metala u odnosu na fotosistem I (Andresen *et al.*, 2018). Smanjena količina pigmenata može biti posledica inhibicije njihove biosinteze usled toksičnog dejstva metala. Alternativno, zamena jona magnezijuma u centru molekula hlorofila (tetrapirolovom prstenu) drugim katjonima, može dovesti do destabilizacije samih pigmenata ili kompleksa koje grade sa proteinima i uzrokovati njihovu degradaciju. Indirektno, do gubljenja fotosintetičkih pigmenata može doći usled peroksidacije tilakoidnih membrana, izazvane pojačanom produkcijom reaktivnih kiseoničnih vrsta u prisutvu toksičnih metala (Myśliwa-Kurdziel *et al.*, 2004; Küpper & Andresen 2016; Bellini *et al.*, 2020). Hlorofili nastali supstitucijom magnezijuma metalima kao što su kadmijum, bakar i cink nazivaju se hm-hlorofili (eng. heavy metal – chlorophyll) (Rai *et al.*, 2016; Souri *et al.*, 2019). Iako su brojne druge komponente procesa fotosinteze meta toksičnog dejstva metala, pokazano je da postoji proporcionalna veza između toksičnosti datog metala po biljku i tendencije da formira hm-hlorofile, a koja prati sledeći redosled:  $Hg^{2+} > Cu^{2+} > Cd^{2+} > Zn^{2+} > Ni^{2+} > Pb^{2+}$ . To ukazuje da je mehanizam supstitucije  $Mg^{2+}$  jedan od primarnih preko koga metali ispoljavaju svoj štetan uticaj na ovaj proces (Küpper *et al.*, 1996). Osim uticaja na fotohemiju, toksični efekti povećane koncentracije metala koji uzrokuju inhibiciju fotosinteze podrazumevaju njihov efekat na membrane, plastocijanin, metabolizam minerala i različite enzime (Küpper *et al.*, 1998; Zengin & Kirbag 2007).

Kvantifikacija i prostorna distribucija fotosintetičkih pigmenata u listovima biljaka predstavlja važan pokazatelj efekta različitih sredinskih stresova, uključujući povećane koncentracije metala (Zeng *et al.*, 2021). Usled mogućih artefakta prilikom ekstrakcije fotosintetičkih pigmenata, neinvazivne tehnike za detekciju njihovog sadržaja i prostornu kvantifikaciju u različitim delovima biljke, poput Raman spektroskopije, pružaju mnogo pouzdanije informacije o uticaju metala na fotosintezu od standardnih biohemijskih merenja (Küpper *et al.*, 1998; Zeng *et al.*, 2021).

### 1.5.1. Toksični efekti povišenih koncentracija metala na mahovine

Prema Sidhu & Brown (1996) praćenje rastenja i razvića mahovina, kao rezultata integracije širokog spektra metaboličkih procesa u organizmu, predstavlja ultimativni način za ispitivanje toksičnih efekata metala na gametofite ovih biljaka. Parametri koji se u ovakvim istraživanjima koriste su prinos biomase, razviće sekundarne protoneme, prečnik protoneme, broj novoporođenih grana ili izdanaka po početnom izdanku i drugi (Sassmann *et al.*, 2010; Sassmann *et al.*, 2015a; Antreich *et al.*, 2016; Sabovljević *et al.*, 2018a). Osim ovoga, efekti delovanja polutanata mogu se detektovati i pre nego što dođe do vidljivih promena u rastu i razviću biljaka, praćenjem ultrastrukturnih promena i promena u fiziološkim procesima (Wolterbeek 2002; Sun *et al.*, 2009; Basile *et al.*, 2012). Ove promene kod mahovina uključuju plazmolizu ćelija, izmene organizacije tilakoida, bubrenje tilakoidnih membrana i narušavanje strukture tilakoida grana, promene oblika hloroplasta i pojavu plastoglobula, dok u citosolu dolazi do vakuolizacije, pojave multivezikularnih tela i lipidnih kapljica (Carginale *et al.*, 2004; Choudhury and Panda, 2005; Basile *et al.*, 2009, 2012; Chen *et al.*, 2015a, b; Bellini *et al.*, 2020). Pokazano je da su uočene promene zavisne od vrste metala, te da u slučaju neesencijalnih metala, poput kadmijuma, dolazi do promena koje su proporcionalne koncentraciji primenjenog metala. U slučaju esencijalnih mikroelemenata kao što su bakar i cink, ovakav efekat nije uočen, već promene ostaju slične pri svim povećanim koncentracijama metala (Carginale *et al.*, 2004; Basile *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2015a).

Osim što dovode do ultrastrukturnih promena, povećane koncentracije metala kao što su kadmijum, cink i bakar, takođe mogu narušiti različite metaboličke procese i uzrokovati fiziološki stres kod mahovina. S obzirom na to da proces fotosinteze predstavlja esencijalni proces koji omogućava razviće i rastenje biljaka, ispitivanje fotosintetičkog kapaciteta, posredstvom analize sadržaja hlorofila ili njihove fluorescencije, predstavlja jedan od čestih pristupa u proceni toksičnih efekata metala na biljke. S druge strane, relativno je mali broj istraživanja koja su ispitivala korelaciju između tipa i koncentracije metala i efekta na sadržaj i funkcionalnost pigmenata u mahovinama (Shakya *et al.*, 2008; Saxena & Saiful-Arfeen, 2009; Chen *et al.*, 2019; Bellini *et al.*, 2020). Smanjenje ukupne količine hlorofila u prisustvu povišenih koncentracija bakra, cinka i kadmijuma predstavlja jedan od generalnih trendova zapažen kod mahovina (Panda & Choudhury, 2005; Chen *et al.*, 2015a, b; Aydoğan *et al.*, 2017; Stanković *et al.*, 2018). Međutim stepen i priroda ovog smanjenja kao i efekat na sadržaj individualnih pigmenata (hlorofila *a* i hlorofila *b*), variraju u zavisnosti od tipa metala, primenjene koncentracije, kao i od vrste mahovina. Zapažene razlike se mogu potencijalno objasniti različitim mehanizmima usvajanja ovih elemenata, različitim potrebama biljke za određenim metalima, kao i različitim mehanizmima preko kojih individualni katjoni ostvaruju svoj toksičan efekat u biološkim sistemima (Vázquez *et al.*, 1999; Stanković *et al.*, 2018; Bellini *et al.*, 2021). Generalno, pri istim koncentracijama, u odnosu na bakar i kadmijum cink ima najmanji uticaj na ukupni sadržaj fotosintetičkih pigmenata. Ovaj obrazac se najčešće detektuje bez obzira na primenjenu koncentraciju metala i vrstu mahovine (Tremper *et al.*, 2004; Panda & Choudhury, 2005; Shakya *et al.*, 2008). S druge strane, relativna toksičnost bakra i kadmijuma u odnosu na sadržaj hlorofila u mahovinama, razlikuje se u različitim studijama, pri čemu isti metal može pokazivati različiti trend uticaja na sadržaj hlorofila, u zavisnosti od trajanja ekspozicije ili primenjene koncentracije (Fatoba & Udoh, 2008; Gecheva & Yurukova, 2008; Saxena & Saiful-Arfeen, 2009; Chen *et al.*, 2015a).

Analiza odnosa hlorofila *a* i *b* (chl *a/b*) takođe je korišćena u nekim studijama za ispitivanje toksičnih efekata metala na fotosintezu mahovina (Gecheva & Yurukova, 2008; Shakya *et al.*, 2008; Saxena & Saiful-Arfeen, 2009; Chen *et al.*, 2015a; Aydoğan *et al.*, 2017). Smatra se da ovaj parametar može biti dobar indikator stresa izazvanog metalima, jer u ovakvim uslovima može doći do povećane konverzije hlorofila *a* u hlorofil *b*, usled oksidacije metil grupe na drugom tetrapirolovom prstenu hlorofila *a* (Shakya *et al.*, 2008; Aydoğan *et al.*, 2017). Međutim, analizom uticaja kadmijuma, bakra i cinka na odnos koncentracija hlorofila kod mahovina *Taxiphyllum taxirameum* (Mitt.) Fleisch i *Eurhynchium eustegium* (Besch.) Dix., Chen *et al.* (2015a) su pokazali da ovaj parametar značajno varira u zavisnosti od tipa primenjenog metala i da je manje pouzdan u detekciji efekata individualnih metala na proces fotosinteze u poređenju sa ukupnom koncentracijom hlorofila. S druge strane, u sličnoj studiji, analizirajući efekat bakra, olova i hroma na druge dve vrste mahovina, Aydoğan *et al.* (2017) su zaključili da chl *a/b* odnos predstavlja efikasniji pokazatelj metal-specifičnog stresa u odnosu na sadržaj ukupnih hlorofila, pri čemu je do smanjenja odnosa kod obe vrste došlo jedino u slučaju tretmana bakrom. Međutim, prema Saxena & Saiful-Arfeen (2009) manja promena vrednosti ovog parametra u uzorcima mahovina tretiranih metalima u odnosu na vrednosti odgovarajućih kontrola, može ukazivati na povećanu otpornost vrste prema ispitivanom tipu stresa.

Kao i u slučaju vaskularnih biljaka, efekat bakra, cinka i kadmijuma na sadržaj karotenoida u mahovinama je znatno manje istraživano u odnosu na hlorofile. U istraživanju uticaja bakra i kadmijuma na sadržaj karotenoida kod mahovine *Rhytidadelphus squarrosus* (Hedw.) Warnst, Saxena & Saiful-Arfeen (2009) su pokazali da pri dugotrajnom izlaganju ovim metalima dolazi do pada ukupne koncentracije karotenoida. S druge strane, pri niskim koncentracijama metala, pokazano je da je sadržaj karotenoida rastao. U istraživanju Aydoğan *et al.* (2017), u zavisnosti od vrste mahovina, primarno, ali i od tipa metala, promene u sadržaju karotenoida su imale različiti trend. Bakar je doveo do smanjenja sadržaja ovih pigmenata u jednoj od vrsta, dok kod druge izlaganje metalima nije dovelo do značajne promene u količini karotenoida ili je, kao u slučaju Ni<sup>2+</sup>, došlo do povećanja njihovog sadržaja.

Toksični efekti metala na mahovine, osim direktnim interakcijama sa biološkim strukturama i metaboličkim procesima, kao i u slučaju vaskularnih biljaka, mogu biti posledica metalima indukovane akumulacije ROS i suprafiziološkog oksidativnog stresa (Panda & Choudhury 2005). Kod mahovina *T. taxirameum* i *E. eustegium*, u odgovoru na povišene koncentracije bakra, kadmijuma i cinka, Chen *et al.* (2015a) su pokazali da pri svim korišćenim koncentracijama individualnih metala dolazi do drastičnog povećanja produkcije vodonik peroksida, dok je u slučaju superoksid radikala to povećanje izraženo tek pri većim primenjenim koncentracijama metala. Među istraživanjima koja su pratila efekte povećanih koncentracija metala kod mahovina na redoks homeostazu i produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta, među najbrojnijim su ona u kojima je ispitivan uticaj bakra, koji kao redoks aktivni jon, ima veliki potencijal da dovede do narušavanja ove homeostaze (Panda & Choudhury, 2005; Dazy *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2015b; Antreich *et al.*, 2016; Aydoğan *et al.*, 2017). Osim što kod senzitivnih vrsta indukuje povećanu produkciju vodonik peroksida čak i pri niskim koncentracijama, bakar dovodi do akumulacije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> čak i kod vrsta koje se smatraju tolerantnim na njega. Dodatno, kod ostljivih vrsta, bakar dovodi do znatno intenzivnijeg nakupljanja superoksid anjona nego kod tolerantnih mahovina (Antreich *et al.*, 2016).

Malondialdehid, kao citotoksični produkt lipidne peroksidacije, smatra se jednim od pouzdanih pokazatelja stepena oksidativnog oštećenja ćelija mahovina u odgovoru na metale kao što su kadmijum, bakar i cink (Panda & Choudhury, 2005; Dazy *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2011; Aydoğan *et al.*, 2017). U slučaju sva tri metala, količina MDA u mahovinama izloženim ovim elementima raste proporcionalno primenjenim koncentracijama (Panda & Choudhury, 2005; Dazy *et al.*, 2009). S druge strane, Dazy *et al.* (2009) su pokazali da u slučaju esencijalnih elemenata, do naglih skokova u koncentraciji malondialdehida dolazi pri većim koncentracijama i dužem periodu izloženosti, dok je toksičan efekat kadmijuma u procesu lipidne peroksidacije vidljiv već pri nižim

dozama. Povećanje MDA u prisustvu povećanih koncentracija metala, ukazuje na to da su membranski sistemi ćelija mahovina među primarnim metama toksičnosti ovih elemenata, koja je posredovana lipidnom peroksidacijom (Sun *et al.*, 2009). Trend povećanja količine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i MDA u mahovinama nakon izlaganja povišenim koncentracijama različitih metala ukazuje na to da bi ova dva parametra mogli imati ulogu markera oksidativnog stresa indukovano od strane toksičnih metala, čak i u situacijama kada nije došlo do vidljivih promena u izgledu ovih biljaka (Sun *et al.*, 2009).

Toksične koncentracije metala, osim što uzrokuju inhibiciju aktivnosti enzima uključenih u različite biohemijske reakcije, mogu dovesti do izmena u metaboličkim putevima mahovina, remeteći proces usvajanja i transporta elemenata neophodnih za normalne biosintetske puteve u ćeliji. Sutter *et al.* (2002) su pokazali da cink i kadmijum mogu dovesti do smanjenog usvajanja azota od strane mahovina, što za posledicu ima inhibiciju sinteze amino kiselina. Kao rezultat ove inhibicije, između ostalog, dolazi i do smanjenja koncentracije proteina u ćelijama (Sutter *et al.*, 2002). Smanjena količina ukupnih proteina u mahovinama tretiranim bakrom, kadmijumom i cinkom, dokumentovana je u radu Saxena & Saiful-Arfeen (2009) i Chen *et al.* (2015a). Ovakvi rezultati mogu biti posledica inhibicije bilo kog koraka njihove biosinteze, ali i rezultat povećane degradacije proteina u uslovima oksidativnog stresa izazvanog metalima (Romero-Puertas *et al.*, 2002; Sutter *et al.*, 2002). Osim uticaja na biosintezu proteina, izlaganje povećanim koncentracijama metala inače prisutnih u tragovima, kod mahovina može dovesti do promena u metabolizmu lipida i promena u zastupljenosti određenih grupa masnih kiselina. Ipak, jako je malo dostupnih informacija o uticaju metala na biosintezu i metabolizam lipida kod mahovina, te generalizovana slika o efektima metala u ovim procesima ne može biti formirana (Guschina & Harwood, 2002). Uz efekte na metabolizam proteina i lipida kod mahovina, Saxena & Saiful-Arfeen (2009) su pokazali da povećane koncentracije kadmijuma i bakra utiču i na smanjenu sintezu složenih ugljenih hidrata, uz istovremeno povećanje količine ukupnih šećera.

Usled oštećenja membrana pod dejstvom toksičnih koncentracija metala moguće je da dođe do curenja fiziološki aktivnih elemenata poput kalijuma, natrijuma, hlora ili fosfora, ili izmeštanja sa katjon vezujućih mesta usled većeg afiniteta katjona iz sredine (Aničić *et al.*, 2009). Kalijum je esencijalni makroelement i u normalnim fiziološkim uslovima nalazi se u solubilnoj formi u velikoj količini unutar ćelije. U slučaju kada je permeabilitet plazmaleme izmenjen može doći do njegovog izlaska, s obzirom na to da je jako mobilan jon, te se često koristi kao indikator promena membranskog integriteta. U istraživanju efekata bakra, kadmijuma i cinka kod dve vrste vodenih mahovina, *F. antipyretica* i *F. polyphyllus*, Vázquez *et al.* (1999) su pokazali da sa povećanjem koncentracije ovih metala u rastvoru dolazi do proporcionalnog smanjenja unutarćelijskog sadržaja sadržaja kalijuma. Kod obe vrste, bakar je doveo do najvećeg pada koncentracije kalijuma.

## **1.6. Održavanje homeostaze i mehanizmi zaštite od toksičnih efekata metala kod biljaka**

### **1.6.1. Homeostaza metala u biljkama i kontrola akumulacije**

Na osnovu interakcija sa metalima prisutnim u spoljašnjoj sredini, sve biljke mogu se podeliti na akumulatore (1), koji koncentrišu metale u izdancima; indikatore (2), kod kojih je usvajanje i transport metala u izdanak regulisan tako da unutrašnje koncentracije odražavaju koncentracije u sredini; i ekskludere (3), kod kojih je koncentracija metala u izdancima konstantna i relativno niska u širokom opsegu koncentracija metala u okruženju, sve do kritične vrednosti, iznad koje mehanizmi regulacije ne funkcionišu i dolazi do porasta koncentracije metala u izdanku (Baker, 1981). Kako bi održavale količine esencijalnih metala u okviru fizioloških granica i minimizirale štetne efekte neesencijalnih metala, biljke su razvile složenu mrežu homeostatskih mehanizama koji daju osnovni nivo tolerancije prema metalima i prisutni su kod sva tri tipa biljaka. Ovi mehanizmi uključuju regulaciju usvajanja, akumulacije, prometa unutar i između ćelija i detoksifikaciju ovih elemenata u ćeliji (Clemens, 2001). I ekskluderi i akumulatori, svoju otpornost baziraju na ovim mehanizmima, ali se relativni doprinos svakog od njih kao i mesta detoksifikacije



u odnosu na ćeliju međusobno razlikuju (Baker, 1981). Smatra se da većina jona metala u ćeliji ne postoji u slobodnoj formi, jer to povećava šansu za neželjenim reakcijama sa različitim supstratima (Hänsch & Mendel, 2009). Otpornost biljaka na toksična dejstva metala postiže se: formiranjem kompleksa sa organskim jedinjenjima učešćem različitih donor liganada (glutation, cistein, nikotinamin, histidin i drugi tioli male molekulske mase) unutar ćelija; aktivnim transportom jona i kompleksa ligand-metal posredstvom membranskih transportera u kompartmente gde imaju najmanju mogućnost narušavanja metaboličkih procesa; ili vezivanjem za negativno naelektrisane grupe ćelijskog zida, koje sa velikom efikasnošću vezuju dvovalentne i trovalentne katjone van ćelije (Vogel-Mikuš *et al.*, 2008; Küpper & Kochian, 2010; Andresen *et al.*, 2018).

Aktivni transport metala posredstvom membranskih transportera predstavlja osnovu unosa, efliksa i redistribucije metala u ćelijama, koji su uključeni kako u akumulaciju tako i u održavanje fizioloških koncentracija metala unutar ćelija. Translokacija metala sa ciljem uklanjanja iz citoplazme najčešće se vrši u kompartmente kao što su vakuola ili ćelijski zid (Stanković *et al.*, 2018). Primarni aktivni transport cinka, bakra i kadmijuma u svim organizmima posredovan je ATP-azama klase P<sub>1B</sub>, koje se zbog konzervisanih cistein-prolin motiva nazivaju još i ATP-aze CPx-tipa. Ovi transporteri su primarno uključeni u ishranu biljaka mikroelementima, redistribuciju metala unutar ćelije i detoksifikaciju citoplazme (Williams & Mills, 2005; Andresen *et al.*, 2018). Jedan od ovih transportera za koga je pokazano da je prisutan kod mahovine *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp i ima ulogu u detoksifikaciji bakra omogućavajući njegovo uklanjanje iz citoplazme u druge kompartmente, kao i dostavljanje bakra membranskim kompartmentima kako bi učestvovao u izgradnji etilenskog receptora je HMA 7 protein (Migocka, 2015). Osim ovih, drugu grupu transportera uključenih u translokaciju metala primarnim aktivnim transportom čine ABC (eng. ATP-binding cassette) transporteri. Za razliku od P<sub>1B</sub> tipa ATP-aza, ovi transporteri ne vrše direktno vezivanje metala već posredstvom liganada poput glutationa ili fitohelatina, koji se za transporter vezuju preko supstrat vezujućih proteina (eng. substrate-binding protein, SBP) (Andresen *et al.*, 2018). ABC transporteri su lokalizovani na različitim membranama u ćeliji uključujući plazmalemu, membrane mitohondrija, lizozoma, vakuole i Goldžijevog aparata (Rice *et al.*, 2014; Andresen *et al.*, 2018).

U grupu transportera koji omogućavaju prenos metala sekundarnim aktivnim transportom kod biljaka spadaju NRAM proteini (eng. Natural Resistance Associated Macrophage Proteins) koji učestvuju u usvajanju metala u citoplazmu i sekvencijaciju u različite organele. Vezivanje i prenos katjona vrši se posredstvom rezidua ovih transportera koje sadrže sumpor (metionin) ili kiseonik (alanin, aspartat ili asparagin), simportom sa protonima (Axelsen & Palmgren, 2001; Andresen *et al.*, 2018). Osim NRAM, i neki od pripadnika ZIP (eng. Zinc Regulated Transporter-Iron Regulated Transporter-like proteins; ZRT-IRT-like Proteins) familije membranskih transportera na sličan način omogućavaju transport mikroelemenata kao što su cink, gvožđe, mangan i bakar, učestvujući u održavanju njihove homeostaze. Osim toga, pokazano je da oni mogu prenositi i neesencijalne mikroelemente poput kadmijuma i uticati na njihovo usvajanje i transport kroz biljku (Milner *et al.*, 2013). Proteini koji olakšavaju difuziju katjona (eng. cation diffusion facilitators, CDFs) predstavljaju treću grupu transportera koji sekundarnim aktivnim transportom unose metale u kompartmente ćelije sa kiselom sredinom kao što su vakuola ili Goldži, zahvaljujući antiportu sa protonima, omogućavajući detoksifikaciju citoplazme (Kolaj-Robin *et al.*, 2015; Andresen *et al.*, 2018). Poslednju grupu transportera koji koriste gradijent protona kako bi posredovali antiport sa jonima metala, pre svega kalcijuma, čine katjon/proton izmenjivači (CAXs). Najčešće su lokalizovani na membranama vakuola i osim kalcijuma mogu učestvovati u izmenjivanju drugih katjona poput Mn<sup>2+</sup> i Cd<sup>2+</sup> (Andresen *et al.*, 2018).

Mehanizmi uključeni u uklanjanje i sekvencijaciju metalnih jona unutar ćelije podrazumevaju učešće specifičnih klasa metal-vezujućih liganada koje obuhvataju helatore i šaperone. Vezivanjem metalnih jona, helatori omogućavaju detoksifikovanje ovih katjona u citoplazmi amortizovanjem njihove citoplazmatske koncentracije. Šaperoni, s druge strane, vezuju metale i specifično ih dopremaju do ćelijskih kompartmentata i metal-zavisnih proteina. Glavne grupe helatora kod biljaka

obuhvataju metalotioneine (MT), fitohelatine (PC), organske kiseline i amino kiseline (Clemens, 2001; Mahapatra *et al.*, 2019).

Fitohelatini predstavljaju grupu metal-vezujućih peptida male molekulske mase sa opštom strukturom sačinjenom od dipeptidnih ponovaka -Glu-Cys- praćenih terminalnim Gly, opšte formule (c-Glu-Cys)<sub>n</sub>-Gly, pri čemu „n“ predstavlja broj ponovaka i kreće se najčešće od 2-5. Sintetišu se direktno od redukovanoog glutationa (GSH) u reakciji transpeptidacije i indukuju se brzo nakon povećanja koncentracije metala u ćelijama. Fitohelatini interaguju sa metalima preko tiolnih (-SH) grupa cisteina, pri čemu je primećeno da sa porastom količine metala u ćelijama dolazi i do većeg stepena polimerizacije ovih peptida. Međutim, kod različitih vrsta biljaka i u zavisnosti od tipa metala, ne dolazi do indukcije ovih peptida sa podjednakom efikasnošću (Clemens, 2001; Saraswat & Rai, 2011). GSH predstavlja dominantan oblik skladištenja i transporta sumpora u ćelijama i kao takav može biti direktno uključen u vezivanje metala ili indirektno kao supstrat za sintezu fitohelatina. Formirani kompleksi GSH ili PC sa metalima dalje mogu biti transportovani u vakuolu, smanjujući koncentraciju katjona u citoplazmi i potencijalne štetne efekte (Yadav, 2010). Fitohelatini su najefikasnije indukovani prisustvom kadmijuma i arsena, u čijoj detoksifikaciji imaju najznačajniju ulogu (Andresen *et al.*, 2018).

Metalotioneini su široko rasporstranjeni proteini bogati cisteinom, male molekulske mase, koji vezuju jone metala u metal-tiolatne klasterne. Kodirani su genima za metalotioneine kojih je detektovano preko 50 kod različitih biljnih vrsta. Sinteza MT u toku akumulacije metala je energetski jako zavistan proces koji koristi aminokiseline (naročito cistein), sumpor i azot, što može dovesti do značajne redukcije u rastu biljaka (Clemens, 2001; Saraswat & Rai, 2011).

Usled reaktivnosti jona metala sa kiseonikom, azotom i sumporom, razne karboksilne i amino kiseline predstavljaju potencijalne helatore metala. Jabučna, limunska i oksalna kiselina uključene su u brojne procese u razvoju tolerancije na metale. Smatra se da je sirćetna kiselina pri nižim koncentracijama važan ligand kadmijuma, kao i da doprinosi akumulaciji cinka i razvoju tolerancije prema njemu. Jabučna kiselina takođe potencijalno predstavlja helatora cinka u cink-tolerantnim biljkama (Clemens 2001).

Pored unutarćelijskih procesa uključenih u detoksifikaciju metala, aktivna modifikacija komponenti ćelijskog zida (npr. pojavom kaloze) pod uticajem toksičnih metala povećava njegov metal vezujući kapacitet i sekvencijaciju u apoplast. Ovi mehanizmi su najizraženiji kod vrsta koje imaju sposobnost hiperakumulacije (Andresen *et al.*, 2018).

Zbog učešća cinka u velikom broju proteina u ćeliji i redoks inertnosti, potreba za posebnim šaperonima koji bi uklanjali jone cinka na specifične lokacije, kao što je slučaj sa jonima bakra, verovatno ne postoji (Blindauer & Schmid, 2010). S druge strane, zbog svoje redoks aktivnosti, održavanje homeostaze bakra u ćelijama podrazumeva učešće solubilnih šaperona koji dopremaju ovaj katjon transporterima kao što su Cu-ATP-aze. Ove pumpe omogućavaju usvajanje bakra i import u kompartmente gde je potreban za sintezu kuproproteina, ali i efluks bakra van ćelija u slučaju supraoptimalnih unutarćelijskih koncentracija (Migočka, 2015). Bakar u obe oksidacione forme ima veliki afinitet za vezivanje liganada koji sadrže azot i sumpor, te citosolne komponente koje učestvuju u kontroli sadržaja bakra predstavljaju jedinjenja male molekulske mase poput glutationa ili proteine sa funkcionalnim grupama amino kiseline poput cisteina, metionina i histidina (Aguirre & Pilon, 2016). Mnoge ključne komponente uključene u promet i održavanje homeostaze bakra kod biljaka su evolutivno visoko konzervisane i najverovatnije su najpre učestvovala u detoksifikaciji gvožđa, koje je u prvim fazama evolucije života na Zemlji bilo dostupnije u anoksičnoj atmosferi i učestvovalo u katalizi i redoks reakcijama organizama pre nego što je bakar postao dostupan. Povećanje koncentracije kiseonika u atmosferi rane Zemlje dovelo je do rastvaranja bakra (I) sulfida i oslobađanja rastvorljive forme bakra (Cu<sup>2+</sup>) iz prethodno nerastvorljivih sulfidnih soli. U takvoj atmosferi, istovremeno je dolazilo i do oksidacije dostupnog Fe na površini Zemlje i formiranja nerastvorljivih oksida gvožđa. Smatra se da su ovakvi uslovi doveli do toga da brojne komponente sistema uključenog u usvajanje gvožđa i održavanje njegove

homeostaze kod biljaka budu prilagođene usvajanju i detoksifikaciji bakra, vodeći postepenoj zameni mnogih enzima koji su sadržali gvožđe, onima koji koriste bakar. Kod današnjih predstavnika biljaka mnogi Cu proteini imaju funkcionalne parnjake koji koriste Fe i mogu funkcionisati kao rezervni mehanizmi u slučaju deficijencije jednog od metala (Krämer & Clemens, 2005; Burkhead *et al.*, 2009).

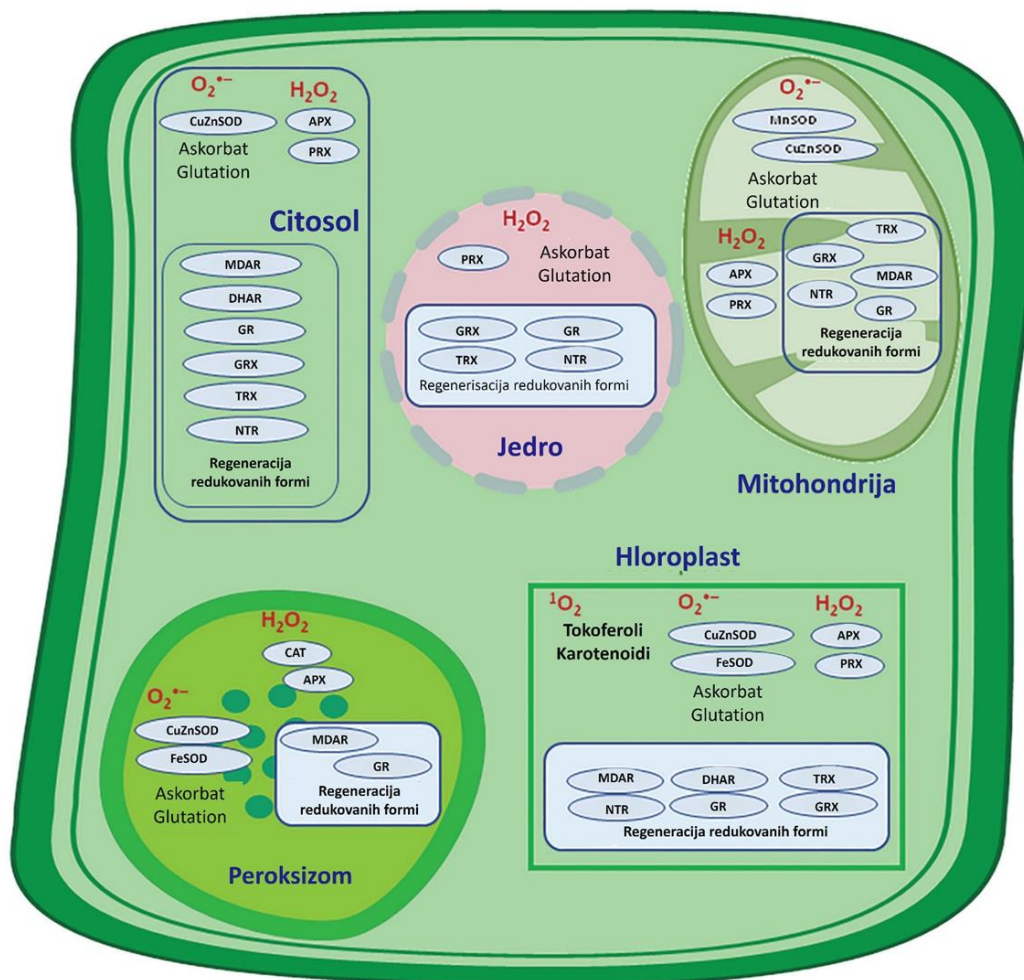
### 1.6.2. Mehanizmi antioksidativne zaštite biljaka

Produkcija značajnih količina reaktivnih kiseoničnih vrsta u različitim delovima biljnih ćelija naročito je naglašena tokom stresnih uslova. Kako bi se suprotstavile štetnim efektima ROS, biljke su razvile efikasni antioksidativni zaštitni sistem koga sačinjavaju neenzimske i enzimске komponente (Slika 14). Neenzimski antioksidanti predstavljaju molekule relativno male molekulske mase, koji imaju sposobnost inhibicije ili gašenja reakcija ROS, sprečavajući ili odlažući oštećenja ćelija. Osim toga, ovi molekuli u manjim koncentracijama nego potencijalni supstrat reaktivnih kiseoničnih vrsta, značajno sprečavaju ili odlažu njegovu oksidaciju. Među najznačajnije antioksidanse biljaka spadaju aminokiseline (npr. cistein i prolin), hidrosikinon, askorbinska kiselina (Asc), fenoli i neproteinski tioli kao što je glutation (GSH), kao i lipofilni antioksidanti poput  $\alpha$ -tokoferola, tokotrienola, alkaloida i karotenoida (Shaw *et al.*, 2004; Michalak, 2006; Dumanović *et al.*, 2021). Uklanjanje ROS posredstvom ovih komponenti postiže se indirektno, helacijom tranzicionih metala i sprečavanjem njihovog učestvovanja u Haber-Weiss i Fenton reakcijama, ili direktno, doniranjem ili primanjem elektrona, uklanjanjem radikala i sprečavanjem reakcija sa biomolekulima. U toku direktne detoksifikacije, stabilizacija antioksidanta koji je donirao ili primio elektron postiže se delokalizacijom  $\pi$ -elektrona ili rezonancijom, i ovo je karakteristično za Asc, fenole i tokoferol. Iako neenzimski antioksidanti mogu sami reagovati sa ROS, efikasnost ovih reakcija je znatno povećana učestvovanjem enzimskih komponenti antioksidativnog sistema, koje dodatno omogućavaju uklanjanje i radikalskih vrsta koje ne mogu biti uklonjene neenzimskim sistemom zaštite. S druge strane, prednost neenzimskih komponenti ogleda se u tome što zbog svoje male veličine mogu difundovati kroz membrane i biti lokalizovani blizu bioloških molekula koji su potencijalna meta ROS (Dumanović *et al.*, 2021).

Najznačajnije enzimске komponente antioksidativne zaštite kod biljaka obuhvataju superoksid dismutaze (SOD), peroksidaze (POD), katalaze (CAT), askorbat peroksidaze (APX), monodehidroaskorbat reduktaze (MDAR), dehidroaskorbat reduktaze (DHAR), glutation reduktaze (GR) i druge (Shaw *et al.*, 2004; Michalak, 2006). Enzimске i neenzimске komponente funkcionišu u bliskoj sprezi kako bi efikasno uklonile ROS, pri čemu se konstantno održava ravnoteža u formiranju i uklanjanju ovih produkata (Shaw *et al.*, 2004).

SOD predstavljaju metaloenzime koji katalizuju brzu konverziju superoksid radikala u vodonik peroksid, smanjujući verovatnoću za nastanak hidroksil radikala posredstvom reakcija katalizovanih metalima (Mittler *et al.*, 2004; Ahmad *et al.*, 2008). Postoje tri tipa SOD kod biljaka, u zavisnosti od katjona kofaktora prisutnog u aktivnom centru enzima. Najzastupljenija izoforma je Cu/Zn-SOD, koja je prisutna u stromi hloroplasta, citosolu, peroksizimima i apoplastu. Mn-SOD se eksprimira u mitohondrijama i peroksizomima, ali se može detektovati i u apoplastu i ćelijskom zidu, dok je Fe-SOD manje zastupljena i eksprimira se u hloroplastima i citosolu (Clijsters *et al.*, 1999; Mittler *et al.*, 2004; Dumanović *et al.*, 2021). Kao metaloenzimi, SOD su osetljive na smanjene količine kofaktornih metala, dok pod dejstvom povećanih koncentracija drugih katjona, njihova aktivnost može biti izmenjena na različite načine. Kadmijum može dovesti do stimulacije aktivnosti Mn-SOD i Fe-SOD, ali inhibirati Cu/Zn-SOD. S druge strane, fitotoksične koncentracije cinka najčešće ne utiču na aktivnost ovog enzima. Efekat bakra, s druge strane, na različite izoforme SOD razlikuje se kako među biljnim vrstama, tako i među izoformama i delovima biljke u kojima je ispitivan (Clijsters *et al.*, 1999).

Regulisanje količine unutarćelijskog  $H_2O_2$  postiže se učešćem dvaju enzima – katalazama i peroksidazama. Katalaze su dominantno lokalizovane u peroksisomima gde efikasno uklanjaju vodonik peroksid u direktnoj reakciji sa njim, produkujući vodu i molekularni kiseonik. S druge strane, katalaze nisu prisutne u hloroplastima i odlikuju se niskom aktivnošću prema organskim peroksidima (Dumanović *et al.*, 2021). Generalno, efekti citotoksičnih koncentracija metala na katalaze su nedovoljno istraženi (Clijsters *et al.*, 1999).



**Slika 14.** Lokalizacija ROS i glavnih komponenti antioksidativnog sistema biljaka u ćeliji (modifikovano prema Dumanović *et al.*, 2021).

Za razliku od katalaza, peroksidaze zahtevaju donore elektrona (antioksidante) male molekulske mase, poput Asc ili GSH, kako bi uklanjale vodonik peroksid, te ovaj proces može biti jako energetski zahtevan (Kohen & Nyska, 2002). Peroksidaze se generalno dele na tri klase, pri čemu su kod biljaka prisutne peroksidaze klase I (askorbat peroksidaze) i peroksidaze klase III (gvajakol peroksidaze, GPX) (Clijsters *et al.*, 1999; Jouili *et al.*, 2011; Dumanović *et al.*, 2021). Askorbat peroksidaze su prisutne u stromi i tilakoidima hloroplasta, glioksizomima i peroksisomima, citosolu i mitohondrijama, što ukazuje na značaj njihove uloge u uklanjanju  $H_2O_2$ . S druge strane, APX nisu efikasne u uklanjanju lipidnih hidroperoksida i u odsustvu askorbata su jako osetljive na inaktivaciju oksidacijom. Peroksidaze klase III (POX; POD) su glavni enzimi uključeni u uklanjanje vodonik peroksida u apoplastu i vakuolama svih biljaka (Jouili *et al.*, 2011; Veljović-Jovanović *et al.*, 2018; Dumanović *et al.*, 2021). Supstrati endogenih POX su donori elektrona za  $H_2O_2$  i većina njih pripada sekundarnim metabolitima kao što su fenoli, indoli ili amini. Oksidacija fenola vodonik peroksidom katalizovana POX uključuje stvaranje fenoksil radikala, koji potom ili polimerizuju ili bivaju redukovani askorbatom u PPA (eng. POXs/Phenolics/Asc, PPA) sistemu za uklanjanje  $H_2O_2$ . Osim toga, ova klasa peroksidaza ima ključnu ulogu u komunikaciji između primarnih (npr. askorbat) i sekundarnih antioksidanata (npr. fenoli). Finalni oksidacioni

produkt POX reakcija sa istim fenolnim jedinjenjem, zavisi od lokalizacije izoforme. U slučaju ekstracelularnih peroksidaza klase III, one koje su vezane za matriks ćelijskog zida, smatra se da učestvuju u lignifikaciji polimerizacijom fenola, dok solubilne izoforme POX funkcionišu u uklanjanju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Veljović-Jovanović *et al.*, 2018). Do indukcije peroksidaza dolazi usled raznih sredinskih stresova, uključujući citotoksične koncentracije metala, te se ovi enzimi mogu smatrati jednim od indikatora stresa metalima i korišćene su kao bioindikatora zagađenja sredine još od 1974. godine (Jouili *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2011; Dumanović *et al.*, 2021).

**Fenoli.** Fenoli predstavljaju raznovrsnu grupu sekundarnih metabolita biljaka. Svi su sačinjeni iz aromatičnog prstena (C<sub>6</sub>) vezanog za minimum jednu (fenoli) ili više (polifenoli) hidroksilnih grupa, i dodatne supstituente, poput metoksil ili karboksil grupa, koje daju polarni karakter ovim jedinjenjima i omogućavaju rastvaranje u vodi. Fenoli se mogu generalno podeliti na proste fenole i kompleksne derivate, koji često sadrže nekoliko aromatičnih prstenova povezanih međusobno. Aromatični prsten fenola sintetiše se u putu šikiminske kiseline, uklanjanjem amino grupe fenilalaninu i stvaranjem cimetine kiseline, polaznog molekula za sintezu drugih fenola. Zbog bočnog lanca sačinjenog od tri atoma ugljenika prikačenog za aromatični prsten, cimetna kiselina i njeni derivati nazivaju se fenilpropanoidi i najčešće imaju zaštitne uloge u ćelijama, pri čemu su njihov sadržaj i stopa metabolizma u stresnim uslovima kao što su toksične količine metala, najčešće povećani (Kubalt, 2016; Sharma *et al.*, 2019). Fenolne supstance, zajedno sa peroksidazama mogu imati značajnu ulogu protiv oksidativnog stresa indukovano povećanim koncentracijama metala kao što je bakar (Kubalt, 2016). Fenoli mogu donirati elektrone gvajakol peroksidazama omogućavajući detoksifikaciju vodonik peroksida nastalog u stresnim uslovima. Signali rezonance elektronskog spina fenoksil radikala mogu biti uklonjeni pod dejstvom enzima monodehidroaskorbat (MDHA) reduktaze, ukazujući da ovi radikali, kao i askorbat radikal, bivaju enzimski reciklirani u originalni fenol, sugerišući da u biljnim ćelijama fenoli formiraju antioksidativni sistem sličan onom koji je karakterističan za askorbat, kao jedan od najznačajnijih antioksidanata. S druge strane, pokazano je da u nekim uslovima cink, bakar, magnezijum i kadmijum mogu stimulisati fenoksil radikal indukovanu lipidnu peroksidaciju (Syta *et al.*, 2013). Antioksidativni kapacitet fenola u vezi je sa njihovom strukturom (aromatični prsten sa –OH ili –OCH<sub>3</sub> supstituentima) koja im omogućava „hvatanje“ slobodnih radikala. Oni imaju veliki kapacitet da doniraju elektron ili atom vodonika, ali takođe, i sposobnost da brzo stabilizuju formirani fenol radikal, što im omogućava da, bar u sistemima *in vitro*, imaju veću antioksidativnu aktivnost u poređenju sa Asc i tokoferolom (Kubalt, 2016; Dumanović *et al.*, 2021). Dodatno, antioksidativni kapacitet fenola u uslovima stresa metalima zasniva se i na „hvatanju“ lipidnih alkoksi radikala nastalih raspadanjem lipidnih hidroperoksida (LOOH) pod dejstvom metala i sprečavanju lančane reakcije oksidacije (Michalak, 2006).

Fenoli mogu doprineti smanjenju štetnih efekata metala i direktnom helacijom jona kao što su gvožđe i bakar, usled prisustva hidroksilnih i karboksilnih grupa. Aktivnost fenola zavisi od strukture molekula, broja i pozicije hidroksilnih grupa. Osim primarnih antioksidativnih svojstava, fenoli poput flavonoida vezivanjem za membranske proteine i fosfolipide stabilizuju membrane i dovode do smanjenja njihove fluidnosti. Ovo za posledicu ima smanjenu difuziju radikalskih vrsta i smanjenje lipidne peroksidacije bioloških membrana. Osim toga, transformacijama fenilpropanoida mogu nastati lignin i suberin, koji dovode do mehaničkog ojačavanje ćelijskih zidova. Biosinteza fenolnih prekursora lignina pojačana je u stresnim uslovima kao što su toksične koncentracije metala, te peroksidaze koje učestvuju u biosintezi lignina a koje koriste fenole kao supstrate, na ovaj način mogu omogućiti i stvaranje fizičke barijere protiv toksičnih količina metala kao što je kadmijum (Michalak, 2006; Kubalt, 2016).

**Karotenoidi.** Karotenoidi predstavljaju izoprenoidna jedinjenja, sačinjena od osam izoprenskih jedinica, koje daju osnovnu strukturu karotenoida od 40 C atoma. Dejstvom različitih enzima poput ciklaza, hidroksilaza, ketolaza i drugih, nastaje ogroman broj strukturno različitih karotenoida. Dve osnovne klase ovih pigmenta čine neoksigenisani karotenoidi (karoteni) i derivati karotena koji sadrže kiseonik (ksantofili). Zahvaljujući različitom broju konjugovanih dvostrukih

veza (3-13), karotenoidi imaju sposobnost apsorpcije svetlosti 450–570 nm, koja se preklapa sa apsorpcionom rupom hlorofila, zbog čega imaju ulogu pomoćnih pigmenata u fotosintezi (Havaux, 2014). Osim ove funkcije, karotenoidi imaju ulogu i u fotoprotekciji. Sistem konjugovanih dvogubih veza omogućava laku apsorpciju energije ekscitiranih molekula od strane karotenoida i rasipanje viška u vidu toplotne energije. Značajna uloga karotenoida u fotoprotekciji fotosintetske mašinerije ostvaruje se kroz ksantofilni ciklus (Shaw *et al.*, 2004; Sytar *et al.*, 2013; Singh & Thakur, 2018). Oni predstavljaju utišivače tripletnih ( $^3\text{Chl}$ ) hlorofila, koji nemaju ulogu u fotosintezi, ali znatno duže ostaju pobuđeni od singletnog hlorofila, te imaju veću šansu za interakciju sa molekulskim kiseonikom i produkciju singlet kiseonika. Dodatno, učestvuju i u gašenju ekscitovanog hlorofila ( $\text{Chl}^*$ ) (Shaw *et al.*, 2004; Dumanović *et al.*, 2021). Pored ovoga, karotenoidi učestvuju i u gašenju  $^1\text{O}_2$ , koji predstavlja glavnu formu ROS produkovanu u biljkama u uslovima jakog osvetljenja i abiotičkih stresova, kao što su toksične koncentracije metala. Pored toga, imaju ulogu u stabilizaciji lipidnog dvosloja membrana zahvaljujući svojoj rigidnoj okosnici koja sadrži sistem konjugovanih dvostrukih veza (Havaux, 2014). Naročito značajna uloga karotenoida u zaštiti od oksidativnog stresa ogleda se u njihovom efikasnom uklanjanju lipidnog peroksid radikala ( $\text{LOO}\cdot$ ), čime omogućavaju zaštitu membranama u biljnoj ćeliji. U ovom procesu, karotenoidi reaguju sa  $\text{LOO}\cdot$  i daju lipidne hidroperokside, dok se karotenoid radikal regeneriše pomoću tokoferola ili askorbata (Dumanović *et al.*, 2021). Iako je toksični efekat metala na hlorofile ispitivan i potvrđen kod velikog broja biljnih vrsta, uticaj metala na karotenoide je znatno manje istražen i dosadašnje studije, u zavisnosti od biljnih vrsta i metala pokazuju različite obrasce efekata na njihov sadržaj, koji mogu biti posledica njihove dvostruke uloge u fotosintetskoj mašineriji (Souri *et al.*, 2019).

### **1.6.3. Održavanje homeostaze i mehanizmi zaštite od toksičnog dejstva metala kod mahovina**

Smatra se da su toksični efekti povišenih koncentracija metala u ćelijama mahovina pretežno rezultat akumulacije ovih elemenata u unutarćelijskoj frakciji, dok metali lokalizovani u ekstra- ili interćelijskom prostoru nemaju direktan efekat na ćelijski metabolizam (Fernández *et al.* 2006). Stoga, mahovine kao i vaskularne biljke, otpornost prema toksičnim dozama metala zasnivaju na sadejstvu mehanizama isključivanja i tolerancije (Stanković *et al.*, 2018). Mahovine nemaju korenov sistem ili dovoljno razvijenu kutikulu koji bi funkcionisali kao barijera metalima iz okruženja, već najveći deo supstanci iz sredine usvajaju celom svojom površinom (Sassmann *et al.*, 2015b; Antreich *et al.*, 2016). Zbog ovoga, isključivanje metala kod mahovina podrazumeva sve mehanizme na nivou pojedinačnih ćelija koji sprečavaju ulazak toksičnih količina metala u protoplast (Krzesłowska *et al.*, 2013). Smatra se da modifikacija morfoloških karakteristika koje utiču na kapacitet zadržavanja katjona, modifikacija stepena metilacije galakturonskih kiselina, kao i promena količine i aktivnosti membranskih transportera metala, koji su odgovorni za prenos ovih elemenata između citoplazme i spoljašnjosti ćelije predstavljaju glavne načine isključivanja metala iz ćelija mahovina (Boquete *et al.*, 2014b). Naročito značajnu ulogu u ovom procesu ima ćelijski zid, koji osim što predstavlja primarno mesto adsorpcije katjona, takođe može uticati na njihovu desorpciju mehanizmima kao što je vezivanje različitih netoksičnih katjona normalno prisutnih u ćelijama ili okruženju, stvarajući nepovoljne uslove za vezivanje i usvajanje drugih potencijalno štetnih metala (Wells *et al.*, 1995).

Nasuprot mehanizma izbegavanja, tolerancija na stres metalima podrazumeva neutralizaciju ovih elemenata ili njihovih toksičnih efekata, kao i redistribuciju iz citosola u kompartmente poput vakuole i ćelijskog zida. GSH kao glavni transportni i rezervni oblik redukovano sumpora može biti direktno uključen u vezivanje metala ili indirektno kao supstrat za sintezu fitohelatina. Pokazano je da kod jetrenjača fitohelatini imaju ulogu u detoksifikaciji elemenata kao što je kadmijum, međutim, njihova sinteza i uloga kod mahovina u ovom procesu nije potvrđena (Bruns *et al.*, 2001; Carginale *et al.*, 2004; Degola *et al.*, 2014). Izlaganje različitih vrsta mahovina hlorodnim solima metala poput kadmijuma, bakra i cinka, pokazalo je da do indukcije sinteze fitohelatina ne dolazi (Bruns *et al.*, 2001). S druge strane, isto istraživanje je pokazalo da se akumuliraju druge



tiolne supstance, naročito glutation. Osim toga, pokazano je da mahovine koje rastu u oblastima sa visokim stepenom zagađenja metalima, takođe poseduju povišene nivoe glutationa, ukazujući na to da on, a ne fitohelatini, može imati primarnu ulogu u heliranju metala i sprečavanju njihovih toksičnih efekata (Varela *et al.*, 2018). Za razliku od PC, kod nekih mahovina, uključujući model organizam *P. patens*, detektovani su geni za metalotioneine, koji su u transformisanom kvascu doveli do razvoja otpornosti na stres kadmijumom (Bellini *et al.*, 2021). Osim toga, akumulacija alifatičnih organskih kiselina, kao što su jabučna i sirćetna, takođe je detektovana u odgovoru na izlaganje povećanim koncentracijama metala poput kadmijuma, ukazujući na njihovu potencijalnu helirajuću ulogu kod mahovina (Kováčik *et al.*, 2020).

Mahovine poseduju i efikasan sistem antioksidativne zaštite koji omogućava uklanjanje slobodnih radikala i štetnih posledica njihovog delovanja nastalih pri toksičnim koncentracijama metala (Zengin & Munzuroglu 2005). Sun *et al.* (2009, 2010) su pokazali da peroksidaze predstavljaju glavne enzime uključene u odgovor mahovine *Hypnum plumaeforme* na stres metalima kao što su olovo i nikel, pri čemu je detektovana aktivnost bila proporcionalna dozi primenjenih metala. Osim toga, detektovan je i sinergistički efekat ovih metala na aktivnost POD. S druge strane, u odgovoru na nikel i olovo, detektovan je povećan sadržaj askorbata i prolina, ukazujući na to da ove neenzimske komponente kod mahovina mogu imati značajnu ulogu u uklanjanju ROS i očuvanju membrana u uslovima oksidativnog stresa. U istraživanju efekta bakra na aktivnost antioksidativnih enzima mahovine *Plagiomnium cuspidatum* (Hew.) T. Kop., Wu *et al.* (2009) su pokazali da pri visokim koncentracijama ovog metala dolazi do značajnog povećanja aktivnosti gvajakol peroksidaza, dok aktivnost askorbat peroksidaze najpre blago raste i zatim drastično opada pri najvišoj koncentraciji ovog elementa. U istraživanju Dazy *et al.* (2009) izlaganje vodene mahovine *F. antipyretica* povećanim koncentracijama bakra, cinka i kadmijuma dovelo je do povećanja aktivnosti enzima APX i GPX u odnosu na one detektovane kod kontrolnih biljaka. Takođe, pokazano je da je APX nespecifično indukovano dejstvom metala, dok je efekat na aktivnost GPX zavistan od tipa primenjenog metala. Ispitujući efekat bakra, cinka i kadmijuma kod mahovina *T. taxirameum* i *E. eustegium*, Chen *et al.* (2015a) su detektovali porast aktivnosti POD u slučaju bakra i cinka, dok je kadmijum doveo do njihove inhibicije. Porast aktivnosti gvajakol peroksidaze u mahovni *Polytrichum commune* Hedw. tretiranoj cinkom ili bakrom detektovali su i Panda & Choudhury (2005). S druge strane, rezultati istraživanja Chen *et al.* (2015b) pokazali su da u odgovoru mahovine *T. taxirameum* na povećane koncentracije bakra dolazi do inhibicije aktivnosti POD enzima. Osim tipa katjona, na obrasce aktivnosti individualnih enzima, pokazano je da utiču i dužina trajanja i primenjena koncentracija metala (Dazy *et al.*, 2009; Saxena & Saiful-Arfeen, 2009).

Mahovine se karakterišu velikom raznovrsnošću biološki aktivnih supstanci kao što su fenolna jedinjenja, alkaloidi, flavonoidi i terpenoidi (Mohandas & Kumaraswamy 2018; Gahtori & Chaturvedi, 2019). Iako ove supstance, naročito fenoli, imaju značajnu ulogu u zaštiti od oksidativnih oštećenja kod traheofita i učestvuju u odgovoru na stres izazvan metalima, istraživanja vezana za efekat toksičnih koncentracija metala na sintezu i količinu ovih supstanci kod mahovina nedostaju.

Mahovine imaju veliku primenu u biomonitoringu zagađenja metalima vazdušne i vodenih sredina. Jedna od važnih karakteristika koja ovu grupu biljaka čini pogodnom za ovakva istraživanja je svojstvo apsorpcije rastvorenih supstanci iz okruženja čitavom površinom tela. Uprkos ovome, postoji jako malo podataka o sposobnosti mahovina da usvajaju metale iz podloge na kojoj rastu, o distribuciji metala unutar gametofora, kao i o efektima povišenih koncentracija metala u podlozi na rasteenje i razviće ovih biljaka. Naročito nedostaju informacije o ovim procesima iz istraživanja u kontrolisanim akseničnim laboratorijskim uslovima. Imajući ovo u vidu, kao i činjenicu da mahovine različitih formi rasta često ispoljavaju različitu otpornost prema specifičnim sredinskim faktorima, u ovom istraživanju testiran je odgovor jedne pleurokarpne i jedne akrokarpne mahovine u laboratorijskim *in vitro* uslovima na povećane koncentracije metala u podlozi.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Glavni ciljevi ovog istraživanja bili su:

- Definisanje morfogenetskog odgovora mahovina *H. cupressiforme* i *A. undulatum* u uslovima dugotrajnog i kratkotrajnog stresa izazvanog metalima u kulturi *in vitro*;
- Utvrđivanje biohemijskih i fizioloških parametara odgovora mahovina *H. cupressiforme* i *A. undulatum* u uslovima stresa izazvanog metalima;
- Određivanje sposobnosti akumulacije metala iz podloge kod dve odabrane vrste mahovina sa različitim formama rasta;
- Određivanje distribucije i specifičnih koncentracija odabranih metala kod ispitivanih vrsta mahovina gajenih na podlogama sa dodatkom acetatnih soli odabranih metala;
- Definisanje obrazaca akumulacije metala kod dve ispitivane vrste mahovina sa različitim formama rasta;
- Utvrđivanje tolerancije, rezistencije i osetljivosti dve odabrane vrste mahovina na stres metalima.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Odabir vrsta

S obzirom na značajnu ulogu mahovina kao bioloških modela u monitoringu zagađenja životne sredine toksičnim metalima, odabir adekvatne vrste predstavlja jedan od ključnih koraka pri dizajniranju ovih istraživanja (Galsomiès *et al.*, 2003). Analiza sadržaja metala u tkivima mahovina jedan je od osnovnih pristupa u ovim studijama koji omogućava procenu prisutnosti datih polutanata u okruženju. Istovremenim praćenjem morfoloških, fizioloških i biohemijskih parametara mahovina mogu se dobiti komplementarne informacije o uticaju određenog tipa zagađenja na organizme koji su mu izloženi (Fabure *et al.*, 2010). U severnoj i centralnoj Evropi najčešće korišćene vrste mahovna za praćenje atmosferskog zagađenja metalima su pleurokarpne vrste *H. splendens*, *P. schreberi*, *H. cupressiforme* i *P. purum* (Galsomiès *et al.*, 2003; Izquieta-Rojano *et al.*, 2016). Međutim, pleurokarpne vrste su generalno osetljivije na duže sušne periode u poređenju sa akrokarpnim vrstama (Gerdol *et al.*, 2002). Zbog toga, u mnogim oblastima južne Evrope i mediteranskog biogeografskog regiona, kao i urbanim sredinama, upotreba pleurokarpnih vrsta u biomonitoringu ograničena je ekološkim uslovima koji utiču na njihovo rasprostranjenje (Galsomiès *et al.*, 2003; Izquieta-Rojano *et al.*, 2016). Primena akrokarpnih vrsta može predstavljati alternativni pristup koji bi omogućio monitoring i onih sredina u kojima standardno korišćene pleurokarpe nisu prisutne (Gerdol *et al.*, 2002; Cowden *et al.*, 2015). Značajne morfološke, fiziološke i ekološke razlike između ove dve grupe potencijalno vode različitim obrascima akumulacije metala. Imajući ovo u vidu, rezultati dobijeni u studijama koje koriste mahovine različitih formi rasta često nisu uporedivi (Fabure *et al.*, 2010; Izquieta-Rojano *et al.*, 2016).

Kako bi se omogućila primena većeg broja vrsta mahovina u studijama zagađenja sredine, kao i upotreba novih vrsta u oblastima gde tradicionalano korišćene vrste nisu zastupljene ili ne opstaju, neophodna je precizna karakterizacija odnosa između koncentracije metala u sredini i u biljci, kao i interspecijska kalibracija u odnosu na praćene parametre (Fabure *et al.*, 2010). Mali broj istraživača bavio se direktnim poređenjem apsorpcionog kapaciteta pleurokarpnih i akrokarpnih vrsta (Fabure *et al.*, 2010; Cowden *et al.*, 2015; Gorelova *et al.*, 2016; Sabovljević *et al.*, 2018b; Sergeeva *et al.*, 2021), dok ispitivanja u kontrolisanim laboratorijskim uslovima koja direktno porede efekte različitih metala na mahovine ove dve grupe trenutno nedostaju. Stoga, za ovo istraživanje odabrane su dve široko rasprostranjene vrste različitih formi rasta – pleurokarpna mahovina *H. cupressiforme* i akrokarpna vrsta *A. undulatum*. Cilj je da se utvrde i uporede obrasci akumulacije i distribucije metala u biljkama, kao i njihov efekat na ekofiziološke parametre mahovina u uslovima *in vitro*.

#### 3.2. Biljni materijal i uslovi gajenja

Kao polazni biljni materijal u ovom istraživanju korišćene su kulture gametofita vrsta *H. cupressiforme* i *A. undulatum* dobijene iz *in vitro* kolekcije mahovina Beogradske Grupe za Biologiju Briofita (BBGB), Instituta za Botaniku i Botaničke bašte „Jevremovac“. Primarne kulture ove dve vrste uspostavljene su korišćenjem spora iz sporofita sakupljenih na dva različita lokaliteta u Srbiji, u zavisnosti od vrste, prema protokolima opisanim u Sabovljević *et al.* (2006) i Vujičić *et al.* (2011). Kako bi se sakupila dovoljna količina uniformnog biljnog materijala za eksperimentalne postavke i eliminisali potencijalni efekti kohabitirajućih organizama na rastenje i razviće biljaka pre i u toku eksperimenata, korišćene su tehnike *in vitro* propagacije koje su podrazumevale manipulaciju i umnožavanje mahovina u aseptičnim i kontrolisanim laboratorijskim uslovima, na precizno definisanim hranljivim podlogama. Kao eksplantati u ovom istraživanju korišćeni su gametofori dve odabrane vrste. Na ovaj način produkovane su genetički identične biljke u okviru iste vrste koje odgovaraju divljem tipu (Slika 15-1). Preliminarnim eksperimentima sa različitim tipovima hranljivih podloga (medijuma za gajenje), za *H. cupressiforme* i *A. undulatum* pojedinačno, ustanovljeni su vrsta podloge i dužina intervala između dve subkultivacije, tako da omoguće optimalno razviće i produkciju što većeg broja gametofora u toku svakog ciklusa umnožavanja. Subkultivacija gametofora obe vrste pre početka eksperimenata vršena je u

intervalima od šest nedelja. U slučaju *H. cupressiforme*, izdanci su gajeni na modifikovanom KNOP medijumu (Reski & Abel, 1985), koji je osim dodatka 0,70% (w/v) agara sadržavao 1,5% (w/v) saharoze (KNOP S/2 medijum). Sastav i količine pojedinačnih komponenti ove podloge prikazani su u Tabelama 3 i 4.

**Tabela 3.** Koncentracije soli u štokovima rastvora korišćenim za pripremu KNOP medijuma.

So	Količina (g/l)
Kalijum hlorid (KCl)	25
Magnezijum sulfat septahidrat ( $MgSO_4 \times 7H_2O$ )	25
Monokalijum fosfat ( $KH_2PO_4$ )	25
Kalcijum nitrat ( $Ca(NO_3)_2$ )	100
Gvožđe-(II)-sulfat septahidrat ( $FeSO_4 \times 7H_2O$ )	0,0125

**Tabela 4.** Količine komponenti potrebnih za pripremu 1l čvrstog KNOP S/2 medijuma.

Supstanca	Količina za 1l medijuma
Štok rastvora KCl	10 ml
Štok rastvora $MgSO_4 \times 7H_2O$	10 ml
Štok rastvora $KH_2PO_4$	10 ml
Štok rastvora $Ca(NO_3)_2$	10 ml
Štok rastvora $FeSO_4 \times 7H_2O$	50 ml
Agar	8 g
Saharoza	15 g
Voda	Do 1000 ml

U slučaju *A. undulatum*, izdanci su gajeni na čvrstom MS medijumu (Murashige & Skoog, 1962) (Tabele 5-7) dvostruko manje koncentracije svih komponenti u odnosu na standardnu recepturu, uz dodatak 0,80% (w/v) agara i 1,5% (w/v) saharoze (MS/2 S/2 medijum – Tabela 8). Ukupna koncentracija mikro- i makroelemenata, uključujući vitamine, MS medijuma iznosi 4405,19 mg/l.

Sterilizacija medijuma vršena je autoklaviranjem na 121°C u trajanju od 30 minuta, pri pritisku od 0,067 MPa (0,8 atm), nakon čega su razlivani u sterilne plastične Petri kutije prečnika 90mm. Pre autoklaviranja, pH vrednost svih medijuma, podešavana je na 5,8. Razlivanje medijuma i manipulacija eksplantatima vršeni su u laminarnoj komori sa horizontalnim strujanjem sterilnog vazduha, čije površine su pre početka rada prebrisane 96% etanolom. Svi instrumenti koji su korišćeni za manipulaciju biljnim materijalom sterilisani su iskuvavanjem u destilovanoj vodi u trajanju od 30 minuta neposredno pre rada u laminaru,. Nakon iskuvavanja, instrumenti su čuvani u posudi sa 96% etanolom u laminaru, i pre svake manipulacije biljkama sterilisani nad plamenom špiritusne lampe u laminarnoj komori.

**Tabela 5.** Koncentracije makro soli u 1L MS medijuma.

<b>Makro soli</b>	<b>Koncentracija (mg/l hranljive podloge)</b>
Amonijum nitrat (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	1650
Kalijum nitrat (KNO <sub>3</sub> )	1900
Monokalijum fosfat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	170
Kalcijum hlorid (CaCl <sub>2</sub> )	332,2
Magnezijum sulfat (MgSO <sub>4</sub> )	180.54

**Tabela 6.** Koncentracije mikro soli u 1L MS medijuma.

<b>Mikro soli</b>	<b>Koncentracija (mg/l hranljive podloge)</b>
Borna kiselina (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	6,2
Mangan sulfat monohidrat (MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O)	16,9
Cink sulfat septahidrat (ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	8,6
Bakar sulfat pentahidrat (CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O)	0,025
Natrijum mangamat dihidrat (Na <sub>2</sub> MnO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	0,025
Kobalt hlorid heksahidrat (CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O)	0,025
FeNaEDTA	36,70
Kalijum jodid (KI)	0,83

**Tabela 7.** Koncentracije vitamina u 1L MS medijuma.

<b>Vitamini</b>	<b>Koncentracija (mg/l hranljive podloge)</b>
Nikotinska kiselina	0,5
Mio-inozitol	100
Piridoksin hlorid	0,5
Tiamin hlorid	0,1
Glicin	2

**Tabela 8.** Sastav 1L čvrstog MS/2 S/2 medijuma.

<b>Supstanca</b>	<b>Količina u 1l podloge</b>
MS prah	2,2 g
Agar	8 g
Saharoza	15 g
Voda	1l

Sve biljke, u toku umnožavanja i eksperimenata gajene su u akseničnim, *in vitro* uslovima pri temperaturi od  $18 \pm 2^\circ\text{C}$ , vlažnosti 60-70%, u uslovima dugog dana (16h svetlo, 8h mrak) pri beloj fluorescentnoj svetlosti (fluorescentne cevi „Tesla“ Pančevo, 65W, fluksa  $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ).

### 3.3. Dizajn eksperimenta

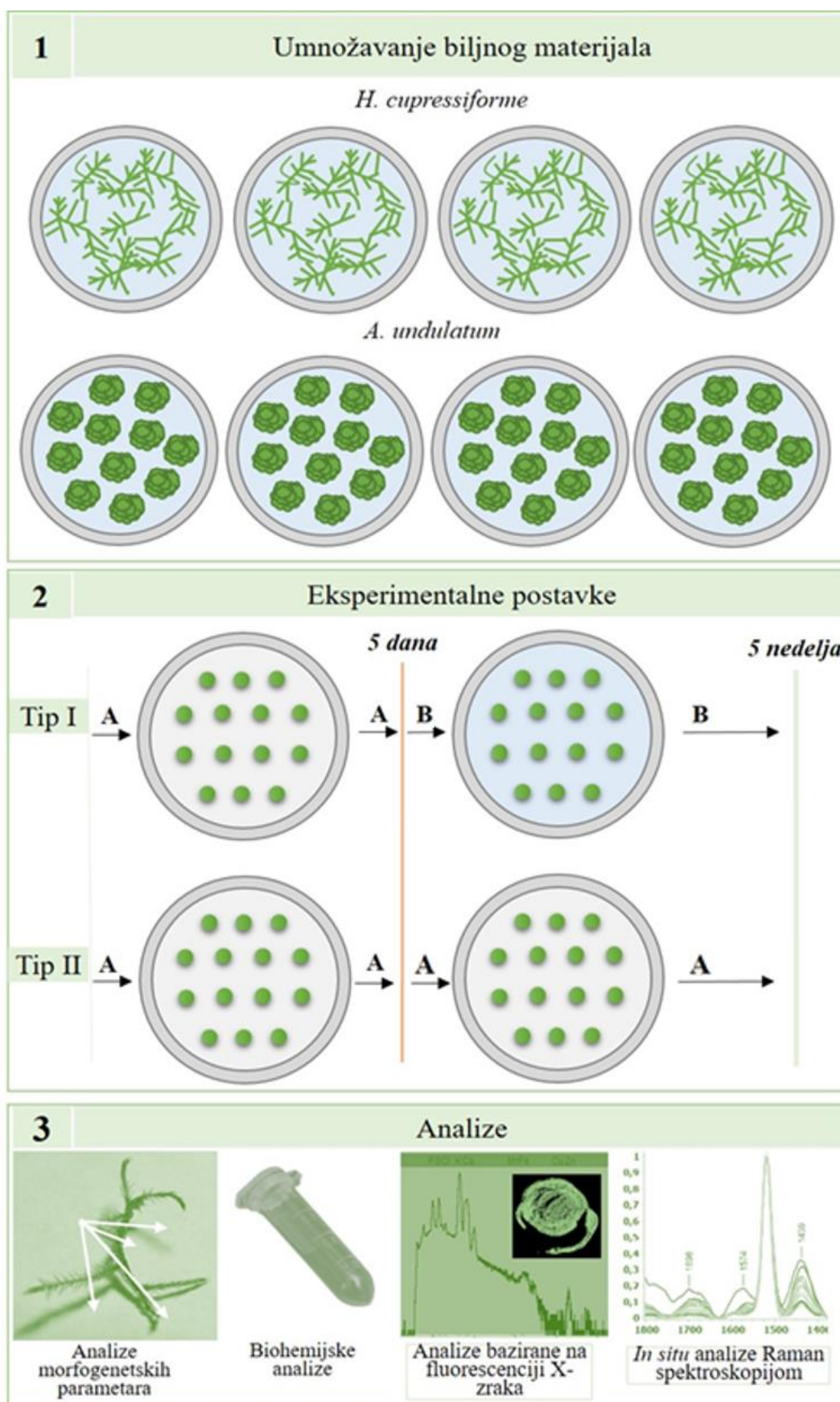
U ovom istraživanju praćen je uticaj vrste metala i njihovih koncentracija u supstratu, kao i uticaj trajanja stresa na ekofiziološke parametre i obrasce akumulacije različitih elemenata u gametoforima dve vrste mahovina, koje se karakterišu različitim formama rasta. Izlaganje biljaka odabranim metalima postignuto je gajenjem na čvrstom KNOP medijumu uz dodatak cink-acetat dihidrata ( $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2$ ), bakar-acetata ( $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ) ili kadmijum-acetat dihidrata ( $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2(\text{H}_2\text{O})_2$ ) finalnih koncentracija 200 ili 700  $\mu\text{M}$  u supstratu. Koncentracije metala korišćene u ovom istraživanju selektovane su na osnovu preliminarnih eksperimenata i ranijih studija sa datim vrstama (Sabovljević *et al.*, 2018a), kako bi se postigla uporedivost rezultata. Kao eksplantati u postavkama eksperimenata korišćeni su isključivo apikalni delovi gametofora dužine 10mm, koji su pozicionirani vertikalno u odnosu na površinu medijuma, tako da je donja polovina (4-5mm) uronjena u medijum, dok ostali deo biljke nije u kontaktu sa medijumom.

U odnosu na dužinu trajanja izlaganja biljaka povećanim koncentracijama metala u medijumu razlikuju se dva tipa nezavisnih eksperimenata (Slika 15-2). Prvi tip (tip I, kratkotrajni stres), obuhvata eksperimentalne postavke u kojima je ispitivan odgovor biljaka na kratkotrajni stres solima metala. U ovim eksperimentima, eksplantati individualnih vrsta gajeni su u Petri kutijama na čvrstom KNOP medijumu obogaćenom sa 200 ili 700  $\mu\text{M}$  Zn-, Cu- ili Cd-acetatom u trajanju od 5 dana. Nakon ovog perioda, biljke su prebacivane u Petri kutije koje su sadržale samo minimalni KNOP medijum, bez dodatka soli metal-acetata, gde su gajene do isteka pet nedelja od početka inicijalnog izlaganja cinku, bakru ili kadmijumu. Kontrolnu grupu predstavljale su biljke gajene na čvrstom KNOP medijumu bez dodatka cinka, bakra ili kadmijuma, koje su nakon pet dana takođe prebacivane u Petri kutije sa svežim minimalnim KNOP medijumom i gajene do isteka perioda od ukupno pet nedelja od početka eksperimenta.

Drugi tip eksperimenta (tip II, dugotrajni stres) obuhvata postavke u kojima je ispitivan odgovor gametofora na dugotrajno izlaganje povećanim koncentracijama cinka, bakra ili kadmijuma u podlozi. Ovo je postignuto gajenjem eksplantata u trajanju od pet nedelja u kontinuitetu na čvrstom KNOP medijumu uz dodatak odabranih metala u vidu acetatnih soli tako da njihove finalne koncentracije u medijumu budu 200 ili 700  $\mu\text{M}$ . Kontrolnu grupu činile su biljke gajene na minimalnom KNOP medijumu bez dodatka cinka, bakra ili kadmijuma u trajanju od pet nedelja.

U zavisnosti od vrste analiza, faktori (nezavisno promenljive) čiji je uticaj na odabrane parametre (zavisno promenljive) ispitivan u ovom istraživanju bili su: vrsta mahovine (dva nivoa - *A. undulatum* i *H. cupressiforme*), vrsta metala (tri nivoa - cink, bakar i kadmijum), koncentracija metala (tri nivoa - 0, 200 i 700  $\mu\text{M}$ ), dužina stresa (dva nivoa - kratkotrajni i dugotrajni stres) i tip preseka gametofora (dva nivoa - apikalni i bazalni). Svaka kombinacija pojedinačnih nivoa različitih faktora definisana je kao tretman. U zavisnosti od vrste analiza i ispitivanih parametara za svaki tretman postavljan je isti broj Petri kutija sa jednakim brojem eksplantata. Takođe, u zavisnosti od daljih analiza, biljni materijal je sakupljan i čuvan na različite načine.





**Slika 15.** Šematski prikaz dizajna istraživanja. 1- Umnožavanje biljnog materijala; 2- Eksperimentalne postavke sa dva tipa eksperimenata u odnosu na dužinu trajanja stresa (Tip I – kratkotrajni; Tip II - dugotrajni), A- KNOP medijum sa različitim vrstama (cink, bakar, ili kadmijum) i koncentracijom metala (0, 200, 700 $\mu$ M), B – minimalni KNOP medijum; 3 – Različiti tipovi čuvanja i analiza biljnog materijala.

### 3.4. Morfogenetske analize

Po završetku gajenja biljaka u eksperimentalnim postavkama (nakon pet nedelja), za svaku vrstu nezavisno praćeni su preživljavanje (procentualni odnos broja preživelih biljaka i ukupnog broja biljaka na početku eksperimenta) i parametri morfogeneze - pojava i prećnik sekundarne protoneme i indeks multiplikacije (broj novoformiranih izdanaka koji su se razvili sa početnog eksplantata). Za analizu morfogenetskih parametara za svaku kombinaciju nivoa faktora (ukupno 36) postavljeno je po 4 Petri kutije sa po 12 eksplantata ( $n=48$  biljaka). Praćenje ovih parametara vršeno je korišćenjem stereomikroskopa (Leica MZ 7,5 Bi-Optic Inc., Santa Clara, California, USA).

### 3.5. Biohemijske analize

Po završetku eksperimenata, biljke su pincetom vađene iz medijuma, kratko prebacivane u staklenu Petri kutiju sa dejonizovanom vodom kako bi se uklonili ostaci medijuma, sušene blagim i kratkim kontaktom sa ubrusom i odlagane u ependorf tube. Ovako sakupljen biljni materijal je zatim smrznut uranjanjem tuba u tećni azot i ćuvan u zamrzivaću na  $-70^{\circ}\text{C}$  do odgovarajućih biohemijskih analiza.

#### 3.5.1. Analiza sadržaja fotosintetićkih pigmenata UV/VIS spektrofotometrijom

Za analizu sadržaja fotosintetićkih pigmenata (hlorofil *a*, hlorofil *b*, karotenoidi), korišćeno je po 20 mg svežeg biljnog materijala po ekstrakciji po tretmanu. Ekstrakcija pigmenata vršena je u mraku u 2 ml 96% etanola, na temperaturi od  $70^{\circ}\text{C}$  u termošejkeru (TS-100 Biosan Ltd., Riga, Latvia) u trajanju od 10 minuta. Za svaki tretman rađene su tri nezavisne ekstrakcije. Apsorbanca svakog etanolnog ekstrakta merena je na tri talasne dućine 470 nm, 648 nm, i 664 nm, korišćenjem UV/VIS spektrofotometra (HP/Agilent 8453 Spektrofotometer, Agilent technologies, Paolo Alto, CA). Sadržaj hlorofila *a* i *b*, i ukupnih karotenoida, raćunati su korišćenjem specifićnih apsorpcionih koeficijenata za 96% etanol na datim talasnim dućinama, kao rastvaraća za ekstrakciju pigmenata, a prema formulama definisanim u Lichtenthaler (1987):

$$\text{Ukupna kolićina hlorofila: } C_{(a+b)} = 5,24 A_{664} + 22,24 A_{648}$$

$$\text{Kolićina hlorofila a: } C_a = 13,36 A_{664} - 5,19 A_{648}$$

$$\text{Kolićina hlorofila b: } C_b = 27,43 A_{648} - 8,12 A_{664}$$

$$\text{Ukupna kolićina karotenoida: } C_{(x+c)} = (1000 A_{470} - 2,13 C_a - 97,64 C_b)/209$$

$$\text{Odnos hlorofila a i b: } C_a/C_b$$

Vrednosti obelećene u formuli kao  $A_{470}$ ,  $A_{648}$  i  $A_{664}$  predstavljaju apsorbanca ekstrakata na talasnim dućinama naznaćenim brojevima u indeksu. Sve dobijene vrednosti predstavljaju kolićinu fotosintetićkih pigmenata u suvoj masi uzoraka, koja je dobijena merenjem uzorka nakon 7 dana sušenja na sobnoj temperaturi.

#### 3.5.2. Određivanje koncentracije vodonik-peroksida

Koncentracija vodonik peroksida u mahovinama iz razlićutih tretmana određena je prema protokolu opisanom u Velikova *et al.* (2000). Po 100 mg smrznutog biljnog materijala iz svakog tretmana preliveno je tećnim azotom i homogenizovano u avanu uz dodatak 1ml 0,1% trihloroacetne kiseline (TCA). Sadržaji avana prebaćeni su u prethodno obelećene mikrotube zapremine 2 ml i centrifugirani 15 minuta na 15000 RCF na  $4^{\circ}\text{C}$ . Po 0,2 ml supernatanta svakog uzorka prebaćeno je u nove mikrotube u koje dodato 0,2 ml 10mM kalijum-fosfatnog pufera, pH 7 i 0,4 ml 1M kalijum jodida. Alikvoti od 200  $\mu\text{l}$  u triplikatu nanesen i su na mikrotitar ploćicu i analizirani spektrofotometrijski na 390 nm.

Koncentracija vodonik peroksida računata je korišćenjem molarnog ekstinkcionog koeficijenta za H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\epsilon=0,28 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) prema formuli:

$$\text{H}_2\text{O}_2 = (A_{390}/0,28) \times 1000 \times V_{rs}/V_{ars} \times 1 \times \text{FW}^{-1}$$

gde je A<sub>532</sub> apsorbance reakcione smeše na 532 nm, V<sub>rs</sub>/V<sub>ars</sub> faktor razblaženja (V<sub>rs</sub>- ukupna zapremina reakcione smeše, V<sub>ars</sub>- zapremina alikvota ekstrakta), FW - sveža masa mahovina korišćena za ekstrakciju. Koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> izražena je u jedinicama  $\mu\text{mol/g}$  sveže mase.

### 3.5.3. Određivanje stepena lipidne peroksidacije

Za određivanje stepena lipidne peroksidacije i koncentracije MDA kod mahovina iz različitih tretmana korišćena je reakcija sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA) prema metodi opisanoj u Heath & Packer (1968). U kiselim uslovima, malonildialdehid reaguje sa dva molekula TBA dajući ružičasto-crveni kompleks, čije se formiranje može pratiti spektrofotometrijski, merenjem apsorbance na 532 nm (Hodges *et al.*, 1999).

Po 100 mg smrznutog biljnog materijala iz svakog tretmana preliveno je tečnim azotom i homogenizovano u avanu uz dodatak 1ml 0,1% trihlorsirćetne kiseline (TCA). Sadržaj avana prebačen je u prethodno obeležene mikrotube zapremine 2 ml i centrifugiran 10 minuta na 15000 RCF (eng. relative centrifugal force) na 4°C. Iz svakog ekstrakta alikvotirano je po 0,25 ml supernatanta u nove mikrotube i u svaku dodato po 0,5 ml 20 % TCA u kojoj je prethodno rastvorena TBA zagrevanjem na 70°C do finalne koncentracije 0,5%. Reakcione smeše inkubirane su 30 minuta na 95°C. Mikrotube su potom brzo prenete na led, hladene 5 minuta na ledu, a sadržaj zatim centrifugiran 10 minuta na 15000 RCF na 4°C. Po 200  $\mu\text{l}$  u triplicatu svake reakcione smeše naneto je na mikrotitar pločicu i analizirano merenjem apsorbance na dve talasne dužine, 532 nm (apsorpcioni maksimum kompleksa TBA-MDA) i 600 nm (korekcija za nespecifično zamućenje), spektrofotometrijskim čitačem mikrotitar pločica (Multiscan Sky Thermo Scientific, Finland). Koncentracija malondialdehida računata je korišćenjem molarnog ekstinkcionog koeficijenta za MDA ( $\epsilon=155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), prema formuli:

$$\text{MDA} = [(A_{532} - A_{600}) / 155] \times 1000 \times V_{rs}/V_{ars} \times 1 \times \text{FW}^{-1}$$

gde su A<sub>532</sub> i A<sub>600</sub> apsorbance reakcione smeše na talasnim dužinama naznačenim brojevima u indeksu, V<sub>rs</sub>/V<sub>ars</sub> faktor razblaženja (V<sub>rs</sub>- ukupna zapremina reakcione smeše, V<sub>ars</sub>- zapremina alikvota ekstrakta), FW - sveža masa mahovina korišćena za ekstrakciju. Koncentracija MDA izražena je kao nmol/g sveže mase.

### 3.5.4. Ekstrakcija ukupnih proteina

Kako bi se analizirao sadržaj ukupnih proteina i aktivnost peroksidaza u mahovinama iz različitih tretmana u istraživanju, izolovani su proteini biljaka iz svakog tretmana. Ekstrakcije su vršene u odnosu 1:6 biljnog tkiva i ekstrakcionog rastvora, čije komponente i finalne koncentracije su prikazane u Tabeli 9.

Za svaku ekstrakciju odmereno je 100 mg smrznutog biljnog materijala čuvanog na -70°C nakon završetka eksperimenata. Biljno tkivo je sprášeno u avanu u tečnom azotu, uz dodatak nerastvorenog polivinil pirolidona (PVP), tako da njegova finalna koncentracija u ekstrakcionom rastvoru bude 5% (w/v). Sadržaj avana je dodatno sprášen, a zatim su dodati kalijum-fosfatni pufer, Triton X 100 i etilendiamintetrasirćetna kiselina (EDTA). Kada je homogenat počeo da se otapa, dodat je fenilmetilsulfonilfluorid (PMSF) i sjedinjen sa ostatkom smeše. Sadržaji avana prebaćeni su po otapanju u prethodno obeležene mikrotube zapremine 1,5 ml, inkubirani na ledu 30 minuta uz povremeno mućkanje i nakon toga centrifugirani na 14000 RCF, 10 minuta na temperaturi od 4°C.

**Tabela 9. Prikaz komponenti pufera za ekstrakciju proteina iz mahovina.**

Komponente	Finalna koncentracija u ekstrakcionom
Kalijum-fosfatni pufer, pH = 6,5	100mM (585 ml)
Triton X 100	0,1% (0,6ml)
EDTA, 250mM štok	1mM (2,4ml)
PMSF, 100mM štok u etanolu	2mM (12ml)
PVP	5% (w/v) (30mg)

Za dalje analize sadržaja ukupnih proteina i aktivnosti POD odvojeni su i korišćeni odgovarajući alikvoti supernatanta dobijenog nakon centrifugiranja. Za svaki tretman rađene su četiri nezavisne ekstrakcije proteina.

#### 3.5.4.1. Određivanje koncentracije ukupnih proteina

Određivanje količine ukupnih proteina u uzorcima vršeno je metodom po Bradford-u (1976), koja se zasniva na spektrofotometrijskom praćenju povećanja apsorbanca boje CBB G-250 (eng. Coomassie Brilliant Blue G-250) na 595 nm, do koga dolazi usled vezivanja za bočne ostatke aminokiselina proteina i proporcionalno je koncentraciji proteina u rastvoru. Formirani kompleksi imaju veliku stabilnost i visok ekstinkcioni koeficijent, što ovu metodu čini senzitivnom i pouzdanom za kvantifikaciju proteina u različitim uzorcima.

Štok rastvor boje korišćene u ovoj analizi pripremljen je rastvaranjem 100 mg koncentrovane boje CBB G-250 u 50 ml 95% etanola, uz dodatak 100 ml koncentrovane fosforne kiseline i destilovane vode do ukupne zapremine od 200 ml. Nakon filtriranja kroz filter papir, rastvor je čuvan u frižideru u mraku do upotrebe, kada je dodatno razblažen vodom u odnosu 1:4 (v/v) i korišćen kao Bradford-ov reagens za spektrofotometrijsko određivanje sadržaja proteina. Kako bi se konstruisala standardna prava na osnovu koje je određivana koncentracija proteina u ekstraktima, napravljeno je serijsko razblaženje BSA (eng. bovine serum albumin) koncentracija 0.1-1 mg/ml u rastvoru korišćenom za ekstrakciju proteina. Za merenje su korišćene mikrotitar pločice, na koje je nanošeno u duplikatu po 5  $\mu$ l BSA rastvora standardnih koncentracija, odnosno po 5  $\mu$ l svakog ekstrakta, i mešano sa 200  $\mu$ l Bradford-ovog reagensa. Svaki ekstrakt je takođe nanošen u zapremini od 2,5  $\mu$ l i mešan sa 200  $\mu$ l Bradford-ovog reagensa u slučaju visokih koncentracija proteina u uzorcima. Vrednosti apsorbanca ovako pripremljenih uzoraka očitavani su nakon 30 minuta na spektrofotometrijskom čitaču mikrotitar pločica (Tecan multimode reader, Infinite M200 PRO).

#### 3.5.4.2. Određivanje aktivnosti peroksidaza klase III

Peroksidaze klase III katalizuju oksido-redukciju između vodonik peroksida i širokog spektra reduktanata, međutim, njihov afinitet za različite supstrate, može značajno varirati i uticati na dobijene rezultate prilikom analiza njihove aktivnosti. Aktivnost peroksidaza klase III (EC 1.11.1.7) u ekstraktima mahovina iz različitih tretmana u ovom istraživanju praćena je spektrofotometrijski, korišćenjem gvajakola (2-metoksifenol) kao donora elektrona u reakciji sa vodonik peroksidom. Reakciona smeša zapremine 1 ml sadržala je 100 mM kalijum-fosfatni pufer, pH 6,5 sa 1 mM EDTA, 20mM gvajakol, 20mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i ekstrakt dobijen postupkom opisanim u poglavlju 2.5.3.1. Za pripremu reakcione smeše korišćeni su 1M štok rastvori vodonik peroksida i 1M štok gvajakola (rastvoren u etanolu). Reakcija je otpočinjala dodavanjem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nakon 20 sekundi (kako bi se očitavala početna brzina reakcije) i praćen je porast apsorbanca na 470 nm usled stvaranja oksidovanog produkta, tetragvajakola ( $\epsilon^{470}=26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Apsorbanca je merena na UV/VIS spektrofotometru (Shimadzu UV-160, Kyoto, Japan), pri radnoj temperaturi od 25°C. Jedinica aktivnosti solubilnih peroksidaza definisana je kao količina enzima dovoljna da katalizuje

oksidaciju 1  $\mu\text{mol}$  gvajakola u minutu u datim uslovima sredine. Dobijene vrednosti aktivnosti POD predstavljene su kao specifične aktivnosti po koncentraciji ukupnih proteina ( $\text{U mg}^{-1}$ ).

### 3.5.5. Karakterizacija ukupnog antioksidativnog kapaciteta mahovina

U zavisnosti od tipa reakcija u njima, eseji za analizu antioksidativnog kapaciteta biljaka mogu se podeliti na one koji se baziraju na reakcijama prenosa atoma vodonika (eng. hydrogen atom transfer reactions, HAT) i one koji se zasnivaju na reakcijama prenosa elektrona (eng. electron transfer, ET). U ET esejima meri se sposobnost antioksidanta da redukuje oksidant (supstrat), što se detektuje promenom boje supstrata nakon njegove redukcije. Intenzitet promene boje je u korelaciji sa koncentracijom antioksidanta u uzorku, pri čemu je odnos između promene apsorbance i promene koncentracije antioksidanta opisan linearnom krivom. Nagib krive odražava redukujući kapacitet antioksidanta, koji je izražen kao ekvivalent troloksa (TE) ili ekvivalent galne kiseline (eng. Gallic acid equivalent, GAE). Zbog toga što u eseju nema kompetitivne reakcije, ni kiseoničnih radikala, redukujući kapacitet antioksidanta izjednačava se sa antioksidativnim kapacitetom. Završna faza reakcije je dostignuta kada prestane promena boje supstrata (Huang *et al.*, 2005).

U metode za određivanje antioksidativnog kapaciteta koje se baziraju na reakcijama transfera elektrona spadaju esej Folin-Ciocalteu reagensom (FCR) za određivanje ukupnog sadržaja fenola, TEAC (eng. Trolox equivalence antioxidant capacity), FRAP (eng. ferric ion reducing antioxidant power (FRAP), DPPH (2, 2-difenil-1-pikrilhidrazil) i esej za „ukupni antioksidativni potencijal“ korišćenjem Cu(II) kompleksa kao oksidanta. Iako je DPPH metod ranije svrstavan u eseje bazirane na HAT reakcijama, novija istraživanja ga svrstavaju u ET eseje, jer u etanolnim i metanolnim rastvaračima, koji se koriste u ovom eseju, preuzimanje vodonika od strane DPPH se odvija previše sporo da bilo primarni način neutralizacije radikala (Huang *et al.*, 2005).

U ovom istraživanju, ukupni antioksidativni kapacitet mahovina iz pojedinačnih tretmana određen je Folin – Ciocalteu i DPPH metodama. Za ove analize korišćeni su etanolni ekstrakti, za čiju pripremu je bilo potrebno po 200 mg biljnog materijala po tretmanu, po ponavljanju. Biljni materijal je preliven tečnim azotom, a potom homogenizovan u avanu uz pomoć tučka. Ovako dobijenom prahu dodato je 2 ml 96% etanola, nakon čega je smeša prebačena u ependorfe od 2 ml, koje su potom inkubirane na sobnoj temperaturi u trajanju od 60 minuta. Po završetku inkubacije, uzorci su centrifugirani 10 minuta na 14 000 RCF na 4°C. Supernatant dobijen centrifugiranjem odliven je u nove ependorfe i korišćen za dalje analize.

#### 3.5.5.1. Folin-Ciocalteu metoda

Prema Huang *et al.* (2005) FCR metoda optimizovana od strane Singleton & Rossi (1965) predstavlja najpogodniji esej za određivanje redukujućeg kapaciteta uzorka među ET esejima. Inicijalno korišćen za analizu ukupnog sadržaja fenola u vinu, vremenom je postao rutinski test za proučavanje fenolnih antioksidanata u širokom spektru bioloških uzoraka (Huang *et al.*, 2005). Folin – Ciocalteu metoda se zasniva na transferu elektrona sa fenolnih supstanci na komplekse fosfomolibdenske/fosfovolframove kiseline (F-C reagens) u alkalnoj sredini, koji se redukuju i posledično menjaju boju iz žute u plavu. Ova promena se može pratiti merenjem apsorbance na 765 nm, pri čemu maksimalna apsorpcija zavisi od alkalnosti rastvora i koncentracije fenolnih supstanci u uzorku. Iako reakcija transfera elektrona nije specifična samo za fenolne supstance, proces ekstrakcije eliminiše približno 85% akorbata i drugih potencijlno interferirajućih jedinjenja, te dobijeni rezultati dobro korelišu sa koncentracijom ukupnih fenola u uzorku (Ainsworth & Gillespie, 2007; Hudz *et al.*, 2019).

Za analizu antioksidativnog kapaciteta mahovina FCR metodom, rastvor Folin – Ciocalteu reagensa dobijen je mešanjem reagensa i dejonizovane vode u zapreminskom odnosu 1:2. U ependorf tube od 2 ml, odmereno je po 300  $\mu\text{l}$  ovako pripremljenog rastvora FC reagensa i 1340  $\mu\text{l}$  dejonizovane vode. U sve ependorfe je potom dodato po 60  $\mu\text{l}$  uzorka, osim u ependorfe koje su korišćene kao slepe probe (blank), u koje je dodato po 60  $\mu\text{l}$  96% etanola. Ependorfe su blago

vorteksovane i ostavljene na sobnoj temperaturi tokom 5 minuta da se inkubiraju. Pošto fenolna jedinjenja reaguju sa F-C reagensom samo pri baznim uslovima, nakon inkubacije, u ependorfe je dodato po 300 µl 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, koje su potom zaštićene od svetlosti i inkubirane na šejkeru na sobnoj temperaturi u trajanju od 90 minuta. Po isteku ovog vremena, merena je apsorbance na talasnoj dužini od 765 nm, pri čemu je analiza biljnog materijala iz svakog tretmana vršena u tri ponavljanja.

Za konstruisanje standardne krive i preračunavanje ukupnog redukujućeg kapaciteta fenola u uzorcima korišćena je galna kiselina, a dobijeni rezultati izraženi su kao mmol GAE/g suve mase biljnog materijala (Ainsworth & Gillespie, 2007).

### 3.5.5.2. DPPH test

Za procenu antioksidativnog kapaciteta mahovina tretiranih povišenim koncentracijama cinka, bakra ili kadmijuma u medijumu, pored FCR, korišćen je i DPPH esej. Ovaj test predstavlja brzu i jednostavnu kolorimetrijsku metodu, koju je prvi opisao Blois (1958), a koja se zasniva na reakciji antioksidanata koje biljni ekstrakt sadrži sa rastvorom DPPH radikala. DPPH radikal predstavlja organski radikal azota, čiji apsorpcioni maksimum u UV/vidljivom delu spektra se nalazi na oko 520 nm. Odlikuje se velikom stabilnošću u poređenju sa drugim radikalima, koja je omogućena delokalizacijom elektrona unutar molekula, te za razliku od drugih radikala ne dimerizuje. Sa nesparenim elektronom na atomu azota, ovaj radikal daje ljubičastu boju rastvoru. Međutim, u prisustvu antioksidanata, dolazi do njegove redukcije i promene boje rastvora u žuto. Ova reakcija se može pratiti smanjenjem apsorbance na 520 nm, koje u odnosu na koncentraciju antioksidanata pokazuje linearnu zavisnost. Nijansa obojenosti rastvora DPPH ukazuje na kapacitet vezivanja radikala, tj. potencijal antioksidativnih jedinjenja da redukuju DPPH (Huang *et al.*, 2005; Pisoschi & Negulescu, 2011).

U ovom istraživanju, DPPH test je rađen prema protokolu opisanom u Urošević *et al.* (2017). U zatamnjenom flakonu, obavijenom aluminijumskom folijom, napravljen je metanolni rastvor DPPH tako da sadrži 5 mg DPPH i 50 ml metanola. Potom je u ependorf tubama napravljena reakciona smeša koja je sadržala 400 µl prethodno pripremljenog rastvora DPPH, 100 µl uzorka (biljnog ekstrakta pripremljenog na isti način kao i za Folin - Ciocalteu test) i 500 µl metanola, koja je inkubirana u mraku na sobnoj temperaturi 45 minuta. Kao negativna kontrola, umesto 100 µl ekstrakta, reakciona smeša sadržala je istu zapreminu metanola. Rastvori koji su korišćeni kao slepa proba umesto biljnog ekstrakta sadržali su po 100 µl metanola. Stepenu redukcije DPPH radikala praćen je spektrofotometrijski, merenjem apsorbance na 520 nm. Antioksidativna aktivnost ekstrakata mahovina izražena je kao procenat uklanjanja slobodnih radikala i izračunata prema formuli:

$$\text{Efikasnost uklanjanja DPPH (\%)} = \left(1 - \frac{A_{uz}}{A_{sp}}\right) \times 100 \%$$

gde je  $A_{uz}$  - apsorbance reakcione smeše na 520 nm, a  $A_{sp}$  - apsorbance negativne kontrole (slepa proba) na 520 nm.

### 3.6. Ramanova spektroskopija

**Princip funkcionisanja i primena.** Ramanova spektroskopija zasniva se na fenomenu neelastičnog rasejanja svetlosti, koje se dešava usled interakcije elektromagnetnog zračenja iz bliskog infracrvenog, vidljivog ili ultraljubičastog (eng. ultraviolet, UV) dela elektromagnetnog spektra sa vibracionim modovima (istezanje, savijanje i deformacije) veza molekula unutar uzorka (Baranski *et al.*, 2005; Baranska *et al.*, 2013; Butler *et al.*, 2016). Kada se uzorak izloži nekom od ovih tipova elektromagnetnog zračenja, većina fotona se rasejava elastično i zadržava istu energiju koju su imali i upadni fotoni. Ovakva interakcija fotona sa materijom naziva se Rejljev efekat (eng. Rayleigh scattering) (Movasaghi *et al.*, 2007). Veoma mali udeo fotona (1 od 10 miliona) koji pogode uzorak će biti neelastično rasejano i imati različitu energiju u odnosu na upadni foton usled interakcije sa molekulima u uzorku. Istovremeno, molekuli bivaju pobuđeni u viša energetska stanja



i prilikom relaksacije vraćaju se u energetski različito vibraciono stanje u odnosu na ono pre izlaganja fotonu (Ramanov efekat) (Payne & Kurouski, 2021). U slučaju kada upadni foton dobije energiju iz veze prisutne u molekulu koja se inicijalno nalazi u ekscitovanom vibracionom stanju, rasejani foton ima veću frekvencu, pa se ovakva pojava naziva anti-Stoks-Ramanovo rasejanje. Ukoliko završno osnovno stanje molekula ima više energije nego početno stanje, a emitovani foton nižu frekvencu, ovakvo rasejanje naziva se Stoks-Ramanovo rasejanje (Parab & Tomar, 2012; Rostron *et al.*, 2016). Razlika u frekvenci između upadne i neelastično rasejane svetlosti predstavlja Ramanov pomeraj, koji ukazuje na diskretne vibracione modove polarizabilnih molekula, jedinstven je za svaki ovakav molekul i predstavlja se kao  $1/\text{cm}$  (Movasaghi *et al.*, 2007; Butler *et al.*, 2016). Intenzitet Ramanovog rasejanja proporcionalan je promeni u polarizovanosti molekula. Prema Ramanovom selekcionom pravilu, promena polarizabilnosti molekula je rezultat izmeštanja atoma u molekulu iz ravnotežnih položaja usled molekulskih vibracija. Merenje pomeraja u energiji rasejanog fotona predstavlja osnovu Ramanove spektroskopije (Rostron *et al.*, 2016).

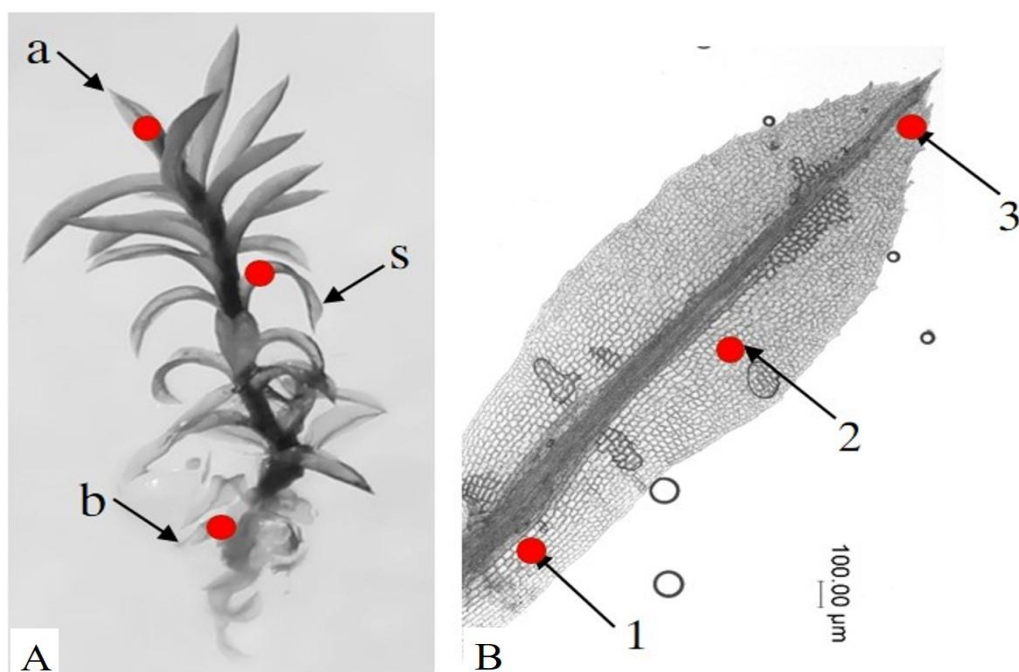
U disperzivnoj Ramanovoj spektroskopiji, za proučavanje vibracionih modova molekula koristi se svetlost emitovana od strane lasera, koja se uz pomoć monohromatora izdvaja i odgovarajućim sočivom usmerava na uzorak. Rasejana svetlost se tipično sakuplja istim optičkim sistemom i usmerava u spektrometar. Difrakcione rešetke vrše disperziju rasejane svetlosti (Ramanovog rasejanja) na detektor i međusobno se razlikuju po broju linija na površini ( $1/\text{mm}$ ) koje mogu varirati u opsegu od 150–4000 po milimetru. Veća frekvencija linija može povećati spektralnu rezoluciju, ali i smanjiti spektralni intenzitet i opseg. S obzirom na to da je Rejljevo rasejanje znatno intenzivnije u poređenju sa Ramanovim, za dobijanje informativnog signala ovom metodom neophodno je da elastično rasejani fotoni budu optički isključeni korišćenjem specifičnih filtera (Rejljevi filteri) pre ulaska rasejanih fotona u spektrometar. Neelastično rasejane fotone hvataju jako senzitivni CCD detektori (eng. charge coupled devices, CCDs) (Butler *et al.*, 2016; Payne & Kurouski, 2021). Na osnovu jedinstvenih obrazaca rasipanja svetlosti, ova tehnika pruža informacije na molekularnom nivou, omogućavajući ispitivanje funkcionalnih grupa, tipova veza i molekularnih konformacija u uzorku (Movasaghi *et al.*, 2007). Ramanova spektroskopija ima visoku molekularnu specifičnost, a dobijeni spektri mogu dati i kvantitativne podatke, ukoliko je izvršena adekvatna kalibracija uređaja (Butler *et al.*, 2016).

Ramanova spektroskopija koristi se za nedestruktivnu i biohemijski specifičnu detekciju organskih molekula, često prisutnih samo u tragovima u uzorku (Altangerel *et al.*, 2017). Glavna prednost ove u odnosu na druge slične tehnike, poput infracrvene spektroskopije, ogleda se u mogućnosti efikasne *in vivo* analize biljnog materijala, zbog toga što voda usled niske polarizabilnosti daje slab signal u Ramanovoj spektroskopiji, koji ne interferira sa signalima poreklom od analita (Parab & Tomar, 2012; Baranska *et al.*, 2013). Dodatno, za razliku od HPLC tehnike (eng. high-performance liquid chromatography), koja predstavlja jednu od najčešće korišćenih tehnika za analizu organskih jedinjenja u biljnom materijalu, Ramanova spektroskopija ne zahteva korišćenje rastvarača i duge procese pripreme biljnog materijala (Baranski *et al.*, 2005). Dobijanje biohemijskih i strukturnih informacija moguće je bez upotrebe obeleživača u vidu boja i drugih hemikalija, te su troškovi za reagense prilikom svake analize svedeni na nulu, a za analizu uzorka dovoljno je svega nekoliko sekundi (Butler *et al.*, 2016; Payne & Kurouski, 2021). Ramanovom spektroskopijom moguće je analizirati vrlo kompleksne uzorke i veći broj vrsta molekula istovremeno. Osim toga, praćenjem biosinteze i degradacije određenih jedinjenja u biljkama u *in vivo* uslovima, moguća je detekcija ranih odgovora ovih bioloških sistema na različite tipove abiotičkih stresova (Altangerel *et al.*, 2017). Ramanova spektroskopija u kombinaciji sa mikroskopijom može dati informacije o molekulima sa visokom prostornom rezolucijom na ćelijskom nivou. Ramanovi spektri se mogu dobiti iz jedne tačke ili mapiranjem duž određene ose (jednodimenzioni) ili u određenoj zoni (dvodimenzioni). Rezultati dobijeni na ovaj način mogu biti predstavljeni u vidu spektroskopske mape i direktno poređeni sa odgovorajućom vizuelnom slikom ispitivanog uzorka, pružajući dodatne detaljne informacije u vezi sa distribucijom analita prisutnih u površinskom sloju biljnog uzorka (Baranski *et al.*, 2005; Baranska *et al.*, 2013).

**Priprema uzoraka za Ramanovu spektroskopiju, obrada spektara i analiza.** U cilju detekcije specifičnih molekularskih vibracija u regionu od 200-1800  $\text{cm}^{-1}$ , poznatijem kao „fingerprint“ region, biljke vrsta *A. undulatum* i *H. cupressiforme* iz različitih tretmana sa Zn- i Cu-acetatima u podlozi, kao i biljke iz kontrolnih grupa, analizirane su korišćenjem Ramanove spektroskopije. Za analizu su odabrani samo filoidi gametofora, jer je njihova debljina omogućila *in situ* analizu, bez posebnih priprema materijala pre izlaganja laseru. Kako bi se izvršilo spektralno mapiranje i ispitao efekat metala iz medijuma na različite delove primarnog modula iste biljke, odabran je i analiziran po jedan filoid na tri različite pozicije duž eksplantata (baza, sredina i vrh) (Slika 16A). Po isteku eksperimentalnog perioda, eksplantati su vađeni pincetom i prebacivani u Petri kutije sa dejonizovanom vodom neposredno pred merenje, kako bi se izbeglo isušivanje i uklonio medijum sa površine biljaka. Entomološkom pincetom, vodeći računa da ne dođe do oštećenja ćelija lamine filoida, ne vadeći biljku iz vode, odvajan je po jedan filoid bazalne, središnje i apikalne pozicije (Slika 16A), koji su potom prebacivani na kvarcna predmetna stakla i snimani Ramanovim spektrometrom. Bazalno pozicionirani filoidi predstavljaju filoide primarnog modula koji su u toku eksperimenta bili uronjeni u medijum, pri čemu je za merenje uvek biran treći filoid od osnove ka vrhu gametofora. Odabirom ovog filoida smanjena je verovatnoća da su potencijalne promene filoida posledica mehaničkog oštećenja prilikom odvajanja i prebacivanja eksplantata na medijume, a ne posledica efekta metala. Središnji filoid biran je sa dela biljke koji se nalazio neposredno iznad medijuma, tako da nijedan njegov deo nije bio u kontaktu sa medijumom u toku eksperimentalnog perioda. Vršni filoid uziman je sa pozicije koja je najdistalnija u odnosu na bazu eksplantata. Svaki filoid sniman je u tri različite tačke duž njegove uzdužne ose – pri bazi, u središnjem delu i u vršnom delu (Slika 16B). Odabir mernih tačaka vršen je pomoću svetlosnog mikroskopa povezanog sa Ramanovim spektrometrom, izbegavajući region centralnog rebra (u slučaju *A. undulatum*) i region marginalnih ćelija. Za svaku biljku snimljeno je ukupno 9 spektara, pri čemu su tri biljke poreklom iz različitih Petri kutija istog tretmana predstavljale nezavisna ponavljanja.

Snimanje spektara filoida vršeno je u opsegu od 200 – 1800  $\text{cm}^{-1}$ , Ramanovim spektrometrom XploRA (Horiba Jobin Yvon, Francuska), povezanim sa mikroskopom Olympus BX41m. Pobuđivanje Ramanovog rasejanja postignuto je laserom talasne dužine 532 nm, maksimalne izlazne snage 20 – 25 mW, sa disperzionom resetkom od 1200 linija/mm. Integraciono vreme pri svakom individualnom merenju bilo je 5 sekundi, a korekcija filtera 5 %. Karakteristični pik silicijuma na 520,47  $\text{cm}^{-1}$  korišćen je za kalibraciju, a spektralna rezolucija svih merenja je oko 3  $\text{cm}^{-1}$ . Analiza Ramanovih spektara izvršena je pomoću softvera LabSpec 6 (Horiba Jobin Yvon). Zbog kompleksnosti bioloških sistema, pre hemometrijskih analiza, izvršeno je predprocesovanje podataka, koje je podrazumevalo korekciju bazne linije i normalizaciju intenziteta svih spektara na osnovu pika najvišeg intenziteta pomoću softvera Spectragryph, version 1.2.14.

Analiza spektralnih podataka dobijenih Ramanovom spektrometrijom, kao i izvlačenje biološki važnih informacija je vrlo kompleksno i često podrazumeva korišćenje tehnika multivarijacione analize, kako bi se efektivno izvukle hemijske i strukturne informacije u osnovi dobijenih rezultata (Butler *et al.*, 2016). Jedan od često korišćenih matematičkih algoritama koji redukuje dimenzionalnost podataka, zadržavajući najveći deo varijabilnosti u skupu podataka je PC analiza (eng. principal component analysis, PCA) (Ringnér, 2008). Ova tehnika može efektivno smanjiti Ramanov spektar na definisan broj nepovezanih varijabli koje se nazivaju glavne komponente (eng. principal components, PC) i koje objašnjavaju onu varijansu koja je spektralno značajna. PCA može biti korišćena za rekonstrukciju spektara koristeći samo nekoliko značajnih glavnih komponenti, zadržavajući značajne spektralne podatke, istovremeno odstranjujući pozadinski šum (Butler *et al.*, 2016). Nakon predprocesovanja, PCA i Klaster analiza spektara filoida mahovina izvršena je za region od 200-1800  $\text{cm}^{-1}$ , pomoću softvera PAST (Hammer *et al.*, 2001).



**Slika 16.** Odabir filoida i tačaka za snimanje Ramanovom spektroskopijom. A – Pozicija merenih filoida duž primarnog modula biljke: b – bazalna, s – središnja, a – apikalna; B – Pozicija tačaka u kojima je vršeno merenje duž individualnih filoida: 1 – baza, 2 – sredina, 3 – vrh filoida

Na graficima spektara svakog od filoida, kao i graficima rezultata PC i klaster analize, uzorci su obeleženi skraćenicama koje sadrže skraćeno ime vrste mahovine (Au – *A. undulatum*, Hc – *H. cupressiforme*), koncentraciju metala u podlozi u datom tretmanu (K – kontrola, 200 ili 700), vrstu metala kojim su biljke tretirane (Cu, Zn), naznaku tipa eksperimenta (se – kratkotrajni stres; le- dugotrajni stres) i poziciju ispitivanog filoida duž primarnog modula kauloida (b-baza, s-sredina, a- apeks).

### 3.7. Tehnike bazirane na fluorescenciji rendgenskih zraka

Za određivanje koncentracija mineralnih elemenata u mahovinama (“bulk”) iz različitih tretmana, kao i kvantitativnu vizuelizaciju njihove distribucije u individualnim biljkama, korišćene su tehnike koje se zasnivaju na fluorescenciji rendgenskih zraka atoma u uzorku: rendgenska fluorescentna spektrometrija (XRF spektrometrija), energetske disperzivna mikroanaliza X-zraka (eng. Energy- Dispersive X-ray microanalysis - EDX), i metoda mikro-protonski indukovane emisije X zraka - mikro-PIXE (eng. micro-proton-induced X-ray emission, mikro-PIXE,  $\mu$ PIXE).

Rendgenski zraci (X zraci) su elektromagnetni talasi čije talasne dužine se nalaze u opsegu od 0,001 nm - 80 nm, odnosno opsega energija od 1,2 MeV do 15 eV, što odgovara vezivnim energijama elektrona u unutrašnjim ljuskama (K, L, M, N) atoma (Vogel-Mikuš *et al.*, 2012). Prilikom izlaganja materije ubrzanim naelektrisanim česticama (elektroni, protoni ili  $\alpha$ -čestice), usled njihovog usporavanja prolaskom kroz Kulonova polja jezgara atoma u materijalu, dolazi do nastanka i emitovanja X zračenja čiji je spektar kontinualan (neprekidan), a koje se naziva zakočno zračenje (“Bremsstrahlung” ili bela radijacija) (Markowicz, 2002; Jenkins, 2006). Osim zakočnog zračenja, usled Kulonovih interakcija ubrzanih naelektrisanih čestica sa elektronima unutrašnjih ljuski elemenata (K, L, M), može doći do jonizacije atoma u ovim ljuskama i izbacivanja vezanih elektrona. Vraćanje atoma u energetske stabilnije stanje (relaksacija) podrazumeva popunjavanje praznina elektronima iz spoljašnjih ljuski (L, M, N), koji tada prelaze iz višeg u niže energetske stanje, a razlika u energiji između dva stanja može biti emitovana u vidu karakterističnih X fotona (diskretnih spektralnih linija - K, L, M linije), koji su prema svojoj energiji tipični za određeni hemijski element (Markowicz, 2002; Vogel-Mikuš *et al.*, 2012).

Osim interakcijom sa ubrzanim naelektrisanim česticama, jonizacija unutrašnjih ljuski atoma moguća je apsorpcijom fotona rendgenskih zraka čija je energija jednaka ili veća od vezivnih energija elektrona u ovim ljuskama, kroz proces koji se zove fotoelektrični efekat. Pobuđujući X zraci mogu biti emitovani od strane različitih primarnih izvora (cevi rendgenskih zraka koje emituju zakočno X zračenje i karakteristične X zrake, radioizotopi, sinhrotron i sl.). Prilikom vraćanja atoma u stabilnije stanje, jedan od načina oslobađanja viška energije je fluorescencija karakterističnih X zraka, čija energija odgovara razlici u energiji nivoa između kojih se vrši prelazak elektrona (K, L i M linije) (Vogel-Mikuš *et al.*, 2012).

Kada je uzorak sačinjen od velikog broja različitih atoma, svaki atom će proizvoditi niz karakterističnih rendgenskih zraka različitih talasnih dužina, u zavisnosti od broja i tipa prelaza elektrona u toku relaksacije, koji su prema svojoj energiji tipični za određeni element. Ovo svojstvo predstavlja osnovu elementalne karakterizacije uzoraka XRF metodama (Jenkins, 2006). XRF spektrometrija omogućava "bulk" analizu elemenata u različitim materijalima, međutim, XRF predstavlja i osnovu sofisticiranih spektroskopskih tehnika za vizuelizaciju prostorne lokalizacije i distribucije određenih elemenata u biološkim uzorcima (Vogel-Mikuš *et al.*, 2012). Kvantitativna lokalizacija metala koji su u tragovima prisutni u biološkim uzorcima, naročito kada su u pitanju uzorci malih dimenzija, nameće stroge kriterijume pri odabiru analitičkih metoda. Tri glavne osobine koje se razmatraju prilikom odabira su senzitivnost (minimalni limit detekcije – MDL, ili limit detekcije – LOD), prostorna selektivnost i kvantitativna preciznost (Garman & Grime, 2005; Vogel-Mikuš *et al.*, 2014).

### **3.7.1. Energetski disperzivna mikroanaliza rendgenskih zraka**

Energetski disperzivna mikroanaliza rendgenskih zraka predstavlja tehniku za analizu hemijskih elemenata zasnovanu na emisiji karakterističnih X zraka atoma u uzorku, pobuđenih dejstvom fokusiranog snopa elektrona emitovanog od strane skenirajućeg elektronskog mikroskopa (eng. scanning electron microscope – SEM) (Abd Mutalib *et al.*, 2017; Scimeca *et al.*, 2018). Emitovani X zraci različitih talasnih dužina mogu se meriti foton-energetski-senzitivnim detektorom, a energija zraka zavisi od atomskog elementa u kome je do interakcije došlo. Sistem za detekciju u EDX simultano prikazuje sve X zrake koji su sakupljeni u toku bilo kog pojedinačnog perioda analize, a njihova energija se reprodukuje u vidu spektra koji predstavlja histogramski prikaz broja zraka u zavisnosti od energije X zraka. Spektar daje semikvalitativne i semikvantitativne podatke, pri čemu pozicija pika u spektru i energija omogućavaju identifikaciju elementa, a površina ispod pika proporcionalna je broju atoma datog elementa u ozračenju površini uzorka. Iako je EDX pre svega tehnika za elementalnu analizu površinskih slojeva uzoraka, imajući u vidu relativno jednostavnu anatomsku građu i mali broj slojeva ćelija koji čine različita tkiva mahovina, ovo ne predstavlja ograničavajući faktor pri analiziranju. Ovom tehnikom moguća je detekcija elemenata čiji je atomski broj veći od 10. Najmanja koncentracija elemenata koju je moguće detektovati je oko 0,1 mmol/kg suve mase uzorka (oko 10 ppm), dok prostorna rezolucija varira u opsegu od 10 nm do nekoliko mikrometara. Biološki uzorci koji sadrže teške metale imaju više limite detekcije usled jačeg pozadinskog šuma. Dodatno, LOD elemenata sa velikim atomskim brojem (dobijen pomoću L ili M linija) su u određenoj meri viši usled nižeg odnosa pika prema pozadini nego u slučaju K linija. U EDX mikroanalizi, analitički rezultati dobijaju se iz uzoraka koji su pripremljeni u skladu sa principima elektronske mikroskopije. U slučaju bioloških uzoraka, to podrazumeva dehidrataciju tkiva pre mikroanalize elektronskom mikroskopijom, pri čemu je važno primeniti tehnike koje će omogućiti zadržavanje elemenata na njihovom fiziološkom aktivnom mestu, kako bi analiza bila tačna i dala smislene rezultate. Kvantifikacija EDX tehnikama je jako teška i zahteva korišćenje standardnih uzoraka. Za svaki pojedinačni element, niz standarda mora biti analiziran pri različitim koncentracijama kako bi se dobili pouzdani podaci (Scimeca *et al.*, 2018).

**Energetski disperzivna mikroanaliza X zraka kod mahovina.** Kako bi se detektovao bakar vezan za pojedinačne biljke *A. undulatum* iz različitih tretmana Cu-acetatom i kodistribucija drugih elemenata, korišćen je EDAX sistem (Ametek GmbH, Germany) povezan sa Philipps XL 20

skenirajućim elektronskim mikroskopom, koji omogućava energetske disperzivnu mikroanalizu rendgenskih zraka. Ovaj sistem je omogućio detekciju tkivno-specifičnih promena u sastavu elemenata *A. undulatum*. Nakon isteka eksperimentalnog perioda, biljke su pažljivo vađene pincetom izbegavajući kontaminaciju medijumom i sušene na sobnoj temperaturi do postizanja konstante težine. Nakon toga, uzorci su montirani na aluminijumske nosače uzoraka opremljene SEM-karbonskim trakama (PELCO Tabs™ Carbon Conductive Tabs, Double Coated, Christine Gröpl, Austria) i obložene ugljenikom (Carbon coater EPA 101) kako bi se sprečilo površinsko naelektrisanje. Sakupljanje podataka, uklanjanje pozdinskog šuma i element-specifična analiza spektara vršeni su softverom EDAX-Genesis software Version 5.11 (Ametek Material Analysis, USA). U toku mikroanalize SEM potencijal za ubrzavanje elektrona bio je 30 kV, radna daljina 12 mm (od uzorka do završnog sočiva), nagib 15°, “take-off“ ugao 27.21°, “dead time” približno 30% i vreme merenja 100 s (Lsec 100) za svaku analizu. Kako bi se postigla statistička značajnost, vršena su najmanje 22 merenja filoida i izdanka po biljci. S obzirom na to da je EDX semi-kvantitativna metoda i sadržaj bakra se detektuje u odnosu na druge elemente, odabrani su sledeći elementi: C, N, O, Na, Mg, Al, Si, P, S, Cl, Cd, K, Ca, Fe, Ni, Cu i Zn. Sve koncentracije izražene su kao težinski procenat suve mase uzorka (% wt). Pošto ne postoji referentni materijal za *A. undulatum*, kao referentni uzorci korišćene su kontrolne biljke (Sabovljević *et al.*, 2020).

Za karakterizaciju odnosa između sadržaja bakra i odabranih hemijskih elemenata u biljakama *A. undulatum*, korišćen je Spearman-ov koeficijent korelacije ( $\rho$ ). Pošto je efekat primene 200  $\mu$ M Cu-acetata bio manje izražen u odnosu na 700  $\mu$ M Cu-acetat, predstavljene su vrednosti samo za biljke iz tretmana sa višom koncentracijom ovog acetata.

### 3.7.2. XRF spektrometrija

Rendgenska fluorescentna spektrometrija je nedestruktivna analitička tehnika koja se koristi za kvalitativnu i kvantitativnu analizu elementalnog sadržaja različitih materijala, sa širokom primenom u industriji, rudarstvu, mineralogiji, geologiji, farmaciji, analizi voda i otpadnih materija u životnoj sredini, kao i u različitim naučnim istraživanjima (Brouwer, 2006). Iako znatno manje zastupljena u analizi bioloških materijala, u poređenju sa tehnikama poput atomske apsorpcione spektroskopije ili induktivno spregnute plazma atomske-emisione spektroskopije (eng. inductively coupled plasma atomic-emission spectroscopy, ICP-AES), sa razvojem sistema za detekciju i obradu signala, XRF spektrometrija je postala brza, isplativa i senzitivna tehnika za elementalnu analizu bioloških uzoraka, čije prednosti su posebno važne sa tačke zaštite životne sredine (Vogel-Mikuš *et al.*, 2012). Ono što ovu metodu čini pogodnom za analizu biljnog materijala je:

- a) Mogućnost direktne analize čvrstih uzoraka,
- b) Istovremena analiza većeg broja elemenata,
- c) Mogućnost kvalitativne, semikvantitativne i kvantitativne analize,
- d) Širok opseg elemenata koje je moguće detektovati (od berilijuma do uranijuma),
- e) Opseg detekcije koncentracija od (sub)ppm do 100%,
- f) Niski troškovi po analizi,
- g) Visoka senzitivnost i reproducibilnost (Brouwer, 2006; Marguí *et al.*, 2009).

U standardnoj XRF spektrometriji, najčešći izvor ekscitacije atoma u uzroku predstavlja X zračenje emitovano iz vakumskih cevi gde elektroni iz užarenog volframskog filameta u sudaru sa ohlađenom anodom dovode do emitovanja zakočnog i karakterističnog X zračenja (primarni X zruci) koje pobuđuje atome u uzorku dovodeći do emisije karakteristične XRF (Helsen & Kuczumow, 2001). Merenjem talasnih dužina ili energija karakterističnih fluoresciranih X zraka vrši se identifikacija elemenata, dok merenje njihovog intenziteta omogućava procenu koncentracije datog elementa u ispitivanom uzorku (Brouwer, 2006; Jenkins, 2006; Vogel-Mikuš *et al.*, 2012). Jedan od važnih preduslova za analizu materijala XRF spektrometrijom je homogenost i ravna površina uzorka, s obzirom na to da XRF spektrofotometri analiziraju površinske slojeve, zbog čega

oni moraju biti reprezentativni za ceo uzorak (Brouwer, 2006). Zbog ovoga, većina uzoraka u čvrstom stanju zahteva predtretman kojim se postiže njihova homogenost, kako bi merenja bila kvalitetna i reproducibilna. To u slučaju biljnog materijala najčešće podrazumeva liofilizaciju, kako bi se imobilisala ili uklonila voda iz uzoraka, a zatim mrvljenje ili mlevenje u fini prah, koje je praćeno peletizacijom pod velikim pritiskom (Marguí *et al.*, 2009).

**XRF spektrometrijska analiza mahovina.** Nakon isteka eksperimentalnog perioda, biljke *H. cupressiforme* su za XRF analizu vadene pincetom iz medijuma, kratko prebacivane u Milli-Q vodu, nakon čega su sušene blagim tapkanjem ubrusom, ubacivane u kesice od aluminijuma i brzo smrjavane u tečnom azotu. Uzorci su potom liofilizovani na temperaturama od  $-188^{\circ}\text{C}$  do  $-25^{\circ}\text{C}$  i pritisku 0.34 mbar u trajanju od tri dana (Scanvac CoolSafe), sprašeni u tečnom azotu pomoću avana i tučka, i pomoću ručne prese oblikovani u kružne pelete. Za XRF analizu mineralnih elemenata u mahovinama ("bulk") različitih tretmana korišćen je uređaj Peduzo T01 (JSI, Slovenija), opremljen rendgenskom cevi sa Rh anodom ekscitacione energije 20,2 keV, i SDD (eng. silicon drift diode) detektorom (Amptek, USA) energetske rezolucije 120 eV na 5,9 keV. Svaki pelet meren je sa dve strane u tri ponavljanja. Spektri su analizirani pomoću LabVIEW programa (Kump *et al.*, 2011). Na ovaj način u biljkama su određene ukupne količine fosfora, sumpora, kalijuma, kalcijuma, kao i metala koji su biljkama dodavani u podlogu u višku u vidu acetatnih soli (cink, bakar i kadmijum).

### 3.7.3. Mikro-protonski indukovana emisija X zraka ( $\mu\text{PIXE}$ )

PIXE predstavlja analitičku tehniku za kvantitativnu analizu makro- i mikroelemenata u razilčitim tipovima materijala, koja se zasniva na fluorescenciji karakterističnih X zraka uzorka pobuđenih snopom protona (2 - 4 MeV) prečnika nekoliko milimetara (Malmqvist, 1986; Garman & Grime, 2005; Vogel-Mikuš *et al.*, 2014). Verovatnoća gubitka energije u vidu zakočnog zračenja opada sa porastom mase mirovanja čestica, zbog čega protoni imaju znatno niži intenzitet bele radijacije u odnosu na elektrone (Markowicz, 2002). Niski kontinualni pozadinski šum u XRF spektru koji indukuju protoni, a koji dominantno potiče od zaustavnog zračenja protona i zaustavnog zračenja sekundarnih elektrona, zajedno sa velikim efikasnim presekom jonizacije (verovatnoće da dođe do jonizacije), omogućavaju visoku elementalnu senzitivnost PIXE. Limit detekcije varira u opsegu 0,1 - 1  $\mu\text{g/g}$  (ppm) za elemente čiji je atomski broj između 20 i 40 ( $20 < Z < 40$ ), dok je za sve ostale elemente periodnog sistema od natrijuma do uranijuma znatno niži (Malmqvist, 1986; Vogel-Mikuš *et al.*, 2014; Ishii, 2019). Unapređenjem standardne PIXE tehnike omogućeno je fokusiranje protonskog snopa na sub-mikrometerske dimenzije ( $\mu\text{PIXE}$ ), a ovakvi sistemi sa visokoenergetskim fokusiranim protonskim zracima se često nazivaju mikroprobe (Vogel-Mikuš *et al.*, 2014). Skeniranjem uzorka fokusiranim snopom protona u raster modu (tačke skeniranja raspoređene su ravnomerno u redove i kolone, obrazac  $256 \times 256$ ) i detekcijom indukovane XRF, PIXE spektar se sakuplja za svaku raster tačku. Na osnovu ovih spektara, moguće je konstruisati elementalne mape koje pokazuju razlike u koncentracijama elementa u različitim delovima uzorka (Garman & Grime, 2005; Vogel-Mikuš *et al.*, 2014).

U metodološkom pogledu,  $\mu\text{PIXE}$  ima dosta sličnosti sa sinhrotronskom mikro-rendgenskom fluorescentnom spektroskopijom (SR-mikro-XRF) i EDX mikroanalizom. Međutim, u odnosu na EDX, mikro-PIXE ima približno dva puta veću elementalnu senzitivnost. Senzitivnost  $\mu\text{PIXE}$  može se porediti sa SR-mikro-XRF (Vogel-Mikuš *et al.*, 2012). Prednost mikro-PIXE u odnosu na SR-mikro-XRF je to što u većini slučajeva se vrši paralelno sa metodama koje se baziraju na detekciji elastično rasutih protona iz uzorka (eng. Rutherford backscattering spectroscopy, RBS) i sa merenjem gubitka energije protona u uzorku (eng. scanning transmission ion microscopy, STIM)), što omogućava eksperimentalno utvrđivanje debljine, kao i sadržaj matriksa lakih elemenata, čime je moguća potpuna kvantifikacija sadržaja elemenata u uzorku. Osim ovoga, prednost mikro-PIXE tehnike u analizi biljnog materijala ogleda se u činjenici da omogućava simultano dobijanje informacija o distribuciji i koncentraciji gotovo svih elemenata u rasponu od Na do U, dok sa SR-mikro-XRF često nije moguća simultana vizuelizacija lokalizacije celog opsega elemenata u biljnim tkivima. Mikro-PIXE elementalne mape za elemente koji su

dominantni u fiziologiji tkiva (kalijum, kalcijum, sumpor i fosfor) obično daju visoko-kontrastne slike, koje se lako mogu povezati sa slikama dobijenim optičkom ili elektronskom mikroskopijom. Mikro-PIXE je multielementalna tehnika, gde se svi elementi detektuju simultano, ali trajanje i ugao pojedinačnih merenja jako zavisi od ciljnih mikroelemenata koji se ispituju. Kada je interesovanje primarno vezano za distribuciju lakih i elemenata srednjih vrednosti atomskog broja, vreme potrebno za jedno merenje varira od 10 minuta do nekoliko sati. U drugim slučajevima, kao što je distribucija kadmijuma u biljnim tkivima, jedno merenje može trajati i 2 dana (Vogel-Mikuš *et al.*, 2012, 2014). Mikro-PIXE je tehnika izbora za mapiranje distribucije elemenata u biološkim tkivima u slučajevima kada su istovremeno neophodni visoka elementalna senzitivnost, visoka lateralna rezolucija i potpuna kvantifikacija. Osnovne komponente mikro-PIXE sistema podrazumevaju akcelerator jona, sočiva za jone, skenirajući sistem, detektore i softver za sakupljanje i obradu podataka (Vogel-Mikuš *et al.*, 2014).

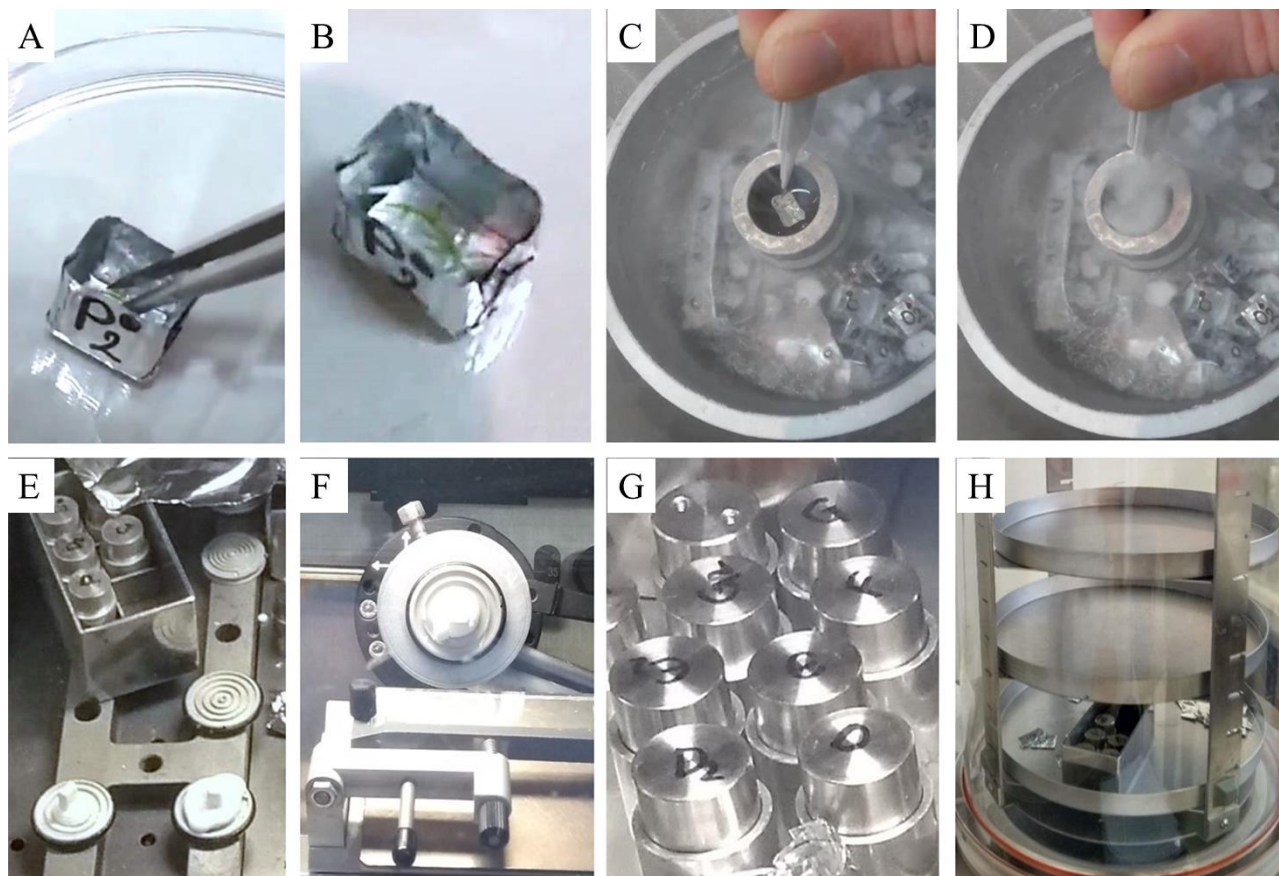
Priprema uzoraka je jedan od najkritičnijih koraka u studijama lokalizacije elemenata u biljnom tkivu. Konačni cilj je očuvati distribuciju elemenata kao i morfologiju tkiva, ćelijskih i subćelijskih struktura tako da budu što sličniji onima u *in vivo* stanju, odnosno da promena morfologije tkiva i hemijska redistribucija budu ograničeni na dimenzije koje su manje od rezolucije mikroprobe. Za ovakve analize opšte prihvaćeno je da samo tehnike pripreme koje se baziraju na niskim temperaturama eliminišu potencijalne artefakte koji mogu nastati primenom tehnika koje se baziraju na hemijskim tretmanima. Smrzavanje uzorka je najčešće praćeno sečenjem na niskim temperaturama, nakon čega se vrši liofilizacija ili direktno merenje u smrznutom-hidratisanom stanju. Krajnji cilj pri smrzavanju tkiva za mikro-PIXE analizu je formiranje amorfno led umesto heksagonalnih kristala koji bi doveli do oštećenja morfoloških struktura uzorka. Ovo se postiže brzim smrzavanjem (stopom od  $10^4$ - $10^6$  po sekundi). Uranjanje uzoraka u tečni azot na njegovoj tački ključanja ( $196^\circ\text{C}$ ) ne omogućava brzo smrzavanje jer tečni azot pri ključanju formira izolacioni film od gasa  $\text{N}_2$  oko uzorka, koji usporava prenos toplote iz uzorka u kriogenu tečnost. Stope hlađenja mogu se poboljšati korišćenjem odgovarajućih kriogena kao što su propan ili izopentan, koji su ohlađeni tečnim azotom. Propan ima tačku topljenja koja je bliska tački ključanja tečnog azota ( $-188^\circ\text{C}$ ), dok je tačka topljenja izopentana  $-160^\circ\text{C}$ . Ovo znači da propan može biti u tečnom stanju duži vremenski period u odnosu na izopentan, te je pogodniji za zamrzavanje većeg broja uzoraka (Vogel-Mikuš *et al.*, 2014).

**Kvalitativna i kvantitativna analiza i mapiranje distribucije elemenata u mahovinama *H. cupressiforme* i *A. undulatum* tehnikom mikro – PIXE.** Po završetku tretmana, mahovine su vađene pincetom iz medijuma i kratko prebacivane u Petri kutije sa Milli-Q vodom, kako bi uklonio medijum sa površine biljaka. Nakon sušenja kontaktom sa papirnim ubrusom, biljke su dalje pripremane u skladu sa procedurom za kriofiksaciju biljnog materijala za mikro-PIXE analizu, koja je optimizovana u Laboratoriji za biljnu fiziologiju, Odeljenja za biologiju, Biotehničkog univerziteta u Ljubljani (Vogel-Mikuš *et al.*, 2009, 2014). Koristeći drvene modle odgovarajuće veličine (dužine oko 1 cm), pre vađenja biljaka iz medijuma, ručno su napravljeni aluminijumski bunarići, 0,5 cm visine i 0,5 cm širine u koje je do 2/3 visine sipan medijum za smrzavanje tkiva (Tissue Tek, Leica biosystems), koji ima potpurnu ulogu u toku sečenja uzoraka u kriotomu. Kako bi se izvršilo mapiranje hemijskih elemenata u poprečnim presecima vršnog i bazalnog dela iste biljke, svaka biljka je skalpelom, neposredno pre kriofiksacije, sečena poprečno na dve polovine. One su potom stavljane u dva različita aluminijumska bunarića, tako da u potpunosti budu uronjene u medijum za smrzavanje tkiva (Slika 17A). Svaki od bunarića je obeležen tako da sadrži informaciju o vrsti mahovine, tipu tretmana, delu biljke i njegovoj orijentaciji unutar bunarića u odnosu na njegovu poziciju unutar intaktne biljke (Slika 17B).

Za kriofiksaciju korišćeni su aluminijumski termoblokovi koji se sastoje iz dve pregrade. U spoljašnu pregradu od sipa se tečni azot. Kada se termo-blok ohladi, propan se ubacuje u unutrašnju pregradu iz boce za gas preko plastičnog creva sa ventilom i bakarnom cevi na kraju. Bakarna cev se prvo ohladi u tečnom azotu, a potom se ventil postepeno otvara kako bi došlo do kondenzacije i prelaska propana u tečno stanje u unutrašnjem odeljku termo-bloka. Ceo aluminijumski termoblok je



spolja dodatno izolovan polistirenom, kako bi se sprečilo brzo isparavanje tečnog azota. Pošto mešavina propana i kiseonika može biti jako eksplozivna, a duga izloženost tečnom azotu u zatvorenoj prostoriji može dovesti do gušenja, cela procedura pripreme uzoraka rađena je u dobro provetrenoj prostoriji, kako bi koncentracija oba gasa u vazduhu bila što manja. Nakon pripreme termobloka, svaki bunarić sa medijumom i polovinom biljke polako je pincetom spuštan u ohlađeni propan, držan oko 30s u njemu, a potom brzo prebacivan u pregradu sa tečnim azotom (Slika 17C, D). Nakon smrzavanja, svi uzroci su uz pomoć tečnog azota prebačeni direktno u krio-mikrotom kako bi se izbeglo njihovo otapanje pre sečenja.

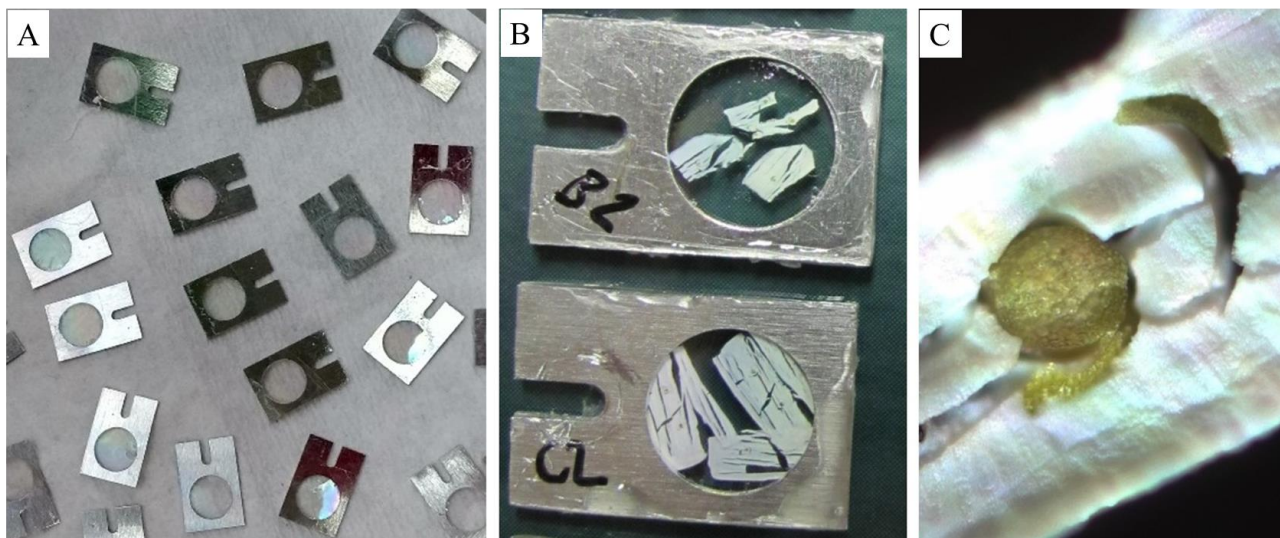


**Slika 17.** Kriofiksacija, kriosečenje i liofilizacija uzoraka za mikro-PIXE analizu. A – Ubacivanje i pozicioniranje biljke u Al-bunarić sa medijumom za zamrzavanje; B – Izgled pripremljenog uzorka za zamrzavanje; C – Ubacivanje bunarića u unutrašnji odeljak termo-bloka; D – zamrzavanje uzorka u propanu i prebacivanje u spoljašnji deo termo-bloka; E – pričvršćivanje uzorka medijumom za zamrzavanje za diskove za uzorke i aklimatizacija u kriokomori; F – kriosečenje; G – Izgled aluminijumskih posudica sa čeličnim poklopcima za fiksaciju uzorka prilikom liofilizacije; H – liofilizacija krio-preseka smeštenih u posudicama za fiksaciju unutar nosača za kriotransfer u liofilizatoru.

Svi uzorci sečeni su u Leica CM3050 kriotomu (Leica, Bensheim, Germany), pri temperaturi kriokomore, CT = -30°C i temperaturi glave krio-mikrotoma, OT= -20 °C. Pre sečenja, uzorci su aklimatizovani u kriokomori u trajanju od 60 minuta kako bi se izbeglo pucanje prilikom sečenja. Koristeći medijum za zamrzavanje tkiva, zaleđeni uzorci su nakon skidanja Al-folije pričvršćivani za diskove za uzorke i ostavljani do očvršćavanja medijuma, nakon čega je vršeno sečenje (Slika 17E). Debljina reza podešena je na 60 μm, kako bi se omogućio dovoljan prinos X zraka u toku mikro – PIXE analize. Svi uzorci su sečeni u istom smeru u kriotomu – od baze ka apikalnom delu tog dela gametofora u odnosu na njegovu poziciju u biljci (Slika 17F). Nakon kriosečenja, preseci su pincetom brzo prebacivani između tankih celuloznih filter-papira, unutar posebno dizajniranih aluminijumskih posuda prečnika 1,5 cm i pritiskani ravnim tegićem od

nerđajućeg čelika, kako bi se sprečilo skupljanje i deformacija tkiva u toku liofilizacije (Slika 17G). Ove posude su potom smeštane u nosače za kriotransfer ohlađene tečnim azotom i prebacivane u liofilizator (Scanvac CoolSafe) gde su preseki liofilizovani postepeno pri rastućoj temperaturi od oko  $-188\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  i pritisku 0,34 mbar u trajanju 72 h, kako bi se izbeglo skupljanje uzoraka (Slika 17H). Manipulacija krio-presecima do trenutka prenosa u liofilizator vršena je u kriokomori instrumentima i opremom koji su prethodno ohlađeni do temperature kriokomore, uz minimalnu izloženost sobnoj temperaturi.

Liofilizirani preseki su monitorirani na aluminijumske držače za mikro-PIXE analizu, pokrivene tankom (oko 300 nm debljine) Pioloform folijom (SPI Chem). Priprema folije vršena je prema proceduri datoj od strane Vogel-Mikuš *et al.* (2009). U staklenoj čašici u 25 ml hloroforma rastvoreno je 0,333 g Pioloform-a uz pomoć magnetne mešalice i držano u mraku do upotrebe. Uranjanjem čiste mikroskopske pločice u rastvor na 5 s i potom držanjem u vertikalnom položaju, kraćom ivicom naslonjenom na ubrus, omogućeno je ceđenje viška rastvora, sušenje i formiranje tankih slojeva folije na obe strane predmetne pločice. Nakon toga pločica je uronjena u čašicu sa dvostruko destilovanom vodom i folija blagim povlačenjem pincetom za ivicu odvojena i izvučena da pluta na površini vode. Uz pomoć aluminijumskih držača za mikro – PIXE analizu, koji su držani pincetom, zahvatane su dobro formirane i neslepljene folije iz vode tako da prekriju kružni otvor na jednoj strani nosača i potom pincetom zatezane preko površine celog nosača, pazeći da ne dođe do pucanja ili nabiranja u predelu kružnog otvora (Slika 18A). Nakon sušenja, na ovako pripremljene nosače na deo koji sadrži samo sloj folije pincetom su ređani liofilizovani preseki tako da ne dođe do njihovog preklapanja, a zatim preklapani drugim nosačem, tako da presek bude fiksiran između dva sloja folije (Slika 18B). Ovako montirani uzorci pregledani su na svetlosnom mikroskopu, kako bi se fotografisali i odabrali najkvalitetniji preseki za analizu (Slika 18C).



**Slika 18.** Montiranje krio-preseka na aluminijumske držače za mikro-PIXE analizu. A – izgled aluminijumskih nosača za mikro-PIXE; B – krio-preseci montirani između dva sloja Pioloform folije aluminijumskih nosača; C – pregledanje i odabir preseka za mikro-PIXE analizu pod svetlosni mikroskopom

Prostorna distribucija elemenata na nivou tkiva određena je nuklearnom mikroprobom Jožef Stefan Instituta u Sloveniji. Procedura potpune kvantifikacije dodatno je poboljšana tehnikama koje omogućavaju precizno određivanje debljine merenih preseka. Korišćenjem softvera GEOPIXE II 26 generisane su nezavisne numeričke matrice za svaki element od interesa. Ove matrice su importovane u ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>) softver za analizu slika kao tekst dokumenti, čime su dobijene 32-bitne koncentracijske mape raspodele, veličine  $256 \times 256$  piksela, gde svaki piksel nosi informaciju o koncentraciji svakog pojedinačnog elementa. Na svakoj mapi, koncentracija ispitivanog elementa izražena u ppm predstavljena je skalom boja. Sve tačke mape koje po intenzitetu odgovaraju najvećoj prikazanoj vrednosti na skali označavaju tu ili veću koncentraciju

datog elementa. Selektovanjem delova mapa koji sadrže samo tkivo kauloida mahovina, izračunate su koncentracije kalcijuma, kalijuma, sumpora, i metala korišćenih za tretmane mahovina (cink, bakar ili kadmijum) u poprečnim presecima gametofora ispitivane dve vrste mahovina u zavisnosti od tretmana. Pomoću istog programa, izvršena je analiza kolokalizacije selektovanih elemenata. Usled sistemski različite kalibracije mikro-PIXE detektora, u nekim merenjima nije bilo moguće dobiti informacije o konkretnoj vrednosti koncentracija elemenata u datom preseku, te su u ovom slučaju generisane i predstavljene kvalitativne mape distribucije, gde skala u boji odražava relativnu koncentraciju ispitivanog elementa u datom preseku.

### 3.8. Statistička obrada podataka

U istraživanjima sa višefaktorskim dizajnom omogućeno je ispitivanje uticaja svih kombinacija faktora pri svim njihovim nivoima (vrednostima) na ispitivane parametre koji predstavljaju zavisno promenljive (Šljivić-Ivanović *et al.*, 2013). S obzirom na višefaktorski dizajn ovog istraživanja, analiza dobijenih rezultata morfogenetskih i biohemijskih ispitivanja, kao i rezultata vezanih za koncentracije hemijskih elemenata u biljkama sprovedena je primenom metoda analize varijanse (Fišerov model). Značajnost razlika između srednjih vrednosti ispitivanih parametara testirana je pomoću Takijevog testa (eng. Tukey's HSD test) za prag značajnosti  $P < 0,05$ .

Prisustvo statistički značajne interakcije između dva (ili više) faktora ukazuje na to da promena vrednosti (nivoa) jednog faktora modifikuje delovanje drugog faktora na ispitivani parametar, odnosno, efekat jednog faktora zavisi od vrednosti drugog ispitivanog faktora (Mičić & Đurić, 1994). Tamo gde su između dva faktora analizom varijanse utvrđene značajne interakcije, izvršena je njihova dalja analiza sa ciljem da se utvrdi koji nivoi jednog faktora su uticali da se značajno modifikuje uticaj drugog faktora na ispitivani parametar. Za testiranje značajnosti interakcije dva faktora korišćen je metod analize jednostavnih efekata (eng. simple effects analysis), a značajne interakcije predstavljene su na graficima. Pošto zbog složenosti postupka testiranje značajnosti interakcija trećeg reda (interakcije tri faktora) u ovom istraživanju nije vršeno, u specifičnim slučajevima komentarisani su samo trendovi međusobnog uticaja tri faktora na ispitivane parametre. Na graficima interakcija paralelne linije ukazuju na nepostojanje efekata interakcije, dok delovi gde je njihova paralelnost u većoj meri narušena, ukazuju na mogućnost postojanja efekta interakcije prikazanih faktora na dati parametar.

U tabelama analize varijanse velikim slovima obeleženi su glavni faktori, dok su njihove interakcije naznačene kao proizvod datih slova (npr. A×B za dvostruku interakciju, A×B×C za trostruku interakciju). Različiti stepeni statističke značajnosti označeni su kao: \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p < 0,05$ , NZ = razlike nisu statistički značajne. Vrednosti ispitivanih parametara u tabelama prikazane su kao prosečne vrednosti  $\pm$  SD (standardna devijacija). Srednje vrednosti različitih nivoa istog faktora obeležene istim malim slovom (a, b, c i sl.) nisu značajno različite za nivo verovatnoće  $P < 0,05$  prema Takijevom HSD testu.

U komentarima rezultata analiza varijanse pod značajnim efektima podrazumevaju se statistički značajni efekti, pri čemu je njihova značajnost istaknuta odgovarajućim brojem zvezdica u sumarnim tabelama analize.

Za statističku obradu podataka metodama analize varijanse korišćen je softver IBM SPSS Statistics (Version 26).

## 4. REZULTATI

Kako bi se ispitaio efekat povećanih koncentracija metala u podlozi na mahovine *H. cupressiforme* i *A. undulatum*, kao i obrasci usvajanja metala kod ove dve vrste, odabrana su tri metala – cink, bakar i kadmijum. Cink i bakar su odabrani kao predstavnici esencijalnih mikroelemenata, različitih hemijskih svojstava. Bakar je redoks-aktivni metal, dok je cink redoks-inertan. Kadmijum je odabran kao neesencijalni metal, koji je hemijski sličan cinku i koji bi se mogao usvajati i transportovati unutar biljaka mehanizmima karakterističnim za cink, te na sličan način dovesti do pojave simptoma toksičnosti kao cink. Joni metala su u podlogu dodavani u vidu acetatnih soli, pošto se smatra da acetatni anjon nema negativni uticaj na fiziološke parametre mahovina.

### 4.1. Uticaj Zn-acetata, Cu-acetata i Cd-acetata na parametre morfogeneze mahovina *H. cupressiforme* i *A. undulatum* u kulturi *in vitro*

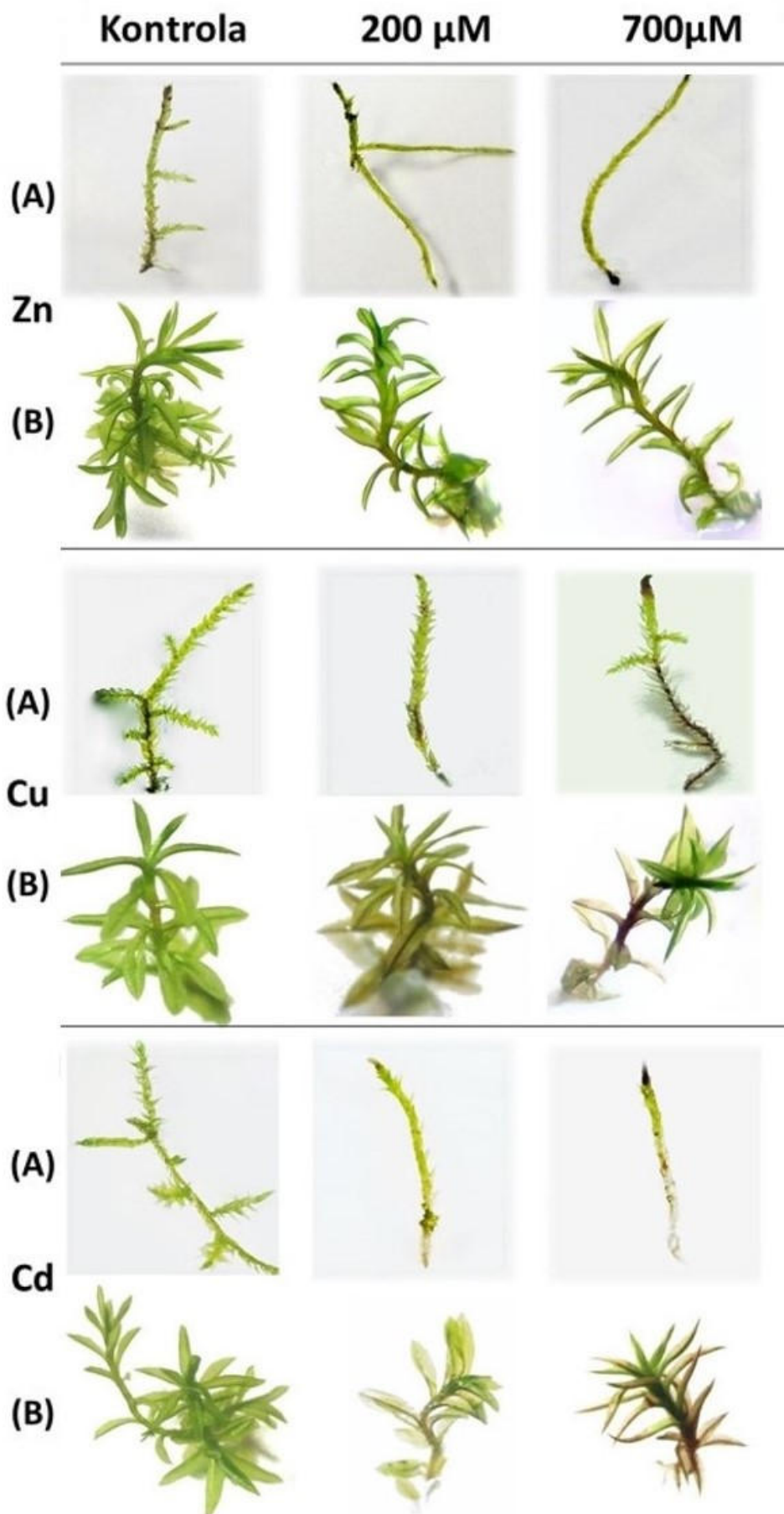
Ispitivane vrste mahovina, *H. cupressiforme* i *A. undulatum*, ispoljile su visok stepen otpornosti na toksične efekte Zn-acetata, Cu-acetata i Cd-acetata u pogledu preživljavanja. Bez obzira na vrstu metala, primenjenu koncentraciju i vreme izlaganja, nije detektovan letalan efekat na nivou gametofora ni kod jedne od vrsta. S druge strane, u zavisnosti od tretmana (Slika 19) uočeni su različiti simptomi toksičnosti na nivou pojedinačnih ćelija i delova biljke.

Mahovine gajene na podlogama sa dodatkom Zn-acetata morfološki se nisu značajno razlikovale u odnosu na kontrolne biljke, s tim što su često bile tamnije zeleno obojene (Slika 19). Kod biljaka obe vrste mahovina gajenih na podlogama sa dodatim Cu-acetatom, u bazalnim i središnjim delovima kauloida uočena je pojava braon boje, koja je sa porastom koncentracije Cu-acetata u podlozi i dužine stresa bila intenzivnija i zahvatala veći deo kauloida (Slika 19). Istovremeno, u filoidima ovih gametofora bakar je doveo do hloroze tkiva, koja je bila različito izražena u zavisnosti od koncentracije Cu-acetata u podlozi, trajanja stresa, vrste mahovine i pozicije filoida duž longitudinalne ose gametofora.

U uslovima kratkotrajnog stresa Cu-acetatom (Slika 20A) kod vrste *A. undulatum* uočeno je da do gubitka pigmenata dolazi jedino u bazalno pozicioniranim filoidima biljaka izlaganih najvišoj koncentraciji Cu-acetata u podlozi. U uslovima dugotrajnog stresa (Slika 20B) u filoidima na ovoj poziciji biljaka *A. undulatum* i pri nižoj primenjenoj koncentraciji Cu-acetata uočena je hloroza tkiva, dok je 700  $\mu\text{M}$  Cu-acetat doveo do potpunog gubitka pigmenata. U eksperimentima sa dugotrajnim stresom, kod biljaka gajenih na podlogama sa dodatkom 200 i 700  $\mu\text{M}$  Cu-acetata i u filoidima na središnjim pozicijama biljke, duž longitudinalne ose gametofora *A. undulatum* uočene su hlorotične zone u blizini koste (Slika 21B i Slika 22B). Kod središnje pozicioniranih filoida duž izdanaka gajenih na podlogama sa dodatkom 200 i 700  $\mu\text{M}$  Cu-acetata, bazalno pozicioniranih filoida biljaka gajenih na podlogama sa 200  $\mu\text{M}$  Cu-acetatom (Slika 21C), kao i kod filoida pozicioniranih apikalno duž izdanaka izlaganih 700  $\mu\text{M}$  Cu-acetatu duži vremenski period (Slika 22 A), jasno su uočljive ćelije narušenog integriteta kojima nedostaje protoplast, a čiji zidovi su izmenjene boje – žute, žutobraon ili braon. Ove ćelije mogu se uočiti u regionu koste ali i u okviru izolovanih zona u različitim delovima lamine filoida.

Kod vrste *H. cupressiforme* u uslovima kratkotrajnog stresa Cu-acetatom, najviša koncentracija ove soli u podlozi dovela je do potpunog gubitka pigmenata u bazalno pozicioniranim filoidima (Slika 23A), dok efekat na filoide na ostalim pozicijama duž biljke nije bio vidljiv. U uslovima dugotrajnog stresa (Slika 23B), pri obe primenjene koncentracije u podlozi (200 i 700  $\mu\text{M}$ ) Cu-acetat je doveo do potpunog gubitka pigmenata u filoidima na bazalnoj poziciji. Osim toga, u eksperimentima sa dugotrajnim stresom i filoidi na središnjim pozicijama ispoljili su određeni stepen hloroze, koji je kao i u slučaju *A. undulatum*, bio izraženiji pri dodatku 200  $\mu\text{M}$  (Slika 24 B) u odnosu na 700  $\mu\text{M}$  (Slika 25B) Cu-acetat u podlozi. Filoidi na apikalnim pozicijama ni u jednom od tretmana (Slike 24C, 25C) nisu ispoljili vidljive znake hloroze ili drugih promena pod dejstvom Cu-acetata u podlozi.

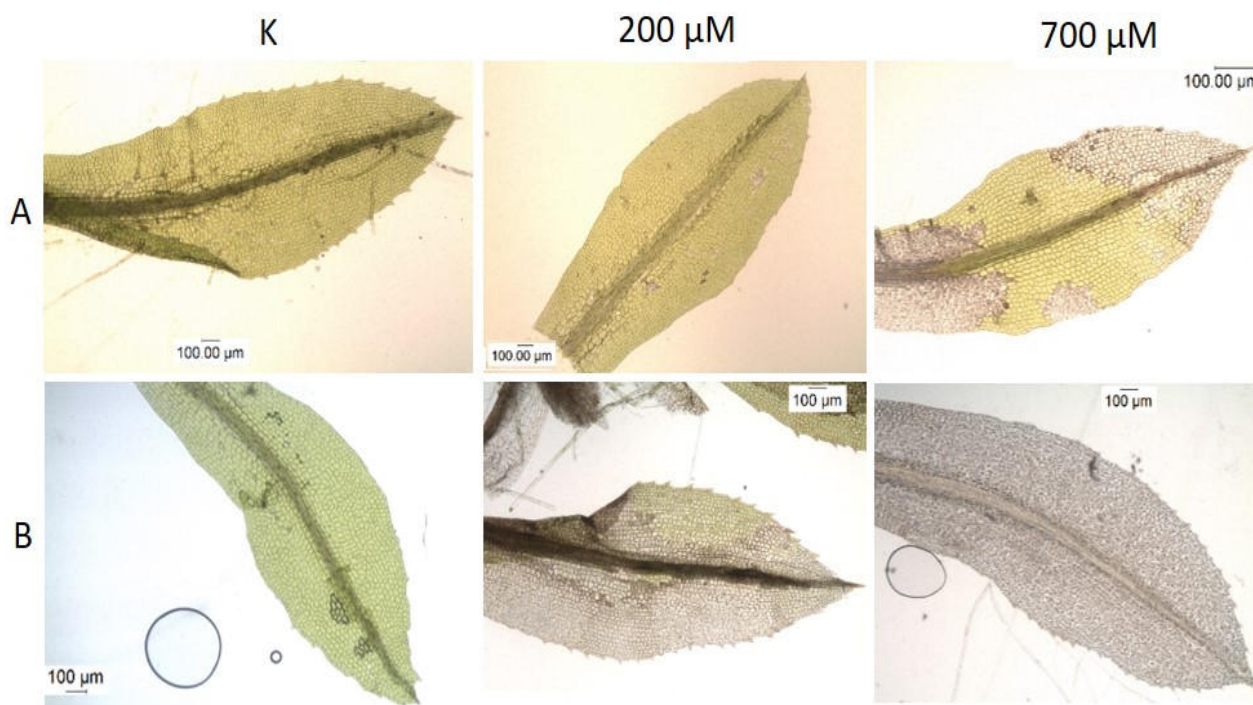




**Slika 19.** Izgled mahovina *A. undulatum* i *H. cupressiforme* nakon 5 nedelja rasta na podlozi bez dodatih Zn-, Cu- ili Cd-acetata, kao i na podlogama sa dodatkom 200 ili 700  $\mu\text{M}$  Zn-, Cu- ili Cd-acetata. A - *H. cupressiforme*, B - *A. undulatum*.

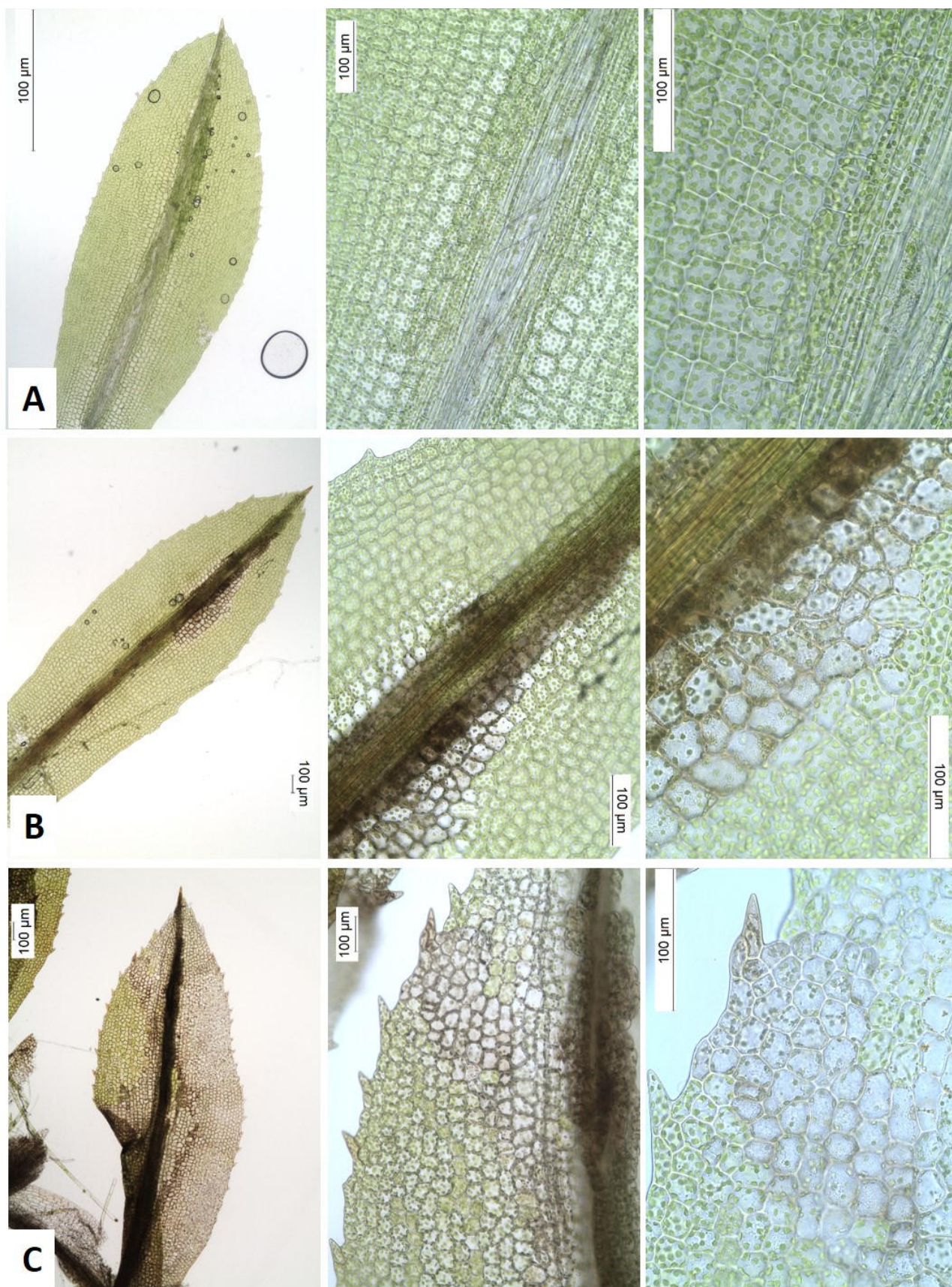
Među tri ispitivana metala u ovom istraživanju, kadmijum je uzrokovao najizraženije simptome hloroze. Zone kauloida sa hlorotičnim tkivom, kao i broj filoida zahvaćen hlorozom, rasli su sa povećanjem koncentracije Cd-acetata u podlozi i sa porastom vremena izlaganja biljaka stresu (Slika 19). Kod biljaka *H. cupressiforme* dugotrajno izlaganje 200  $\mu\text{M}$  Cd-acetatu iz podloge dovelo je do potpunog gubitka fotosintetičkih pigmenta u donjem delu gametofora, dok je primena više koncentracije istog acetata uzrokovala gubitak pigmenta i u središnjem delu biljke. Pri 700  $\mu\text{M}$  Cd-acetatu u podlozi, apikalni delovi pojedinih gametofora *H. cupressiforme* ispoljavali su blagu hlorozu tkiva. Kod vrste *A. undulatum* dugotrajno gajenje biljaka na podlozi sa 200  $\mu\text{M}$  Cd-acetatom dovelo je do pojave manje izražene hloroze kauloida i filoida bazalnog dela biljke, koja je imala mozaičan izgled, kada su filoidi u pitanju. U uslovima dugotrajnog stresa pri višoj primenjenoj koncentraciji Cd-acetata u podlozi, u bazalnom delu kauloida i odgovarajućim filoidima i kod *A. undulatum* došlo je do potpunog gubitka pigmenta. Središnje delove ovih gametofora karakterisali su filoidi različitog stepena hloroze. Pored navedenih simptoma toksičnosti, biljke tretirane kadmijumom bile su znatno krhkije i osetljivije u poređenju sa biljkama tretiranim bakrom ili cinkom. U odgovoru na tretmane metalima, nijedna od dve ispitivane vrste mahovina nije ispoljila merljivi rast sekundarne protoneme, u smislu prečnika protoneme.

Uzimajući u obzir sve tretmane, vrsta *H. cupressiforme* produkovala je veći broj bočnih izdanaka u poređenju sa *A. undulatum* (Tabela 10). Među ispitivanim metalima cink je ispoljio najmanji inhibitorski efekat na produkciju novih izdanaka kod mahovina, te je srednja vrednost indeksa multiplikacije kod biljaka obe vrste tretiranih ovim metalom bila 1,32 dok su bakar i kadmijum doveli do statistički značajnog pada u vrednosti praćenog parametra u odnosu na cink. Prosečna vrednost indeksa multiplikacije biljaka obe vrste tretiranih bakrom bila je 1,04 dok je u slučaju kadmijuma bila neznatno niža i iznosila je 0,97.



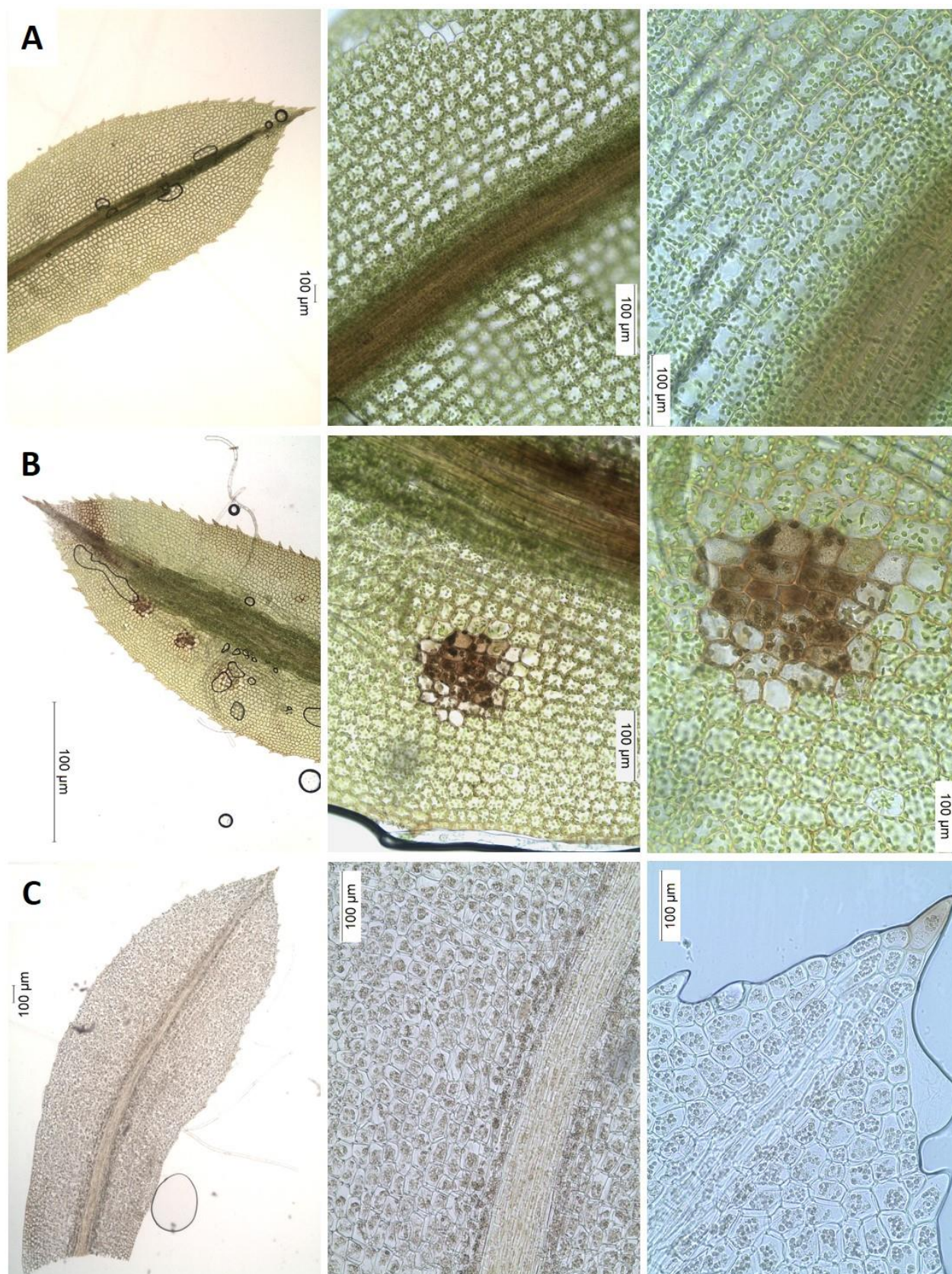
**Slika 20.** Izgled bazalno pozicioniranih filoida biljaka *A. undulatum* gajenih na podlozi bez dodatnih metal-acetata, kao i na podlogama sa dodatkom 200 i 700  $\mu\text{M}$  Cu-acetata. A - kratkotrajni stres B - dugotrajni stres.





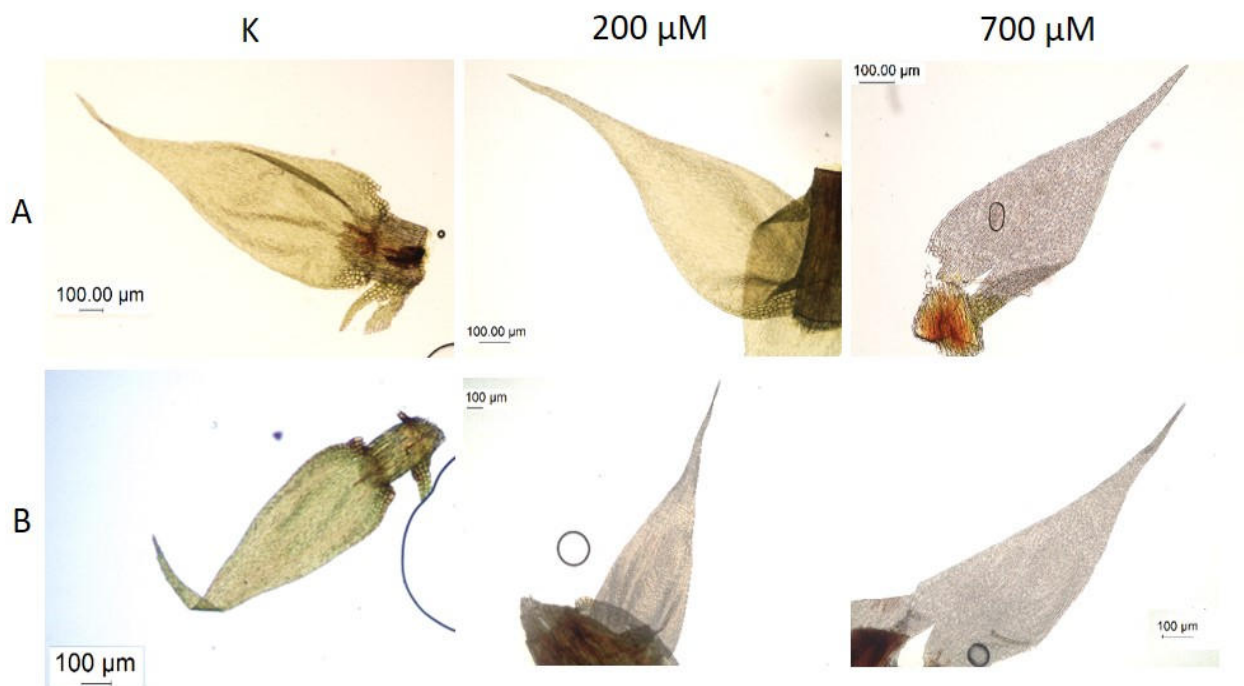
**Slika 21.** Izgled apikalno, središnje i bazalno pozicioniranih filoida biljaka *A. undulatum* gajenih na podlozi sa dodatkom 200 μM Cu-acetata u eksperimentima sa dugotrajnim stresom. A - apikalno pozicionirani filoid, B - središnje pozicionirani filoid, C - bazalno pozicionirani filoid.



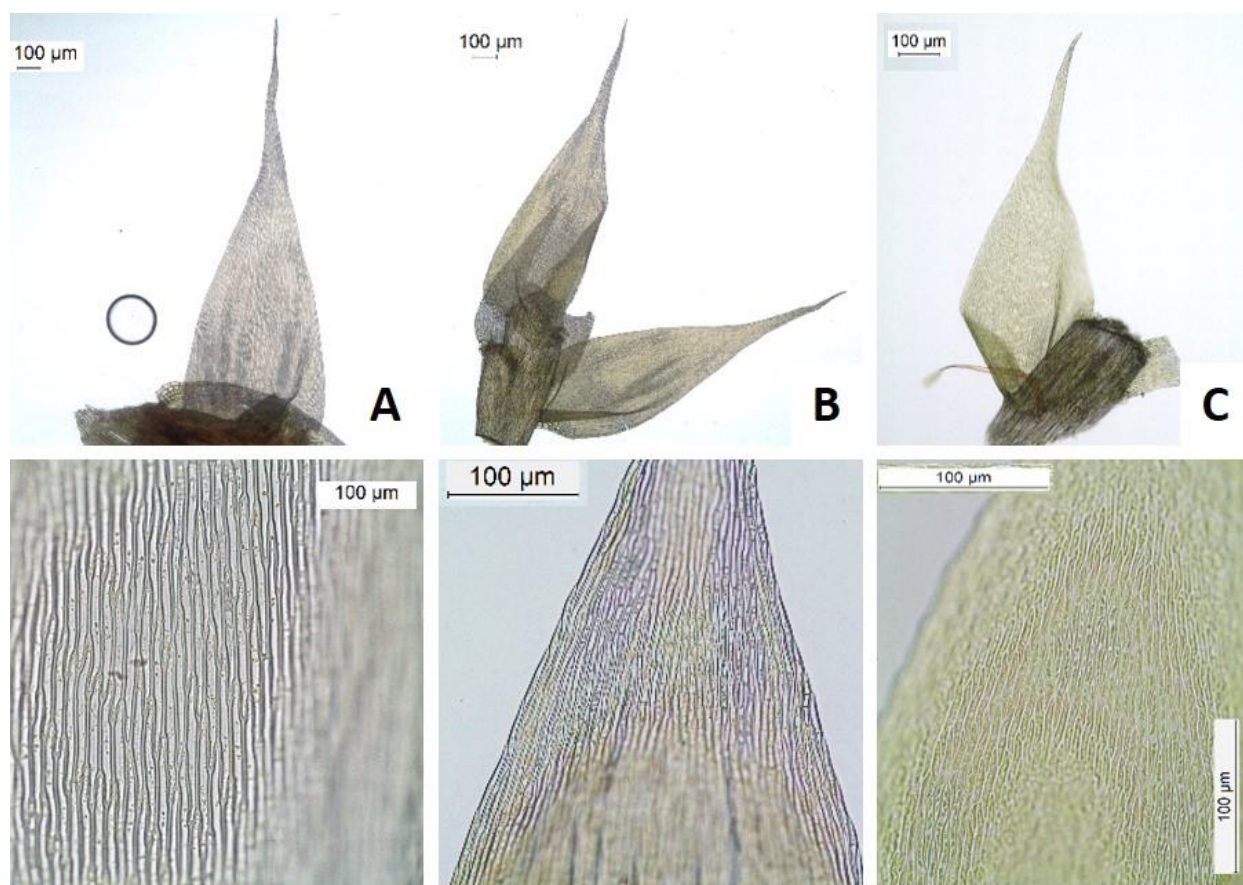


**Slika 22.** Izgled apikalno, središnje i bazalno pozicioniranih filoida biljaka *A. undulatum* gajenih na podlozi sa dodatkom 700 μM Cu-acetata u eksperimentima sa dugotrajnim stresom. A - apikalno pozicionirani filoid, B - središnje pozicionirani filoid, C - bazalno pozicionirani filoid.

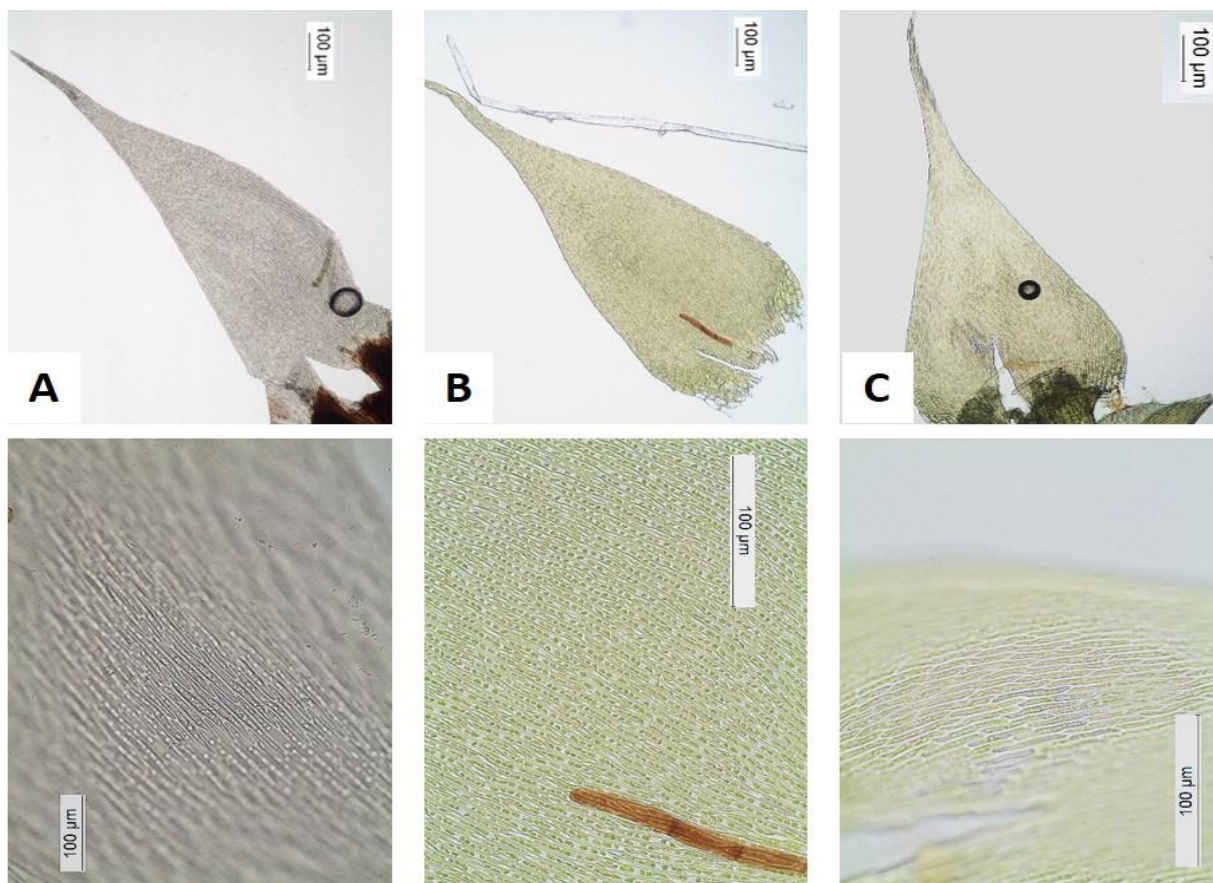




**Slika 23.** Izgled bazalno pozicioniranih filoida biljaka *H. cupressiforme* gajenih na podlozi bez dodatnih metal-acetata, kao i na podlogama sa dodatkom 200 i 700  $\mu\text{M}$  Cu-acetata. A - kratkotrajni stres B - dugotrajni stres.



**Slika 24.** Izgled apikalno, središnje i bazalno pozicioniranih filoida biljaka *H. cupressiforme* gajenih na podlozi sa dodatkom 200  $\mu\text{M}$  Cu-acetata u eksperimentima sa dugotrajnim stresom. A – bazalno pozicionirani filoid, B – središnje pozicionirani filoid, C – apikalno pozicionirani filoid.



**Slika 25.** Izgled apikalno, središnje i bazalno pozicioniranih filoida biljaka *H. cupressiforme* gajenih na podlozi sa dodatkom 700  $\mu\text{M}$  Cu-acetata u eksperimentima sa dugotrajnim stresom. A - bazalno pozicionirani filoid, B - središnje pozicionirani filoid, C - apikalno pozicionirani filoid.

Značajan je bio kombinovani efekat vrste metala i primenjene koncentracije na indeks multiplikacije mahovina (Grafik 1A). Vrednosti indeksa multiplikacije kada su biljke obe vrste mahovina tretirane 200  $\mu\text{M}$  Cu- ili Cd-acetatom, bile su gotovo iste, dok su mahovine gajene na Zn-acetatu imale značajno veći indeks multiplikacije. Međutim, pri koncentraciji od 700  $\mu\text{M}$ , efekat kadmijuma na indeks multiplikacije bio je značajno negativniji u odnosu i na cink (za 0,94) i na bakar (za 0,73).

Na nivou dvostrukih interakcija, povećanje koncentracije soli svih metala u podlozi sa 200  $\mu\text{M}$  na 700  $\mu\text{M}$  imalo je znatno veći negativan efekat na indeks multiplikacije u eksperimentima sa dugotrajnim stresom, nego u eksperimentima sa kratkotrajnim stresom, što ukazuje na postojanje negativnog kumulativnog efekta povećane koncentracije i trajanja stresa na indeks multiplikacije mahovina (Grafik 1B). Značajan je bio i kombinovani efekat vrste metala u podlozi i tipa stresa (Grafik 1C). U postavkama gde su biljke kratko izlagane metalima, biljke obe vrste tretirane cinkom i bakrom imale su značajno veće indekse multiplikacije u odnosu na one gajene na podlogama sa kadmijumom. U eksperimentima sa dugotrajnim stresom, biljke tretirane bakrom imale su najniži indeks multiplikacije, koji je bio značajno niži od indeksa mahovina gajenih na podlogama sa druga dva metala. Ovo ukazuje da se toksičnost bakra u odnosu na cink i kadmijum povećava znatno više sa produžavanjem perioda izlaganja biljaka acetatima ova tri metala.

Biljke *H. cupressiforme* i *A. undulatum* različito su reagovala u zavisnosti od vrste metala u podlozi, pri čemu su razlike u indeksima multiplikacije među vrstama mahovina bile značajne za sva tri ispitivana metala (Grafik 1D). Izdanci *H. cupressiforme* koji su rasli na medijumima sa Zn-acetatom produkovali su najveći broj bočnih izdanaka, dok su biljke iste vrste tretirane Cd-acetatom imale najniži indeks multiplikacije. S druge strane, kod *A. undulatum* najveći indeks multiplikacije bio je kod mahovina gajenih na podlogama sa Cd-acetatom, a najnegativniji efekat na produkciju

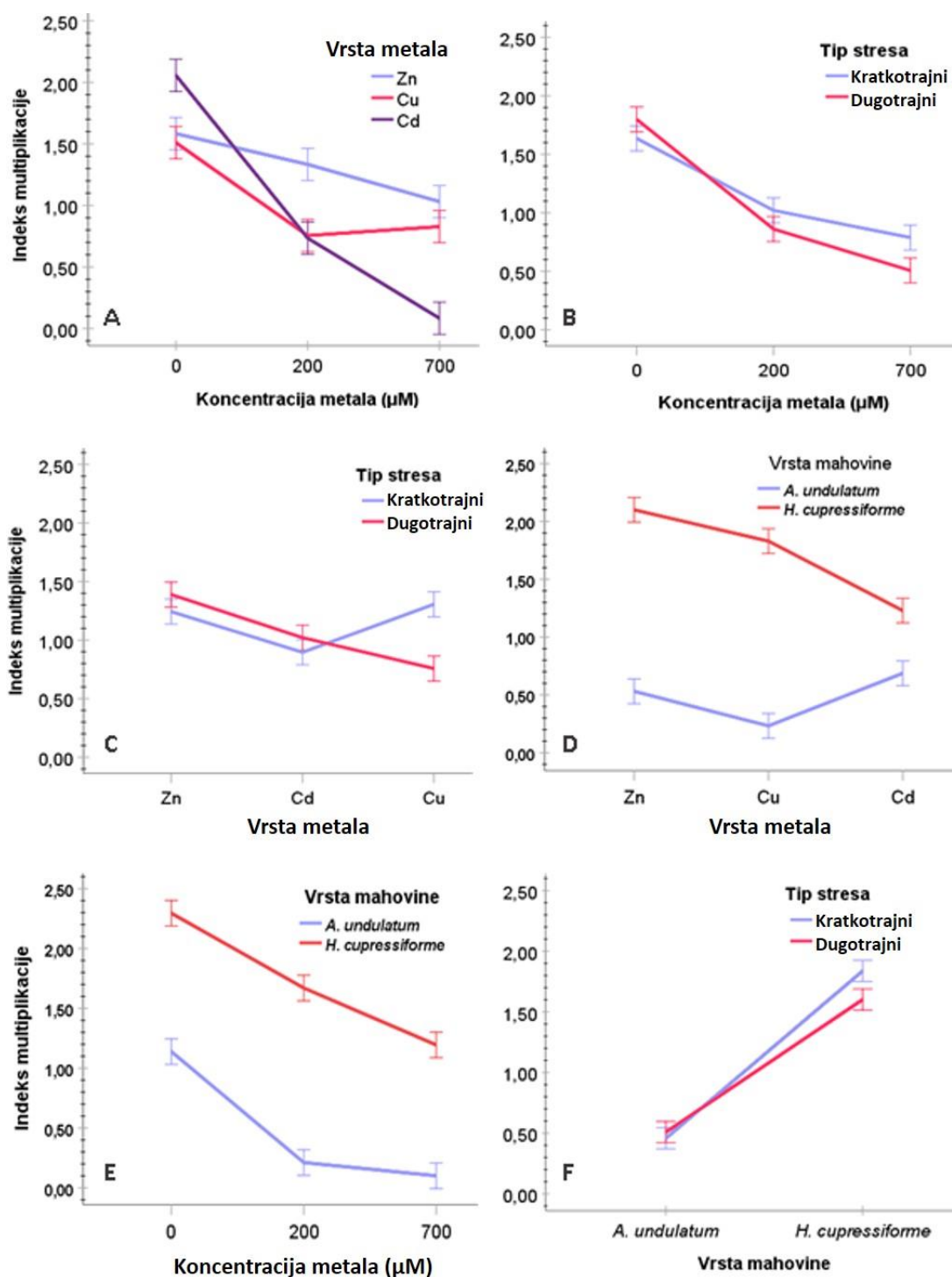
bočnih izdanaka imao je Cu-acetat. Najveća razlika u indeksima multiplikacije dve vrste uočena je kod biljaka izlaganih bakru (1,6), dok je u slučaju kadmijuma ona bila najmanja (0,53) (Grafik 1D). Ovakvi rezultati, osim što ukazuju na povećanu osetljivost mahovine *H. cupressiforme* na kadmijum u odnosu na druga dva metala, ukazuju i na veći stepen otpornosti *A. undulatum* prema ovom metalu u odnosu na cink i bakar.

**Tabela 10.** Uticaj faktora (A, B, C i D) i njihovih interakcija na indeks multiplikacije (srednja vrednost  $\pm$  SD). Faktori: A - vrsta mahovine, B - koncentracija metala, C - vrsta metala, D – dužina stresa. Različiti stepeni statističke značajnosti označeni su kao: \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p < 0,05$ , NZ = razlike nisu statistički značajne. Srednje vrednosti različitih nivoa istog faktora obeležene istim malim slovom nisu značajno različite za nivo verovatnoće  $P < 0,05$  prema Takijevom HSD testu.

Faktori	Nivoi faktora	Indeks multiplikacije
Vrsta mahovine (A)	<i>A. undulatum</i>	0,49 $\pm$ 0,85 a
	<i>H. cupressiforme</i>	1,72 $\pm$ 1,38 b
Koncentracija metala ( $\mu$ M) (B)	0	1,72 $\pm$ 1,36 a
	200	0,95 $\pm$ 1,18 b
	700	0,66 $\pm$ 1,11 c
Vrsta metala (C)	Zn	1,32 $\pm$ 1,38 a
	Cu	1,04 $\pm$ 1,30 b
	Cd	0,97 $\pm$ 1,18 b
Tip stresa (D)	Kratkotrajni	1,15 $\pm$ 1,23 a
	Dugotrajni	1,07 $\pm$ 1,36 a
A		***
B		***
C		***
D		NZ
A $\times$ B		**
A $\times$ C		***
A $\times$ D		**
B $\times$ C		***
B $\times$ D		**
C $\times$ D		***

Sa povećanjem koncentracije acetata različitih metala u podlogama, vrednosti indeksa multiplikacije biljaka gajenih na njima značajno su se opadale kod obe vrste (Tabela 10; Grafik 1E). Kombinovani efekat vrste mahovine i koncentracije metal-acetata na indeks multiplikacije bio je značajan – najmanja razlika (1,08) u broju novoprodukovanih izdanaka između dve vrste bila je kada su mahovine izlagane 700  $\mu$ M metal-acetatima, dok je najveća (1,46) bila pri koncentraciji od 200  $\mu$ M (Grafik 1E). Različite dužine trajanja stresa ispoljile su značajno drugačiji efekat kod dve ispitivane vrste na nastanak novih izdanaka (Grafik 1F). Biljke *H. cupressiforme* koje su gajene u kontinuitetu pet nedelja na podlogama sa acetatima imale su znatno niže indekse multiplikacije u odnosu na biljke iste vrste gajene pet dana na podlogama sa povećanim koncentracijama testiranih metala. Kod *A. undulatum*, uočen je suprotan trend – indeksi multiplikacije bili su niži kod biljaka iz eksperimenata sa kratkotrajnim stresom, ali razlika u efektima različitog trajanja stresa na indeks multiplikacije kod ove vrste nije bila statistički značajna.





**Grafik 1.** Uticaj interakcija faktora na indeks multiplikacije mahovina: A – koncentracija metala × vrsta metala; B - koncentracija metala × tip stresa; C – vrsta metala × tip stresa; D – vrsta metala × vrsta mahovine; E – koncentracija metala × vrsta mahovine; F – vrsta mahovine × tip stresa. Na graficima su prikazane srednje vrednosti ± standardna greška.

#### 4.2. Uticaj Zn-acetata, Cu-acetata i Cd-acetata na koncentraciju fotosintetičkih pigmenata kod mahovina *H. cupressiforme* i *A. undulatum* u kulturi *in vitro*

##### 4.2.1. Koncentracija hlorofila *a* i *b*

Na nivou celog istraživanja *A. undulatum* imao je značajno veću koncentraciju hlorofila *a* u odnosu na *H. cupressiforme* (Tabela 11). Kod obe vrste, koncentracija hlorofila *a* imala je isti trend promena, koji je zavisio samo od koncentracije i vrste primenjenog metala u podlozi i njihovog kombinovanog uticaja. Kombinovani efekti drugih faktora i vrste mahovine, kao i efekti dužine

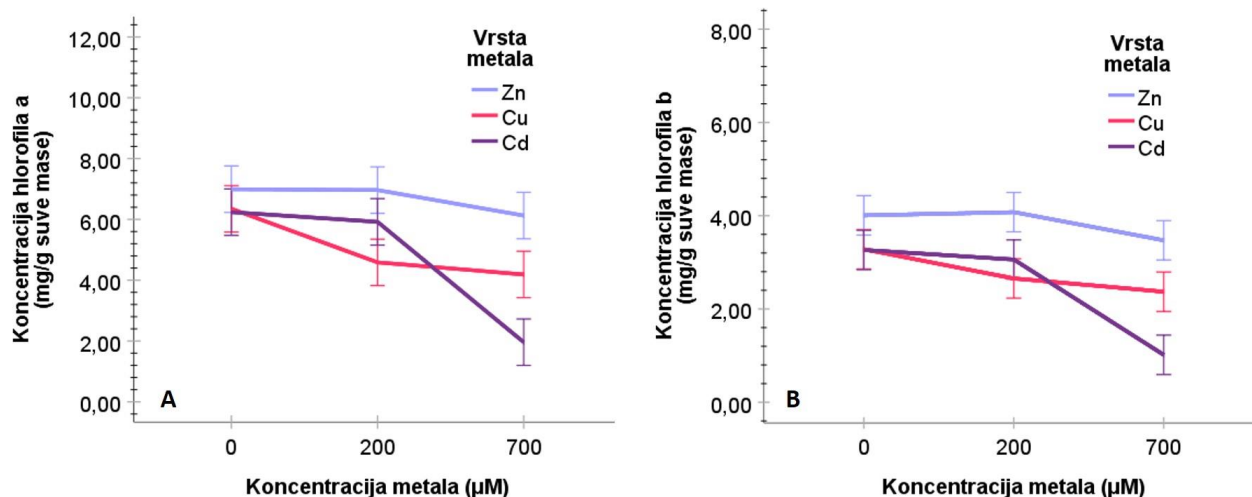
stresa i interakcija ovog faktora sa ostalima nisu bili značajni (Tabela 11).

**Tabela 11.** Uticaj vrste mahovine (faktor A), koncentracije metala (faktor B), vrste metala (faktor C), dužine stresa (faktor D) i njihovih interakcija na koncentraciju fotosintetičkih pigmenta (hlorofila *a*, *b* i karotenoida) i odnos koncentracija hlorofila *a/b* (srednja vrednost  $\pm$  SD). Različiti stepeni statističke značajnosti označeni su kao: \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p < 0,05$ , NZ = razlike nisu statistički značajne. Srednje vrednosti različitih nivoa istog faktora obeležene istim malim slovom nisu značajno različite za nivo verovatnoće  $P < 0,05$  prema Takijevom HSD testu.

Faktori	Nivoi faktora	Koncentracija hlorofila <i>a</i> (mg/g)	Koncentracija hlorofila <i>b</i> (mg/g)	Odnos koncentracija <i>a/b</i>	Koncentracija karotenoida (mg/g)
Vrsta mahovine (A)	<i>A. undulatum</i>	6,28 $\pm$ 2,02 a	3,21 $\pm$ 1,23 a	2,03 $\pm$ 0,33 a	2,30 $\pm$ 0,64 a
	<i>H. cupressiforme</i>	4,68 $\pm$ 1,64 b	2,88 $\pm$ 1,05 a	1,63 $\pm$ 0,19 b	1,95 $\pm$ 0,70 b
Koncentracija metala ( $\mu$ M) (B)	0	6,52 $\pm$ 1,27 b	3,55 $\pm$ 0,90 a	1,88 $\pm$ 0,25 a	2,43 $\pm$ 0,48 a
	200	5,82 $\pm$ 1,83 b	3,26 $\pm$ 0,98 a	1,79 $\pm$ 0,26 a	2,19 $\pm$ 0,75 a
	700	4,09 $\pm$ 2,02 a	2,31 $\pm$ 1,18 b	1,82 $\pm$ 0,46 a	1,75 $\pm$ 0,66 b
Tip metala (C)	Zn	6,68 $\pm$ 1,00 a	3,88 $\pm$ 0,67 a	1,74 $\pm$ 0,23 a	2,54 $\pm$ 0,47 a
	Cu	5,04 $\pm$ 1,91 b	2,77 $\pm$ 1,12 b	1,84 $\pm$ 0,26 a	1,88 $\pm$ 0,73 b
	Cd	4,71 $\pm$ 2,30 b	2,48 $\pm$ 1,10 b	1,91 $\pm$ 0,46 a	1,95 $\pm$ 0,67 b
Tip stresa (D)	Kratkotrajni	5,20 $\pm$ 1,70 a	2,70 $\pm$ 0,91 a	1,97 $\pm$ 0,37 a	1,96 $\pm$ 0,53 a
	Dugotrajni	5,75 $\pm$ 2,24 a	3,38 $\pm$ 1,27 b	1,70 $\pm$ 0,24 b	2,29 $\pm$ 0,79 b
A		***	NZ	***	**
B		***	***	NZ	***
C		***	***	NZ	***
D		NZ	**	***	**
A $\times$ B		NZ	NZ	*	NZ
A $\times$ C		NZ	**	***	**
A $\times$ D		NZ	*	***	**
B $\times$ C		***	***	NZ	***
B $\times$ D		NZ	NZ	*	NZ
C $\times$ D		NZ	NZ	NZ	NZ

Različite vrste metala imale su značajno drugačiji uticaj na koncentraciju hlorofila *a* mahovina, pri čemu je on zavisio od koncentracije metala u podlozi (Tabela 11; Grafik 2A). Kod biljaka gajenih na podlogama sa 200  $\mu$ M Zn- ili Cd-acetatom nije došlo do značajne promene koncentracije hlorofila *a* u odnosu na vrednosti kod kontrolnih grupa, dok je Cu-acetat pri istoj koncentraciji ispoljio značajan negativan efekat na vrednost ovog parametra. Pri koncentraciji od 700  $\mu$ M, Zn- i Cu-acetat nisu dodatno značajno uticali na smanjenje koncentracije hlorofila *a*. S druge strane, kod biljaka izlaganih 700  $\mu$ M Cd-acetatu u podlozi, uočen je značajan gubitak ovog pigmenta u odnosu na mahovine gajene na podlogama sa nižom koncentracijom ove soli. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima za indekse multiplikacije prikazanim na Grafiku 1A.

Koncentracije hlorofila *b* na nivou celog eksperimenta nisu se značajno razlikovale kod dve ispitivane vrste mahovina (Tabela 11). Kao i u slučaju hlorofila *a*, uticaj vrste metala na koncentraciju hlorofila *b* značajno je zavisio od koncentracije metala (Grafik 2B). Dodavanje 200  $\mu$ M Cu-acetata u podlogu imalo je za posledicu značajno smanjenje koncentracije hlorofila *b* u mahovinama, dok dodavanje iste količine Zn- i Cd-acetata nije dovelo do značajnih promena. Povećanje koncentracije kadmijumove soli sa 200  $\mu$ M na 700  $\mu$ M izazvalo je značajno veće smanjenje sadržaja hlorofila *b* u mahovinama nego prilikom primene istih koncentracija soli cinka ili bakra.



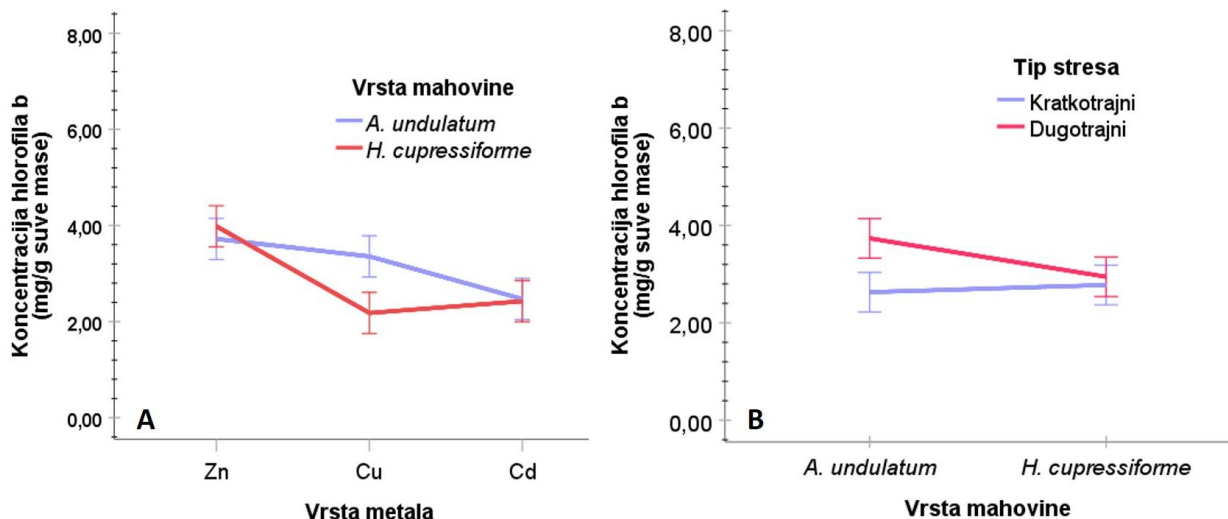
**Grafik 2.** Uticaj interakcija između koncentracije i vrste metala u podlozi na koncentraciju hlorofila *a* (A) i hlorofila *b* (B) kod mahovina *A. undulatum* i *H. cupressiforme* u uslovima kratkotrajnog i dugotrajnog stresa. Na graficima su prikazane srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška.

Povećanje koncentracija acetata u podlogama kod obe vrste mahovina rezultovalo je sličnim trendom promene sadržaja hlorofila *b*, što potvrđuje odsustvo značajne interakcije između vrste mahovine i koncentracije metala (Tabela 11). Međutim, u zavisnosti od vrste primenjenog metala, koncentracija ovog pigmenta značajno se razlikovala kod dve vrste mahovine. Cu-acetat je izazvao značajno veći pad koncentracije hlorofila *b* kod *H. cupressiforme*, nego kod *A. undulatum* (Grafik 3A). S druge strane, koncentracija hlorofila *b* bila je gotovo ista kod obe vrste kada su gajene na podlogama sa Zn- ili Cd-acetatima. Kod biljaka koje su izlagane dugotrajnom stresu, koncentracija hlorofila *b* bila je značajno veća u odnosu na biljke iz eksperimenata sa kratkotrajnim stresom i ova razlika bila je značajna bez obzira na vrstu metala i njihovu koncentraciju u podlozi (Tabela 11). Razlike u vrednostima ispitivanog parametra kod mahovina iz eksperimenata sa dugotrajnim i kratkotrajnim stresom bile su značajne kod vrste *A. undulatum*, dok kod vrste *H. cupressiforme* nije zapažena značajna razlika (Grafik 3B).

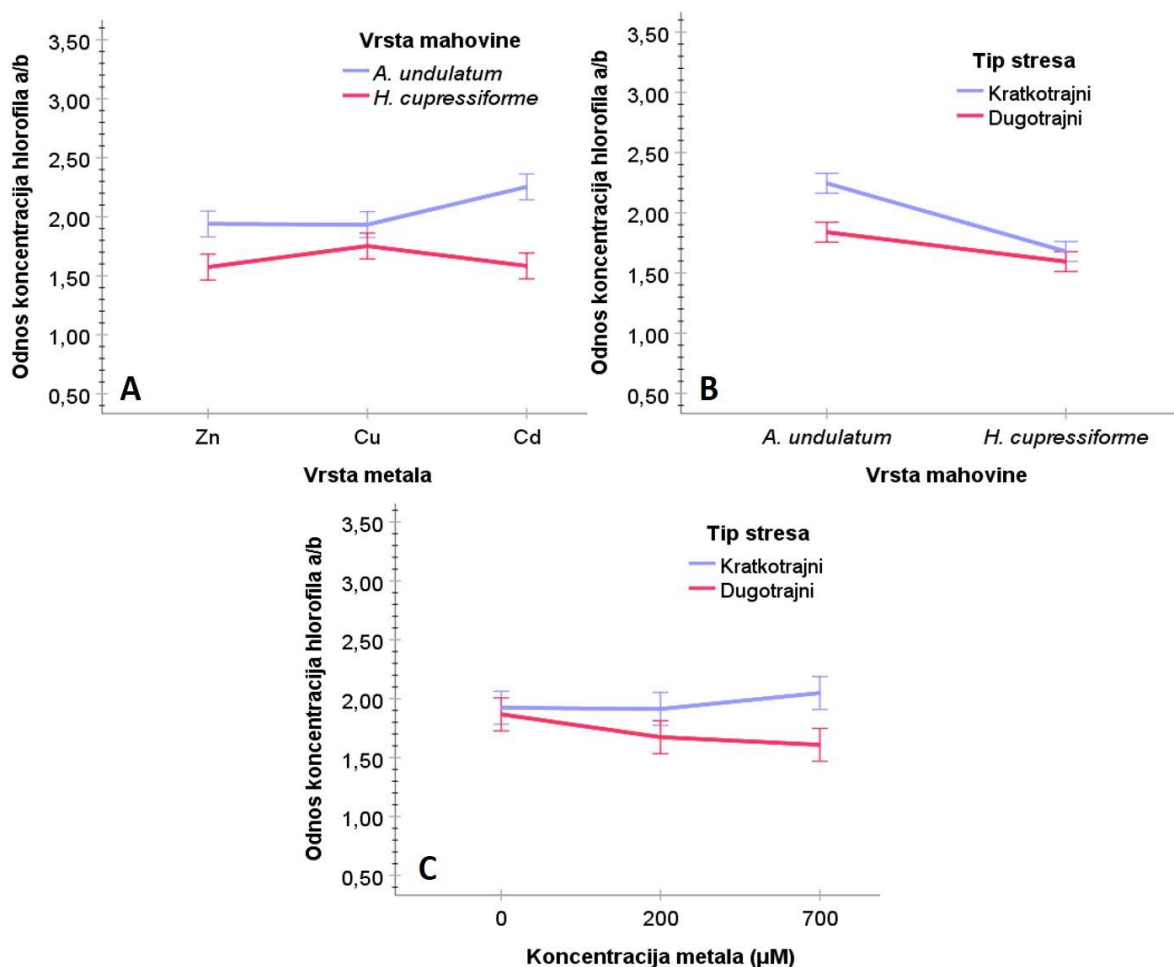
Vrsta *A. undulatum* karakterisala se višim odnosom koncentracija hlorofila *a* i *b* u odnosu na *H. cupressiforme* na nivou čitavog istraživanja (Tabela 11). Efekat pojedinačnih metala na vrednost ovog parametra značajno se razlikovao u zavisnosti od vrste mahovine (Grafik 4A). Razlika odnosa hlorofila *a/b* (0,65 mg/g) između *A. undulatum* i *H. cupressiforme* bila je značajno najveća kod biljaka gajenih na podlogama sa dodatkom Cd-acetata, a najmanja kod mahovina koje su rasle na podlogama sa Cu-acetatom. Efekat tipa stresa takođe je bio značajno drugačiji u zavisnosti od vrste mahovine (Grafik 4B). U eksperimentima sa kratkotrajnim stresom razlika u odnosu koncentracija hlorofila *a/b* dve vrste bila je značajno veća (0,58 mg/g), nego u slučaju eksperimenata sa dugotrajnim izlaganjem biljaka metal-acetatima (0,23 mg/g). Osim toga, biljke *A. undulatum* iz eksperimenata sa kratkotrajnim stresom imale su značajno veći odnos koncentracija hlorofila *a* i *b* u odnosu na biljke iz eksperimenata sa dugotrajnim izlaganjem metal-acetatima, dok kod vrste *H. cupressiforme* nije bilo značajne razlike između biljaka izlaganih različitim tipovima stresa.

Odnos koncentracija hlorofila *a* i *b* bio je značajno različit u dva tipa eksperimenata u zavisnosti od koncentracije metala (Grafik 4C). Kada su mahovine gajene na podlogama bez dodatka metal-acetata ili pri koncentraciji 200 µM, nije bilo značajnih razlika u vrednosti ispitivanog parametra u dva tipa eksperimenata. Međutim, kada su biljke rasle na podlogama sa dodatkom 700 µM metal-acetata, odnos koncentracija hlorofila *a* i *b* bio je značajno viši kod mahovina iz eksperimenata sa kratkotrajnim stresom.





**Grafik 3.** Uticaj interakcija faktora na koncentraciju hlorofila *b* kod mahovina *A. undulatum* i *H. cupressiforme* u uslovima kratkotrajnog i dugotrajnog stresa: A – vrsta metala × vrsta mahovine; B - vrsta mahovine × tip stresa. Na graficima su prikazane srednje vrednosti ± standardna greška.



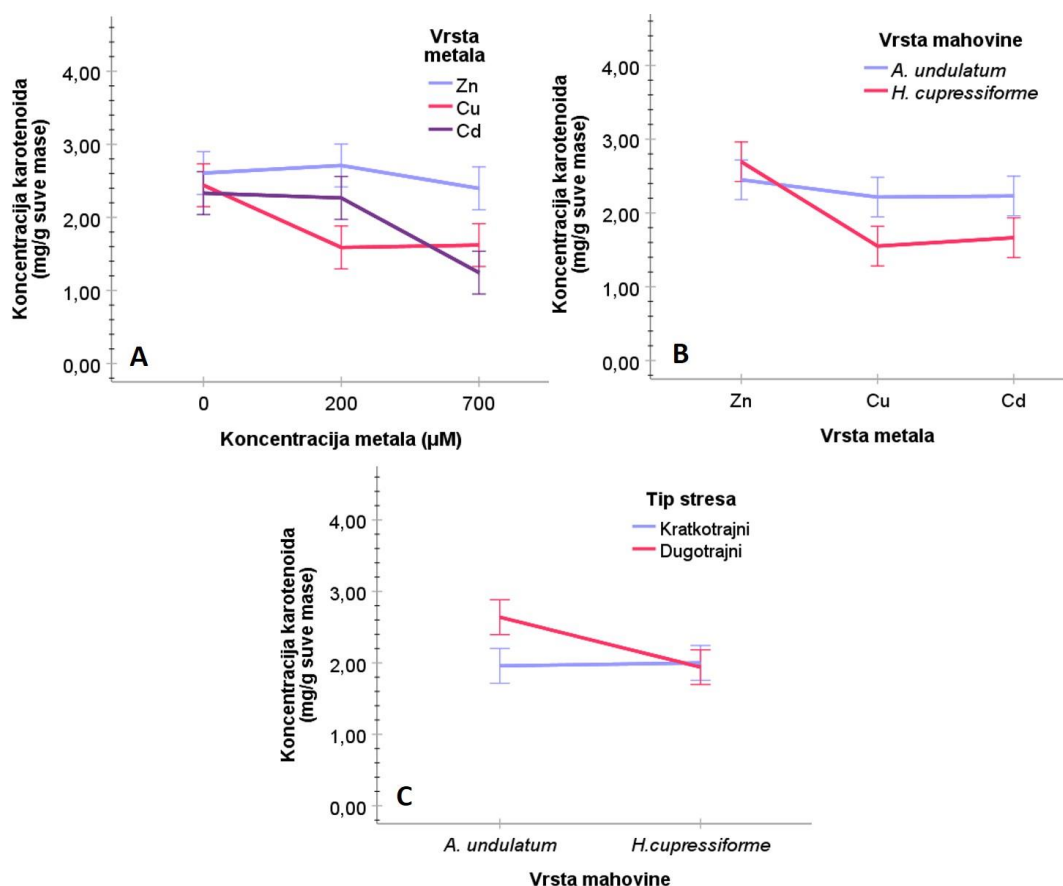
**Grafik 4.** Uticaj interakcija faktora na odnos koncentracija hlorofila *a/b* kod mahovina *A. undulatum* i *H. cupressiforme* u uslovima kratkotrajnog i dugotrajnog stresa: A – vrsta metala × vrsta mahovine; B - vrsta mahovine × tip stresa; C – koncentracija metala × tip stresa. Na graficima su prikazane srednje vrednosti ± standardna greška.

#### 4.2.2. Koncentracija ukupnih karotenoida

Efekat različitih metala na koncentraciju ukupnih karotenoida u mahovinama značajno se razlikovao u zavisnosti od koncentracije ovih elemenata u podlozi, na šta ukazuje prisustvo značajne dvostruke interakcije između vrste i koncentracije metala (Tabela 11; Grafik 5A). Kod biljaka koje su gajene na podlogama sa 200  $\mu\text{M}$  Zn- ili Cd-acetatom nije detektovana značajna promena u koncentraciji karotenoida u odnosu na biljke gajene na podlozi bez ovih soli. Pri istoj koncentraciji, Cu-acetat je značajno uticao na smanjenje sadržaja ovih pigmenata kod mahovina. Sa povećanjem koncentracije Cd-acetata na 700  $\mu\text{M}$ , značajno je opala koncentracija ukupnih karotenoida. U slučaju biljaka gajenih na podlogama sa 700  $\mu\text{M}$  acetatima druga dva metala nije bilo značajnih razlika u sadržaju karotenoida u odnosu na biljke izlagane 200  $\mu\text{M}$  acetatima istih metala.

U zavisnosti od vrste metala, koncentracija karotenoida kod različitih vrsta mahovina se značajno razlikovala (Grafik 5B). Kada su biljke gajene na podlozi sa Zn-acetatom, između ispitivanih vrsta mahovina nije bilo značajne razlike u vrednostima ovog parametra. Nasuprot tome, kada su mahovine izlagane Cu- ili Cd-acetatu, *A. undulatum* je imao znatno veću koncentraciju karotenoida u odnosu na biljke *H. cupressiforme* gajene na podlogama sa solima istih metala.

Generalno, koncentracija karotenoida u mahovinama bila je veća u eksperimentima sa dugotrajnim stresom (Tabela 11), ali se efekat dužine stresa značajno razlikovao u zavisnosti od vrste mahovine (Grafik 5C). U slučaju dugotrajnog stresa, koncentracija karotenoida bila je značajno veća (za 0,70 mg/g) kod vrste *A. undulatum* nego kod *H. cupressiforme*. S druge strane, kod biljaka dve vrste iz eksperimenata sa kratkotrajnim stresom nije bilo značajnih razlika u ukupnom sadržaju ovih pigmenata.



**Grafik 5.** Uticaj interakcija faktora na koncentraciju ukupnih karotenoida kod mahovina *A. undulatum* i *H. cupressiforme* u uslovima kratkotrajnog i dugotrajnog stresa: A - koncentracija metala  $\times$  vrsta metala; B – vrsta metala  $\times$  vrsta mahovine; C – vrsta mahovine  $\times$  tip stresa. Na graficima su prikazane srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška.

### 4.3. Markeri oksidativnog stresa kod mahovina *H. cupressiforme* i *A. undulatum* gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-acetata ili Cu-acetata u uslovima dugotrajnog stresa u kulturi *in vitro*

Usled izrazito negativnog efekta kadmijuma na rastenje i prinos mase biljaka, mahovine iz tretmana sa ovim metalom nisu korišćene za analize markera oksidativnog stresa i drugih fizioloških i biohemijskih parametara. Rezultati su prikazani za oba tipa stresa samo za *A. undulatum*, dok su za *H. cupressiforme* prikazani samo rezultati dugotrajnog stresa.

#### 4.3.1. Koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

*Atrichum undulatum* je na nivou svih eksperimenata sa dugotrajnim stresom imao značajno veću produkciju vodonik-peroksida u odnosu na *H. cupressiforme* (Tabela 12).

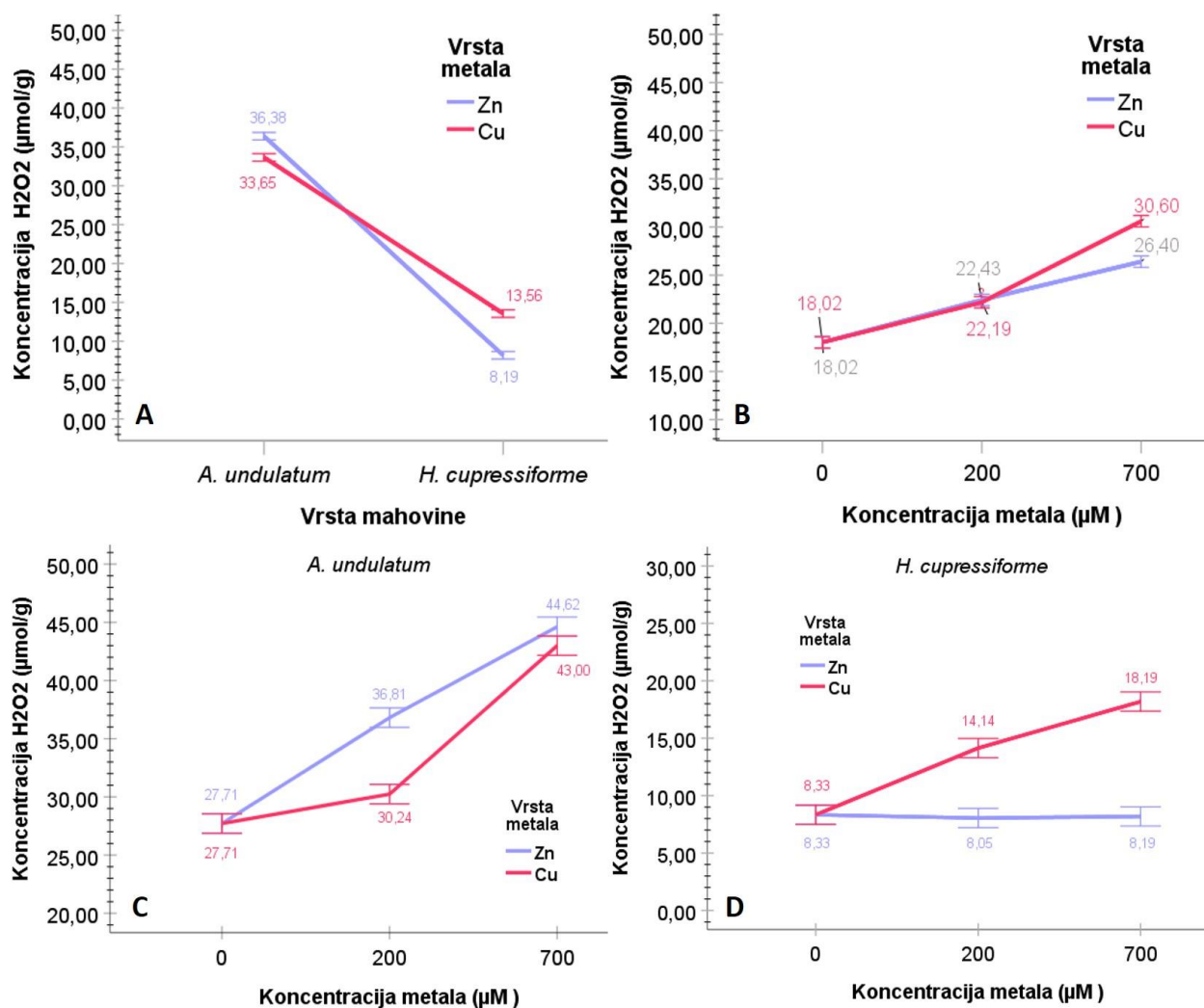
**Tabela 12.** Koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kod mahovina *A. undulatum* i *H. cupressiforme* gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-acetata ili Cu-acetata u uslovima dugotrajnog stresa (srednja vrednost ± SD). Različiti stepeni statističke značajnosti označeni su kao: \*\*\* = p < 0,001; \*\* = p < 0,01; \* = p < 0,05. Srednje vrednosti različitih nivoa istog faktora obeležene istim malim slovom nisu značajno različite za nivo verovatnoće P < 0,05 prema Takijevom HSD testu.

Faktori	Nivoi faktora	Koncentracija H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (μmol/g)
Vrsta mahovine (A)	<i>A. undulatum</i>	35,0 ± 7,2 a
	<i>H. cupressiforme</i>	10,9 ± 4,0 b
Vrsta metala (B)	Zn	22,3 ± 15,4 a
	Cu	23,6 ± 11,8 b
	0	18,0 ± 10,1 a
Koncentracija metala (C)	200	22,3 ± 12,2 b
	700	28,5 ± 16,4 c
	A	***
B	***	
C	***	
A × B	***	
A × C	***	
B × C	***	
A × B × C	***	

U zavisnosti od vrste mahovine, efekat pojedinačnih metala na produkciju vodonik-peroksida se značajno razlikovao (Grafik 6A). Kod *A. undulatum* cink je doveo do značajno veće produkcije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u odnosu na bakar (za 2,730 μmol/g), dok je kod *H. cupressiforme* značajno veća koncentracija vodonik-peroksida (za 5,365 μmol/g) bila kod biljaka tretiranih bakrom.

Sa povećavanjem koncentracije Zn- i Cu-acetata, uočen je različit efekat dva metala na koncentraciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kod obe vrste mahovina (Grafik 6B). Na nivou dvostrukih interakcija, pri dodatku 200 μM metal-acetata u podlogu nije bilo značajnih razlika u dejstvu cinka i bakra, međutim, kod biljaka koje su gajene na podlogama sa dodatkom 700 μM Cu-acetata, koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bila je značajno veća (za 4,190 μmol/g) nego kod mahovina gajenih na podlogama sa istom koncentracijom Zn-acetata. Prisustvo značajne trostruke interakcije između vrste mahovine, koncentracije metala i vrste metala, ukazuje na to da se efekat povećanja koncentracije metala u podlozi na produkciju vodonik-peroksida razlikovao kod *H. cupressiforme* i *A. undulatum* u zavisnosti od vrste metala (Grafik 6C, D). Sa Grafika 6C može se uočiti da je kod vrste *A. undulatum* porast koncentracije soli oba metala u podlozi doveo do povećanja koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u biljkama, ali da je efekat Zn-acetata na produkciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bio značajno veći nego efekat Cu-acetata. S druge strane, kod *H. cupressiforme*, uočen je dugačiji trend - sa povećanjem koncentracije Cu-

acetata u podlozi, rasla je i koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kod ove pleurokarpne mahovine, dok primena Zn-acetata nije značajno uticala na produkciju ove ROS forme (Grafik 6D).



**Grafik 6.** Uticaj interakcija faktora na koncentraciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kod mahovina *A. undulatum* i *H. cupressiforme* gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-acetata ili Cu-acetata u uslovima dugotrajnog stresa: A - vrsta mahovine × vrsta metala; B - koncentracija metala × vrsta metala; C i D – vrsta mahovine × vrsta metala × koncentracija metala. Na graficima su prikazane srednje vrednosti ± standardna greška.

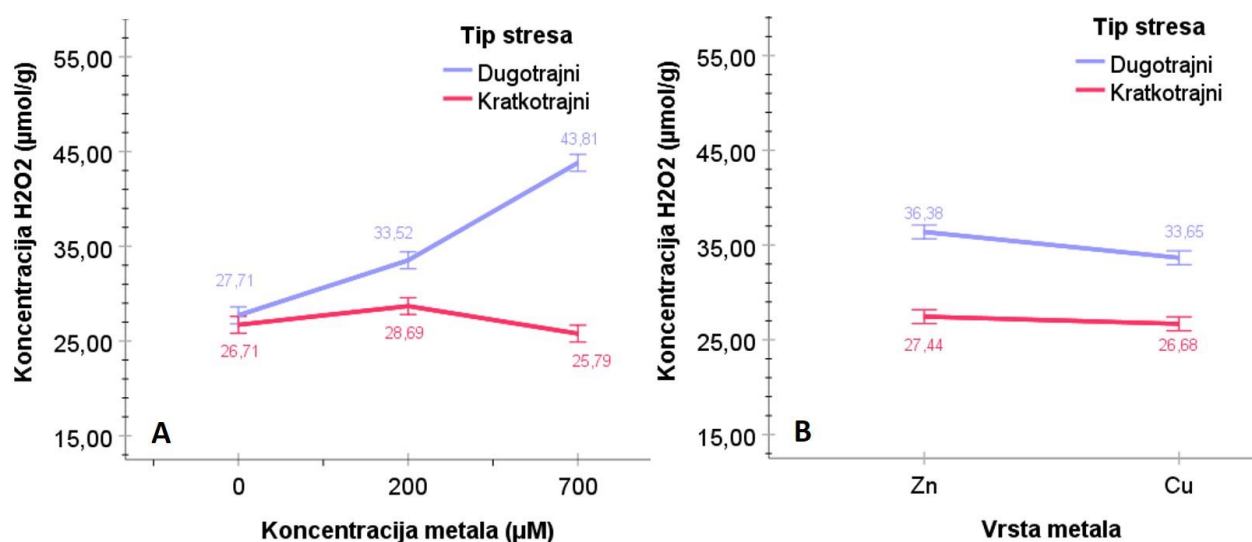
U eksperimentima sa dugotrajnim i kratkotrajnim stresom kod vrste *A. undulatum* Zn-acetat je imao značajno veći efekat na povećanje koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u odnosu na Cu-acetat (Tabela 13).

Efekat primenjene koncentracije dva metala na koncentraciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kod vrste *A. undulatum*, značajno se razlikovao u zavisnosti od tipa stresa (Grafik 7A). Primena Cu- i Zn-acetata koncentracije 200 µM dovela je do značajnog povećanja produkcije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kod biljaka u oba tipa eksperimenata. U eksperimentima sa dugotrajnim stresom kod *A. undulatum* značajno veća proizvodnja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (za 10,286 µmol/g) bila je kada su biljke izlagane 700 µM metal-acetatima nego kada su rasle na podlogama sa 200 µM solima isptivanih metala. U eksperimentima sa kratkotrajnim stresom, mahovine gajene na podlogama sa 200 µM metal-acetatima imale su značajno višu koncentraciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (za 2,905 µmol/g) nego one gajene na podlogama sa najvišom koncentracijom soli. Ovo ukazuje na pozitivno kumulativno dejstvo povećane koncentracije metala u medijumu i trajanja stresa na produkciju vodonik-peroksida kod vrste *A. undulatum*.

**Tabela 13.** Koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kod biljaka *A. undulatum* gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-acetata ili Cu-acetata u uslovima kratkotrajnog i dugotrajnog stresa (srednja vrednost ± SD). Različiti stepeni statističke značajnosti označeni su kao: \*\*\* = p < 0,001; \*\* = p < 0,01; \* = p < 0,05. Srednje vrednosti različitih nivoa istog faktora obeležene istim malim slovom nisu značajno različite za nivo verovatnoće P < 0,05 prema Takijevom HSD testu.

Faktori	Nivoi faktora	Koncentracija H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (μmol/g)
Vrsta metala (A)	Zn	31,9 ± 6,9 a
	Cu	30,2 ± 6,3 b
	0	27,2 ± ,9 a
Koncentracija metala (B)	200	31,1 ± 3,8 b
	700	34,8 ± 9,6 c
Tip stresa (C)	Dugotrajni	35,0 ± 7,2 a
	Kratkotrajni	27,1 ± 2,0 b
A		***
B		***
C		***
A × B		**
A × C		**
B × C		***
A × B × C		***

Efekat dužine stresa na stvaranje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kod *A. undulatum* značajno se razlikovao u zavisnosti od vrste primenjenog metal-acetata. Koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bila je značajno veća u eksperimentima sa dugotrajnim stresom, i te razlike su bile značajne u slučaju oba testirana metala (Grafik 7B). Međutim, u slučaju cinka ova razlika iznosila je 8,937 μmol/g, dok je kod bakra bila značajno manja (6,968 μmol/g). Osim toga, na produkciju vodonik-peroksida značajno su uticale interakcije između koncentracije i vrste metala, kao i između sva tri tipa ispitivanih faktora (Tabela 13).



**Grafik 7.** Uticaj interakcija faktora na koncentraciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kod biljaka *A. undulatum* gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-acetata ili Cu-acetata u uslovima kratkotrajnog i dugotrajnog stresa: A – koncentracija metala × tip stresa; B – vrsta metala × tip stresa. Na graficima su prikazane srednje vrednosti ± standardna greška.

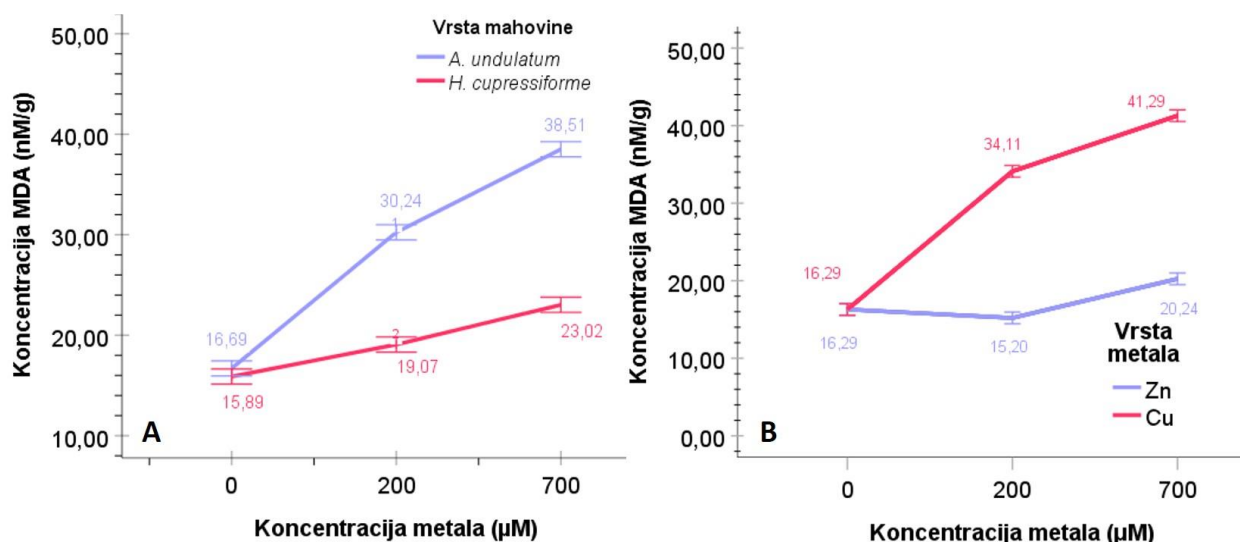
### 4.3.2. Koncentracija malondialdehida (MDA)

Kada su mahovine gajene na podlogama sa dodatkom acetatnih soli cinka i bakra u uslovima dugotrajnog stresa *H. cupressiforme* je u poređenju sa *A. undulatum* imao znatno nižu koncentraciju MDA (Tabela 14). Kad su biljke rasle na podlogama bez dodatka metala, sadržaj MDA kod dve vrste mahovina nije bio značajno različit, ali sa povećanjem koncentracije metala u podlozi, rasle su i razlike u koncentraciji MDA kod dve ispitivane vrste (Grafik 8A). Pri koncentraciji metala u podlozi od 200  $\mu\text{M}$ , *A. undulatum* je imao značajno veću koncentraciju MDA u odnosu na *H. cupressiforme* (za 11,17 nmol/g), dok je pri koncentraciji od 700  $\mu\text{M}$ , razlika bila još veća tj. 15,49 nmol/g. Kod biljaka obe vrste bakar je doveo do značajno veće produkcije MDA nego cink, ali je i kombinovani efekat koncentracije metala i vrste metala u podlozi na sadržaj MDA bio značajan (Tabela 14). Sa primenom 200  $\mu\text{M}$  Cu-acetata u podlozi koncentracija MDA u mahovinama bila je značajno veća nego u kontrolnoj grupi (za 17,82 nmol/g) (Grafik 8B). S druge strane, kada su biljke gajene na podlozi sa dodatkom 200  $\mu\text{M}$  Zn-acetata, nije bilo značajne razlike u koncentraciji MDA kod njih i biljaka iz kontrolne grupe. Kod mahovina koje su rasle na podlogama sa 700  $\mu\text{M}$  Cu- ili Zn-acetata sadržaji MDA bili su značajno veći u odnosu na one kod biljaka gajenih na podlogama sa istom vrstom metala pri koncentraciji od 200  $\mu\text{M}$ . U slučaju Zn-acetata ova razlika bila je 5,04 nmol/g, dok je kod Cu-acetata ta razlika iznosila 7,18 nmol/g. Na koncentraciju MDA u mahovinama značajan kombinovani efekat imali su koncentracija metala u podlozi i vrsta mahovina, kao i kombinacija tri varijable: koncentracija metala  $\times$  vrsta mahovine  $\times$  vrsta metala (Tabela 14).

**Tabela 14.** Koncentracija MDA kod mahovina *A. undulatum* i *H. cupressiforme* gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-acetata ili Cu-acetata u uslovima dugotrajnog stresa (srednja vrednost  $\pm$  SD). Različiti stepeni statističke značajnosti označeni su kao: \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p < 0,05$ . Srednje vrednosti različitih nivoa istog faktora obeležene istim malim slovom nisu značajno različite za nivo verovatnoće  $P < 0,05$  prema Takijevom HSD testu.

Faktori	Nivoi faktora	MDA (nmol/g)
Vrsta mahovine (A)	<i>A. undulatum</i>	28,48 $\pm$ 13,54 a
	<i>H. cupressiforme</i>	19,33 $\pm$ 7,62 b
Vrsta metala (B)	Zn	17,24 $\pm$ 4,85 a
	Cu	30,56 $\pm$ 12,97 b
Koncentracija metala (C)	0	16,29 $\pm$ 0,61 a
	200	24,66 $\pm$ 11,62 b
	700	30,77 $\pm$ 13,82 c
A		***
B		***
C		***
A $\times$ B		***
A $\times$ C		***
B $\times$ C		***
A $\times$ B $\times$ C		***

Kod biljaka *A. undulatum* iz eksperimenata sa dugotrajnim stresom koncentracija MDA bila je značajno veća nego kod onih iz eksperimenata sa kratkotrajnim stresom (Tabela 15). Kada se upoređi koncentracija MDA kod kontrolnih biljaka *A. undulatum* u dva tipa eksperimenata (Grafik 9A) dobijena razlika nije bila značajna (1,694 nmol/g). Međutim, sa porastom koncentracije metala (bakra ili cinka) u podlogama razlika u koncentracijama MDA mahovina kod ove dve grupe bila je značajna i iznosila je 14,92 nmol/g pri koncentraciji 200  $\mu\text{M}$ , odnosno 24,56 nmol/g, kada su biljke gajene na medijumu sa 700  $\mu\text{M}$  metal-acetatima.



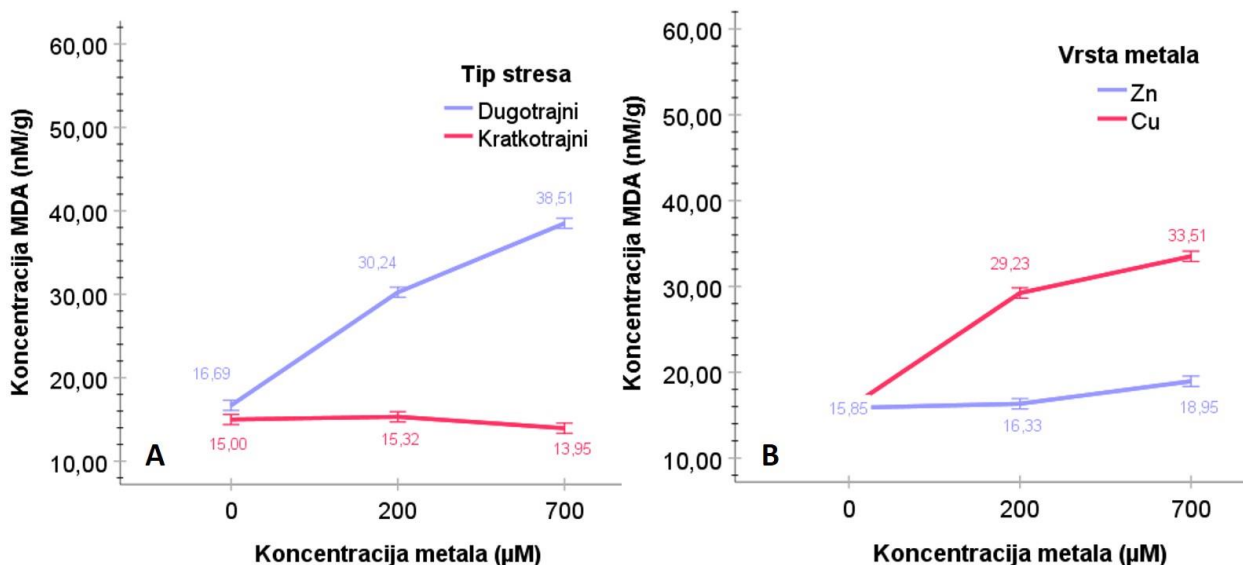
**Grafik 8.** Uticaj interakcija faktora na koncentraciju MDA kod mahovine *A. undulatum* i *H. cupressiforme* gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-acetata ili Cu-acetata u uslovima dugotrajnog stresa: A - koncentracija metala × vrsta mahovine; B – koncentracija metala × vrsta metala. Na graficima su prikazane srednje vrednosti ± standardna greška

Efekat bakra na povećanje koncentracije MDA u odnosu na cink, bio je značajno veći sa porastom koncentracija soli ovih metala u podlozi (Grafik 9B). Najmanja razlika u sadržaju MDA između biljaka tretiranih Zn-acetatom i Cu-acetatom bila je kod kontrolnih grupa, značajno veća (12,90 nmol/g) pri koncentraciji metala od 200 µM, a najveća kod biljaka tretiranih 700 µM metal-acetatima (14,56 nmol/g).

**Tabela 15.** Koncentracija MDA kod biljaka *A. undulatum* gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-acetata ili Cu-acetata u uslovima kratkotrajnog i dugotrajnog stresa (srednja vrednost ± SD). Različiti stepeni statističke značajnosti označeni su kao: \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p < 0,05$ . Srednje vrednosti različitih nivoa istog faktora obeležene istim malim slovom nisu značajno različite za nivo verovatnoće  $P < 0,05$  prema Takijevom HSD testu.

Faktori	Nivoi faktora	MDA (nmol/g)
Vrsta metala(A)	Zn	17,04 ± 4,87 a
	Cu	26,20 ± 14,78 b
	0	15,85 ± 1,08 a
Koncentracija metala (B)	200	22,78 ± 11,38 b
	700	26,23 ± 15,84 c
Tip stresa (C)	Dugotrajni	28,48 ± 13,54 a
	Kratkotrajni	14,76 ± 1,86 b
A		***
B		***
C		***
A × B		***
A × C		***
B × C		***
A × B × C		***





**Grafik 9.** Uticaj interakcija faktora na koncentraciju MDA kod biljaka *A. undulatum* gajenih u uslovima kratkotrajnog i dugotrajnog stresa: A – koncentracija metala × tip stresa; B – koncentracija metala × vrsta metala. Na graficima su prikazane srednje vrednosti ± standardna greška.

#### 4.4. Aktivnost POD kod biljaka *A. undulatum* gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-acetata i Cu-acetata u uslovima dugotrajnog i kratkotrajnog stresa u kulturi *in vitro*

Mahovine kao biljke sitnih dimenzija, naročito kada se gaje u kulturi *in vitro*, predstavljaju poseban izazov prilikom sakupljanja materijala za biohemijske analize, posebno za analize parametara poput enzimskih komponenti antioksidativnog odgovora koje zahtevaju relativno veliku masu uzorka. Dobijanje dovoljne količine materijala naročito je teško kada su biljke gajene u uslovima *in vitro* dodatno izložene nekoj vrsti abiotičkog stresa, poput stresa metalima. Zbog znatno krupnijih izdanaka (debljih kauloida i nekoliko puta veće površine filoida) biljaka *A. undulatum* u poređenju sa izdancima *H. cupressiforme*, za ispitivanje aktivnosti POD u ovom istraživanju, odabrana je samo ova akrokarpna vrsta.

Biljke gajene na podlogama sa dodatkom Cu-acetata imale su značajno veću aktivnost peroksidaza u odnosu na biljke izlagane Zn-acetatima (Tabela 16). Kombinovani efekat vrste metala i koncentracije metala u podlozi bio je veoma značajan (Tabela 16, Grafik 10A). U slučaju biljaka *A. undulatum* izlaganih Cu-acetatima, najveća aktivnost POD bila je pri koncentraciji 700 µM, i ona je bila značajno veća nego u kontrolnoj grupi (za 0,93 U/mg). S druge strane, aktivnost peroksidaza biljaka *A. undulatum* gajenih na podlozi sa 700 µM Zn-acetatom nije se značajno razlikovala od one kod kontrolnih biljaka (za 0,14 U/mg), ali je bila značajno manja od aktivnosti POD kod biljaka izlaganih 200 µM Zn-acetatu (niža za 0,16 U/mg).

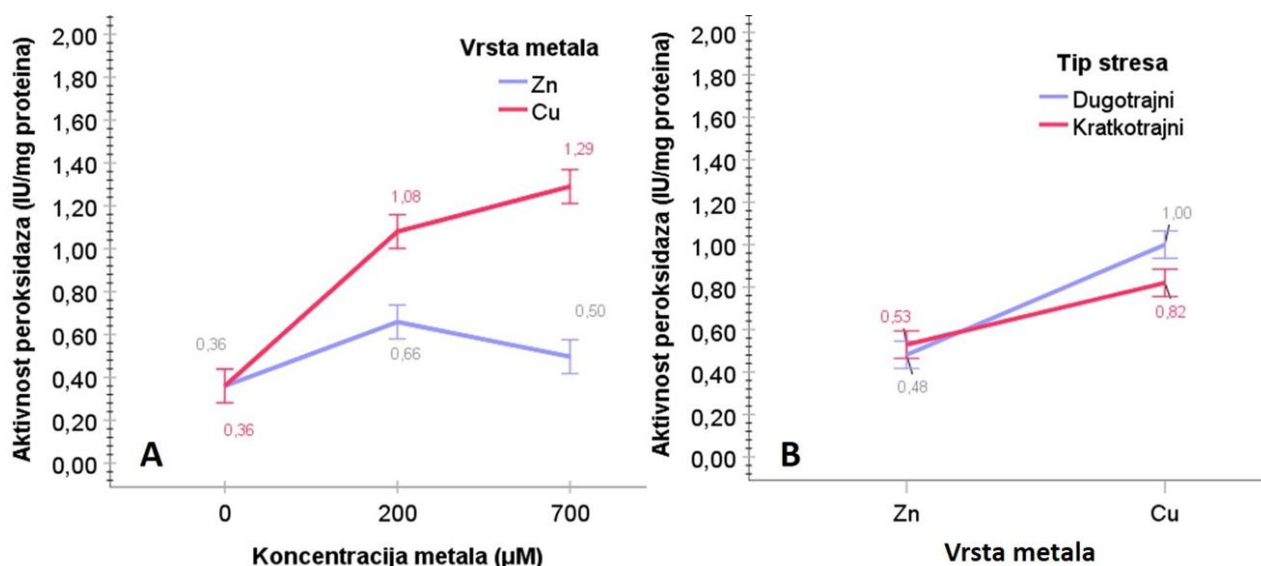
Aktivnost peroksidaza bila je pod značajnim kombinovanim efektom vrste metala i tipa stresa (Grafik 10B). Kada su mahovine gajene na podlogama sa Zn-acetatom pet dana ili pet nedelja, vrednosti ispitivanog parametra nisu se značajno razlikovale (razlike vrednosti = 0,05 U/mg). Međutim, kod biljaka gajenih pet nedelja u kontinuitetu na podlogama sa Cu-acetatom aktivnost POD bila je značajno veća (za 0,18 U/mg), nego u postavkama gde su mahovine izlagane pet dana ovom metalu.

Utvrđeno je da su trostruke interakcije između tipa stresa, koncentracije metala i vrste metala imale značajan uticaj na vrednosti aktivnosti POD kod *A. undulatum*. Na osnovu Grafika 11(A, B) može se zaključiti da je primena 200 µM Cu-acetata imala različit uticaj na aktivnost POD u zavisnosti od tipa eksperimenta – veća aktivnost peroksidaza pri ovoj koncentraciji bila je kod biljaka iz eksperimenata sa dugotrajnim stresom. S druge strane, efekat 700 µM Cu-acetata bio je

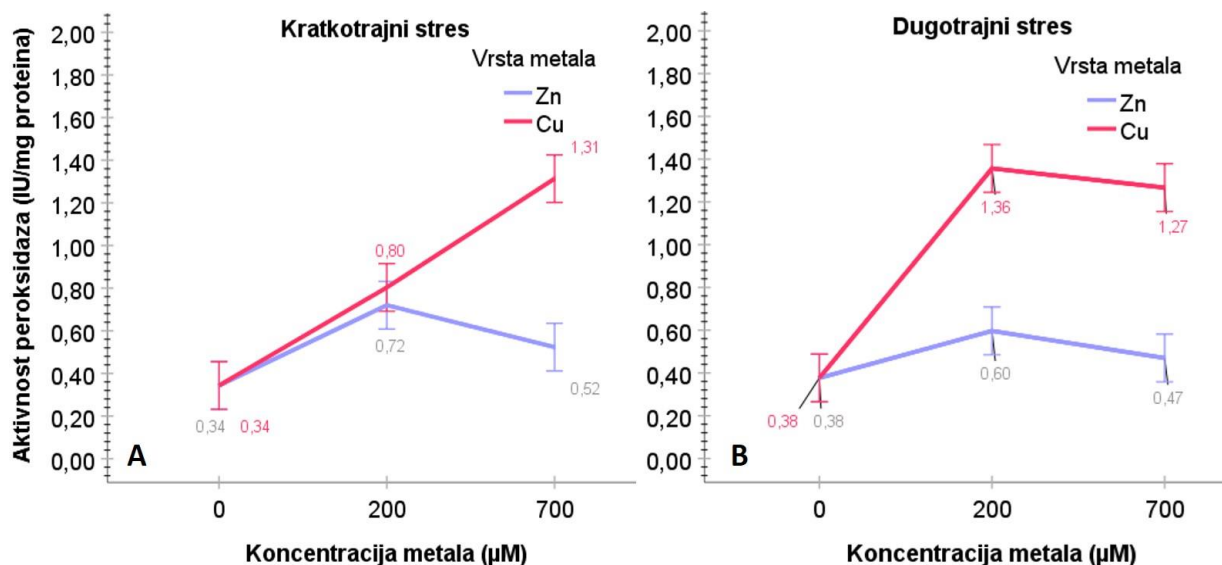
sličan bez obzira na tip stresa. Aktivnosti POD pod uticajem rastućih koncentracija Zn-acetata u oba tipa eksperimenata pri svim koncentracijama menjala se po sličnom obrascu.

**Tabela 16.** Aktivnost POD kod biljaka *A. undulatum* gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-acetata ili Cu-acetata u uslovima kratkotrajnog i dugotrajnog stresa (srednja vrednost  $\pm$  SD). Različiti stepeni statističke značajnosti označeni su kao: \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p < 0,05$ . Srednje vrednosti različitih nivoa istog faktora obeležene istim malim slovom nisu značajno različite za nivo verovatnoće  $P < 0,05$  prema Takijevom HSD testu.

Faktori	Nivoi faktora	Aktivnost POD (U/mg proteina)
Vrsta metala (A)	Zn	0,505 $\pm$ 0,142 a
	Cu	0,910 $\pm$ 0,453 b
	0	0,360 $\pm$ 0,038 a
Koncentracija metala (B)	200	0,869 $\pm$ 0,313 b
	700	0,893 $\pm$ 0,430 b
Tip stresa (C)	Dugotrajni	0,741 $\pm$ 0,427 a
	Kratkotrajni	0,674 0,356 b
A		***
B		***
C		*
A $\times$ B		***
A $\times$ C		**
B $\times$ C		**
A $\times$ B $\times$ C		***



**Grafik 10.** Uticaj interakcija faktora na aktivnost POD kod biljaka *A. undulatum* gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-acetata ili Cu-acetata u uslovima kratkotrajnog i dugotrajnog stresa: A - koncentracija metala  $\times$  vrsta metala; B - koncentracija metala  $\times$  tip stresa. Na graficima su prikazane srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška.



**Grafik 11.** Uticaj trostrukih interakcija faktora na aktivnost POD kod biljaka *A. undulatum* gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-acetata ili Cu-acetata u uslovima kratkotrajnog i dugotrajnog stresa: tip stresa × koncentracija metala × vrsta metala. Na graficima su prikazane srednje vrednosti ± standardna greška.

#### 4.5. Antioksidativni kapacitet mahovina *H. cupressiforme* i *A. undulatum* gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-acetata ili Cu-acetata u kulturi *in vitro*

Mahovine i druge briofite poznate su po produkciji raznovrsnih fenolnih jedinjenja. Kod drugih biljnih vrsta pokazano je da fenolna jedinjenja mogu učestvovati u odbrani od oksidativnog stresa uzrokovanog abiotičkim faktorima. Kako bi se ispitalo da li fenolna jedinjenja, koja proizvode ispitivane vrste mahovina, imaju ulogu u odgovoru biljaka na povećane koncentracije metala u podlozi i odbrani od oksidativnog stresa, određeni su ukupni antioksidativni kapacitet biljaka i sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja Folin – Ciocalteu i DPPH metodama.

##### 4.5.1. Koncentracija ukupnih fenolnih jedinjenja

U eksperimentima sa dugotrajnim stresom *A. undulatum* karakterisao se značajno većom količinom fenolnih jedinjenja u poređenju sa *H. cupressiforme* (Tabela 17).

U zavisnosti od vrste mahovine razlikovao se uticaj individualnih metala na koncentraciju ukupnih fenolnih jedinjenja (Tabela 17; Grafik 12A). Kod vrste *A. undulatum*, Cu-acetat je doveo do znatno većeg smanjenja koncentracije ukupnih fenola u odnosu na Zn-acetat (za 3,25 mmol GAE/g), nego što je to bio slučaj kod biljaka *H. cupressiforme* gde je razlika u koncentraciji fenola između biljaka tretiranih bakrom i cinkom bila 1,3 mmol GAE/g. Kod obe vrste, dobijene razlike bile su značajne.

Sa porastom primenjene koncentracije metal-acetata, smanjivala se koncentracija ukupnih fenolnih jedinjenja kod obe ispitivane vrste, ali se efekat koncentracije metala u podlozi na sadržaj fenola kod biljaka razlikovao u zavisnosti od vrste mahovine (Grafik 12 B). Dodatak 200 µM metal-acetata u podlogu doveo je do značajnog pada koncentracije ukupnih fenola kod obe vrste mahovina u odnosu na kontrolne grupe biljaka, i ta razlika u slučaju *A. undulatum* iznosila je 1,06 mmol GAE/g, dok je u slučaju *H. cupressiforme* bila 0,36mmol GAE/g. Kada su biljake gajene na podlogama sa 700 µM acetatima ispitivanih metala, kod *H. cupressiforme* nije bilo značajne razlike u količini fenola između ovih i biljaka gajenih na podlogama sa 200 µM metal-acetatima. Kod biljaka *A. undulatum* ova razlika je bila značajna i iznosila je 1,56 mmol GAE/g.

Kod različitih vrsta mahovina, efekat pojedinačnih metala u zavisnosti od primenjene koncentracije bio je različit (Grafik 12C, D). Kod obe biljne vrste, pri svakoj ispitivanoj koncentraciji metala u podlozi, Cu-acetat je uzrokovao veću inhibiciju u sintezi fenolnih jedinjenja nego Zn-acetat. Kod *A. undulatum*, sa povećanjem koncentracije Zn- i Cu-acetata u podlozi primećen je trend opadanja koncentracije ukupnih fenola u biljakama. S druge strane, kod biljaka *H. cupressiforme* gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-acetata trend smanjenja koncentracije ukupnih fenolnih jedinjenja sa povećanjem koncentracije ovog acetata nije primećen. Pri nižoj koncentraciji Zn-acetata u podlozi, sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja bio je sličan kod biljaka gajenih na ovoj podlozi i kod kontrolne grupe biljaka. S druge strane, biljke *H. cupressiforme* iz tretmana sa 700  $\mu\text{M}$  Zn-acetatom imale su veći sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u poređenju sa biljakama iz kontrolne grupe. Kod biljaka ove vrste, maksimalni negativni efekat Cu-acetata na koncentraciju fenola postignut je već primenom niže koncentracije Cu-acetata.

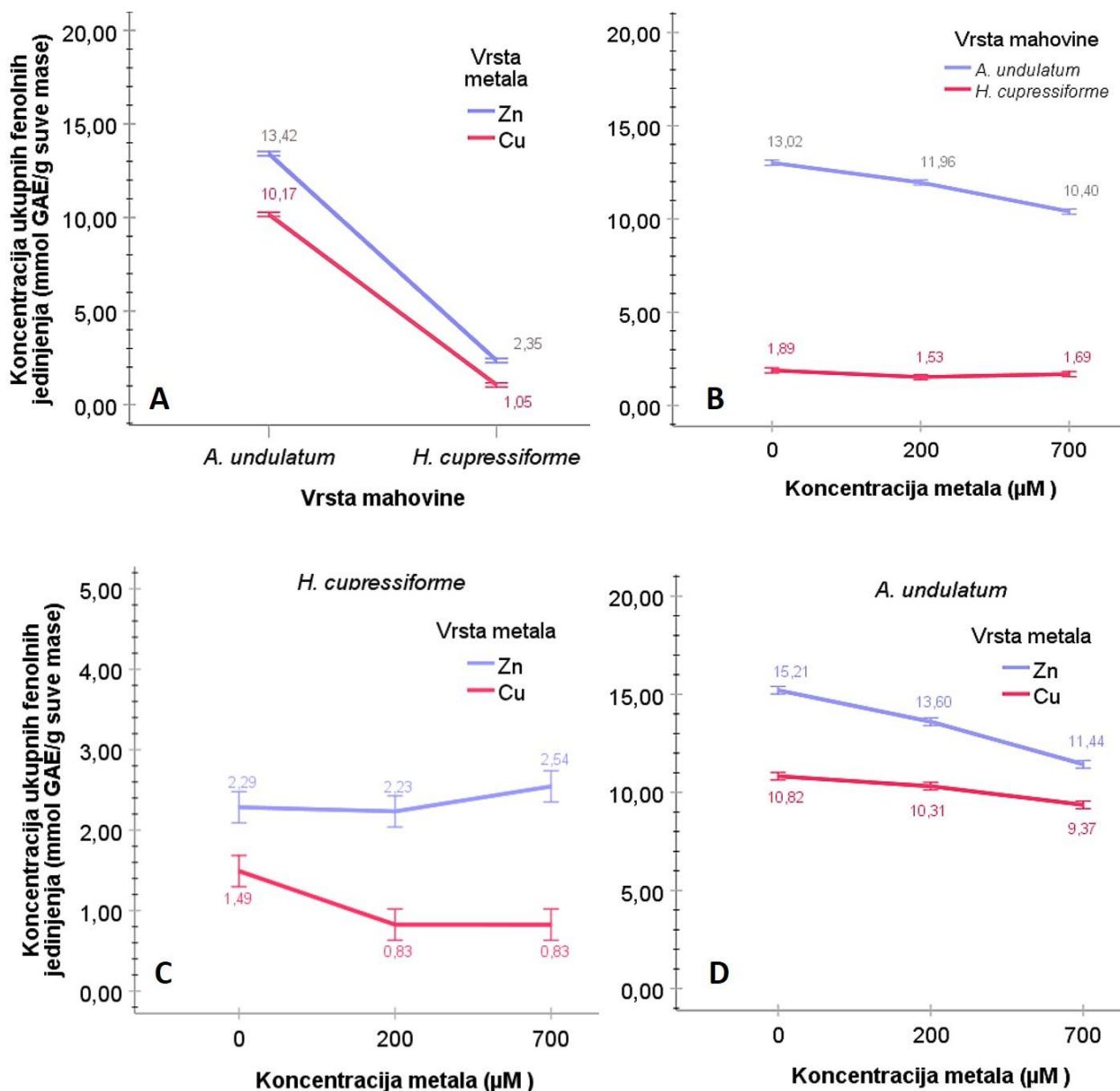
**Tabela 17.** Koncentracija ukupnih fenolnih jedinjenja kod mahovina *A. undulatum* i *H. cupressiforme* gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-acetata ili Cu-acetata u uslovima dugotrajnog stresa (srednja vrednost  $\pm$  SD). Različiti stepeni statističke značajnosti označeni su kao: \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p < 0,05$ . Srednje vrednosti različitih nivoa istog faktora obeležene istim malim slovom nisu značajno različite za nivo verovatnoće  $P < 0,05$  prema Takijevom HSD testu.

Faktori	Nivoi faktora	Koncentracija ukupnih fenolnih jedinjenja (mmol GAE/g)
Vrsta mahovine (A)	<i>A. undulatum</i>	11,8 $\pm$ 2,1 a
	<i>H. cupressiforme</i>	1,7 $\pm$ ,7 b
Vrsta metala (B)	Zn	7,9 $\pm$ 5,8 a
	Cu	5,6 $\pm$ 4,7 b
Koncentracija metala (C)	0	7,5 $\pm$ 12 a
	200	6,7 $\pm$ 5,6 b
	700	6,0 $\pm$ 4,7 c
A		***
B		***
C		***
A $\times$ B		***
A $\times$ C		***
B $\times$ C		***
A $\times$ B $\times$ C		***

U eksperimentima sa dva tipa duzine stresa kod vrste *A. undulatum*, koncentracija ukupnih fenolnih jedinjenja bila je značajno viša kod biljaka poreklom iz eksperimenata sa dugotrajnim stresom (Tabela 18).

U zavisnosti od tipa stresa, značajno se razlikovao i efekat pojedinačnih metala (Grafik 13A). Bakar je imao značajno negativniji efekat na koncentraciju fenola u odnosu na cink u uslovima dugotrajnog stresa (za 3,25 mmol GAE/g). Kada su biljke izlagane metal-acetatima kraći

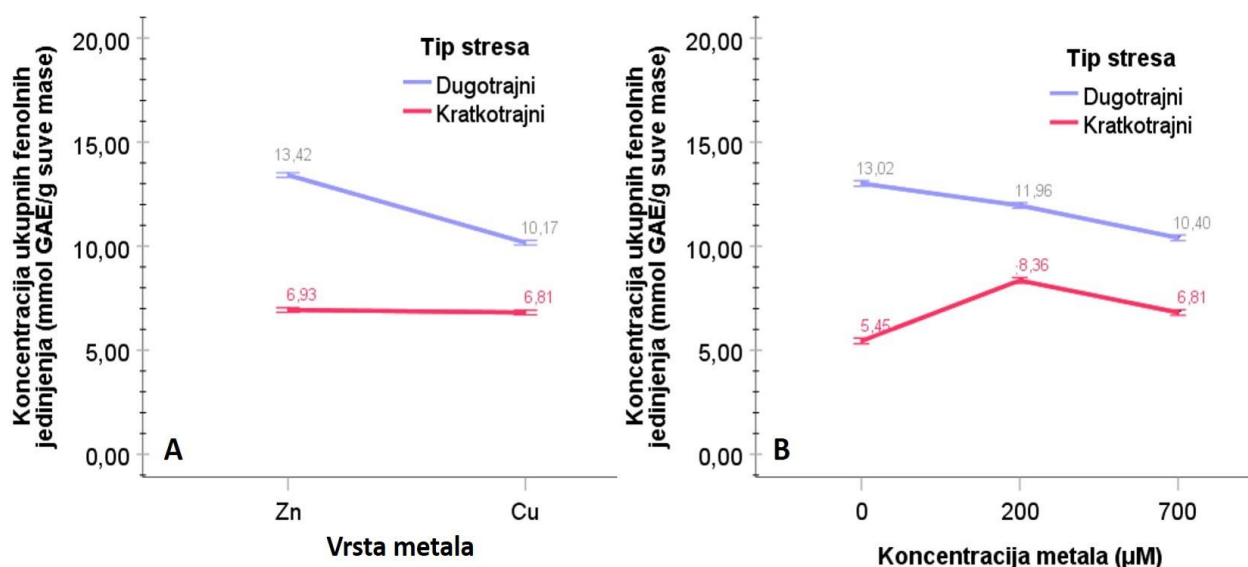
period, efekat cinka i bakra se nije značajno razlikovao (razlika vrednosti = 0,12 mmol GAE/g). U zavisnosti od tipa trajanja stresa, razlikovao se i efekat različitih koncentracija metal-acetata u podlogama na koncentraciju ukupnih fenolnih jedinjenja kod *A. undulatum* (Grafik 13B). U eksperimentima sa dugotrajnim stresom, koncentracija fenola bila je značajno niža u grupi biljaka gajenih na podlogama sa 200  $\mu\text{M}$  metal-acetatima, nego u kontrolnoj grupi. S druge strane, pri istoj koncentraciji metal-acetata u podlozi, biljke iz eksperimenata sa kratkotrajnim stresom imale su značajno veću koncentraciju ukupnih fenola u poređenju sa odgovarajućom kontrolom. U oba tipa eksperimenata sa različitom dužinom stresa, kod biljaka gajenih na podlogama sa dodatkom 700  $\mu\text{M}$  metal-acetata uočene su značajno niže vrednosti ispitivanog parametra nego kod biljaka gajenih na podlogama sa dodatkom 200  $\mu\text{M}$  acetata ispitivanih metala isti vremenski period.



**Grafik 12.** Uticaj interakcija faktora na koncentraciju ukupnih fenolnih jedinjenja kod mahovina *A. undulatum* i *H. cupressiforme* gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-acetata ili Cu-acetata u uslovima dugotrajnog stresa: A - vrsta mahovine × vrsta metala; B - koncentracija metala × vrsta mahovine; C i D – vrsta mahovine × vrsta metala × koncentracija metala. Na graficima su prikazane srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška.

**Tabela 18.** Koncentracija ukupnih fenolnih jedinjenja kod biljaka *A. undulatum* gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-acetata ili Cu-acetata u uslovima kratkotrajnog i dugotrajnog stresa (srednja vrednost  $\pm$  SD). Različiti stepeni statističke značajnosti označeni su kao: \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p < 0,05$ . Srednje vrednosti različitih nivoa istog faktora obeležene istim malim slovom nisu značajno različite za nivo verovatnoće  $P < 0,05$  prema Takijevom HSD testu.

Faktori	Nivoi faktora	Koncentracija ukupnih fenolnih jedinjenja (mmol GAE/g)
Vrsta metala (A)	Zn	10,173 $\pm$ 3,67 a
	Cu	8,490 $\pm$ 1,93 b
	0	9,231 $\pm$ 4,27 a
Koncentracija metala (B)	200	10,157 $\pm$ 2,27 b
	700	8,606 $\pm$ 2,04 c
Tip stresa (C)	Dugotrajni	11,791 $\pm$ 2,07 a
	Kratkotrajni	6,872 $\pm$ 1,27 b
A		***
B		***
C		***
A $\times$ B		***
A $\times$ C		***
B $\times$ C		***
A $\times$ B $\times$ C		***



**Grafik 13.** Uticaj interakcija faktora na koncentraciju ukupnih fenolnih jedinjenja kod biljaka *A. undulatum* gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-acetata ili Cu-acetata u uslovima kratkotrajnog i dugotrajnog stresa: A – vrsta metala  $\times$  tip stresa; B – koncentracija metala  $\times$  tip stresa. Na graficima su prikazane srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška.



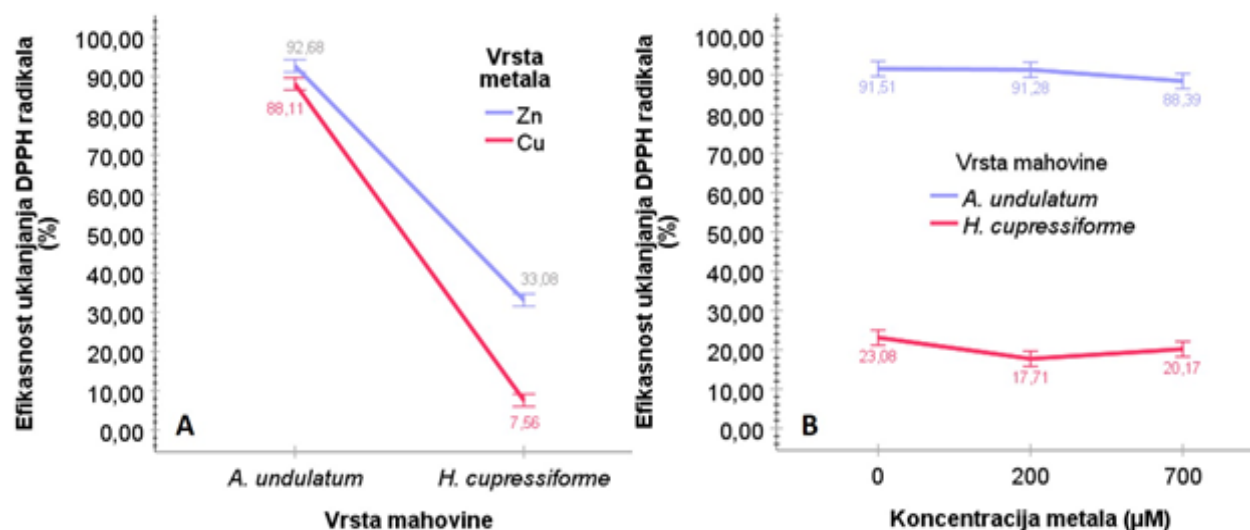
#### 4.5.2. Efikasnost uklanjanja DPPH radikala

U eksperimentima sa dugotrajnim stresom *A. undulatum* se karakterisao znatno većim kapacitetom za uklanjanje DPPH radikala u poređenju sa *H. cupressiforme* (Tabela 19).

**Tabela 19.** Efikasnost uklanjanja DPPH radikala kod mahovina *A. undulatum* i *H. cupressiforme* gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-acetata ili Cu-acetata u uslovima dugotrajnog stresa (srednja vrednost  $\pm$  SD). Različiti stepeni statističke značajnosti označeni su kao: \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p < 0,05$ , NZ = razlike nisu statistički značajne. Srednje vrednosti različitih nivoa istog faktora obeležene istim malim slovom nisu značajno različite za nivo verovatnoće  $P < 0,05$  prema Takijevom HSD testu.

Faktori	Nivoi faktora	Efikasnost uklanjanja DPPH radikala (%)
Vrsta mahovine (A)	<i>A. undulatum</i>	90,4 $\pm$ 3,8 a
	<i>H. cupressiforme</i>	20,3 $\pm$ 13,5 b
Vrsta metala (B)	Zn	62,9 $\pm$ 30,8 a
	Cu	47,8 $\pm$ 41,6 b
Koncentracija metala (C)	0	57,3 $\pm$ 37,2 a
	200	54,5 $\pm$ 39,4 b
	700	54,3 $\pm$ 37,2 b
A		***
B		***
C		*
A $\times$ B		***
A $\times$ C		*
B $\times$ C		NZ
A $\times$ B $\times$ C		NZ

Efekat Zn- i Cu-acetata bio je značajno različit kod dve vrste mahovina (Grafik 14A).



**Grafik 14.** Uticaj interakcija faktora na efikasnost uklanjanja DPPH radikala kod mahovina *A. undulatum* i *H. cupressiforme* gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-acetata ili Cu-acetata u uslovima dugotrajnog stresa: A - vrsta mahovine  $\times$  vrsta metala; B – koncentracija metala  $\times$  vrsta mahovine. Na graficima su prikazane srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška.



Kod vrste *A. undulatum* razlika u efektima cinka i bakra na efikasnost uklanjanja DPPH radikala nije bila značajna, dok je kod *H. cupressiforme* bakar doveo do značajnog pada od 25,44% u efikasnosti uklanjanja DPPH radikala u odnosu na cink (Grafik 14A). Sa porastom koncentracije metala u podlozi oba metala su na sličan način uticala na ispitivani parametar, na šta ukazuje odsustvo značajnih interakcija između vrste metala i koncentracije metala u podlozi (Tabela 19). Efikasnost uklanjanja DPPH radikala kod *H. cupressiforme* i *A. undulatum* u zavisnosti od primenjene koncentracije metal-acetata u podlozi menjala se po sličnom obrascu kao i koncentracija ukupnih fenolnih jedinjenja (Grafik 14B).

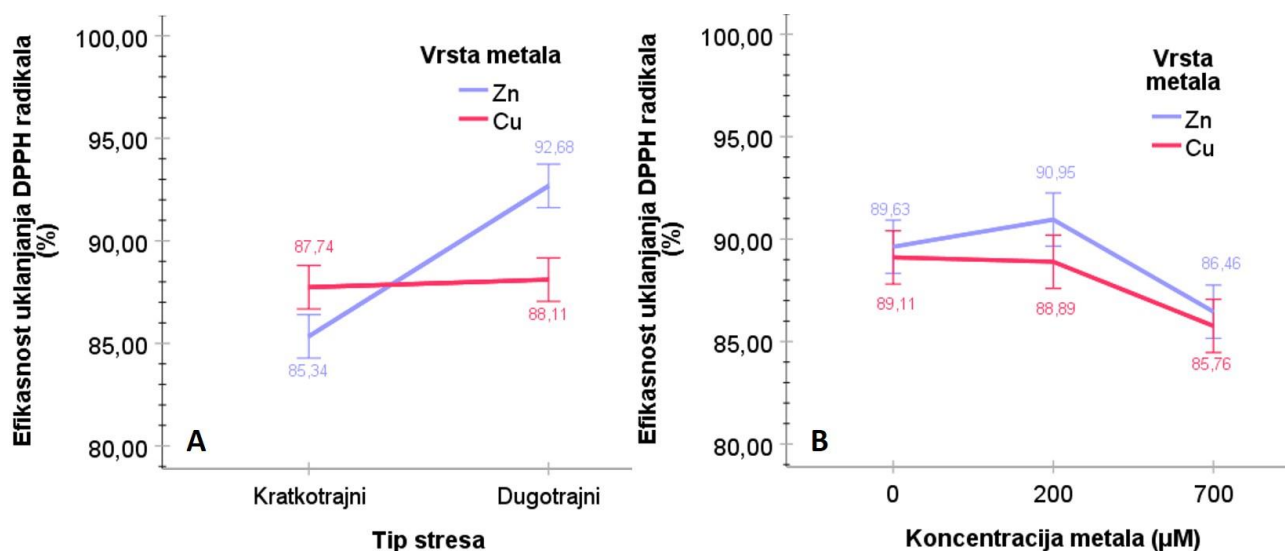
U eksperimentima sa dugotrajnim i kratkotrajnim stresom kod vrste *A. undulatum*, efekat Zn-acetata i Cu-acetata na efikasnost uklanjanja DPPH radikala značajno se razlikovao u zavisnosti od tipa stresa (Tabela 20; Grafik 15A).

**Tabela 20.** Efikasnost uklanjanja DPPH radikala kod biljaka *A. undulatum* gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-acetata ili Cu-acetata u uslovima kratkotrajnog i dugotrajnog stresa (srednja vrednost  $\pm$  SD). Različiti stepeni statističke značajnosti označeni su kao: \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p < 0,05$ , NZ = razlike nisu statistički značajne. Srednje vrednosti različitih nivoa istog faktora obeležene istim malim slovom nisu značajno različite za nivo verovatnoće  $P < 0,05$  prema Takijevom HSD testu.

Faktori	Nivoi faktora	Efikasnost uklanjanja DPPH radikala (%)
Vrsta metala (A)	Zn	89,012 $\pm$ 4,76 a
	Cu	87,922 $\pm$ 2,94 b
	0	89,368 $\pm$ 2,37 b
Koncentracija metala (B)	200	89,923 $\pm$ 2,04 b
	700	86,111 $\pm$ 5,50 a
Tip stresa (C)	Dugotrajni	90,393 $\pm$ 3,77 a
	Kratkotrajni	86,541 $\pm$ 3,14 b
A		*
B		***
C		***
A $\times$ B		NZ
A $\times$ C		***
B $\times$ C		NZ
A $\times$ B $\times$ C		***

Vrednost ispitivanog parametra bila je značajno veća kada su biljke izlagane Zn-acetatu pet nedelja u kontinuitetu, nego kada su gajene na podlogama sa solima istog metala kraći period. S druge strane, kod biljaka gajenih na podlogama sa dodatkom Cu-acetata, efikasnost uklanjanja DPPH radikala bila je slična u eksperimentima sa kratkotrajnim i dugotrajnim stresom.

Efekat ispitivanih metala razlikovao se u zavisnosti od primenjene koncentracije metal-acetata (Tabela 20; Grafik 15B). Pri koncentraciji soli od 200  $\mu$ M, biljke gajene na podlozi sa Zn-acetatom imale su značajno veću efikasnost uklanjanja DPPH radikala nego biljke gajene na podlozi sa Cu-acetatom. Između mahovina gajenih na podlogama sa dodatkom 700  $\mu$ M Zn-acetata i Cu-acetata, nije bilo značajne razlike u vrednostima efikasnosti uklanjanja DPPH radikala. Ove vrednosti kod obe grupe biljaka bile su značajno niže nego kod odgovarajućih kontrolnih grupa.



**Grafik 15.** Uticaj interakcija faktora na efikasnost uklanjanja DPPH radikala kod biljaka *A. undulatum* gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-acetata ili Cu-acetata u uslovima kratkotrajnog i dugotrajnog stresa: A – vrsta metala × tip stresa; B – koncentracija metala × vrsta metala. Na graficima su prikazane srednje vrednosti ± standardna greška.

#### 4.6. Koncentracija odabranih hemijskih elemenata kod biljaka *H. cupressiforme* gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-, Cu- i Cd-acetata u uslovima dugotrajnog stresa u kulturi *in vitro*

Jedna od premisa prilikom upotrebe pleurokarpnih vrsta mahovina u biomonitoringu aerozagađenja metalima je da one imaju minimalno usvajanje mineralnih elemenata iz podloge na kojoj rastu. Kako bi se unapredio kvalitet takvih istraživanja, važno je ispitati efikasnost usvajanja metala iz podloge kod vrsta poput *H. cupressiforme*. Stoga, u ovom istraživanju kod biljaka *H. cupressiforme* iz eksperimenata sa dugotrajnim stresom gajenih na podlozi bez dodatka metal-acetata i na podlogama sa 700 µM Zn-, Cu- ili Cd-acetatom metodom XRF spektrometrije određena je koncentracija kalijuma, kalcijuma, sumpora, cinka i bakra. U Tabeli 21 prikazan je uticaj koncentracije i vrste metala u podlozi na sadržaje individualnih elemenata u biljkama.

Koncentracija kalijuma kod *H. cupressiforme* bila je značajno veća u kontrolnoj grupi biljaka, nego kod onih gajenih na podlogama sa 700 µM metal-acetatima (Tabela 21). Značajan je bio kombinovani efekat koncentracije i vrste metala u podlozi (Grafik 16A). Među tri ispitivana metala, kadmijum je imao značajan, najnegativniji, uticaj na sadržaj kalijuma u biljkama, te su biljke tretirane Cd-acetatom imale za 19926,667 ppm nižu koncentraciju kalijuma u odnosu na biljke tretirane cinkom, gde je uočena najveća koncentracija kalijuma. Kod biljaka gajenih na podlozi sa dodatkom Cu-acetata, sadržaj kalijuma bio je značajno viši u odnosu na sadržaj kod biljaka izlaganih Cd-acetatu (za 2893,333 ppm), ali i značajno niži nego kod onih gajenih na podlozi sa Zn-acetatom (za 17033,333 ppm).

U zavisnosti od vrste metala u podlozi, razlikovala se koncentracija kalcijuma u mahovinama (Grafik 16B). Kao i u slučaju kalijuma, koncentracija kalcijuma bila je najniža kod biljaka gajenih na podlozi sa dodatkom Cd-acetata. Ova vrednost bila je za 11466 ppm manja od koncentracije kalcijuma u kontrolnoj grupi biljaka i nije se značajno razlikovala od one izmerene kod biljaka izlaganih Cu-acetatu. S druge strane, koncentracija kalcijuma bila je značajno veća (za 6200 ppm) kod mahovina koje su rasle na podlozi sa dodatim cinkom, nego kada su biljke gajene bez ovog metala. Ova vrednost bila je značajno veća u odnosu na vrednosti izmerene kod biljaka koje su rasle na podlogama sa Cd- i Cu-acetatima.

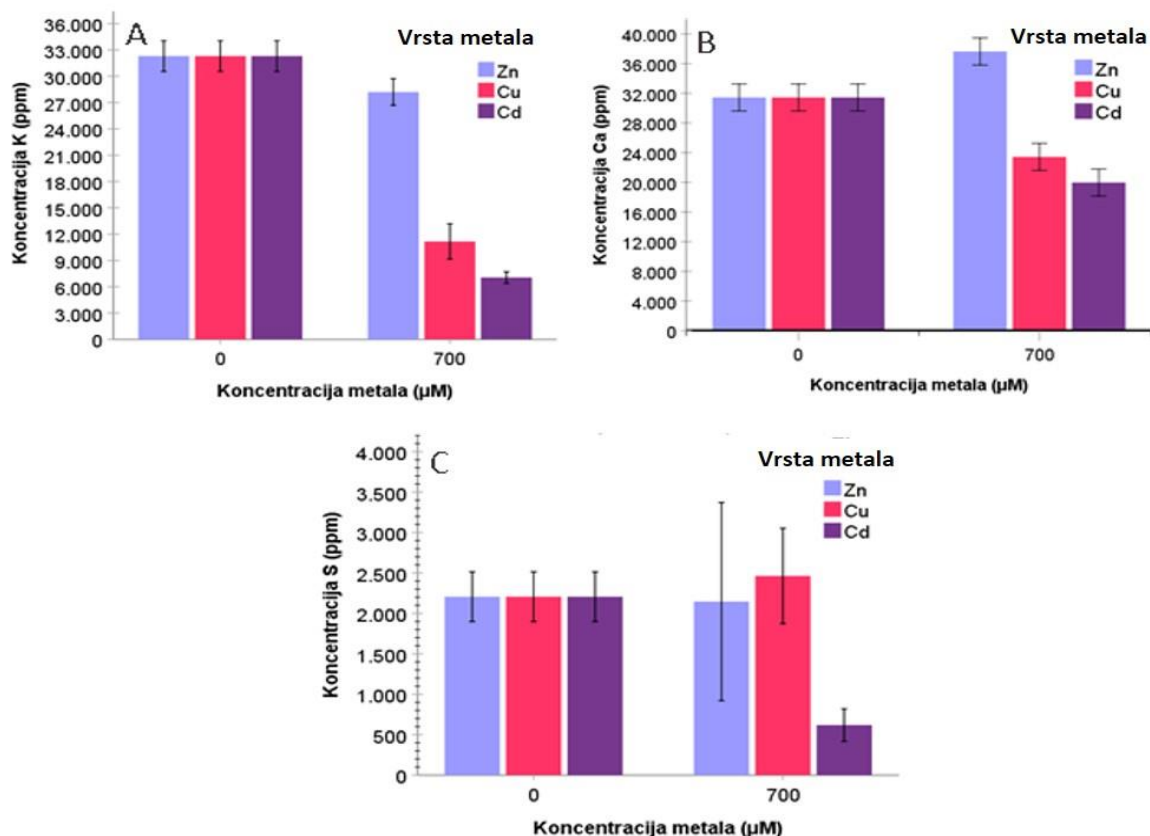
**Tabela 21.** Koncentracija elemenata (K, Ca, S, Zn i Cu) određena XRF metodom kod biljaka *H. cupressiforme* gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-, Cu- ili Cd-acetata u uslovima dugotrajnog stresa (srednja vrednost  $\pm$  SD). ND – nisu detektovane značajne koncentracije. Različiti stepeni statističke značajnosti označeni su kao: \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p < 0,05$ , NZ = razlike nisu statistički značajne. Srednje vrednosti različitih nivoa istog faktora obeležene istim malim slovom nisu značajno različite za nivo verovatnoće  $P < 0,05$  prema Takijevom HSD testu.

Faktori	Nivoi faktora	Koncentracija K (ppm)	Koncentracija Ca (ppm)	Koncentracija S (ppm)	Koncentracija Zn (ppm)	Koncentracija Cu (ppm)
Vrsta metala (A)	Zn	30250,00 $\pm$ 2320,991 a	34533,33 $\pm$ 3640,696 a	2176,67 $\pm$ 323,337 a	760,00 $\pm$ 767,364	ND
	Cu	21733,33 $\pm$ 11594,941 b	27433,33 $\pm$ 4572,818 b	2335,00 $\pm$ 219,795 a	ND	2895,17 $\pm$ 3139,452
	Cd	19676,67 $\pm$ 13836,262 c	25700,00 $\pm$ 6406,559 b	1413,17 $\pm$ 874,222 b	ND	ND
Koncentracija metala (B)	0	32300,00 $\pm$ 606,218 a	31433,33 $\pm$ 1410,674 a	2206,67 $\pm$ 106,89 a	61,33 $\pm$ 4,041 a	33,67 $\pm$ 3,215 a
	700	15880,00 $\pm$ 9412,709 b	27011,11 $\pm$ 8177,782 b	1957,67 $\pm$ 1092,52 b	1460,00 $\pm$ 70,000 b	5756,67 $\pm$ 275,379 b
A		***	***	***	-	-
B		***	***	***	***	**
A $\times$ B		***	***	***	-	-

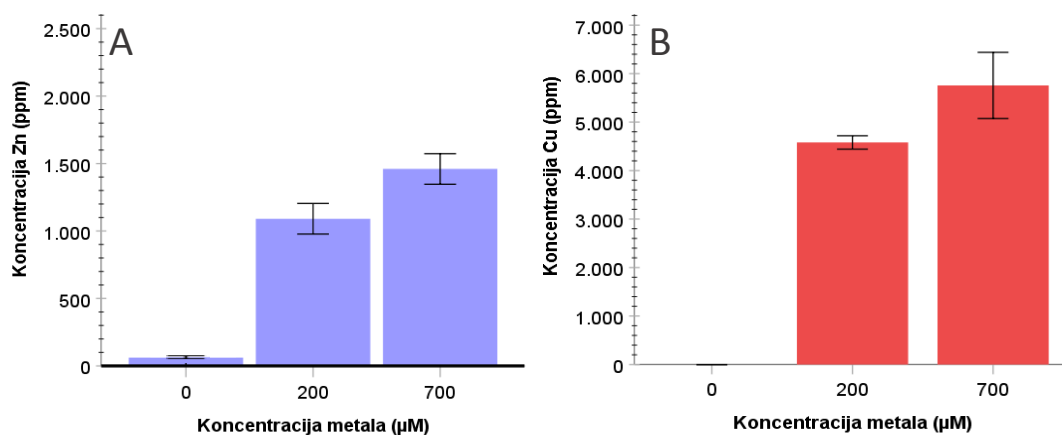
Koncentracija sumpora u mahovinama značajno je zavisila od interakcija vrste metala i koncentracije metala u podlozi (Tabela 21; Grafik 16C). Kod biljaka gajenih na podlogama sa dodatkom Zn- ili Cu-acetata, koncentracije sumpora nisu se značajno razlikovale u odnosu na onu kod biljaka kontrolne grupe, s tim da je koncentracija S kod biljaka gajenih na podlozi sa Cu-acetatom bila neznatno veća nego u kontrolnoj grupi. S druge strane, Cd-acetat je doveo do značajnog pada koncentracije sumpora (1587 ppm) kod mahovina gajenih na podlozi sa ovim metalom u odnosu na koncentraciju kod kontrolne grupe mahovina.

Ukupna koncentracija cinka kod biljaka *H. cupressiforme* gajenih na podlozi bez dodatka acetata i sa 200  $\mu$ M ili 700  $\mu$ M Zn-acetatom prikazana je na Grafiku 17A. Prosečna koncentracija cinka u kontrolnoj grupi iznosila je 61,33 ppm, dok je kod mahovina gajenih na podlozi sa 200  $\mu$ M Zn-acetatom bila značajno veća i iznosila je 1090,67 ppm. Najveća koncentracija cinka izmerena je kod biljaka tretiranih 700  $\mu$ M Zn-acetatom (1460 ppm) i bila je značajno veća u odnosu na druge dve vrednosti.

Ukupni sadržaj bakra kod mahovine *H. cupressiforme*, meren je kod kontrolne grupe biljaka i kod biljaka gajenih na podlogama sa 200  $\mu$ M ili 700  $\mu$ M Cu-acetatom (Grafik 17B). Najveću koncentraciju bakra imale su biljke tretirane 700  $\mu$ M acetatom ovog metala (5756,67 ppm). Kada su biljke gajene na podlozi sa 200  $\mu$ M Cu-acetatom, sadržaj bakra bio je 4580,00 ppm. Najniža koncentracija bakra bila je u kontrolnoj grupi i iznosila je 33,67 ppm. Razlike između između sve tri vrednosti koncentracije bakra bile su statistički značajne.



**Grafik 16.** Koncentracija kalijuma (A), kalcijuma (B) i sumpora (S) određena XRF metodom kod biljaka *H. cupressiforme* gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-, Cu- ili Cd-acetata u uslovima dugotrajnog stresa. Na graficima su prikazane srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška.



**Grafik 17.** Koncentracija cinka (A) i bakra (B) određena XRF metodom kod biljaka *H. cupressiforme* gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-, ili Cu-acetata u uslovima dugotrajnog stresa. Na graficima su prikazane srednje vrednosti  $\pm$  standardna greška.

#### 4.7. Koncentracija i distribucija elemenata u poprečnim presecima gametofora vrsta *A. undulatum* i *H. cupressiforme*

Gametofori vrsta *H. cupressiforme* i *A. undulatum* karakterišu se različitim stepenom anatomske diferencijacije i drugačijim obrascima rasteanja i grananja. Primenom mikro-PIXE metode u ovom istraživanju ispitano je da li se obrasci usvajanja metala iz podloge i raspodele unutar gametofora kod ove dve vrste mahovina razlikuju.

#### 4.7.1. Koncentracija i distribucija elemenata u poprečnim preseccima gametofora vrste *H. cupressiforme* gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-acetata, Cu-acetata i Cd-acetata u kulturi *in vitro*

Kod biljaka *H. cupressiforme* gajenih na podlozi bez dodatka acetatnih soli metala, kao i na podlogama sa 200  $\mu\text{M}$  ili 700  $\mu\text{M}$  Zn-, Cu- ili Cd-acetatom, mikro-PIXE metodom određene su koncentracije odabranih elemenata (K, Ca, S, Zn, Cu i Cd) u poprečnim preseccima apikalnih i bazalnih delova pojedinačnih kauloida. Dodatno, za svaki element generisane su koncentracijske mape raspodele u analiziranim preseccima. U Tabeli 22 prikazan je uticaj koncentracije i vrste metala u podlozi na koncentraciju kalijuma, kalcijuma i sumpora kod poprečnih preseka kauloida *H. cupressiforme* u različitim delovima izdanka.

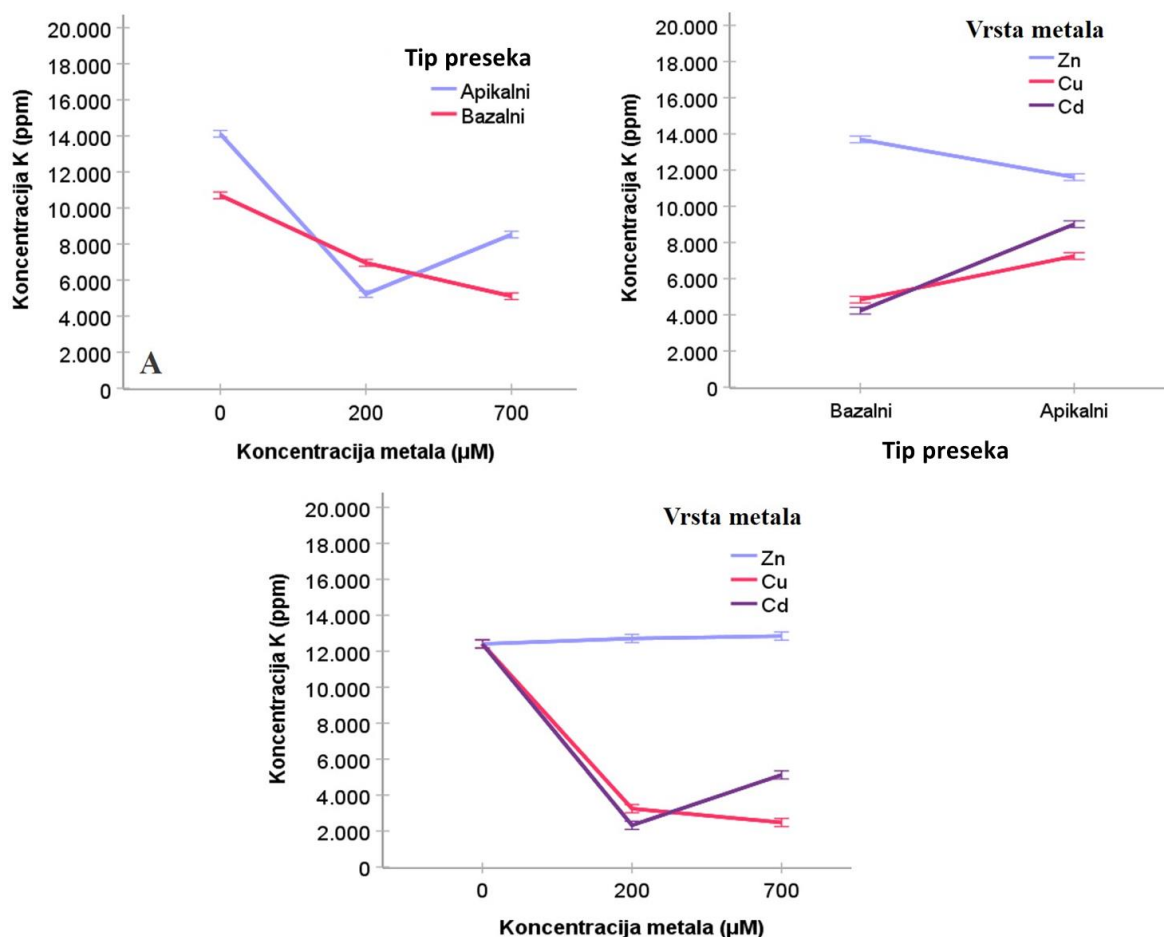
**Tabela 22.** Koncentracija elemenata (K, Ca, S) u poprečnim preseccima biljaka *H. cupressiforme* gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-, Cu- ili Cd-acetata u uslovima dugotrajnog stresa određena mikro-PIXE metodom (srednja vrednost  $\pm$  SD). Različiti stepeni statističke značajnosti označeni su kao: \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p < 0,05$ . Srednje vrednosti različitih nivoa istog faktora obeležene istim malim slovom nisu značajno različite za nivo verovatnoće  $P < 0,05$  prema Takijevom HSD testu.

Faktori	Nivoi faktora	Koncentracija K (ppm)	Koncentracija Ca (ppm)	Koncentracija S (ppm)
Tip preseka (A)	Apikalni	9288,5 $\pm$ 4450,90 a	10496,2 $\pm$ 7652,6 a	2917,5 $\pm$ 697,8 a
	Bazalni	7586,5 $\pm$ 5917,7 b	13134,9 $\pm$ 6159,2 b	2388 $\pm$ 1025,8 b
Vrsta metala (B)	Zn	12653,3 $\pm$ 2571,5 a	14468,3 $\pm$ 9075,2 a	3527,8 $\pm$ 699,5 a
	Cu	6042,0 $\pm$ 4873,9 b	8812,6 $\pm$ 3639,9 b	2393,5 $\pm$ 559,8 b
	Cd	6617,3 $\pm$ 5233,3 c	12165,7 $\pm$ 6354,3 c	2036,8 $\pm$ 700,3 c
Koncentracija metala (C)	0	12407,1 $\pm$ 1784,0 a	5887,4 $\pm$ 690,6 a	2793,7 $\pm$ 592,2 a
	200	6090,7 $\pm$ 5371,4 b	12122,1 $\pm$ 5351,1 b	2724,7 $\pm$ 1100,1 b
	700	6814,8 $\pm$ 5368,3 c	17437,2 $\pm$ 7296 c	2439,8 $\pm$ 970,2 b
A		***	***	***
B		***	***	***
C		***	***	***
A $\times$ B		***	***	***
A $\times$ C		***	***	***
B $\times$ C		***	***	***
A $\times$ B $\times$ C		***	***	***

Kod svih ispitivanih biljaka *H. cupressiforme* koncentracija kalijuma bila je značajno veća u poprečnim preseccima apikalnih u odnosu na bazalne delove kauloida (Tabela 22). Sadržaj kalijuma u različitim delovima biljke, značajno se razlikovao u zavisnosti od primenjene koncentracije soli u podlozi (Grafik 18A). Kod kontrolnih biljaka značajno veća koncentracija kalijuma (za 3414,3 ppm) bila je u apikalnim u odnosu na bazalne poprečne preseke kauloida. S druge strane, kod biljaka *H. cupressiforme* tretiranih 200  $\mu\text{M}$  metal-acetatima, sadržaj kalijuma u apikalnim poprečnim preseccima bio je značajno niži (za 1730,9 ppm) nego kod bazalnih. U poređenju sa poprečnim preseccima odgovarajućih delova kontrolnih biljaka, preseki biljaka gajenih na

podlogama sa 200  $\mu\text{M}$  metal-acetatima imali su značajno nižu koncentraciju. Pri najvišoj koncentraciji acetatnih soli metala u podlozi, sadržaj kalijuma u presecima bazalnih delova gametofora bio je značajno niži nego u apikalnim (za 3422,5 ppm) i značajno niži (za 1852,7 ppm) u odnosu na sadržaj ovog elementa kod bazalnih delova biljaka tretiranih 200  $\mu\text{M}$  metal-acetatima.

Efekat pojedinačnih soli iz medijuma na sadržaj kalijuma u poprečnim presecima biljaka *H. cupressiforme* značajno se razlikovao u zavisnosti od dela gametofora iz koga je presek poticao (Grafik 18B). Kod poprečnih preseka bazalnih delova, najnegativniji efekat na sadržaj kalijuma imao je kadmijum sa prosečnom vrednošću izmerene koncentracije u presecima od 4226,8 ppm, dok je koncentracija bila najveća kada su biljke tretirane Zn-acetatom (13695,5 ppm). Sadržaj kalijuma u poprečnim presecima bazalnog dela biljaka koje su rasle na podlogama sa bakrom bio je 4837,3 ppm. Razlike u efektima svakog od acetata na koncentraciju kalijuma u ovoj grupi poprečnih preseka bile su značajne. U poređenju sa bazalnim, poprečni preseki apikalnih delova biljaka tretiranih Cu- i Cd-acetatom imali su značajno veće koncentracije kalijuma (7246, 6 ppm i 9007,8 ppm redom), dok je kod biljaka tretiranih Zn-acetatom detektovan suprotan trend. Razlike u koncentraciji kalijuma između poprečnih preseka donjeg i gornjeg dela biljaka bile su značajne za sva tri ispitivana acetata, te je u slučaju cinka razlika bila 2084,4 ppm, u slučaju bakra 2409,3 ppm a kod biljaka *H. cupressiforme* tretiranih kadmijumom 4781 ppm.



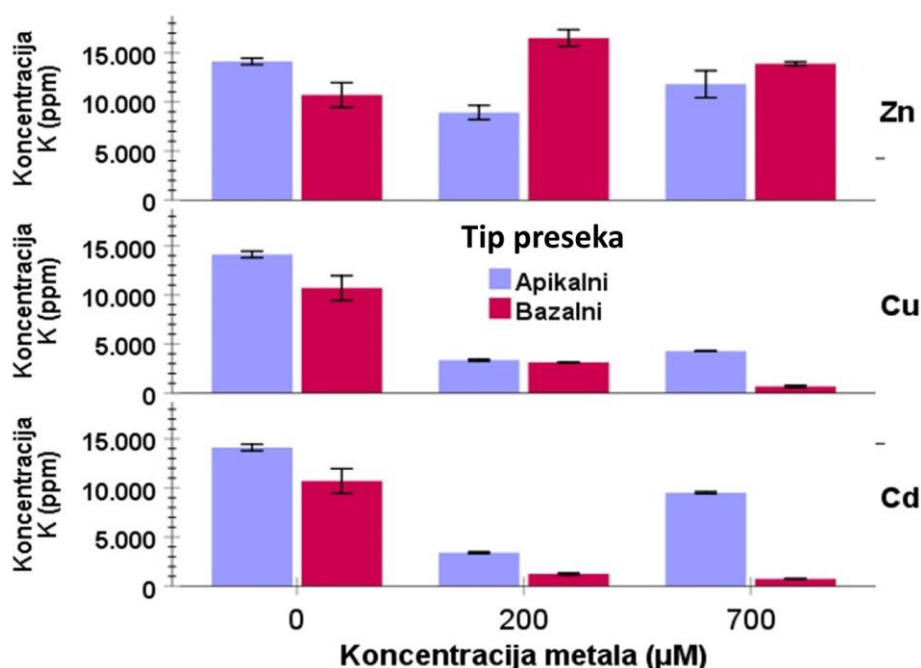
**Grafik 18.** Uticaj interakcija faktora na koncentraciju kalijuma kod poprečnih preseka kauloida biljaka *H. cupressiforme* gajenih u uslovima dugotrajnog stresa na podlogama sa dodatkom Zn-, Cu- ili Cd-acetata određenu mikro-PIXE metodom: A – koncentracija metala  $\times$  tip preseka; B – tip preseka  $\times$  vrsta metala; C – koncentracija metala  $\times$  vrsta metala.

Koncentracija kalijuma kod poprečnih preseka kontrolnih biljaka bila je 12407 ppm. Efekat primenjene koncentracije soli različitih metala u podlozi na sadržaj kalijuma u poprečnim presecima razlikovao se u zavisnosti od vrste metala (Grafik 18C). Bez obzira na koncentraciju, Zn-acetat nije značajno uticao na količinu kalijuma u presecima kauloida *H. cupressiforme*. S druge strane,



poprečni preseki biljaka *H. cupressiforme* gajenih na podlozi sa 200  $\mu\text{M}$  Cu-acetatom imali su značajno nižu koncentraciju kalijuma (za 9164 ppm) u odnosu na onu kod kontrolnih biljaka, dok je efekat Cd-acetata bio najnegativniji. Koncentracija kalijuma kod preseka biljaka tretiranih 200  $\mu\text{M}$  Cd-acetatom iznosila je 2320,3 ppm. Kada su biljke gajene na podlogama sa dodatkom 700  $\mu\text{M}$  metal-acetata, sadržaj kalijuma bio je najmanji kod biljaka tretiranih bakrom i značajno niži (za 767,3 ppm) od koncentracije kalijuma izmerene kod biljaka tretiranih 200  $\mu\text{M}$  acetatom istog metala. Najviši sadržaj kalijuma je zabeležen kod biljaka gajenih na podlogama sa dodatkom 700  $\mu\text{M}$  Zn-acetata.

Na sadržaj kalijuma u poprečnim presecima biljaka *H. cupressiforme* značajan efekat imale su trostruke interakcije delova izdanaka, koncentracije i vrste metala u podlozi (Tabela 22; Grafik 19). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je sa povećanjem koncentracija soli u podlozi trend promene koncentracije kalijuma u apikalnim poprečnim presecima bio sličan za sva tri ispitivana acetata. U presecima bazalnih delova, obrazac promene sadržaja kalijuma razlikovao se kod biljaka gajenih na podlogama sa Zn-acetatom u odnosu na obrazac kod biljaka gajenih na podlogama sa dodatkom druge dve soli. Dodatno, sa porastom koncentracije metal-acetata u podlozi, obrazac variranja koncentracije kalijuma uočeno kod apikalnih preseka razlikovao se od onoga kod bazalnih preseka biljaka istih tretmana.

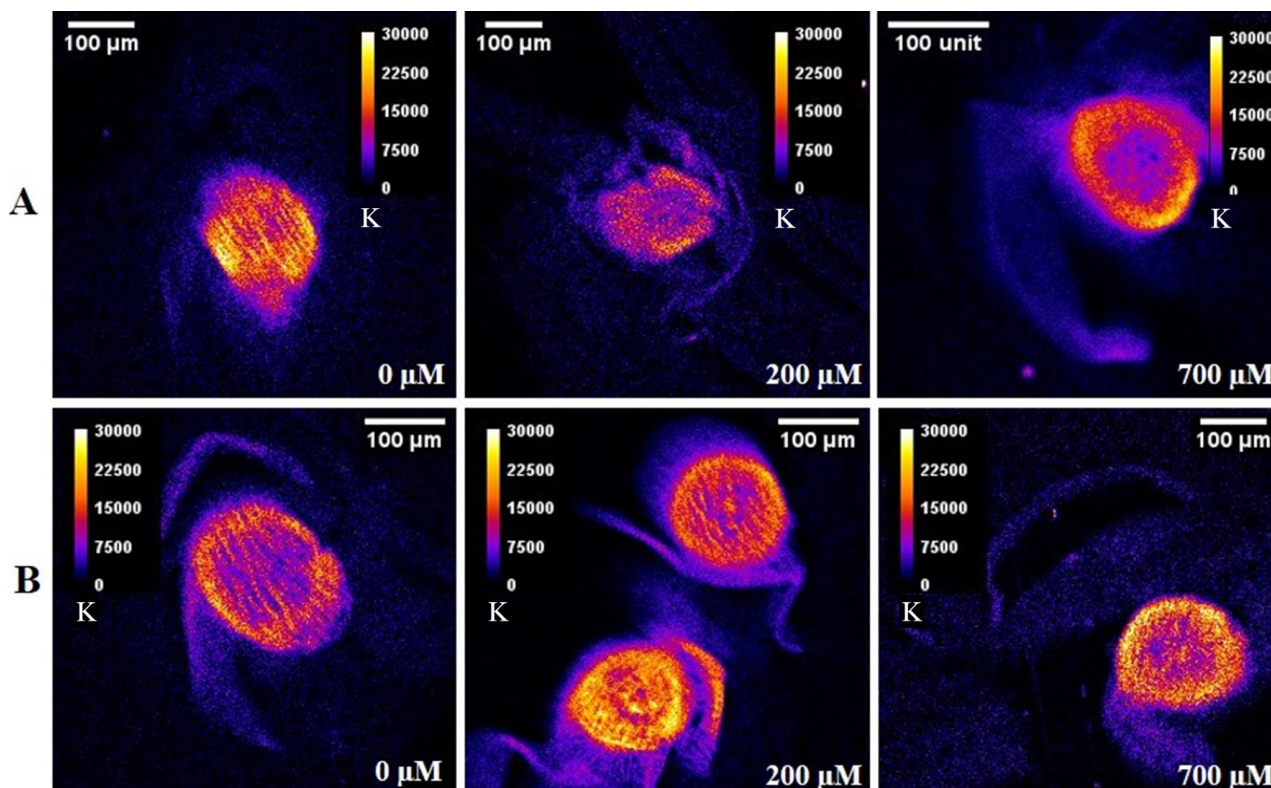


**Grafik 19.** Koncentracija kalijuma određena mikro-PIXE metodom u poprečnim presecima apikalnih i bazalnih delova kauloida biljaka *H. cupressiforme* gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-, Cu- ili Cd-acetata u uslovima dugotrajnog stresa (srednja vrednost  $\pm$  standardna greška).

Koncentracijske mape raspodele kalijuma na poprečnim presecima apikalnih i bazalnih delova izdanaka *H. cupressiforme* tretiranih različitim koncentracijama Zn-acetata, Cu-acetata ili Cd-acetata prikazane su na Slikama 26-28.

Iako se prosečne koncentracije kalijuma kod biljaka gajenih na podlogama sa različitim koncentracijama cinka nisu statistički značajno razlikovale (Grafik 18C), sa porastom koncentracije cinka u medijumu, razlikovala se distribucija i sadržaj kalijuma između različitih delova biljaka istog tretmana (Grafik 19; Slika 26). U odnosu na kontrolu u kojoj se veća koncentracija kalijuma uočava u apikalnom poprečnom preseku, kod biljaka gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-acetata, zapažen je obrnut trend – veća koncentracija kalijuma nalazi se u bazalnim delovima kauloida. Kod eksplantata gajenih na podlogama sa povećanom koncentracijom Zn-acetata, u apikalnim poprečnim presecima (Slika 26A) kalijum je u najvećoj meri lokalizovan u epidermisu i spoljašnjim slojevima korteksa kauloida, dok je kod bazalnih preseka (Slika 26B) region povećane

koncentracije kalijuma i u centralnom delu preseka, u vidu „ostrvceta“ okruženog zonom smanjenog sadržaja kalijuma. Na poprečnom preseku apikalnog dela biljke iz kontrolne grupe, kalijum je uniformno raspoređen, dok kod bazalnog, koncentracija raste od centra ka perifernim delovima preseka, uz prisutvo slabo naglašenog „ostrvceta“ povećane koncentracije u centralnom delu poprečnog preseka.

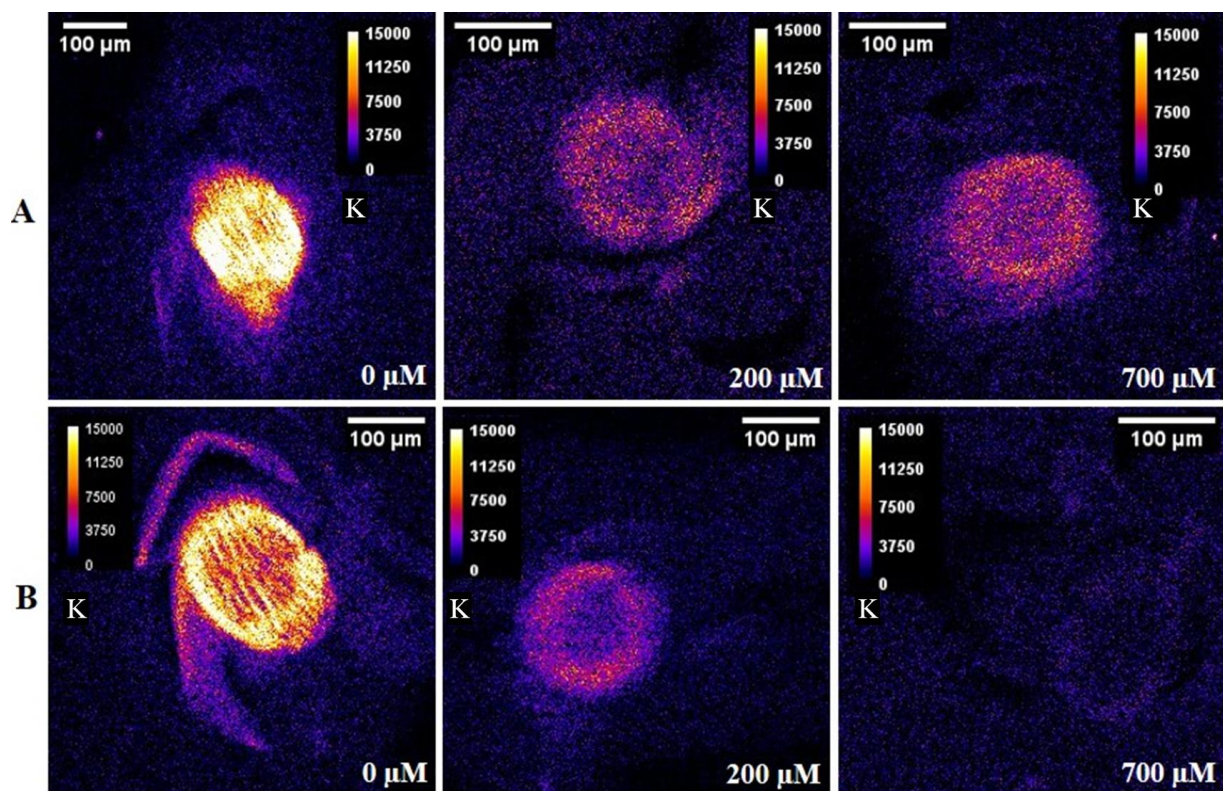


**Slika 26.** Koncentracijske mape raspodele kalijuma na poprečnim presecima biljaka *H. cupressiforme* gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-acetata u uslovima dugotrajnog stresa. A - poprečni preseki apikalnog dela biljaka; B - poprečni preseki bazalnog dela biljaka. Sadržaj elemenata u presecima izražen je u ppm.

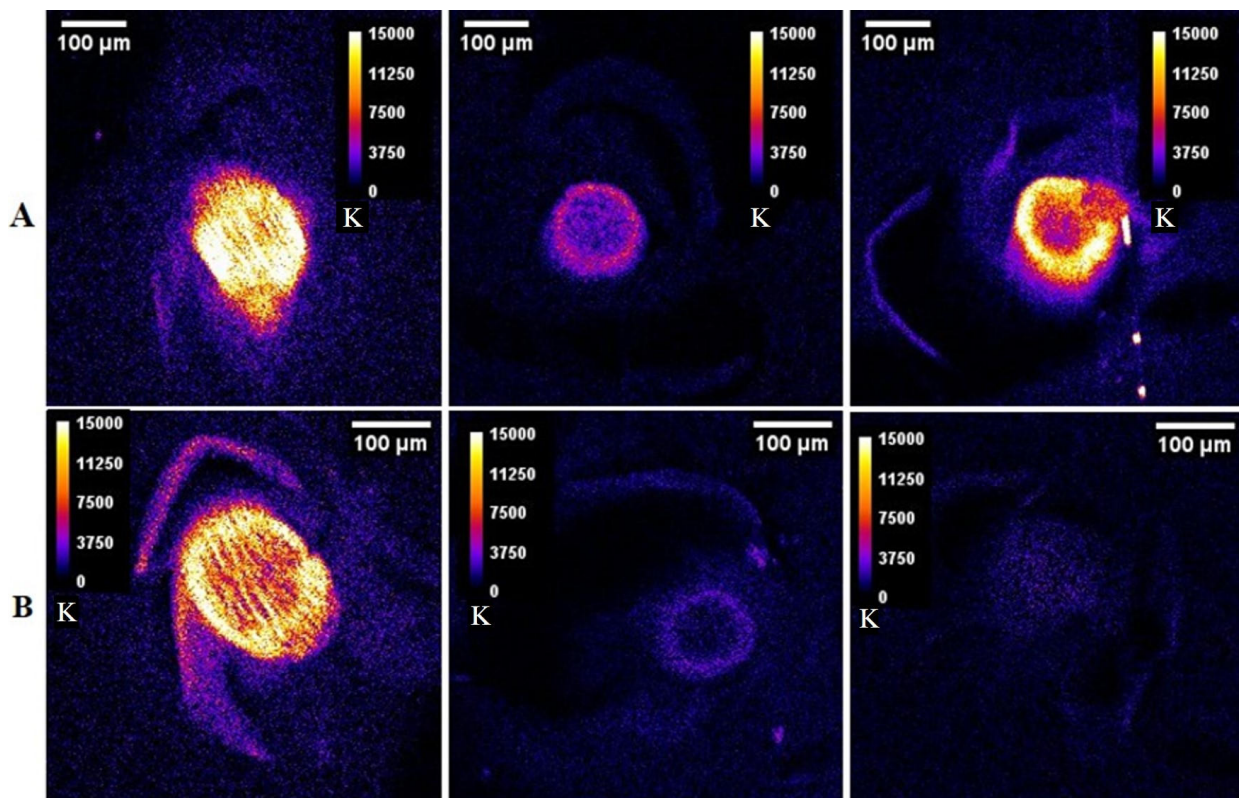
Na koncentracijskim mapama raspodele kalijuma poprečnih preseka biljaka *H. cupressiforme* gajenih na podlogama sa dodatkom Cu-acetata, sa povećanjem koncentracije ove soli uočava se pad sadržaja kalijuma u presecima oba dela kauloida u odnosu na kontrole (Grafik 19, Slika 27). Apikalni preseki pri svim koncentracijama Cu-acetata u podlozi imaju veći sadržaj kalijuma u odnosu na odgovarajuće bazalne. Sa porastom koncentracije Cu-acetata u podlozi, razlike između poprečnih preseka apikalnih (Slika 27A) i bazalnih (Slika 27B) delova kauloida bile su izraženije. Na svim presecima biljaka gajenih na podlogama sa dodatim Cu-acetatom, kalijum je lokalizovan u spoljašnjim slojevima korteksa kauloida i epidermisu, što se na koncentracijskim mapama raspodele kalijuma (Slika 27) vidi kao širi prsten svetlije boje, dok centralni deo kauloida ima manji sadržaj kalijuma.

U odnosu na poziciju preseka i koncentraciju metal-acetata u podlozi, kod biljaka tretiranih Cd-acetatom zapaža se sličan obrazac promena koncentracije i raspodele kalijuma u poprečnim presecima kao kod biljaka tretiranih Cu-acetatom (Grafik 19; Slika 28). Poprečni preseki bazalnog dela biljaka (Slika 28B) sadrže znatno manje kalijuma u odnosu na apikalne preseke (Slika 28A) kod biljaka koje su gajene pri povećanim koncentracijama Cd-acetata. Uočljiva je razlika u distribuciji kalijuma tretiranih i kontrolnih biljaka, gde se kod prve grupe jasno izdvajaju zone povećane koncentracije kalijuma u vidu uskih prstenova u spoljašnjem sloju kauloida, koji najverovatnije predstavljaju epidermis, dok je kalijum u kontrolnim presecima relativno uniformno distribuiran i prisutan u znatno većoj koncentraciji.



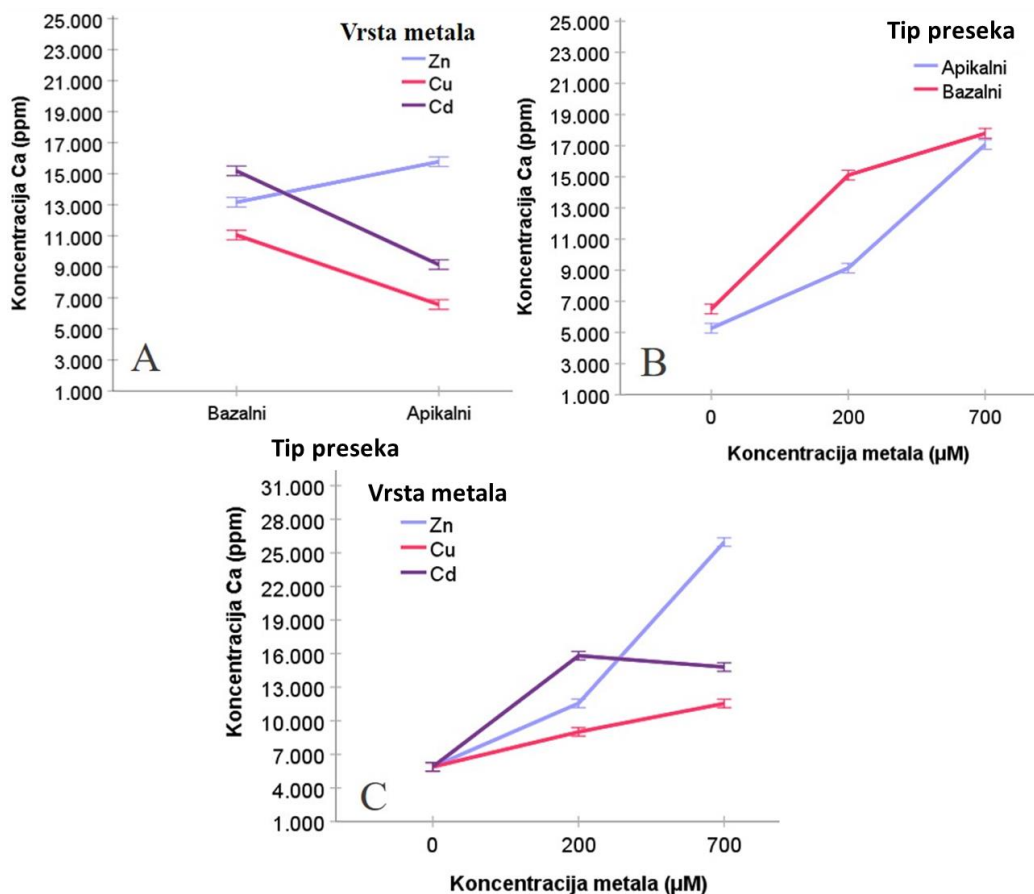


**Slika 27.** Koncentracijske mape raspodele kalijuma na poprečnim presecima biljaka *H. cupressiforme* gajenih na podlogama sa dodatkom Cu-acetata u uslovima dugotrajnog stresa. A - poprečni preseći apikalnog dela biljaka; B - poprečni preseći bazalnog dela biljaka. Sadržaj elemenata u presecima izražen je u ppm.



**Slika 28.** Koncentracijske mape raspodele kalijuma na poprečnim presecima biljaka *H. cupressiforme* gajenih na podlogama sa dodatkom Cd-acetata u uslovima dugotrajnog stresa. A - poprečni preseći apikalnog dela biljaka; B - poprečni preseći bazalnog dela biljaka. Sadržaj elemenata u presecima izražen je u ppm.

Koncentracija kalcijuma bila je značajno veća u bazalnim nego u apikalnim presecima mahovina. Za sve kombinacije faktora uočeni su značajni efekti dvostrukih i trostrukih interakcija na vrednost koncentracije ovog elementa (Tabela 22). Bazalni preseci biljaka gajenih na podlogama sa dodatkom Cu- i Cd-acetata imali su značajno veću koncentraciju kalcijuma u odnosu na odgovarajuće apikalne preseke (Grafik 20A). Kod biljaka gajenih na podlogama sa Cd-acetatom razlika je iznosila 6036,8 ppm, dok je kod biljaka izlaganih Cu-acetatu bila 4484,3 ppm. S druge strane, kod mahovina gajenih na podlogama sa Zn-acetatom, koncentracija kalcijuma u presecima bila je značajno niža (2605,0 ppm) u bazalnom nego u apikalnom delu biljaka. Poredeći efekat različitih metala na koncentraciju kalcijuma, uticaj bakra bio je značajno negativniji u odnosu na druga dva metala kod oba tipa poprečnih preseka.



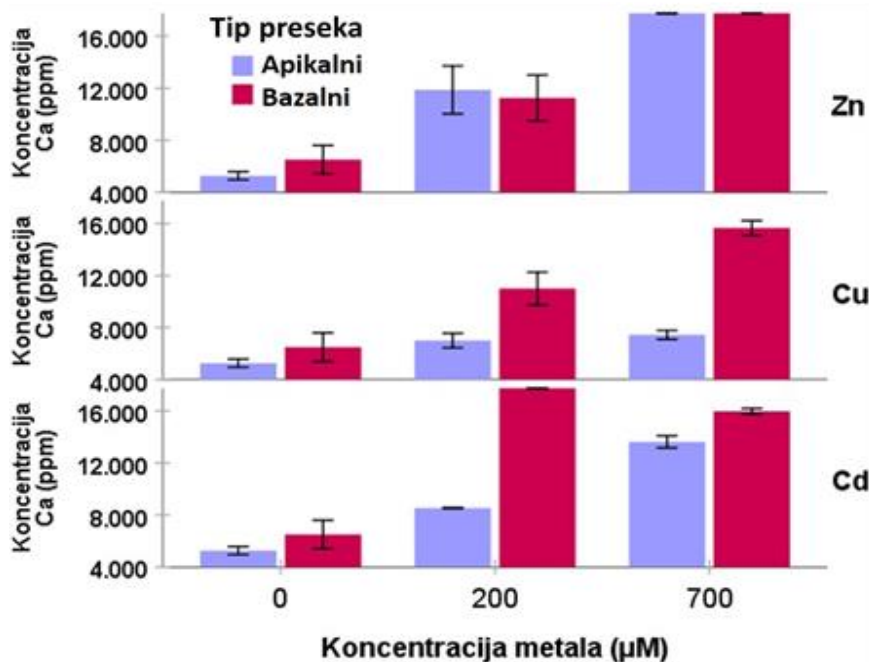
**Grafik 20.** Uticaj interakcija faktora na koncentraciju kalcijuma određenu mikro-PIXE metodom kod poprečnih preseka kauloida biljaka *H. cupressiforme* gajenih u uslovima dugotrajnog stresa na podlogama sa dodatkom Zn-, Cu- ili Cd-acetata: A – koncentracija metala × tip preseka; B – tip preseka × koncentracija metala; C – koncentracija metala × vrsta metala.

Koncentracija kalcijuma bila je značajno veća u presecima bazalnog dela kauloida, kako u kontrolnoj grupi tako i pri svim primenjenim koncentracijama metal-acetata u podlogama (Grafik 20B). Najveća razlika u sadržaju kalcijuma u dva tipa poprečnih preseka bila je pri koncentraciji soli od 200 µM (5970,5 ppm), a najmanja kada su biljke izlagane 700 µM acetatima metala (711,5 ppm). Efekat individualnih metala na koncentraciju kalcijuma u poprečnim presecima biljaka zavisio je od njihove koncentracije u podlozi (Grafik 20C). Kod poprečnih preseka biljaka izloženih 200 µM metal-acetatima, koncentracija kalcijuma bila je značajno veća u odnosu na koncentraciju u presecima kontrolnih biljaka, bez obzira na vrstu primenjenog metala. Najveća je bila kod biljaka izloženih Cd-acetatu (15809,5 ppm), a najniža kod biljaka tretiranih Cu-acetatu (9002,7 ppm), pri čemu su razlike između efekata sva tri metala na ispitivani parametar bile značajne. Kada su biljke rasle na 700 µM Zn- ili Cu-acetatu, koncentracija kalcijuma u poprečnim presecima bila je značajno veća nego u slučaju biljaka gajenih na podlogama sa 200 µM acetatima ova dva metala. Pri ovoj



koncentraciji, najveći sadržaj kalcijuma imali su poprečni preseki biljaka gajenih na podlogama sa Zn-acetatom (25963,6 ppm) a najmanji oni kod biljaka koje su rasle na podlogama sa Cu-acetatom (11547,6 ppm), pri čemu su razlike u efektima između sva tri metala bile značajne.

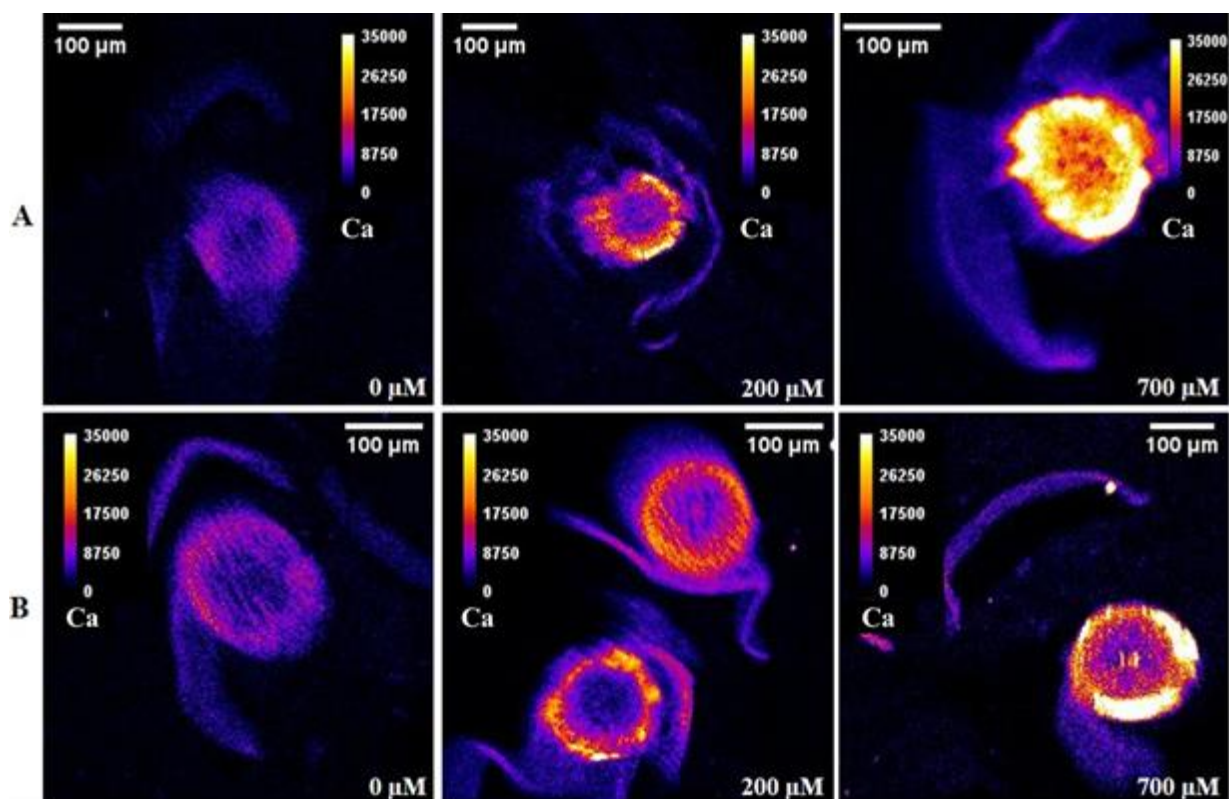
Sadržaj kalcijuma je u oba tipa preseka rastao sa povećanjem koncentracije soli svakog od tri metala u podlozi (Grafik 21), što je kada su tretirani sa Cu- i Cd-acetatom u pitanju, suprotan trend od onog primećenog u slučaju kalijuma. Osim kod biljaka tretiranih 200  $\mu\text{M}$  Zn-acetatom, u svim ostalim slučajevima sadržaj kalcijuma bio je veći u bazalnim nego u apikalnim presecima biljaka istog tretmana.



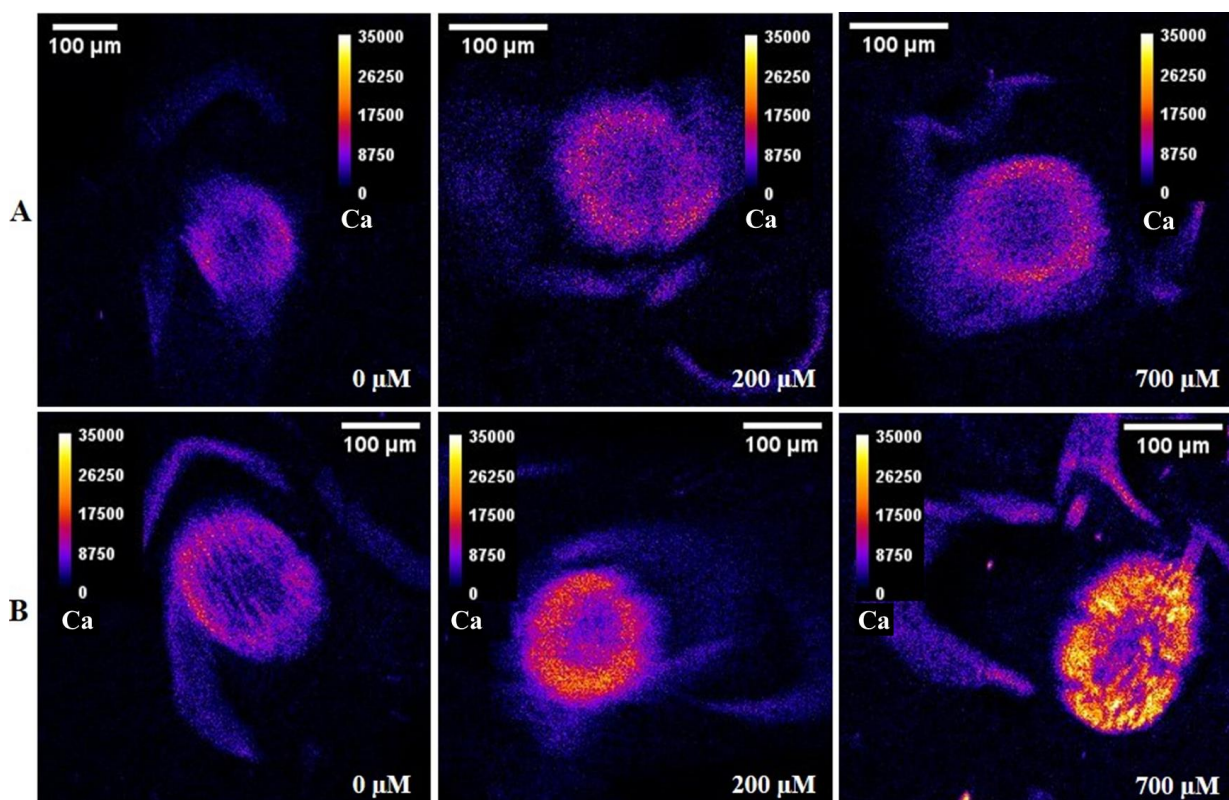
**Grafik 21.** Koncentracija kalcijuma određena mikro-PIXE metodom u poprečnim presecima apikalnog i bazalnog dela kauloida biljaka *H. cupressiforme* gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-Cu- ili Cd-acetata u uslovima dugotrajnog stresa (srednja vrednost  $\pm$  standardna greška).

Kod kontrolnih, kao i kod poprečnih preseka biljaka tretiranih Zn-acetatom, kalcijum je dominantno bio lokalizovan u perifernim slojevima korteksa kauloida i epidermisu, dok su se centralni delovi karakterisali znatno nižim sadržajem ovog elementa (Slika 29). Sa porastom koncentracije Zn-acetata u podlozi, kalcijum se koncentrisao u spoljašnjem, relativno tankom, prstenu kauloida u okviru koga su se izdvajale zone posebno visokih koncentracija ovog elementa. Kod biljaka gajenih na podlogama sa dodatkom 200- i 700  $\mu\text{M}$  Zn-acetata, u centralnom delu preseka bazalnog dela biljaka (Slika 29B), uočava se „ostrvce“ sa povećanom koncentracijom, čiji intenzitet raste sa povećanjem koncentracije ove soli u podlozi.

Na svim koncentracijskim mapama raspodele kalcijuma poprečnih preseka biljaka gajenih na podlogama sa dodatkom Cu-acetata (Slika 30), kalcijum je dominantno lokalizovan u vidu širokog perifernog svetlog prstena rastućeg intenziteta sa porastom primenjene koncentracije bakra u podlozi. Širina i intenzitet ovih prstenova veći su u bazalnim (Slika 30B) u odnosu na apikalne (Slika 30A) preseke biljaka istih tretmana, ukazujući na veću koncentraciju kalcijuma u donjim delovima biljaka. Na koncentracijskim mapama raspodele kalcijuma poprečnih preseka biljaka tretiranih Cd-acetatima (Slika 31), kalcijum je dominantno lokalizovan u vidu uskog prstena u spoljašnjem delu korteksa i u epidermisu kauloida. Ovi prstenovi (Slika 31), za razliku od onih na presecima biljaka gajenih na podlogama sa Zn-acetatima (Slika 29), su homogenog izgleda. U odnosu na apikalne preseke biljaka istih tretmana (Slika 31A), prstenovi u poprečnim presecima bazalnog dela kauloida (Slika 31B) su jačeg intenziteta i zauzimaju veću površinu na koncentracijskim mapama raspodele kalcijuma. Širina prstenova rasla je i sa porastom koncentracije kadmijuma u podlozi. U bazalnom delu biljaka tretiranih 700  $\mu\text{M}$  Cd-acetatom, kalcijum je bio uniformno raspoređen celom površinom preseka (Slika 31B).

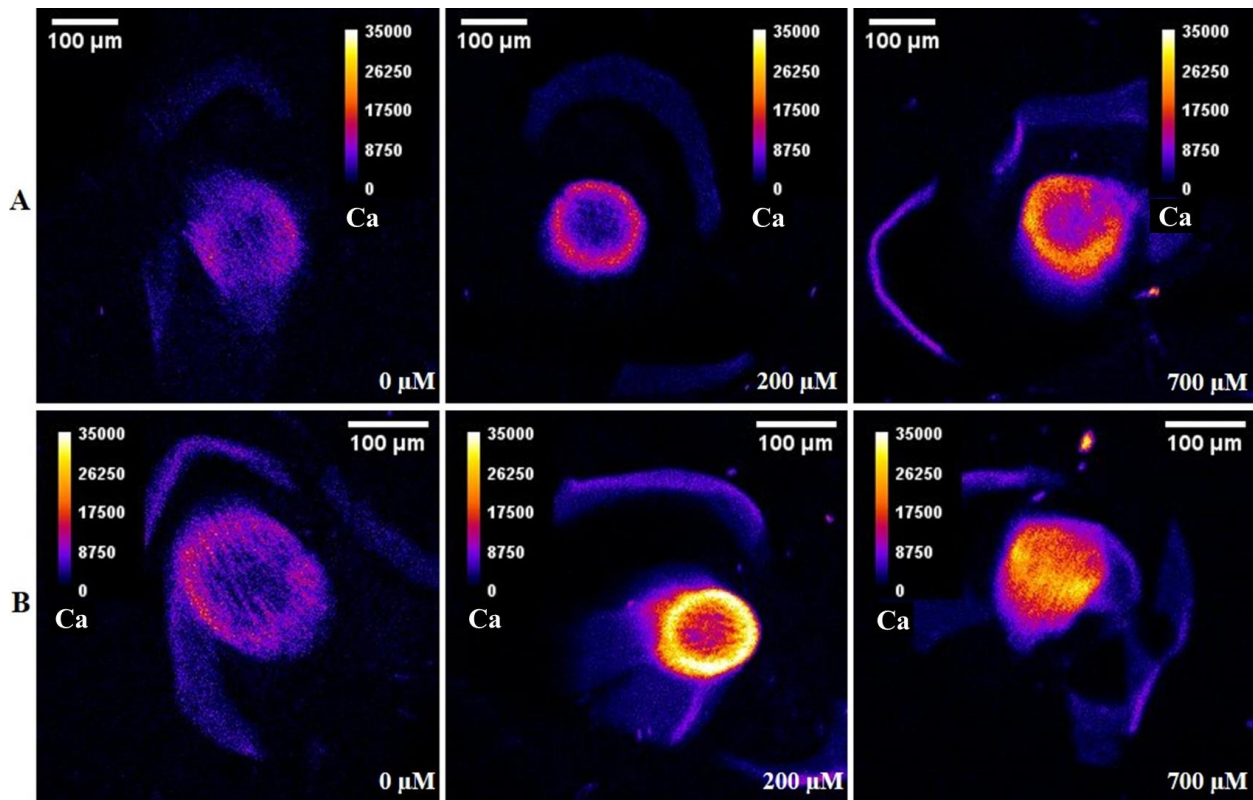


**Slika 29.** Koncentracijske mape raspodele kalcijuma na poprečnim presecima biljaka *H. cupressiforme* gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-acetata u uslovima dugotrajnog stresa. A - poprečni preseki apikalnog dela biljaka; B - poprečni preseki bazalnog dela biljaka. Sadržaj elemenata u presecima izražen je u ppm.



**Slika 30.** Koncentracijske mape raspodele kalcijuma na poprečnim presecima biljaka *H. cupressiforme* gajenih na podlogama sa dodatkom Cu-acetata u uslovima dugotrajnog stresa. A - poprečni preseki apikalnog dela biljaka; B - poprečni preseki bazalnog dela biljaka. Sadržaj elemenata u presecima izražen je u ppm.

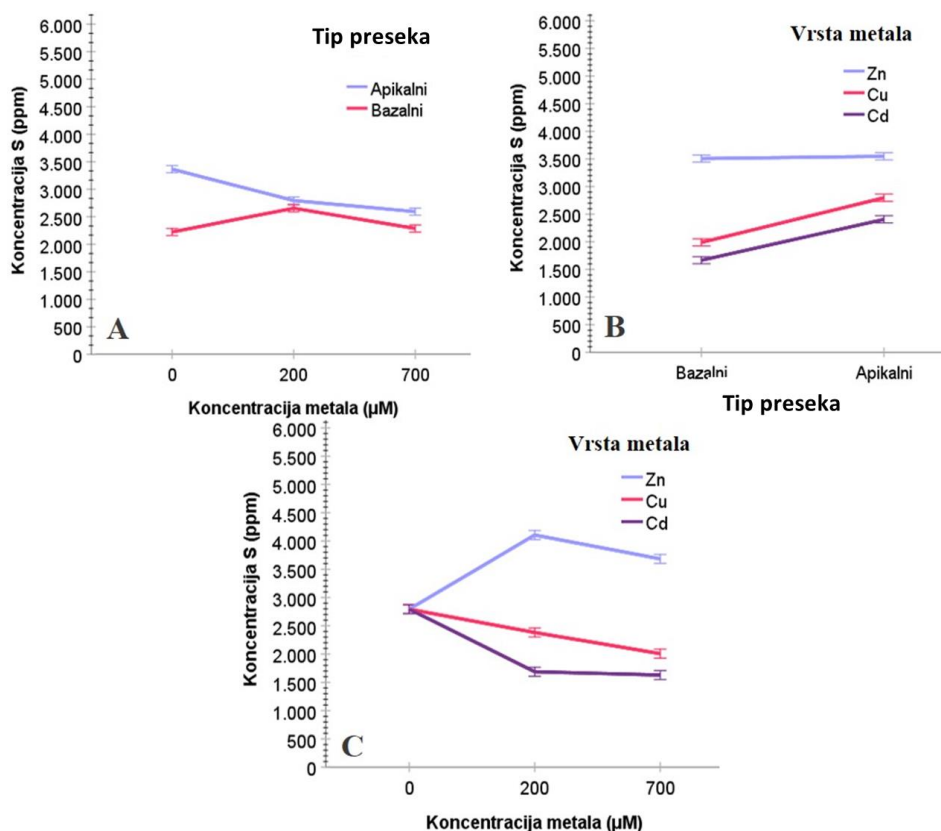




**Slika 31.** Koncentracijske mape raspodele kalcijuma na poprečnim preseccima biljaka *H. cupressiforme* gajenih na podlogama sa dodatkom Cd-acetata u uslovima dugotrajnog stresa. A - poprečni presecci apikalnog dela biljaka; B - poprečni presecci bazalnog dela biljaka. Sadržaj elemenata u preseccima izražen je u ppm.

Koncentracija sumpora u mahovinama na nivou svih eksperimenata bila je veća u apikalnim nego u bazalnim preseccima. U zavisnosti od vrste metala, i primenjene koncentracije, sadržaj ovog elementa razlikovao se u različitim delovima biljke (Tabela 22). Kada su biljke gajene bez metal-acetata u podlozi, apikalni presecci sadržali su u proseku 3364,7 ppm sumpora, a bazalni 2222,8 ppm i razlika među njima bila je značajna (Grafik 22A). Kada su biljke gajene na podlogama sa 200  $\mu\text{M}$  metal-acetatima, sadržaj sumpora u apikalnim preseccima bio je značajno manji (za 569,7 ppm), dok je u slučaju bazalnih preseka uočen značajan porast (za 431,5 ppm) koncentracije u poređenju sa koncentracijom u odgovarajućim preseccima kontrolnih biljaka. Pri koncentraciji metal-acetata u podlozi od 700  $\mu\text{M}$ , koncentracija sumpora u apikalnim preseccima dodatno je značajno opala. Kod preseka bazalnog dela biljaka iz ovog tretmana takođe je uočen značajan pad koncentracije sumpora u odnosu na vrednosti zabeležene kod bazalnih preseka biljaka gajenih na podlogama sa 200  $\mu\text{M}$  metal-acetatom, pri čemu se ova koncentracija nije značajno razlikovala od vrednosti kod kontrolnih preseka bazalne pozicije.

Efekat acetata različitih metala na koncentraciju sumpora na poprečnim preseccima mahovine *H. cupressiforme* značajno se razlikovao u zavisnosti od dela kauloida gde su presecci uzimani (Grafik 22B). U bazalnim preseccima biljaka, najmanji sadržaj sumpora izmeren je kod mahovina tretiranih kadmijumom (1667,2 ppm), dok je najveći bio kod biljaka tretiranih cinkom (3507,5 ppm). Koncentracija sumpora kod poprečnih preseka bazalnog dela biljaka koje su rasle na podlogama sa bakrom bila je 1989,3 ppm. Razlike u efektima pojedinačnih metala u preseccima ovog tipa bile su značajne. U poređenju sa bazalnim delovima, apikalni presecci biljaka tretiranih bakrom i kadmijumom imali su značajno veće koncentracije sumpora. Razlika u koncentraciji sumpora između bazalnih i apikalnih preseka u slučaju bakra bila je 808,5 ppm, a kod mahovina tretiranih kadmijumom 739,2 ppm. Kod biljaka gajenih na podlogama sa Zn-acetatom koncentracija sumpora u preseccima apikalnih delova bila je za 40,6 ppm veća nego kod odgovarajućih bazalnih delova, ali ova razlika nije bila značajna.



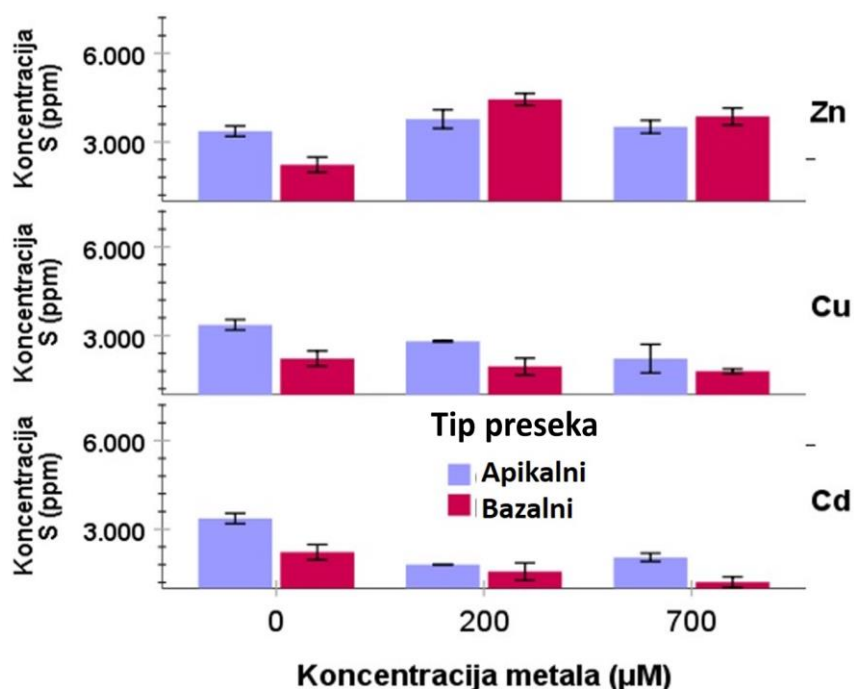
**Grafik 22.** Uticaj interakcija faktora na koncentraciju sumpora određenu mikro-PIXE metodom kod poprečnih preseka kauloida biljaka *H. cupressiforme* gajenih u uslovima dugotrajng stresa na podlogama sa dodatkom Zn-, Cu- ili Cd-acetata: A – koncentracija metala × tip preseka; B – tip preseka × vrsta metala; C – koncentracija metala × vrsta metala.

U zavisnosti od primenjene koncentracije u podlozi, efekat soli pojedinačnih metala na sadržaj sumpora u poprečnim presecima mahovina bio je različit (Grafik 22C). Kada su mahovine tretirane 200 µM Cu- ili Cd-acetatom, sadržaj sumpora u ovim presecima bio je značajno niži u odnosu na sadržaj kod kontrolnih preseka. S druge strane, primena Zn-acetata ove koncentracije za posledicu je imala značajno povećanje sadržaja sumpora u presecima. Sa povećanjem koncentracije acetatnih soli metala u podlozi na 700 µM, koncentracija sumpora u presecima bila je značajno manja za svaki ispitivani metal u odnosu na vrednost dobijenu kada su oni dodavani u medijum u koncentraciji od 200 µM. Kadmijum je u obe primenjene koncentracije imao značajno najnegativniji efekat na sadržaj sumpora u mahovinama u poređenju sa druga dva metala.

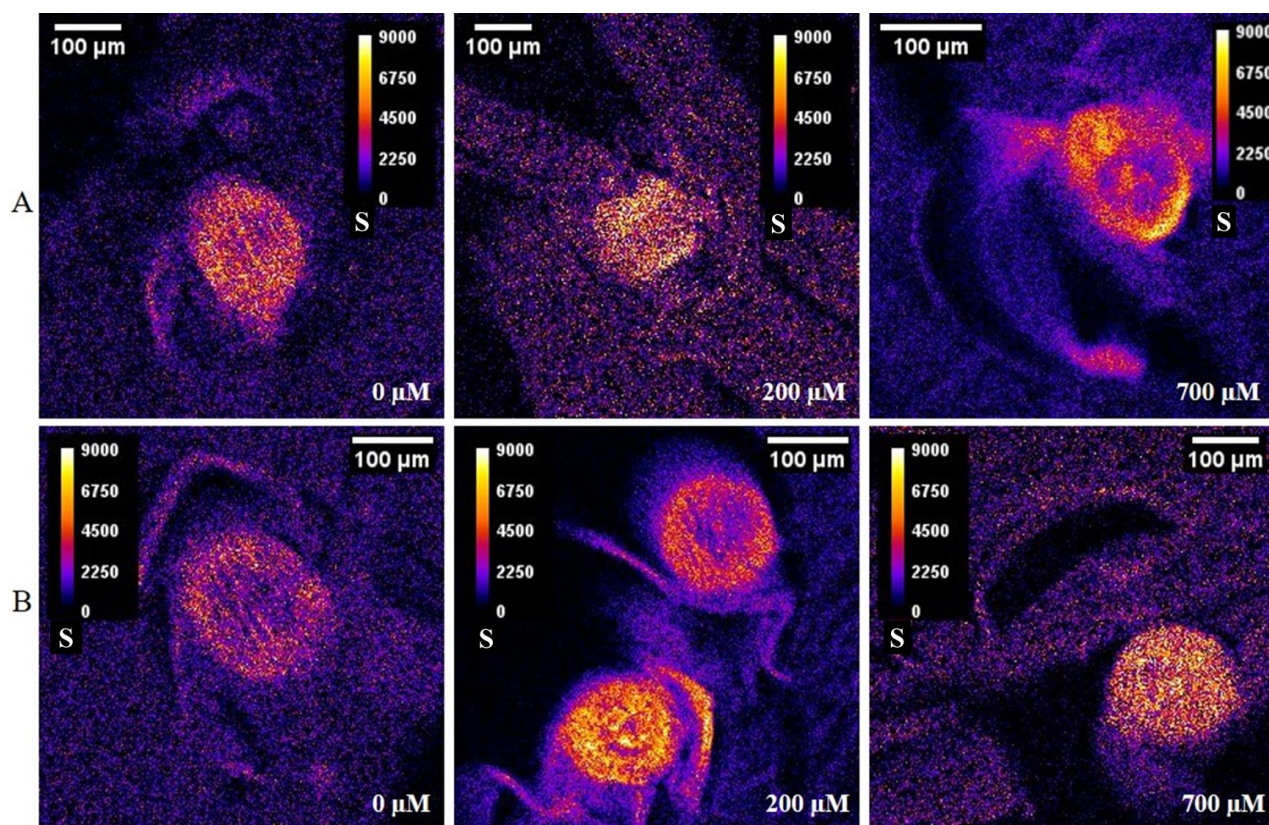
Koncentracija sumpora u mahovinama bila je pod značajnim uticajem svih tipova interakcija sa značajnošću  $p < 0.001$  (Tabela 22; Grafik 23).

Kod kontrolnih biljaka sadržaj sumpora u apikalnim presecima bio je veći od nego u bazalnim. Na koncentracijskoj mapi raspodele sumpora odabranog apikalnog preseka ove grupe biljaka sumpor je relativno ravnomerno raspoređen u svim delovima, sem u centralnom regionu gde se uočava blago smanjenje koncentracije (Slika 32A). Na poprečnom preseku bazalnog dela biljke poreklom iz kontrolne grupe (Slika 32B) ovo smanjenje koncentracije sumpora je izraženije i uočava se kao tamni region unutar preseka. Kao u slučaju kalijuma, kada su biljke gajene na podlogama sa povećanim koncentracijama cinka (200 µM i 700 µM) veći sadržaj sumpora primećen je u bazalnim presecima u odnosu na apikalne (Grafik 23). Obrasci distribucije sumpora (Slika 32) pratili su obrasce distribucije kalijuma (Slika 26) u istim presecima, pri čemu su zone povećanog intenziteta boje tj. povećane koncentracije sumpora bile šire i difuznije.





**Grafik 23.** Koncentracija sumpora određena mikro-PIXE metodom u poprečnim presecima apikalnog i bazalnog dela kauloida biljaka *H. cupressiforme* gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-, Cu- ili Cd-acetata u uslovima dugotrajnog stresa (srednja vrednost ± standardna greška).

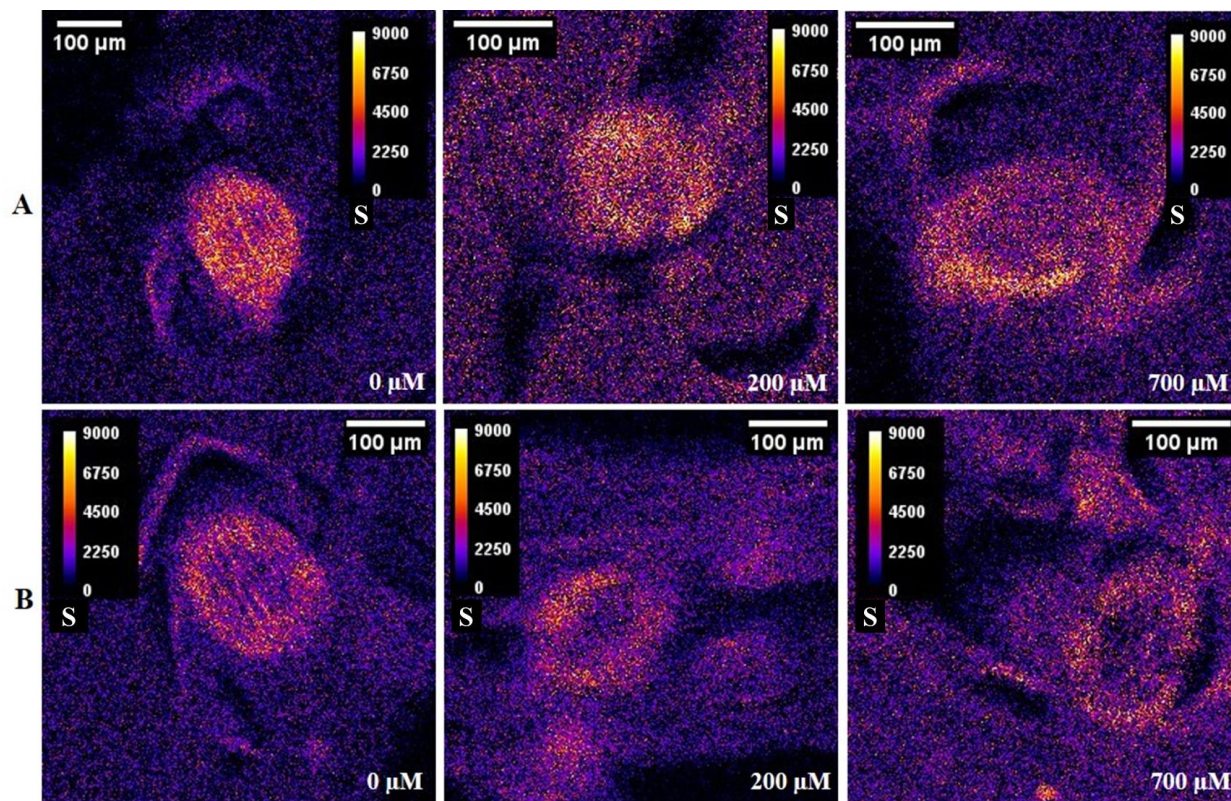


**Slika 32.** Koncentracijske mape raspodele sumpora na poprečnim presecima biljaka *H. cupressiforme* gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-acetata u uslovima dugotrajnog stresa. A - poprečni preseki apikalnog dela biljaka; B - poprečni preseki bazalnog dela biljaka. Sadržaj elemenata u presecima izražen je u ppm.

Kod biljaka tretiranih Cu-acetatom, sadržaj sumpora je u slučaju svih tretmana bio veći u apikalnim presecima (Grafik 23), u kojima je primećena uniformnija distribucija ovog elementa



(Slika 33A) nego u bazalnim presecima, kod kojih je sumpor dominantno lokalizovan u spoljašnjim slojevima kauloida (Slika 33B). Sa povećanjem koncentracije Cu-acetata u podlozi, ukupan sadržaj sumpora u presecima je opadao (Grafik 23). S druge strane, na mapama ovih preseka uočavaju se zone povećane koncentracije sumpora, u vidu relativno širokih prstenova. Intenzitet signala ovih prstenova odgovara intenzitetu u zonama visoke koncentracije na koncentracijskim mapama raspodele sumpora poprečnih preseka kontrolnih biljaka.



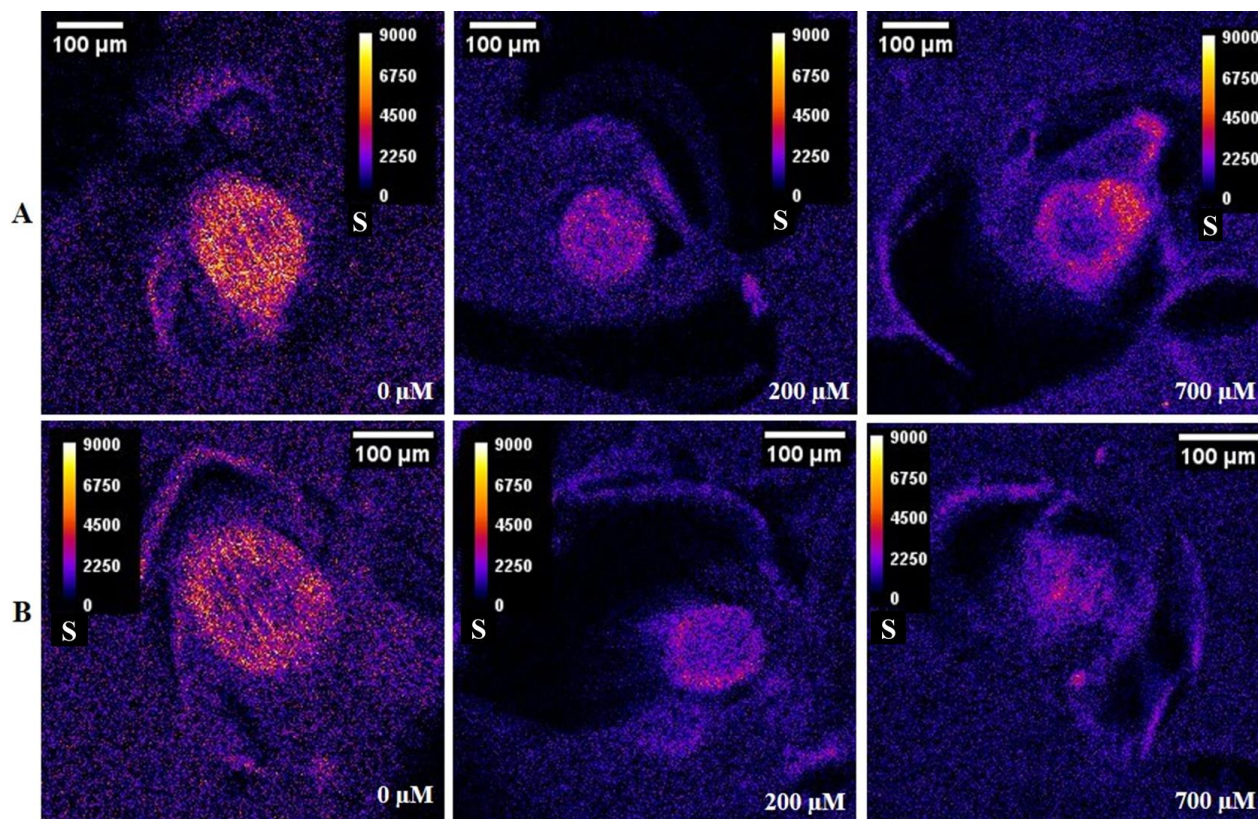
**Slika 33.** Koncentracijske mape raspodele sumpora na poprečnim presecima biljaka *H. cupressiforme* gajenih na podlogama sa dodatkom Cu-acetata u uslovima dugotrajnog stresa. A - poprečni preseki apikalnog dela biljaka; B - poprečni preseki bazalnog dela biljaka. Sadržaj elemenata u presecima izražen je u ppm.

Kada su biljke tretirane Cd-acetatom, kao i u slučaju biljaka tretiranih bakrom, veći sadržaj sumpora imali su apikalni preseki (Grafik 23). Sa povećanjem Cd-acetata u podlozi, opadala je količina sumpora u presecima, pri čemu su razlike između pojedinačnih tretmana izraženije u slučaju apikalnih preseka (Slika 34). Kod biljke tretirane 200  $\mu\text{M}$  Cd-acetatom, sumpor je uniformno distribuiran na poprečnom preseku apikalnog dela kauloida (Slika 34A), dok se kod bazalnog preseka (Slika 34B) uočava koncentrisanje sumpora u epidermisu ili uskom spoljašnjem sloju korteksa kauloida. Kod izdanka *H. cupressiforme* tretiranog 700  $\mu\text{M}$  Cd-acetatom, u centralnom delu apikalnog preseka uočava se taman region, koji ukazuje na znatno smanjenu koncentraciju sumpora, dok se oko njega, ka spoljašnjem delu preseka kauloida ističe znatno svetliji prstenasti region nejednake širine duž celog obima, koji ukazuje na znatno veće koncentracije sumpora. S druge strane, na poprečnom preseku bazalnog dela biljke gajene na podlozi sa 700  $\mu\text{M}$  Cd-acetatom, spoljašnji slojevi preseka kauloida imali su manji sadržaj sumpora u poređenju sa centralnim regionom ovog preseka.

Koncentracija cinka kod biljaka tretiranih ovim metalom bila je značajno veća kod bazalnih preseka, nego kod preseka apikalnog dela gametofora (Tabela 23). U zavisnosti od dela biljke, razlikovao se efekat Zn-acetata na vrednost ispitivanog parametra (Grafik 24A). U odsustvu cinka u podlozi, koncentracija cinka u apikalnim presecima biljaka iznosila je 19 ppm i nije se značajno razlikovala od one u presecima bazalnog dela biljke. Kada su biljke tretirane 200  $\mu\text{M}$  Zn-acetatom, sadržaj cinka bio je značajno veći i u apikalnim (6581 ppm) i u bazalnim (6453,6 ppm) presecima u



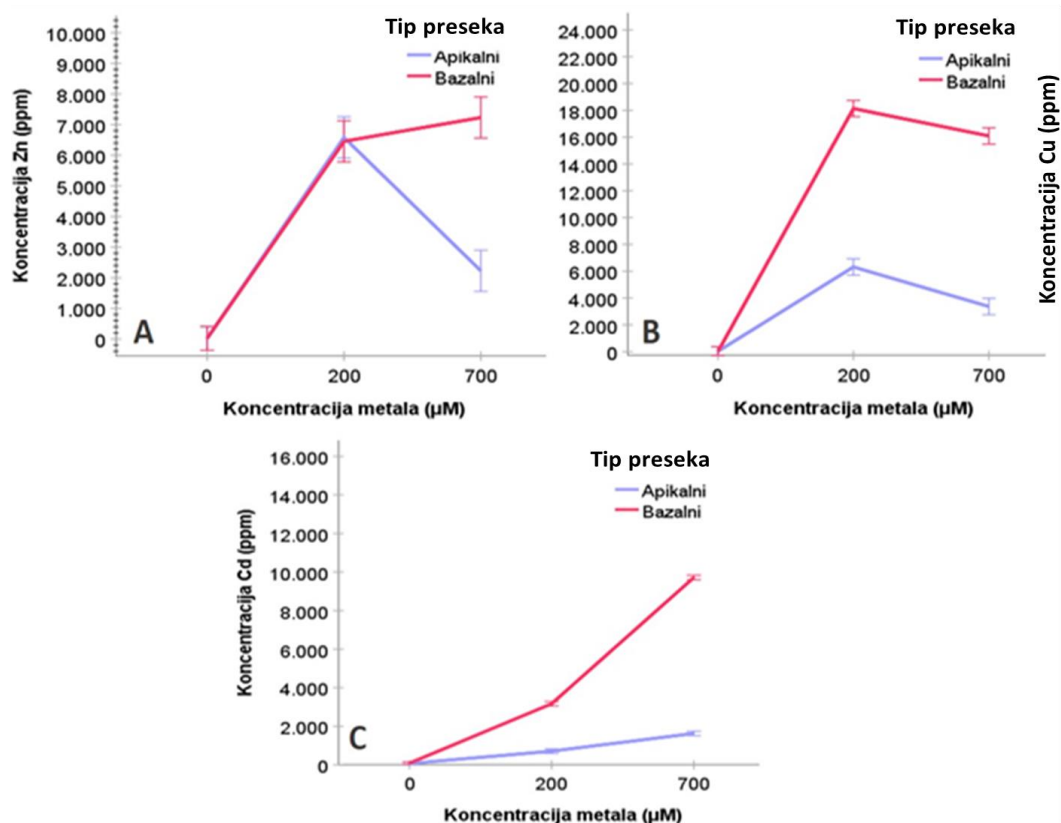
poređenju sa kontrolama, pri čemu se vrednosti u ova dva tipa poprečnih preseka nisu međusobno značajno razlikovale. Međutim, kod biljaka koje su rasle na 700  $\mu\text{M}$  Zn-acetatu, sadržaj cinka u presecima bazalnog segmenta (7230,7 ppm) bio je značajno veći u odnosu na sadržaj cinka apikalnih preseka (2226,7), i značajno veći u odnosu na koncentraciju u bazalnim presecima biljaka tretiranih 200  $\mu\text{M}$  Zn-acetatom.



**Slika 34.** Koncentracijske mape raspodele sumpora na poprečnim presecima biljaka *H. cupressiforme* gajenih na podlogama sa dodatkom Cd-acetata u uslovima dugotrajnog stresa. A - poprečni preseki apikalnog dela biljaka; B - poprečni preseki bazalnog dela biljaka. Sadržaj elemenata u presecima izražen je u ppm.

**Tabela 23.** Koncentracija cinka, bakra i kadmijuma određena mikro-PIXE metodom u poprečnim presecima kauloida biljaka *H. cupressiforme* gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-, Cu- ili Cd-acetata u uslovima dugotrajnog stresa (srednja vrednost  $\pm$  SD). Različiti stepeni statističke značajnosti označeni su kao: \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \* =  $p < 0,05$ . Srednje vrednosti različitih nivoa istog faktora obeležene istim malim slovom nisu značajno različite za nivo verovatnoće  $P < 0,05$  prema Takijevom HSD testu.

Faktori	Nivoi faktora	Zn (ppm)	Cu (ppm)	Cd (ppm)
Tip preseka (A)	Apikalni	2942,2 $\pm$ 3021,1 a	3232,7 $\pm$ 2819,7 a	803,7 $\pm$ 680,6 a
	Bazalni	4568,8 $\pm$ 3428,6 b	11409,6 $\pm$ 8603,2 b	4323,3 $\pm$ 4259,8 b
Koncentracija metala (B)	0	20,5 $\pm$ 4,8 a	15,3 $\pm$ 7,1 a	79,2 $\pm$ 14,0 b
	200	6517,3 $\pm$ 1115,8 b	12223,3 $\pm$ 6544,2 b	1939,2 $\pm$ 1358,6 b
	700	4728,7 $\pm$ 2741,8 c	9724,9 $\pm$ 6976,7 c	5672,2 $\pm$ 4428,0 c
A		***	***	***
B		***	***	***
A $\times$ B		***	***	***

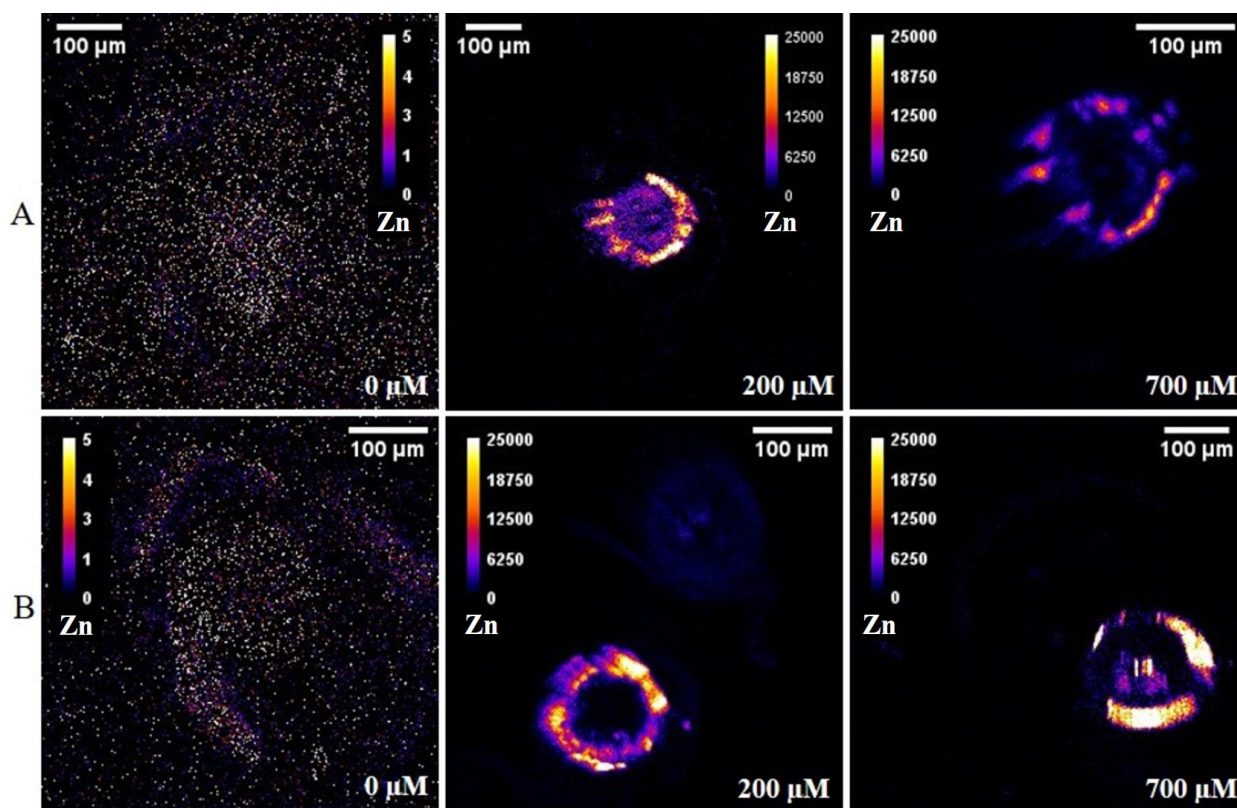


**Grafik 24.** Uticaj interakcija između tipa preseka i koncentracije metala u podlozi na koncentraciju cinka (A), bakra (B) i kadmijuma (C) određenu mikro-PIXE metodom kod poprečnih preseka kauloida biljaka *H. cupressiforme* gajenih u uslovima dugotrajnog stresa na podlogama sa dodatkom acetata ispitivanih metala.

Na koncentracijskoj mapi raspodele cinka poprečnog preseka apikalnog dela biljke *H. cupressiforme* (Slika 35A) iz kontrolne grupe cink je difuzno raspoređen, dok je na poprečnom preseku bazalnog dela biljke (Slika 35B), centralni region preseka tamniji ukazujući na to da je cink pri bazi biljke uglavnom lokalizovan u perifernim delovima korteksa kauloida. Na mapama poprečnih preseka biljaka tretiranih 200 µM Zn-acetatom (Slika 35), cink je dominantno lokalizovan u jako uskoj zoni spoljašnjih slojeva kauloida, formirajući tanak prsten intenzivne svetložute boje, oko široke tamne centralne zone preseka kauloida, koja ukazuje na jako nisku koncentraciju cinka u njoj, naročito u bazalnom delu ovih biljaka. Individualni prstenovi karakterišu se žarištima jako visokog intenziteta signala. Kod preseka biljaka tretiranih 700 µM Zn-acetatom (Slika 35) distribucija cinka slična je onoj uočenoj na mapama biljaka tretiranih 200 µM Zn-acetatom – u vidu prstenova u spoljašnjem sloju kauloida sa žarištima visokog intenziteta, u čijoj unutrašnjosti, ka centru poprečnog preseka je koncentracija cinka značajno niža. Zanimljivo je da se kod biljaka tretiranih 700 µM Zn-acetatom u centralnom regionu poprečnog preseka bazalnog dela kauloida (Slika 35B) uočava ostrvce jako visoke koncentracije koja je uporediva sa onom u spoljašnjem prstenu kauloida.

Kod biljaka koje su gajene na podlogama sa Cu-acetatom, značajno veće koncentracije bakra izmerene su u bazalnim delovima biljaka, nego u apikalnim delovima (Tabela 23). Značajan je bio efekat interakcije tipa preseka i primenjene koncentracije Cu-acetata (Tabela 23; Grafik 24B). U kontrolnim grupama biljaka sadržaj bakra u bazalnim presecima bio je 21,5 ppm i nije bio značajno različit od onog u apikalnim (9,1 ppm). Kod biljaka tretiranih 200 µM Cu-acetatom, koncentracija bakra u oba tipa preseka bila je značajno veća nego u kontrolama. Kada su biljke gajene na podlozi sa dodatim 700 µM Cu-acetatom, izmerene koncentracije su bile značajno manje u odnosu na one u odgovarajućim delovima biljaka gajenih pri 200 µM Cu-acetata, ali značajno veće u odnosu na kontrole. Razlike u koncentraciji bakra između apikalnih i bazalnih preseka biljaka pri svim primenjenim koncentracijama Cu-acetata bile su značajne.



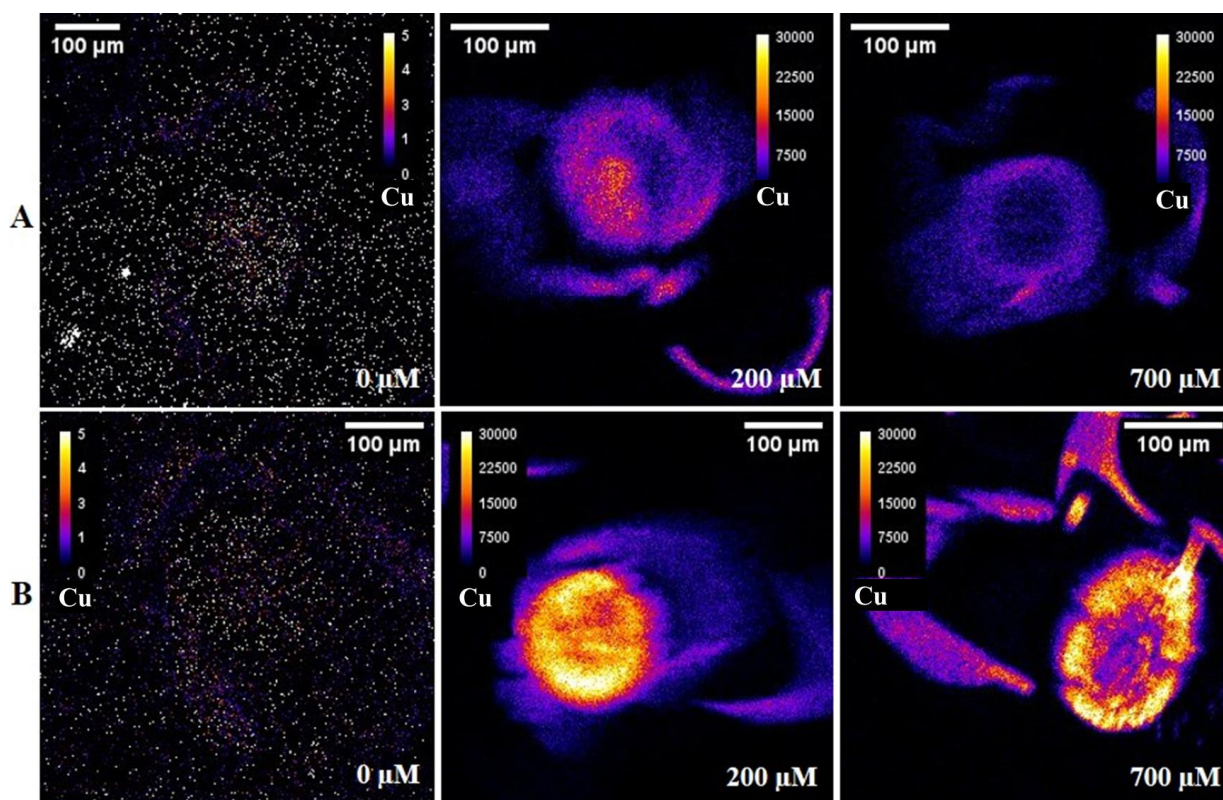


**Slika 35.** Koncentracijske mape raspodele cinka na poprečnim presecima biljaka *H. cupressiforme* gajenih pri različitim koncentracijama Zn-acetata u uslovima dugotrajnog stresa. A - poprečni preseki apikalnog dela biljaka; B - poprečni preseki bazalnog dela biljaka. Sadržaj elemenata u presecima izražen je u ppm.

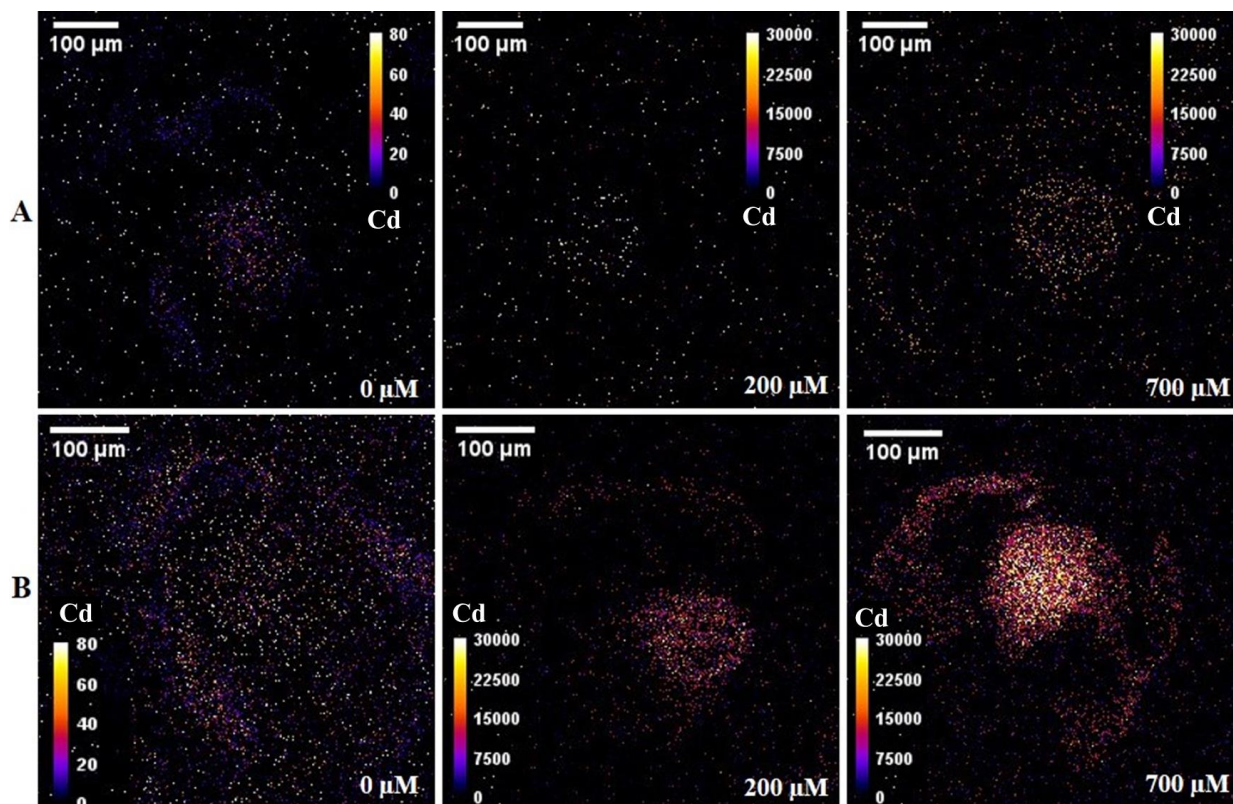
Na koncentracijskim mapama raspodele bakra (Slika 36) poprečnih preseka kontrolnih biljaka, bakar se uočava u vidu jako slabog difuznog signala koji se teško razlikuje od pozadinskog šuma, što ukazuje na jako male količine ovog elementa u presecima. Kod bazalnog preseka biljke gajene na podlozi sa dodatkom 200  $\mu\text{M}$  Cu-acetata (Slika 36B), bakar je u jako visokoj koncentraciji uniformno raspoređen u svim delovima preseka pri čemu se blago smanjenje koncentracije uočava samo u određenim regionima ka unutrašnjosti kauloida. U apikalnom preseku (Slika 36A), sadržaj bakra je bio znatno manji, pri čemu su zone većeg sadržaja bile asimetrično distribuirane u vidu spoljašnjeg širokog prstena na koji se ka unutrašnjosti kauloida nastavlja region povećane koncentracije dok je druga polovina preseka znatno tamnija, ukazujući na nizak sadržaj bakra. Kod biljaka gajenih na podlozi sa dodatkom 700  $\mu\text{M}$  Cu-acetata, ovaj element je kod oba tipa preseka (Slika 36) bio lokalizovan u vidu širokog prstena u spoljašnjem sloju korteksa kauloida, koji je u slučaju bazalnog preseka bio znatno intenzivniji, ukazujući na mnogo veću koncentraciju bakra u ovom delu biljke, nego u apikalnom delu.

Biljke tretirane Cd-acetatom imale su značajno veću koncentraciju kadmijuma u bazalnim nego u apikalnim delovima kauloida (Tabela 23). Sa povećanjem primenjene koncentracije kadmijuma u podlogama, značajno je rasla i koncentracija kadmijuma u oba tipa preseka mahovina. Osim toga, značajne su bile i razlike između koncentracija ovog elementa u bazalnim i apikalnim delovima biljaka gajenih pri istoj koncentraciji Cd-acetata (Grafik 24C). Najveća razlika uočena je između poprečnih preseka biljaka gajenih na medijumu sa 700  $\mu\text{M}$  Cd-acetatom (8083,715 ppm), dok je u tretmanima sa 200  $\mu\text{M}$  Cd-acetatom ona iznosila 2458,74 ppm.

U kontrolnoj grupi biljaka, na koncentracijskim mapama raspodele kadmijuma oba tipa preseka (Slika 37), signali poreklom od kadmijuma su difuzno raspoređeni i jako slabog intenziteta. Sa povećanjem koncentracije Cd-acetata u medijumu, koncentracija kadmijuma u presecima bazalnog dela biljaka (Slika 37B) rasla je u svim regionima preseka.



**Slika 36.** Koncentracijske mape raspodele bakra na poprečnim presecima biljaka *H. cupressiforme* gajenih pri različitim koncentracijama Cu-acetata u uslovima dugotrajnog stresa. A - poprečni preseki apikalnog dela biljaka; B - poprečni preseki bazalnog dela biljaka. Sadržaj elemenata u presecima izražen je u ppm.



**Slika 37.** Koncentracijske mape raspodele kadmijuma na poprečnim presecima biljaka *H. cupressiforme* gajenih pri različitim koncentracijama Cd-acetata u uslovima dugotrajnog stresa. A - poprečni preseki apikalnog dela biljaka; B - poprečni preseki bazalnog dela biljaka. Sadržaj elemenata u presecima izražen je u ppm.

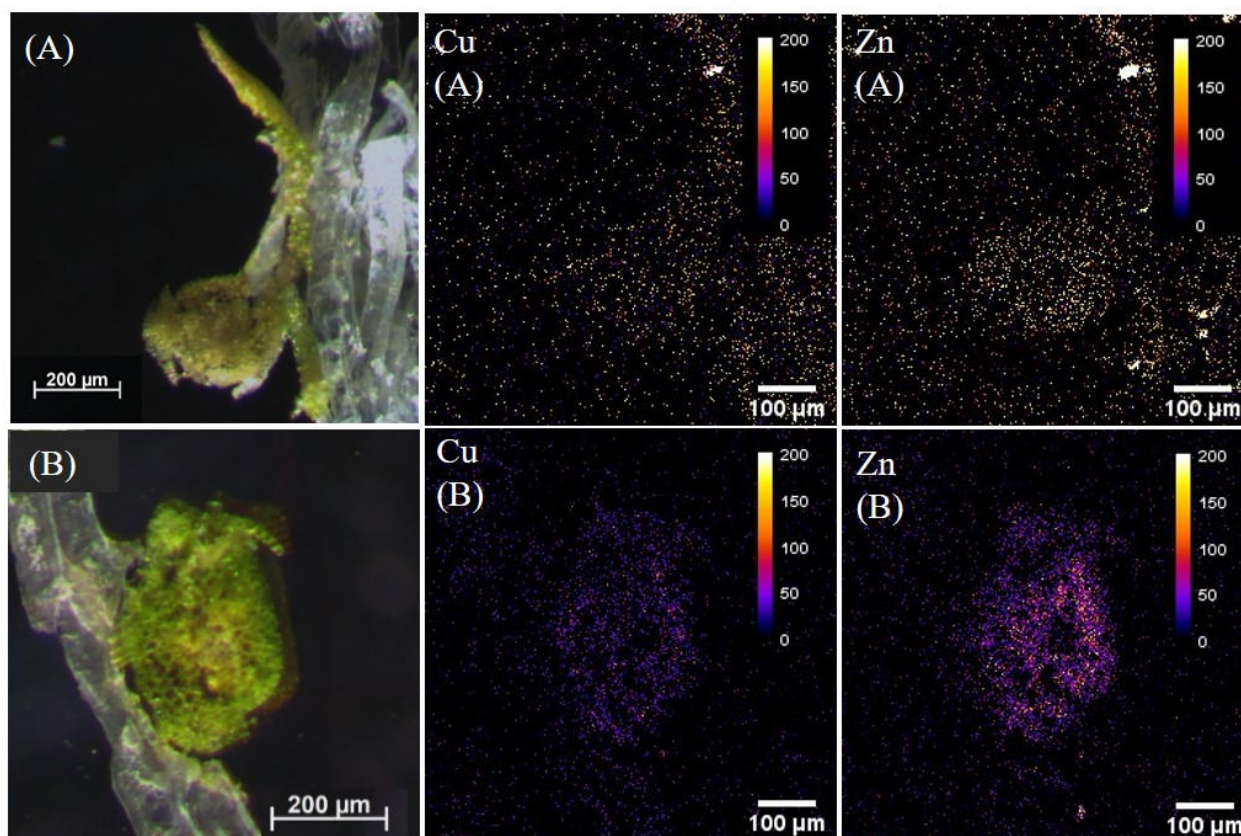


Na poprečnom preseku bazalnog dela biljke tretirane 700  $\mu\text{M}$  Cd-acetatom uočava se najveći sadržaj sumpora. Na apikalnim presecima biljaka gajenih na podlozi sa dodatkom 200  $\mu\text{M}$  Cd-acetata (Slika 37A), signal poreklom od kadmijuma se slabo izdvaja od pozadinskog šuma, i uočljiv je jedino kao grupacija tačaka sličnog intenziteta u centralnom delu koncentracijske mape, unutar koje se nalazi mali region bez ikakvog signala. Raspodela kadmijuma na preseku apikalnog dela biljke tretirane najvećom koncentracijom Cd-acetata (Slika 37A) predstavljena je tačkama sličnog intenziteta čija gustina opada ka unutrašnjosti preseka kauloida.

#### 4.7.2. Koncentracija i distribucija elemenata u poprečnim presecima gametofora vrste *A. undulatum* gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-acetata i Cu-acetata u kulturi *in vitro*

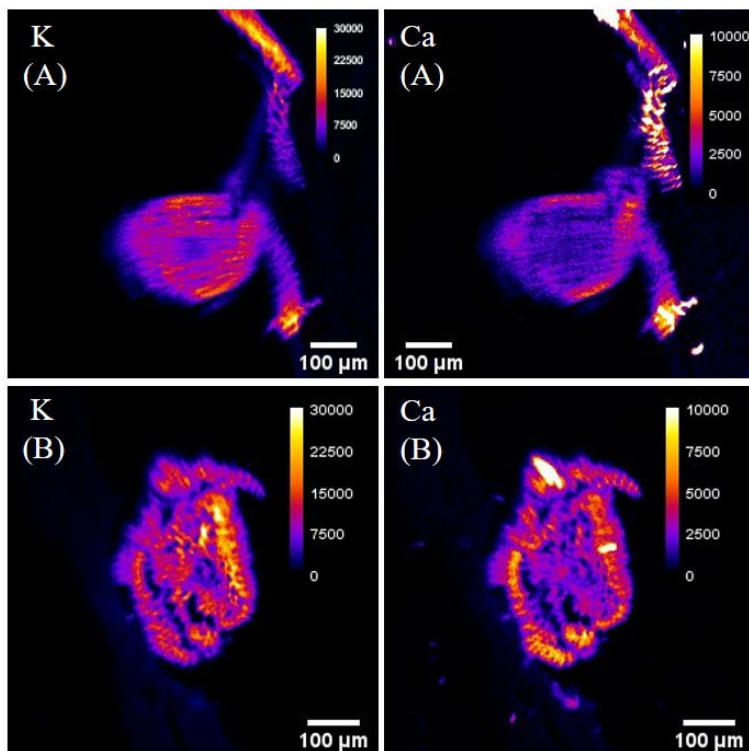
U apikalnim i bazalnim presecima kontrolnih biljaka i biljaka *A. undulatum* gajenih na podlogama sa 700  $\mu\text{M}$  Zn- ili Cu-acetatom u uslovima kratkotrajnog ili dugotrajnog stresa, mikro-PIXE metodom određeni su distribucija i sadržaj odabranih elemenata (K, Ca, Zn i Cu) (Slike 38-44).

**Kontrolna grupa biljaka.** Bakar je kod kontrolnih biljaka *A.undulatum* (Slika 38) bio prisutan u jako niskim koncentracijama, zbog čega je na mapama teško razdvojiti signale poreklom od ovog elementa u biljci od signala iz okružujućeg medijuma za kriofiksaciju. Kod apikalnog preseka (Slika 38A), intenzitet signala individualnih tačaka je jači, dok se u bazalnom preseku (Slika 38B), uočava veća gustina tačaka nižeg intenziteta signala poreklom od bakra. Cink je na poprečnim presecima oba dela gametofora difuzno raspoređen, pretežno van centralnog regiona poprečnog preseka kauloida. Smanjena koncentracija cinka u ovom delu preseka kauloida uočava se u vidu zatamnjenja. Sadržaj cinka je u oba segmenta biljke bio relativno nizak.



**Slika 38.** Koncentracijske mape raspodele cinka i bakra na poprečnim presecima biljaka *A. undulatum* gajenih na podlogama bez dodatka metal-acetata. A - poprečni preseki apikalnog dela biljaka; B - poprečni preseki bazalnog dela biljaka. Sadržaj elemenata u presecima izražen je u ppm.

Na presecima kauloida kontrolnih biljaka kalijum je lokalizovan relativno ravnomerno u svim delovima korteksa, osim u centralnom delu preseka, gde se uočava znatno manja koncentracija ovog elementa (Slika 39). Za razliku od cinka (Slika 38) i kalijuma (Slika 39), kalcijum je u poprečnim presecima kontrolnih biljaka (Slika 39) dominantno skoncentrisan u spoljašnjim slojevima kauloida, pri čemu je ta razlika u distribuciji unutar istih preseka izraženija kod preseka apikalnog dela biljke.



**Slika 39.** Koncentracijske mape raspodele kalijuma i kalcijuma na poprečnim presecima biljaka *A. undulatum* gajenih na podlogama bez dodatka metal-acetata. A - poprečni preseki apikalnog dela biljaka; B - poprečni preseki bazalnog dela biljaka. Sadržaj elemenata u presecima izražen je u ppm.

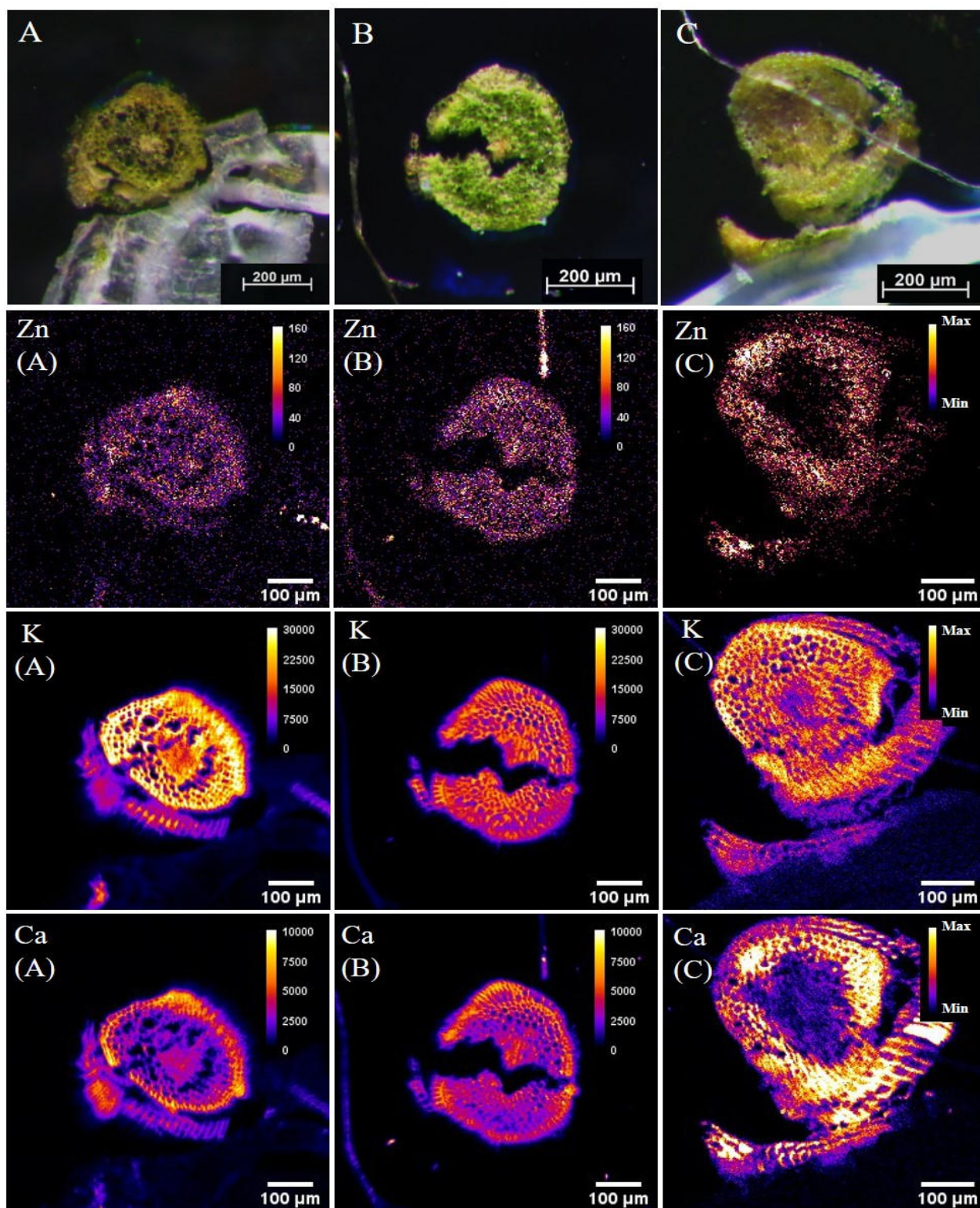
**Tretmani Zn-acetatom.** Na poprečnom preseku bazalnog dela gametofora *A. undulatum* gajenog na podlozi sa 700 µM Zn-acetatom u uslovima kratkotrajnog stresa (Slika 40A), cink je pretežno lokalizovan unutar širokog, nehomogenog prstena koji obuhvata epidermis i spoljašnje slojeve korteksa kauloida u okviru koga se izdvajaju žarišta sa povećanom koncentracijom ovog elementa. Van ovog prstena, u regionu centralnog provodnog snopa uočava se izolovana zona povećanog sadržaja cinka, koja po intenzitetu odgovara žarištima u prstenu. Između ova dva regiona, nalazi se region smanjenog sadržaja cinka usled velikog broja šupljina unutar korteksa kauloida.

Na koncentracijskoj mapi raspodele cinka poprečnog preseka apikalnog dela biljke *A. undulatum* gajene duži period na podlozi sa 700 µM Zn-acetatom (Slika 40B), nisu uočljivi tamni regioni između centra i spoljašnjih slojeva korteksa, već se signal poreklom od cinka detektuje u svim delovima preseka. Povećana koncentracija cinka u vidu svetlog ostrvceta uočava se u oblasti koja odgovara hadromu kauloida, kao i u regionu koji odgovara epidermisu kauloida, koji je na koncentracijskoj mapi predstavljen tankim prstenom svetlije boje u odnosu na ostatak preseka.

Kod biljaka tretiranih 700 µM Zn-acetatom u trajanju od pet nedelja (Slika 40C), na poprečnom preseku bazalnog dela kauloda cink je dominantno lokalizovan u spoljašnjim slojevima korteksa, dok se centralni deo preseka karakteriše znatno nižim sadržajem ovog elementa i odsustvom svetlih centralnih ostrvaca prisutnih na koncentracijskim mapama raspodele cinka preseka prikazanih na Slici 40A i 40B. S druge strane, na mapama raspodele cinka sva tri analizirana poprečna preseka (Slika 40A-C), u regionima povećane koncentracije cinka u



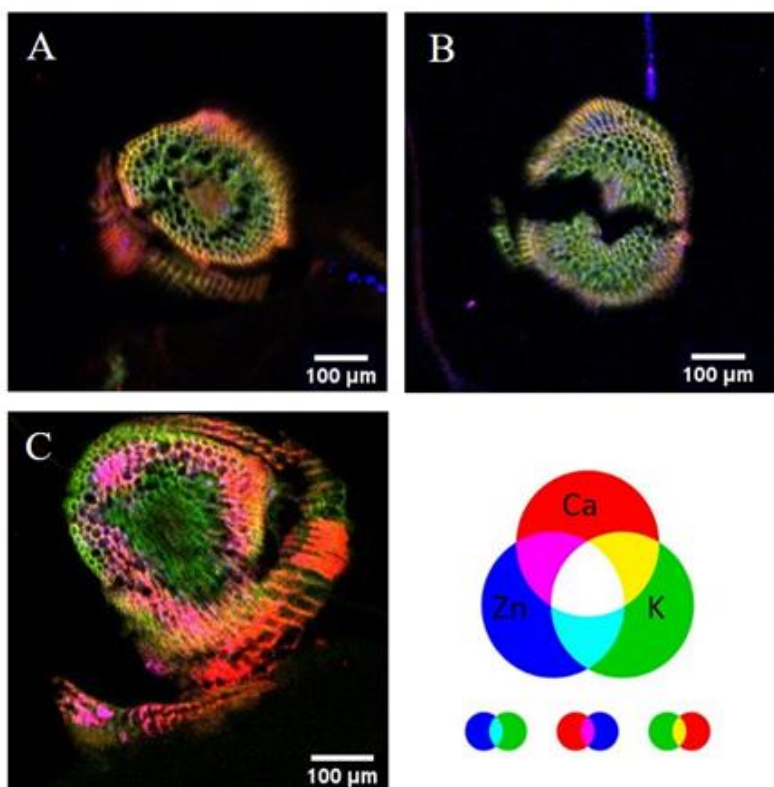
spoljašnjim slojevima korteksa i/ili epidermisa, uočavaju se jako svetla ostrvca, koja odražavaju znatno veću količinu cinka u ovim delovima preseka.



**Slika 40.** Koncentracijske mape raspodele cinka, kalijuma i kalcijuma na poprečnim presecima biljaka *A. undulatum* gajenih na podlogama sa 700 µM Zn-acetatom u uslovima kratkotrajnog i dugotrajnog stresa. A – poprečni presek bazalnog dela biljke gajene u uslovima kratkotrajnog stresa; B – poprečni presek apikalnog dela biljke gajene u uslovima dugotrajnog stresa; C – poprečni presek bazalnog dela biljke gajene u uslovima dugotrajnog stresa. Sadržaj elemenata u presecima izražen je u ppm.

Na poprečnim preseccima biljaka *A. undulatum* tretiranih cinkom, kalijum je dominantno lokalizovan u ćelijskim zidovima (Slika 40A-C). Razlike u intenzitetu signala između korteksa i epidermisa na poprečnom preseku apikalnog dela biljke izlagane dugotrajnom stresu (Slika 40B) nisu izražene, dok se na preseccima bazalnog dela biljaka iz eksperimenata sa različitim dužinom stresa (Slika 40A, B) u centralnom regionu uočava pad sadržaja ovog elementa. Kao i u slučaju kalijuma, kalcijum se na istim preseccima (Slika 40A-C) dominantno nalazi u ćelijskim zidovima ćelija kauloida. Za razliku od kalijuma, regioni sa povećanom koncentracijom kalcijuma poklapaju se sa oblastima povećane koncentracije cinka na odgovarajućim preseccima.

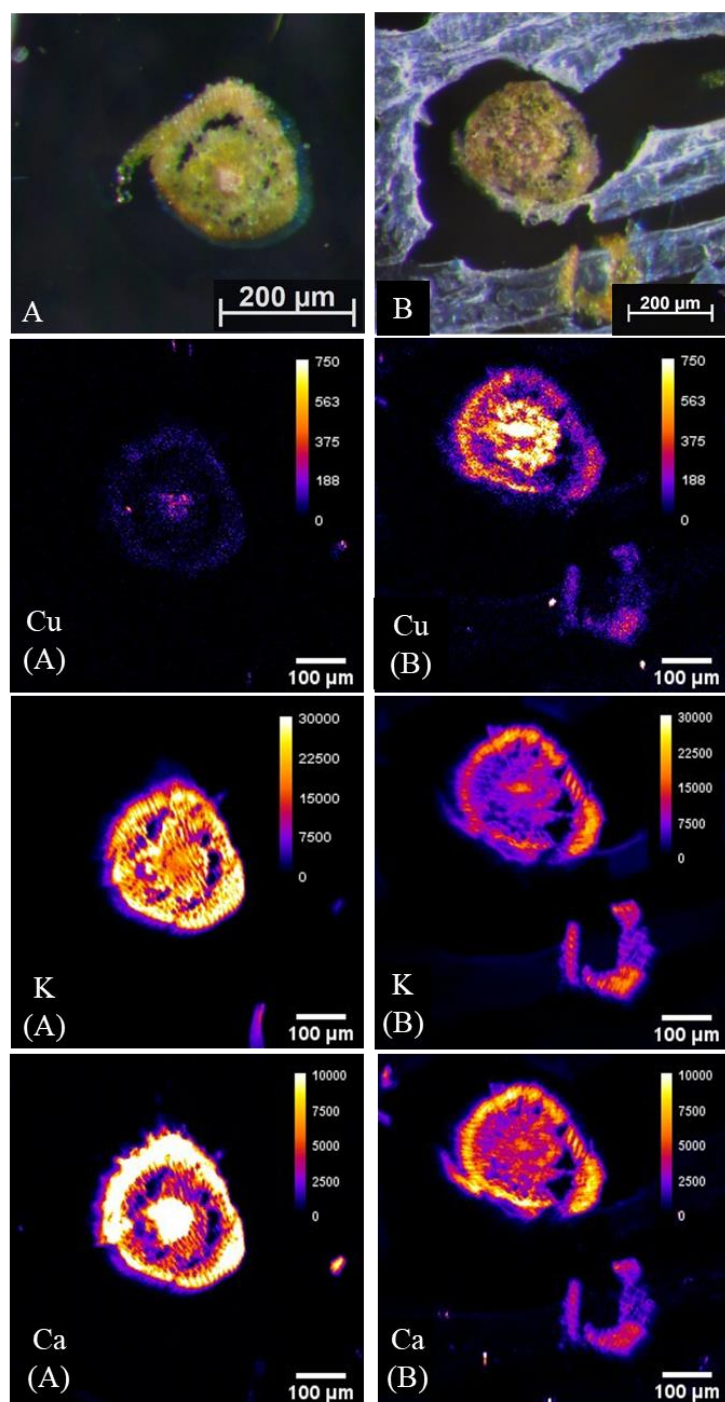
Kolokalizacija cinka, kalijuma i kalcijuma na poprečnim preseccima biljaka *A. undulatum* gajenih na podlozi sa 700  $\mu\text{M}$  Zn-acetatom u uslovima kratkotrajnog i dugotrajnog stresa prikazana je na Slici 41.



**Slika 41.** Kolokalizacija cinka, kalijuma i kalcijuma na poprečnim preseccima biljaka *A. undulatum* gajenih na podlogama sa dodatkom 700  $\mu\text{M}$  Zn-acetata u uslovima kratkotrajnog i dugotrajnog stresa. A – poprečni presek bazalnog dela biljke gajene u uslovima kratkotrajnog stresa; B – poprečni presek apikalnog dela biljke gajene u uslovima dugotrajnog stresa; C - poprečni presek bazalnog dela biljke gajene u uslovima dugotrajnog stresa. Svaki element predstavljen je jednom bojom, te preklapanje elemenata rezultuje mešanjem boja. prema prikazanoj šemi.

**Tretmani Cu-acetatom.** Kod biljaka *A. undulatum* gajenih na podlozi sa 700  $\mu\text{M}$  Cu-acetatom u uslovima kratkotrajnog stresa, bakar je dominantno lokalizovan u epidermisu i centralnom delu korteksa kauloida (Slika 42A, B). Na poprečnom preseku apikalnog dela biljke *A. undulatum* na Slici 42A, najveća koncentracija bakra uočava se u regionu hadroma, koji se na mapi raspodele bakra izdvaja kao ostrvce intenzivno ljubičaste boje. Na poprečnom preseku bazalnog dela biljke tretirane 700  $\mu\text{M}$  Cu-acetatom u trajanju od pet dana (Slika 42B), centralni region povećane koncentracije bakra znatno je svetliji i veće površine u poređenju sa datim regionom na poprečnom preseku apikalnog dela biljke (Slika 42A) i obuhvata i delove koretaksa bliže epidermisu. Sadržaj bakra u epidermalnom sloju preseka bazalnog dela biljke značajno je viši u odnosu na sadržaj istog elementa u epidermisu apikalnog dela.



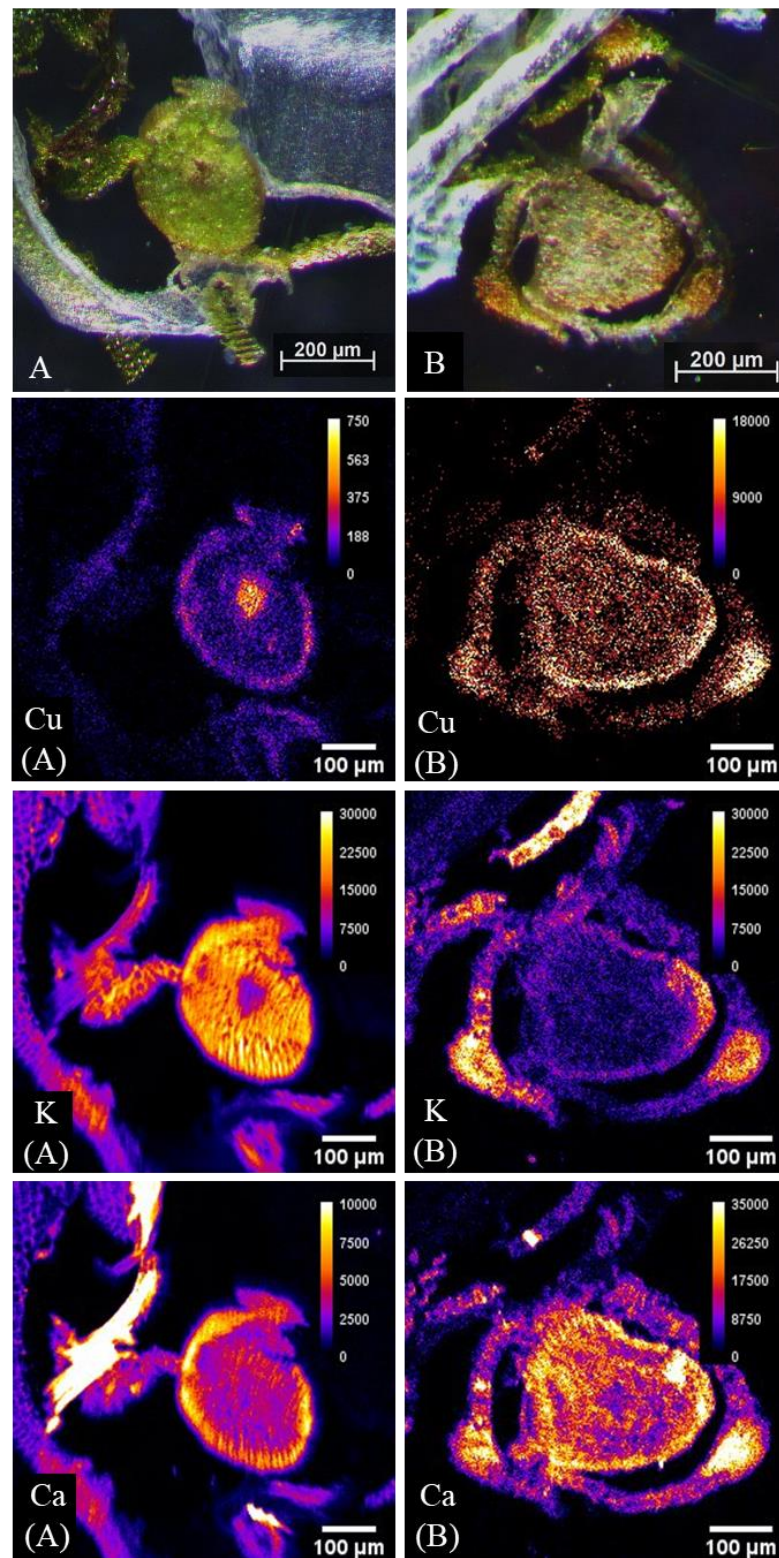


**Slika 42.** Koncentracijske mape raspodele bakra, kalijuma i kalcijuma na poprečnim presecima biljaka *A. undulatum* gajenih na podlogama sa 700 µM Cu-acetatom u uslovima kratkotrajnog stresa. A – poprečni presek apikalnog dela biljke, B – poprečni presek bazalnog dela biljke. Sadržaj elemenata u presecima izražen je u ppm.

Na koncentracijskoj mapi raspodele kalijuma prikazanoj na Slici 42A, sadržaj ovog elementa visok je u svim delovima preseka kauloida, osim u regionu hadroma, gde se primećuje blago smanjeni intenzitet signala ovog elementu, kao i u zonama preseka koje su na mapama crne a koje odgovaraju šupljinama unutar korteksa izdanka. Za razliku od preseka apikalnog dela gametofora, bazalni presek biljke gajene na podlozi sa 700 µM Cu-acetatom u uslovima kratkotrajnog stresa (Slika 42B) karakteriše se znatno nižom koncentracijom kalijuma, koji je pretežno lokalizovan u epidermisu i centralnom delu izdanka.

Na koncentracijskoj mapi raspodele kalcijuma na Slici 42A (presek apikalnog dela biljke iz eksperimenta sa kratkotrajnim stresom gajene na podlozi sa dodatkom 700 µM Cu-acetata),

kalcijum je dominantno raspoređen u epidermalnom sloju i hadromu kauloida. Na mapi bazalnog preseka biljke istog tretmana (Slika 42B), kao i u slučaju kalijuma, sadržaj kalcijuma je manji u poređenju sa apikalnim presekom, pri čemu se obrasci distribucije kalcijuma i bakra na ovom preseku poklapaju.



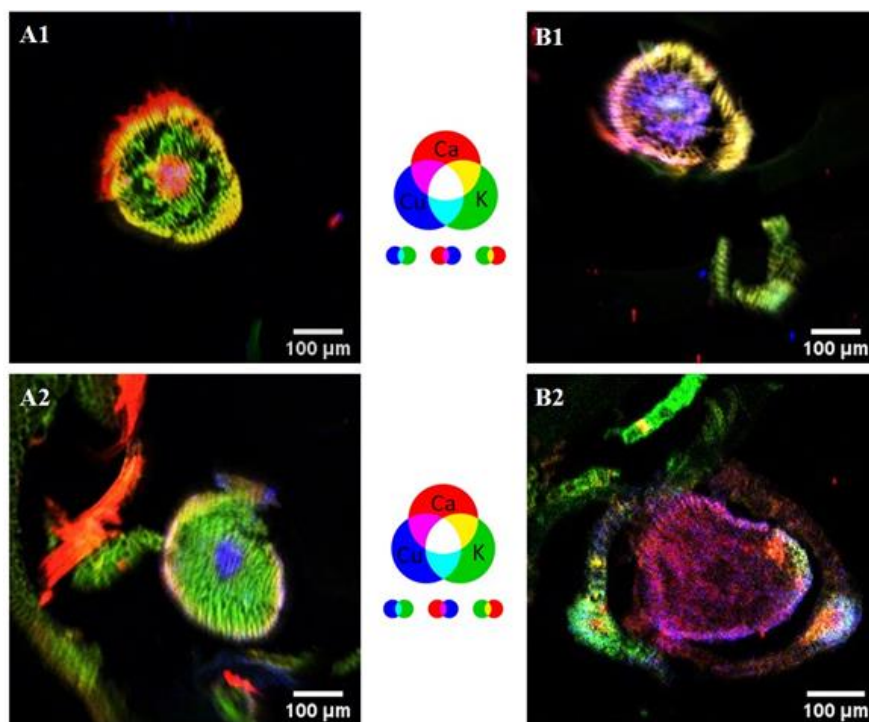
**Slika 43.** Mape raspodele bakra, kalijuma i kalcijuma na poprečnim presecima biljaka *A. undulatum* gajenih na podlogama sa 700 µM Cu-acetatom u uslovima dugotrajnog stresa. U prvom redu panela prikazane su fotografije poprečnih preseka pripremljenih za mikro-PIXE analizu pod svetlosnim mikroskopom: A – poprečni presek apikalnog dela biljke, B – poprečni presek bazalnog dela biljke. Sadržaj elemenata u presecima izražen je u ppm.

Na koncentracijskoj mapi raspodele bakra poprečnog preseka apikalnog dela biljke gajene na podlozi sa dodatkom 700  $\mu\text{M}$  Cu-acetatom u uslovima dugotrajnog stresa (Slika 43A) uočava se da je ovaj element dominantno skoncentrisan u oblasti epidermisa, a naročito u regionu hadroma. Bakar je na poprečnom preseku bazalnog dela biljke istog tretmana (Slika 43B) lokalizovan pretežno u epidermisu, dok se u centralnom delu poprečnog preseka uočava izolovan taman region, koji ukazuje na znatno manji sadržaj bakra. Na istoj mapi, oko preseka kauloida uočavaju se preseci filoida, sa izraženom kostom, gde je koncentracija bakra u odnosu na ostali deo filoida znatno veća, sa intenzitetom signala ovog elementa koji je sličan onom u epidermisu kauloida.

Na koncentracijskoj mapi raspodele kalijuma preseka predstavljenog na Slici 43A, kalijum je uniformno u velikoj koncentraciji raspoređen u svim delovima kauloida, osim u centralnom regionu preseka, gde se zapaža znatno niža koncentracija ovog elementa. Nasuprot ovome, na koncentracijskoj mapi raspodele kalijuma poprečnog preseka na Slici 43B, kalijum se pretežno nalazi u epidermisu, dok se ostatak preseka, naročito centralni deo korteksa, karakteriše značajno manjim sadržajem ovog elementa. Na njoj, najintenzivniji signali uočavaju se u zoni koste filoida prisutnih oko kauloida. Unutar ovih žarišta velikog intenziteta signala na preseku filoida, zapažaju se male tamnije zone, koje predstavljaju lokalno smanjenje sadržaja kalijuma.

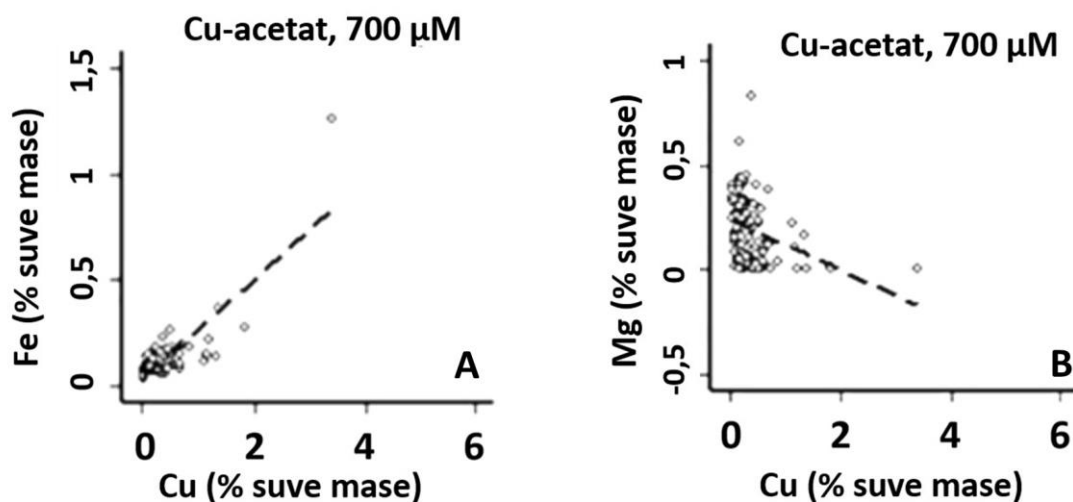
Na koncentracionim mapama raspodele kalcijuma preseka prikazanih na Slici 43, najintenzivniji signal uočava se u regionu epidermisa kauloida. Povećana koncentracija kalcijuma na presecima oba dela biljke, zapaža se i u delu korteksa između epidermisa i hadroma kauloida, dok se u centralnom regionu korteksa uočava značajan pad koncentracije ovog elementa

Kolokalizacija bakra, kalijuma i kalcijuma na mapama raspodele elemenata preseka biljaka *A. undulatum* gajenih na podlozi sa 700  $\mu\text{M}$  Zn-acetatom u uslovima kratkotrajnog i dugotrajnog stresa prikazana je na Slici 44.



**Slika 44.** Kolokalizacija bakra, kalijuma i kalcijuma na poprečnim presecima biljaka *A. undulatum* gajenih na podlogama sa 700  $\mu\text{M}$  Cu-acetatom u uslovima kratkotrajnog i dugotrajnog stresa. A1 – poprečni presek apikalnog dela biljke gajene u uslovima kratkotrajnog stresa; B1 – poprečni presek bazalnog dela biljke gajene u uslovima kratkotrajnog stresa; A2 – poprečni presek apikalnog dela biljke gajene u uslovima dugotrajnog stresa; B2 – poprečni presek bazalnog dela biljke gajene u uslovima dugotrajnog stresa. Svaki element predstavljen je određenom bojom, a preklapanje elemenata rezultuje mešanjem boja prema prikazanoj šemi.

Kod biljaka *A. undulatum* bakar je znatno više bio akumuliran u kauloidima nego u filoidima. Kod ove vrste sadržaj bakra u biljkama nije pokazao značajnu korelaciju sa elementima poput C, N, O, Na, Al, Si, P, S, Cl, Cd, K, Ca, i Ni. S druge strane, bakar je imao značajnu pozitivnu korelaciju sa gvožđem, i značajnu negativnu korelaciju sa magnezijumom kod gametofora *A. undulatum*.



**Grafik 25.** Korelacija bakara sa gvožđem (A) i magnezijumom (B) kod biljaka *A. undulatum* izlaganih 700 µM Cu-acetatu na nivou celih gametofora.

#### 4.8. Ramanova spektroskopija filoida mahovina *H. cupressiforme* i *A. undulatum* gajenih na podlogama sa dodatkom različitih koncentracija Zn-acetata i Cu-acetata u kulturi *in vitro*

Kako bi se dobile biohemijske i strukturne informacije na nivou svih organskih jedinjenja o promenama koje se dešavaju u uslovima stresa izazvanog metalima kod mahovina *H. cupressiforme* i *A. undulatum*, i kako bi se eliminisali potencijalni artefakti koji nastaju kao posledica priprema materijala za klasične biohemijske analize, primenjena je tehnika Ramanove spektroskopije. Usled izraženog negativnog efekta Cd-acetata na rastenje i prinos mase kod ispitivanih mahovina, klasičnim biohemijskim tehnikama analize su vršene samo kod biljaka iz tretmana sa cinkom i bakrom. Radi uporedljivosti dobijenih rezultata, Ramanovom spektroskopijom su takođe analizirane samo biljake iz tretmana sa Zn- i Cu-acetatom. Pošto je analiza obrazaca raspodele testiranih metala unutar gametofora pokazala da postoje značajne razlike u apikalnim i bazalnim delovima, Ramanovom spektroskopijom izvršeno je spektralno mapiranje filoida na tri različite pozicije duž eksplantata, kako bi se detektovale potencijalne razlike na biohemijskom nivou. Preklapanjem signala koji potiču od različitih hemijskih jedinjenja prisutnih u filoidima mahovina i njihovih karakterističnih molekularnih vibracija, dobijeni su specifični Ramanovi spektri u regionu od 200-1800  $\text{cm}^{-1}$  za svaki filoid na tri različite pozicije duž filoida i kauloida biljaka *H. cupressiforme* i *A. undulatum* gajenih na podlogama sa različitim koncentracijama Zn- i Cu-acetata u uslovima kratkotrajnog i dugotrajnog stresa.

***Atrichum undulatum*.** Kod biljaka *A. undulatum* u eksperimentima sa kratkotrajnim stresom najintenzivniji pikovi uočavaju se na oko 1520  $\text{cm}^{-1}$  i oko 1151  $\text{cm}^{-1}$  i oni su karakteristični za spektre svih analiziranih filoida, bez velikih razlika u intenzitetu između spektara filoida istog tretmana (Grafik 26). Izuzetak su pikovi na 1151  $\text{cm}^{-1}$  kod spektara filoida biljaka tretiranih 700 µM Zn-acetatom, gde se po intenzitetu izdvaja isti pik unutar spektra filoida na bazalnoj poziciji biljke. Pik srednjeg intenziteta prisutan kod svih spektara nalazi se na oko 1001  $\text{cm}^{-1}$ , i on se po intenzitetu ne razlikuje bitno između različitih spektara. Ostali pikovi srednjeg intenziteta, koji zavise od pozicije filoida na samoj biljci, zapažaju se u regionu talasnih brojeva 1313-1322  $\text{cm}^{-1}$  (pik široke osnove nastale preklapanjem pikova nižeg intenziteta u regionu od 1250 do 1350  $\text{cm}^{-1}$ ), 1435 –



1439  $\text{cm}^{-1}$  i 1686-1698  $\text{cm}^{-1}$ , pri čemu su oni na oko 1437  $\text{cm}^{-1}$  najintenzivniji. Spektri filoida na apikalnoj poziciji izdanaka mahovina su na ovim talasnim brojevima imali najniži intenzitet pikova, dok je intenzitet pikova bazalno pozicioniranih filoida, sem u kontrolnoj grupi, bio najveći. U odnosu na spektre filoida na središnjoj i apikalnoj poziciji, spektri bazalno pozicioniranih filoida biljaka *A. undulatum* tretiranih 700  $\mu\text{M}$  Cu-acetatom izdvajaju se po prisustvu pika srednjeg intenziteta na 1574  $\text{cm}^{-1}$ . Kod svih spektara prisutan je veći broj manjih pikova u intervalu od 200-960  $\text{cm}^{-1}$  pri čemu se najviše izdvajaju oni na oko 285  $\text{cm}^{-1}$ , 364  $\text{cm}^{-1}$  i 956  $\text{cm}^{-1}$  kod kojih se u zavisnosti od pozicije filoida uočavaju razlike u intenzitetu navedenih pikova.

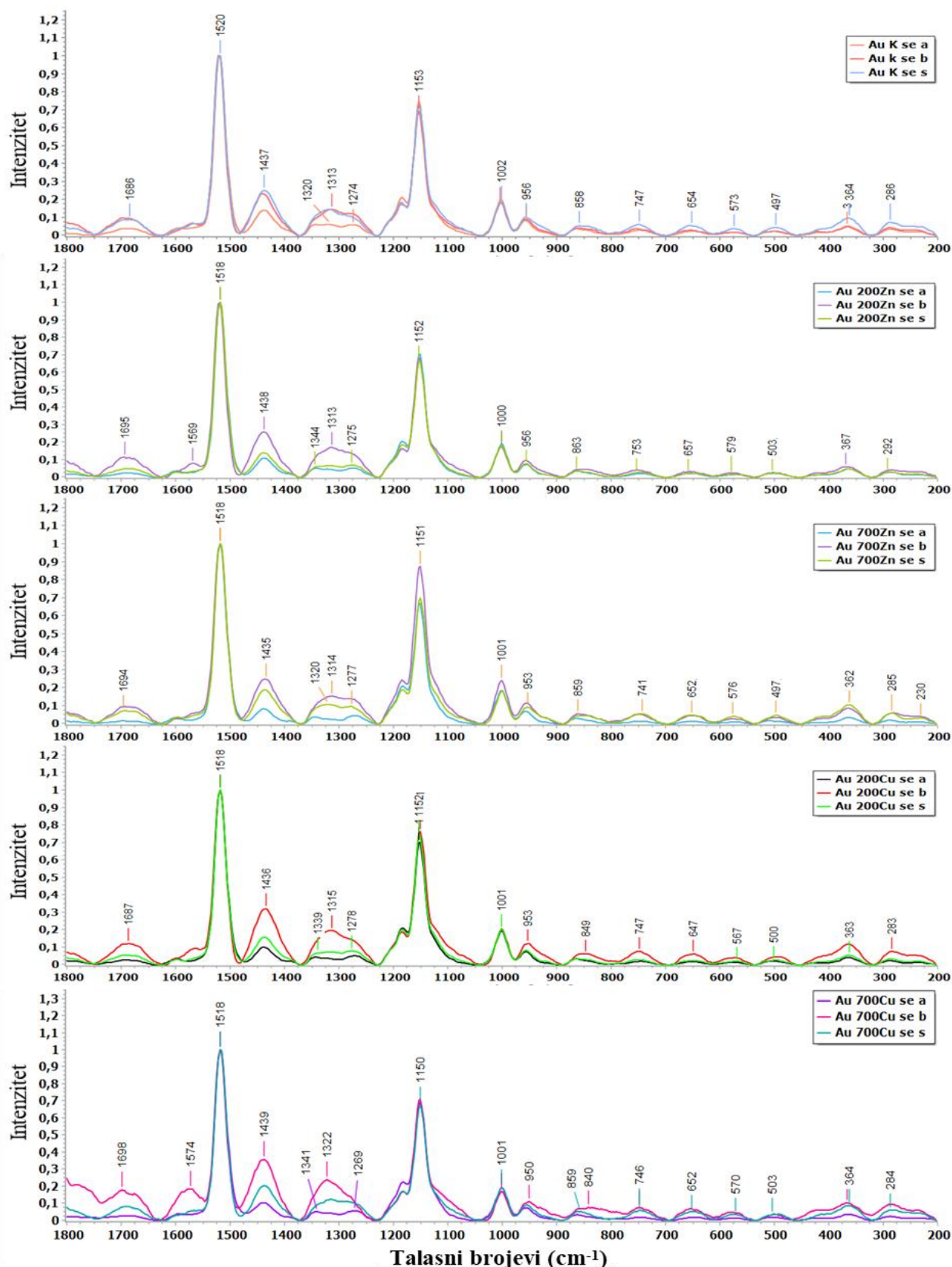
Ramanovi spektri filoida biljaka *A. undulatum* gajenih u kontinuitetu pet nedelja na podlogama sa različitom koncentracijom metal-acetata prikazani su na Grafiku 27. Dominantan pik na 1151  $\text{cm}^{-1}$  uočen u spektrima biljaka iz eksperimenata sa kratkotrajnim stresom, kod biljaka tretiranih metal-acetatima duži period pomeren je ka većim talasnim brojevima (oko 1155  $\text{cm}^{-1}$ ). U slučaju bazalno pozicioniranih filoida biljaka dugotrajno izlaganih 700  $\mu\text{M}$  Cu-acetatu, umesto intenzivnog pika na ovoj poziciji, javljaju se dva nova pika srednjeg intenziteta na 1106  $\text{cm}^{-1}$  i 1227  $\text{cm}^{-1}$ . Osim toga, umesto dominantnog pika na oko 1520  $\text{cm}^{-1}$ , prisutnog kod spektara filoida na svim pozicijama, u spektru bazalno pozicioniranih filoida biljaka dugotrajno izlaganih 700  $\mu\text{M}$  Cu-acetatu pik najvećeg intenziteta uočava se na 1583  $\text{cm}^{-1}$ . Pikovi srednjeg intenziteta karakteristični su za pozicije oko 1003  $\text{cm}^{-1}$ , 1318-1325  $\text{cm}^{-1}$  i 1442  $\text{cm}^{-1}$ . Međutim, u spektru bazalno pozicioniranih filoida biljaka gajenih na medijumu sa 700  $\mu\text{M}$  Cu-acetatom, pik na 1003  $\text{cm}^{-1}$  u potpunosti izostaje, dok je onaj na 1442  $\text{cm}^{-1}$  znatno intenzivniji u poređenju sa pikovima na istom talasnom broju u spektrima svih ostalih filoida. U spektrima ovog filoida prisutni su i pikovi srednjeg intenziteta koji kod drugih spektara nisu izraženi (na oko 923  $\text{cm}^{-1}$ , 1227 i 1278  $\text{cm}^{-1}$ ). Pikovi malog intenziteta karakteristični za region 200 – 960  $\text{cm}^{-1}$  koji se uočavaju kod biljaka iz eksperimenata sa kratkotrajnim stresom, prisutni su i u spektrima biljaka gajenih u uslovima dugotrajnog stresa ali, sem u slučaju bazalno pozicioniranih filoida biljaka tretiranih 700  $\mu\text{M}$  Cu-acetatom, manje su izraženi nego kod spektara odgovarajućih filoida u drugom tipu eksperimenta.

Na dendrogramu klaster analize filoida bazirane na Ramanovim spektrima filoida biljaka *A. undulatum* gajenih u uslovima kratkotrajnog stresa (Grafik 28A), uočava se prisustvo dva glavna klastera (A1 i A2). Klaster A1 sadrži samo bazalno pozicionirane filoide biljaka tretiranih 700  $\mu\text{M}$  Cu-acetatom, koji se značajno razlikuju od svih drugih analiziranih filoida, a koji se nalaze u okviru klastera A2. U klasteru A2 razlikuju se dva značajno udaljena podklastera (A3 i A4). Podklaster A4 sadrži relativno homogenu grupu podklastera različite hijerarhije, međusobno male udaljenosti. U okviru ove grupe nalaze se apikalno pozicionirani filoidi biljaka svih tretmana i središnje pozicionirani filoidi biljaka gajenih na podlozi sa 200  $\mu\text{M}$  Zn- ili Cu-acetatom. Podklaster A3 čine relativno udaljene grupe različitog nivoa hijerarhije.

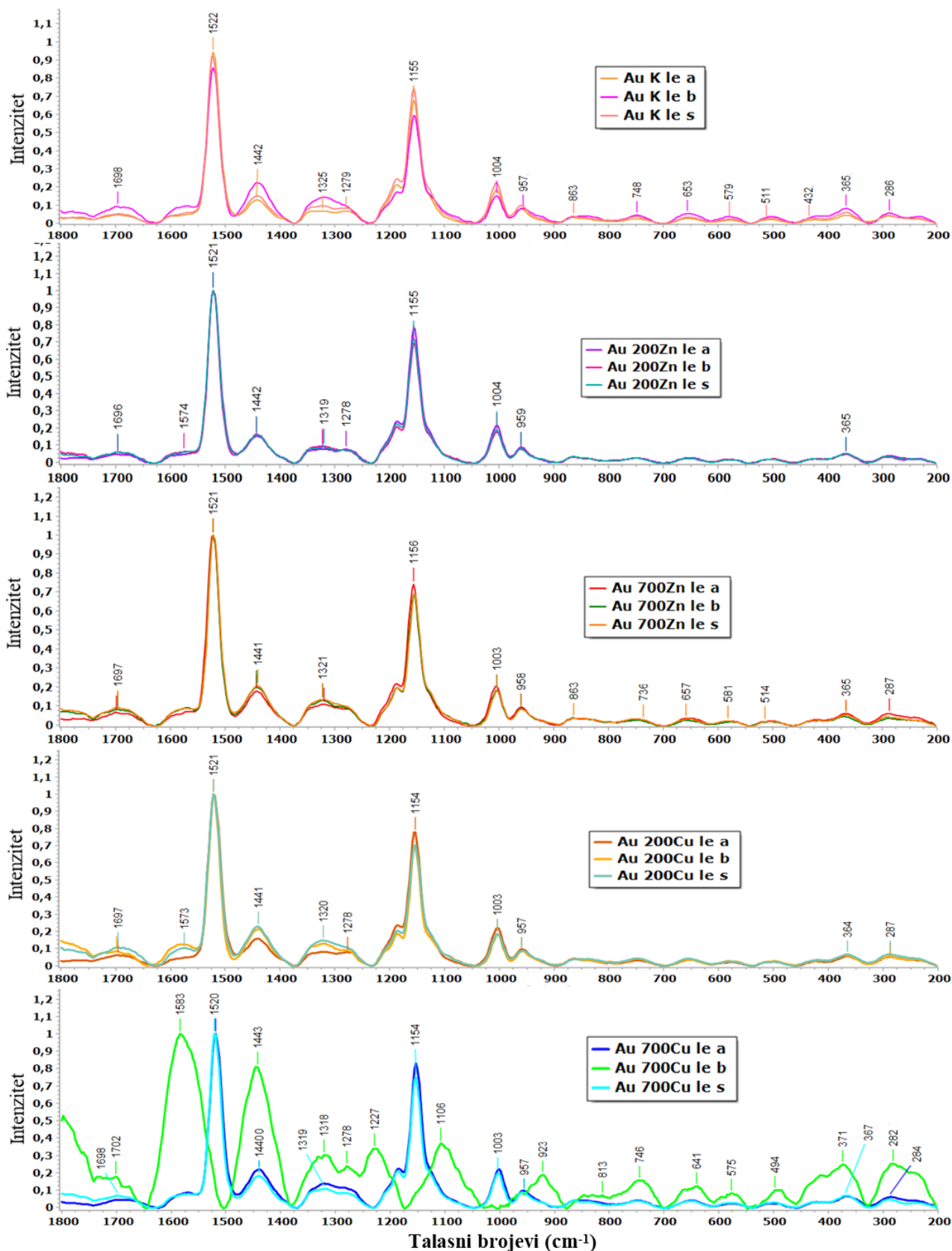
Rezultati klaster analize filoida biljaka iz eksperimenata sa dugotrajnim stresom prikazani su na Grafiku 28B. Kao i na dendrogramu na Grafiku 28A, uočavaju se dve glavne grupe (B1 i B2), veoma udaljene, gde jednu čine bazalno pozicionirani filoidi biljaka gajenih na podlozi sa 700  $\mu\text{M}$  Cu-acetatom (B2), dok se u okviru druge nalaze relativno bliski klasteri različitog stepena hijerarhije.

S obzirom da su najbitnije promene u poziciji i intenzitetu Ramanovih spektara filoida *A. undulatum* uočene kod bazalnih filoida, urađena je analiza glavnih komponenti koje doprinose razdvajanju ovih filoida kod biljaka poreklom iz oba tipa eksperimenata sa različitim dužinom stresa. Ovom analizom identifikovne su dve glavne komponente koje objašnjavaju 97,47% ukupne varijabilnosti (prva glavna komponenta opisuje 92,4%, a druga 5,07% varijabilnosti). Na Grafiku 29 prikazani su rezultati PC analize sa dve glavne ose. U odnosu na prvu osu (prvu glavnu komponentu), filoidi se razdvajaju na grupu sa bazalno pozicioniranim filoidima biljaka gajenih na podlogama sa 700  $\mu\text{M}$  Cu-acetatom u oba tipa eksperimenata (dugotrajni i kratkotrajni stres), i grupu sa filoidima svih ostalih tretmana. U odnosu na 2. osu, izdvaja se grupa A (Grafik 29), koju formiraju svi filoidi biljaka gajenih na podlogama sa povećanim koncentracijama metal-acetata kraći vremenski period, dok svi ostali filoidi čine grupu B.

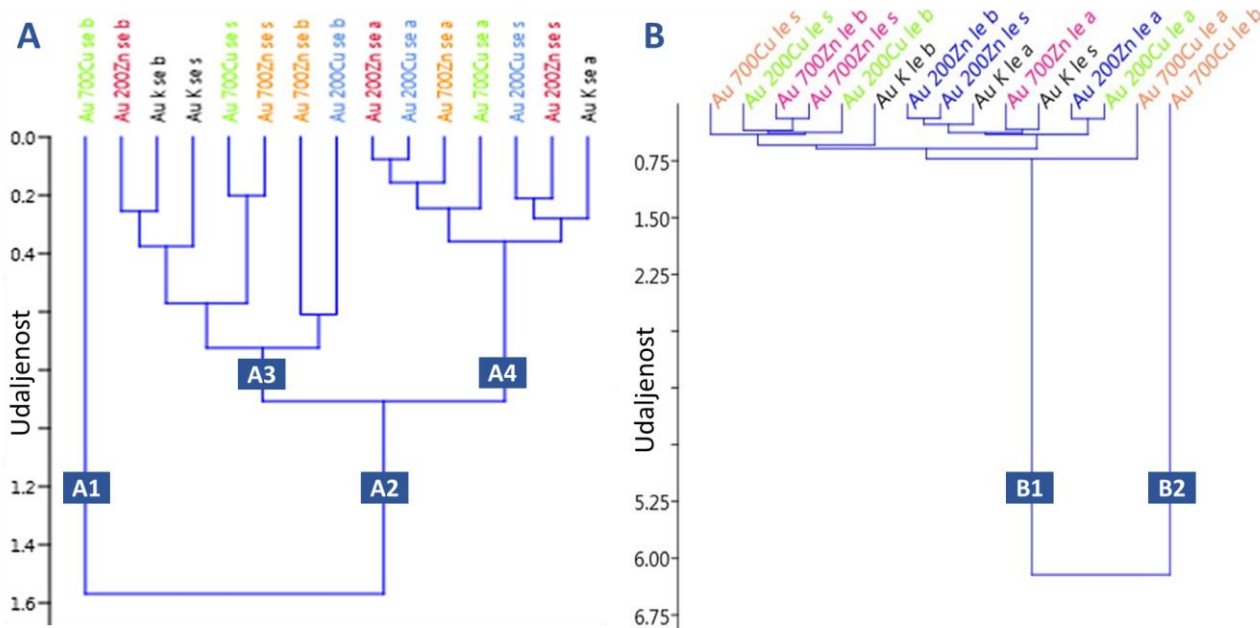




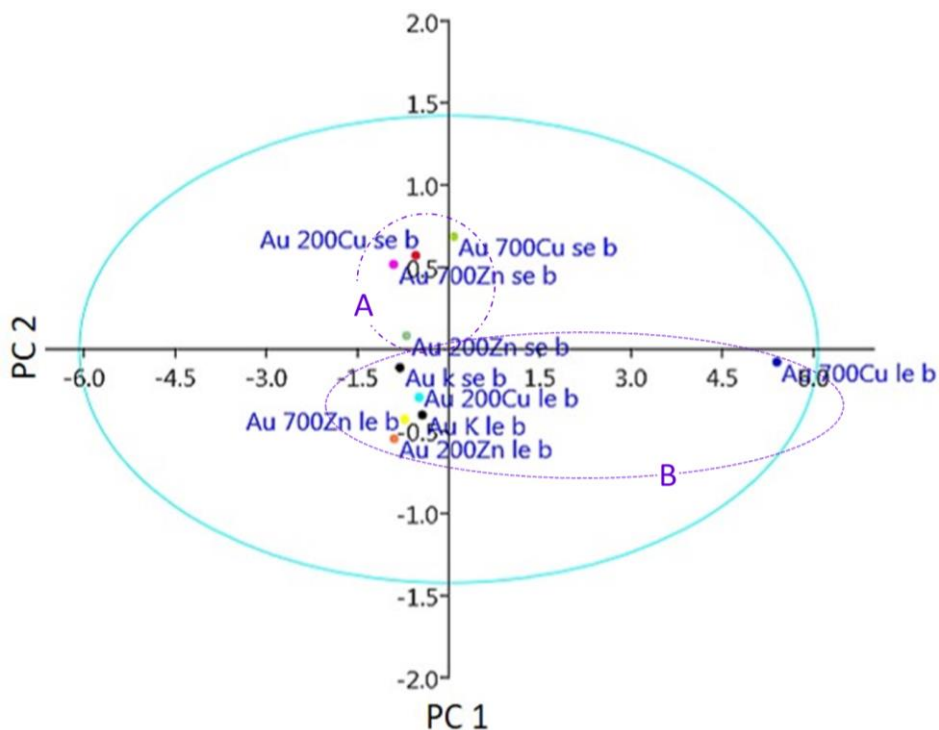
**Grafik 26.** Ramanovi spektri filoida biljaka *A. undulatum* gajenih u uslovima kratkotrajnog stresa na podlogama sa različitim koncentracijama Zn- i Cu-acetata. Uzorci su obeleženi skraćenicama koje sadrže skraćeno ime vrste mahovine (Au - *A. undulatum*), koncentraciju metala u podlozi u datom tretmanu (K - kontrola, 200 ili 700), vrstu metala kojim su biljke tretirane (Cu, Zn), naznaku tipa eksperimenta (se - kratkotrajni stres) i poziciju ispitivanih filoida duž primarnog modula kauloida (b - baza, s - sredina, a - apeks).



**Grafik 27.** Ramanovi spektri filoida biljaka *A. undulatum* gajenih u uslovima dugotrajnog stresa na podlogama sa različitim koncentracijama Zn- i Cu-acetata. Uzorci su obeleženi skraćenicama koje sadrže skraćeno ime vrste mahovine (Au - *A. undulatum*), koncentraciju metala u podlozi u datom tretmanu (K - kontrola, 200 ili 700), vrstu metala kojim su biljke tretirane (Cu, Zn), naznaku tipa eksperimenta (le - dugotrajni stres) i poziciju ispitivanih filoida duž primarnog modula kauloida (b - baza, s - sredina, a - apeks).

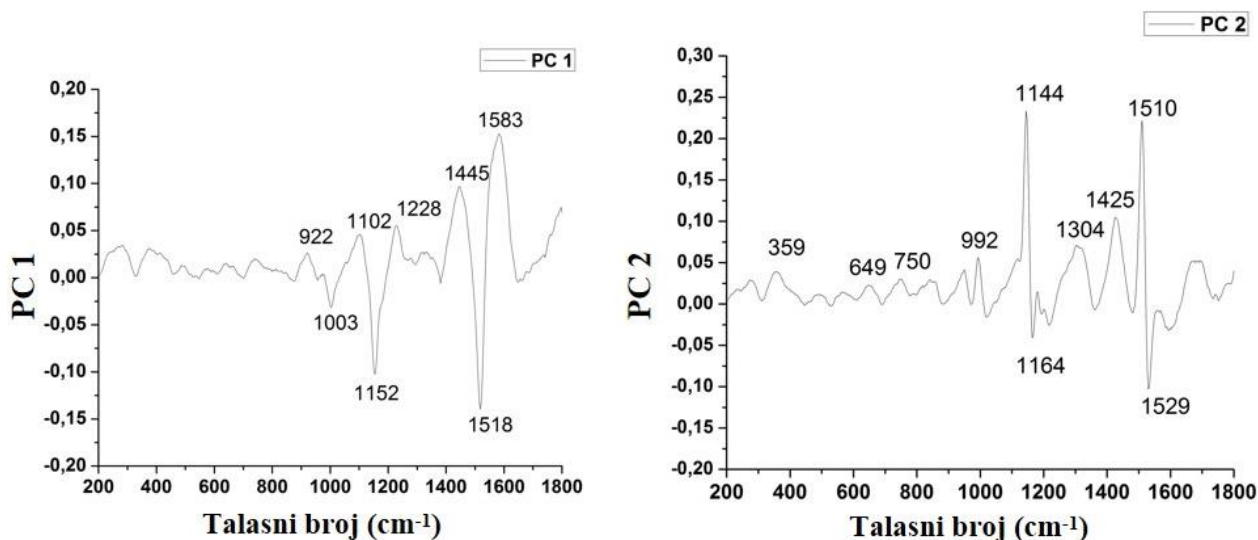


**Grafik 28.** Hijerarhijska klaster analiza filoida biljaka *A. undulatum* gajenih u uslovima kratkotrajnog (A) i dugotrajnog (B) stresa na podlogama sa različitim koncentracijama Zn- i Cu-acetata. Uzorci su obeleženi skraćenicama koje sadrže skraćeno ime vrste mahovine (Au - *A. undulatum*), koncentraciju metala u podlozi u datom tretmanu (K - kontrola, 200 ili 700), vrstu metala kojim su biljke tretirane (Cu, Zn), naznaku tipa eksperimenta (se - kratkotrajni stres; le - dugotrajni stres) i poziciju ispitivanih filoida duž primarnog modula kauloida (b - baza, s - sredina, a - apeks).



**Grafik 29.** PCA analiza Ramanovih spektara bazalnih filoida biljaka *A. undulatum* gajenih u uslovima dugotrajnog i kratkotrajnog stresa na podlogama sa različitim koncentracijama Zn- i Cu-acetata. Uzorci su obeleženi skraćenicama koje sadrže skraćeno ime vrste mahovine (Au - *A. undulatum*), koncentraciju metala u podlozi u datom tretmanu (K - kontrola, 200 ili 700), vrstu metala kojim su biljke tretirane (Cu, Zn), naznaku tipa eksperimenta (se - kratkotrajni stres; le - dugotrajni stres) i poziciju ispitivanog filoida duž primarnog modula kauloida (b - baza).

Projekcijama svih varijabli na prvoj glavnoj komponenti identifikuju se pikovi koji najviše doprinose razlikama između spektara bazalno pozicioniranih filoida biljaka gajenih na podlozi sa 700  $\mu\text{M}$  Cu-acetatom u eksperimentima sa dugotrajnim i kratkotrajnim stresom i spektara filoida biljaka iz svih ostalih tretmana (Grafik 30). Pikovi sa negativnijim ili pozitivnijim vrednostima imaju veći uticaj na razdvajanje među uzorcima. Pikovi sa najvećim pozitivnim vrednostima uočavaju se na 1445  $\text{cm}^{-1}$  i 1584  $\text{cm}^{-1}$ , dok su oni sa najvećim negativnim vrednostima na pozicijama 1152  $\text{cm}^{-1}$  i 1518  $\text{cm}^{-1}$ . Projekcije na drugoj osi pokazuju najvažnije promenljive koje utiču na razlike između bazalno pozicioniranih filoida biljaka tretiranih povećanim koncentracijama metal-acetata u podlozi u uslovima kratkotrajnog stresa i svih ostalih bazalno pozicioniranih filoida. Pikovi sa najvećim uticajem na razdvajanje ovih grupa nalaze se na 1144  $\text{cm}^{-1}$ , 1510  $\text{cm}^{-1}$  i 1529  $\text{cm}^{-1}$ .



**Grafik 30.** Projekcije varijabli PC1 i PC2 komponenti za bazalno pozicionirane filoide biljaka *A. undulatum* gajenih u uslovima dugotrajnog i kratkotrajnog stresa na podlogama sa različitim koncentracijama Zn- i Cu-acetata.

***Hypnum cupressiforme*.** Na Ramanovim spektrima svih analiziranih filoida vrste *H. cupressiforme* iz eksperimenata sa kratkotrajnim stresom (Grafik 31) uočavaju se dva pika velikog intenziteta na oko 1520  $\text{cm}^{-1}$  i u regionu 1152-1156  $\text{cm}^{-1}$ . Pikovi srednjeg intenziteta uočavaju se na oko 1440  $\text{cm}^{-1}$  i na 1002  $\text{cm}^{-1}$  kod svih spektara, s tim što je u slučaju spektara bazalno pozicioniranih filoida biljaka gajenih na podlozi sa 700  $\mu\text{M}$  Cu-acetatom pik na poziciji 1440  $\text{cm}^{-1}$  znatno intenzivniji. Osim toga, drugi pik srednjeg intenziteta kod ovih uzoraka pomećen je ka većoj vrednosti talasnog broja (1009  $\text{cm}^{-1}$ ). Pored ovih, na oko 1315-1320  $\text{cm}^{-1}$  svih spektara filoida biljaka iz eksperimenta sa kratkotrajnim stresom uočava se pik široke osnove nastale preklapanjem pikova nižeg intenziteta u regionu od 1250 do 1330  $\text{cm}^{-1}$ . U intervalu 200-1000  $\text{cm}^{-1}$  i 1550  $\text{cm}^{-1}$ -1800  $\text{cm}^{-1}$  nalaze se pikovi niskog intenziteta koji su najizraženiji kod filoida bazalne pozicije biljaka gajenih na podlozi sa dodatim 700  $\mu\text{M}$  Cu-acetatom u uslovima kratkotrajnog stresa.

Ramanovi spektri filoida biljaka *H. cupressiforme* gajenih u uslovima dugotrajnog stresa prikazani su na Grafiku 32. U Ramanovim spektrima filoida biljaka *H. cupressiforme* iz eksperimenata sa dugotrajnim stresom najintenzivniji pikovi uočavaju se na oko 1520  $\text{cm}^{-1}$  i 1152-1155  $\text{cm}^{-1}$  kod svih, osim kod spektara bazalno pozicioniranih filoida mahovina gajenih na podlogama sa 700  $\mu\text{M}$  Cu-acetatom. Kod njih ovi pikovi u potpunosti izostaju, a pikovi najvećeg intenziteta uočavaju se na 1102  $\text{cm}^{-1}$ , 1317  $\text{cm}^{-1}$ , 1442  $\text{cm}^{-1}$  i 1569  $\text{cm}^{-1}$ . Poslednja tri pika relativno velikog intenziteta prisutna su i u spektru bazalnog filoida biljaka *H. cupressiforme* tretiranih 200  $\mu\text{M}$  Cu-acetatom u uslovima dugotrajnog stresa, dok su kod svih drugih spektara znatno nižeg

intenziteta i manje naglašeni. Kod svih spektara uočava se pik srednjeg intenziteta na poziciji oko  $1004\text{ cm}^{-1}$ , i pikovi niskog intenziteta karakteristični za regione  $200\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$  i  $1550\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ , koji su znatno izraženiji kod bazalnih filoida biljaka tretiranih  $200\text{-}$  i  $700\text{ }\mu\text{M}$  Cu-acetatom i po intenzitetu odgovaraju pikovima srednjeg intenziteta ostalih spektara.

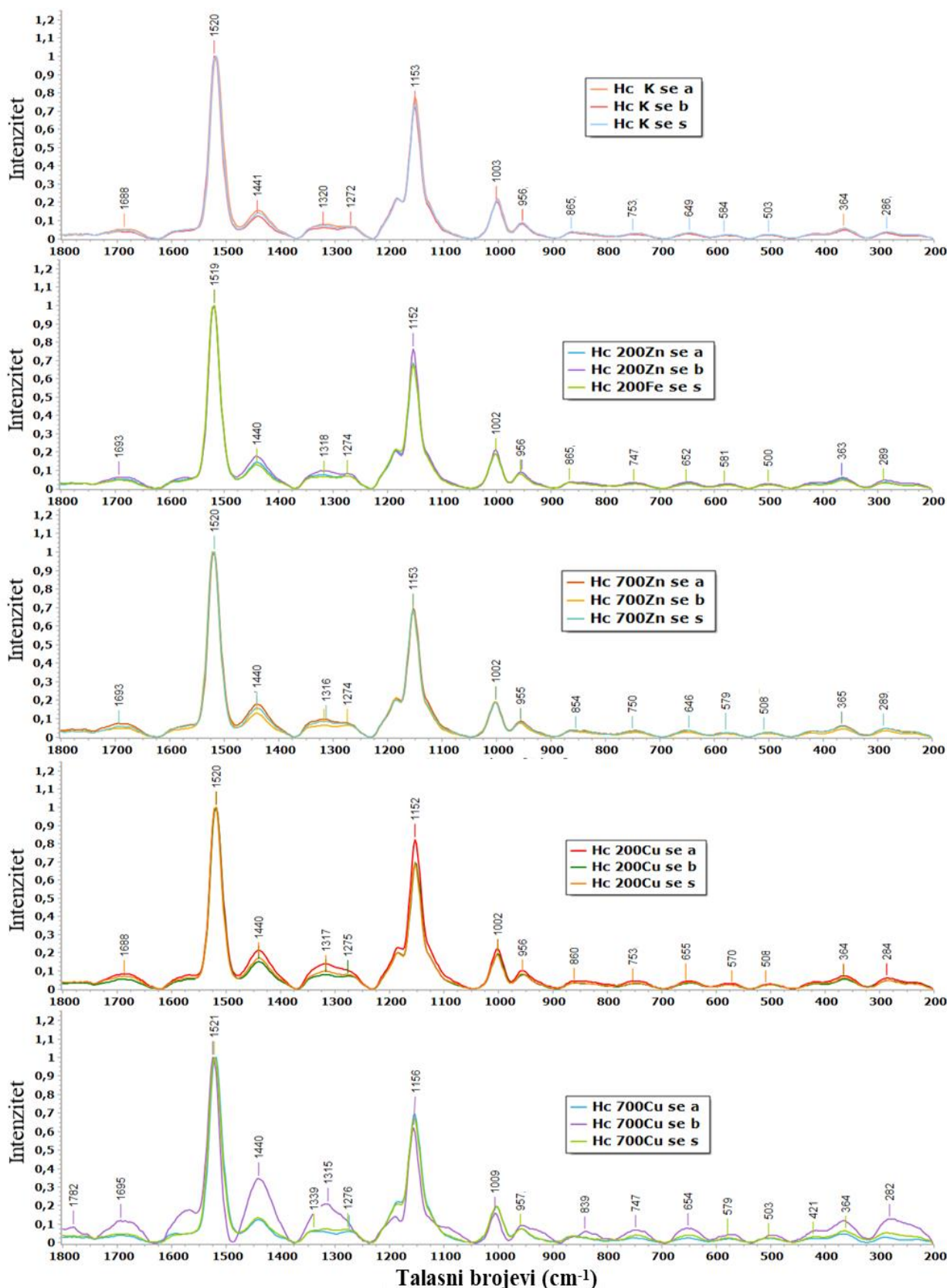
Rezultati klaster analize Ramanovih spektara filoida biljaka gajenih u uslovima kratkotrajnog stresa prikazani su na Grafiku 33A. Na dendogramu se uočavaju dve jasno odvojene grupe (A1 i A2), od kojih A1 sadrži samo bazalno pozicionirane filoide biljaka tretiranih  $700\text{ }\mu\text{M}$  Cu-acetatom, dok su u okviru značajno udaljene A2 grupe preostali filoidi raspoređeni u podklasterne različite hijerarhije. Na dendogramu prikazanom na Grafiku 33B, jasno se izdvajaju dva vrlo udaljena klastera (B1 i B2), gde B1 čine bazalno pozicionirani filoidi biljaka gajenih na podlozi sa  $700\text{ }\mu\text{M}$  Cu-acetatom, dok se u B2 izdvajaju dva međusobno takođe značajno udaljena podklastera (B3 i B4). U okviru B4 podklastera nalaze se bazalno pozicionirani filoidi biljaka tretiranih  $200\text{ }\mu\text{M}$  Cu-acetatom, dok B3 podklaster čine hijerarhijski organizovani podklasteri sa preostalim filoidima, koji se nalaze na relativno maloj udaljenosti

PC analizom bazalnih filoida biljaka *H. cupressiforme* iz eksperimenata sa kratkotrajnim i dugotrajnim stresom identifikovane su dve glavne komponente koje objašnjavaju  $98,24\%$  varijabilnosti između filoida (Grafik 34). Prva glavna komponenta opisuje  $92,80\%$  uočenih razlika, a druga glavna komponenta  $5,44\%$ . U odnosu na PC1, izdvaja se grupa B koja obuhvata filoide biljaka gajenih na podlogama sa Cu-acetatom u uslovima dugotrajnog stresa, na samoj osi su filoidi biljaka tretiranih  $700\text{ }\mu\text{M}$  Cu-acetatom iz eksperimenata sa kratkotrajnim stresom, dok svi ostali filoidi čine grupu A. Na osnovu druge glavne komponente razdvajaju se filoidi biljaka tretiranih Cu-acetatom ( $200\text{ }\mu\text{M}$  u uslovima dugotrajnog stresa i  $700\text{ }\mu\text{M}$  u uslovima kratkotrajnog stresa), od svih ostalih filoida.

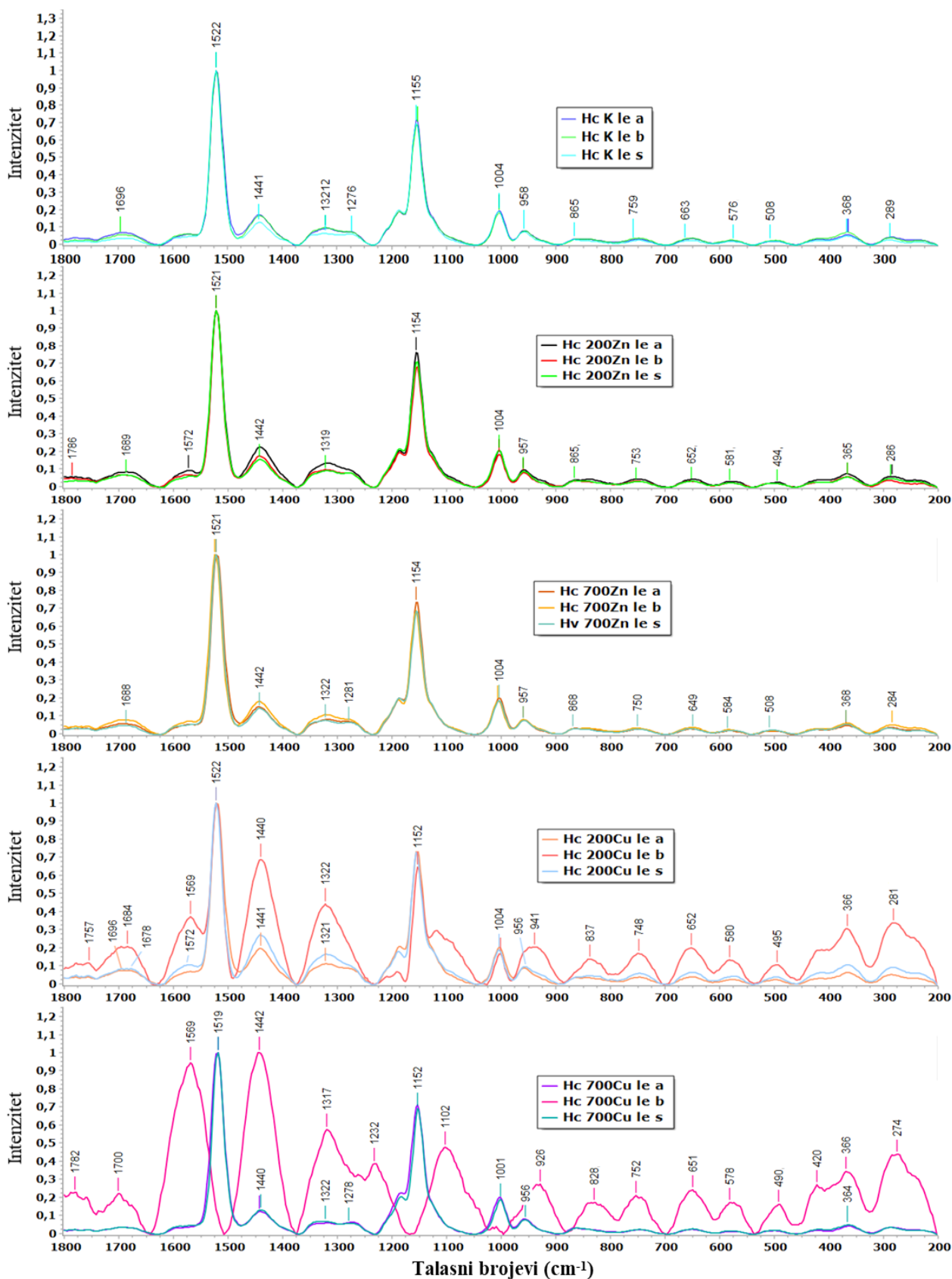
Najbitnije varijable koje doprinose razdvajanju bazalno pozicioniranih filoida na grupe na osnovu prve glavne komponente uočavaju se na osnovu projekcija na PC1 (Grafik 35A). Pikovi sa najvećim pozitivnim doprinosom nalaze se na  $1442\text{ cm}^{-1}$  i  $1569\text{ cm}^{-1}$ , dok su pikovi sa najvećim negativnim doprinosom na poziciji  $1155\text{ cm}^{-1}$  i  $1518\text{ cm}^{-1}$ . Na razdvajanje po prvoj PC osi u manjoj meri doprinose i pikovi na  $1099\text{ cm}^{-1}$  i  $1316\text{ cm}^{-1}$ . Pikovi sa najvećim pozitivnim uticajem na razdvajanje u odnosu na drugu PC osu (Grafik 35B) nalaze se na  $1521\text{ cm}^{-1}$  (pik najvećeg intenziteta) i  $1152\text{ cm}^{-1}$ . Najintenzivniji pikovi sa negativnim doprinosom nalaze se na pozicijama  $1231\text{ cm}^{-1}$  i  $1487\text{ cm}^{-1}$  (manjeg intenziteta). Na razdvajanje po obe ose mali uticaj imao je pik zabeležen na  $272\text{ cm}^{-1}$ .

S obzirom na to da su najveće promene u Ramanovim spektrima detektovane u grupi biljaka iz eksperimenata sa dugotrajnim stresom, spektri filoida obe vrste mahovina na istim pozicijama duž longitudinalne ose kauloida iz ove grupe eksperimenata upoređeni su na Grafiku 36. Spektri apikalno (Grafik 36A) ili središnje pozicioniranih filoida (Grafik 36B) *H. cupressiforme* i *A. undulatum*, bez obzira na vrstu i koncentraciju metala u podlozi, sadrže pikove na sličnim talasnim brojevima. S druge strane, među spektrima bazalno pozicioniranih filoida dve vrste uočavaju se razlike povezane sa vrstom i koncentracijom metala u podlozi (Grafik 36C). Kod obe vrste najintenzivnije promene u Ramanovim spektrima uočavaju se kod bazalno pozicioniranih filoida biljaka gajenih na podlozi sa  $200\text{ }\mu\text{M}$  (u eksperimentima sa dugotrajnim stresom) i  $700\text{ }\mu\text{M}$  (oba tipa eksperimenata) Cu-acetatom.

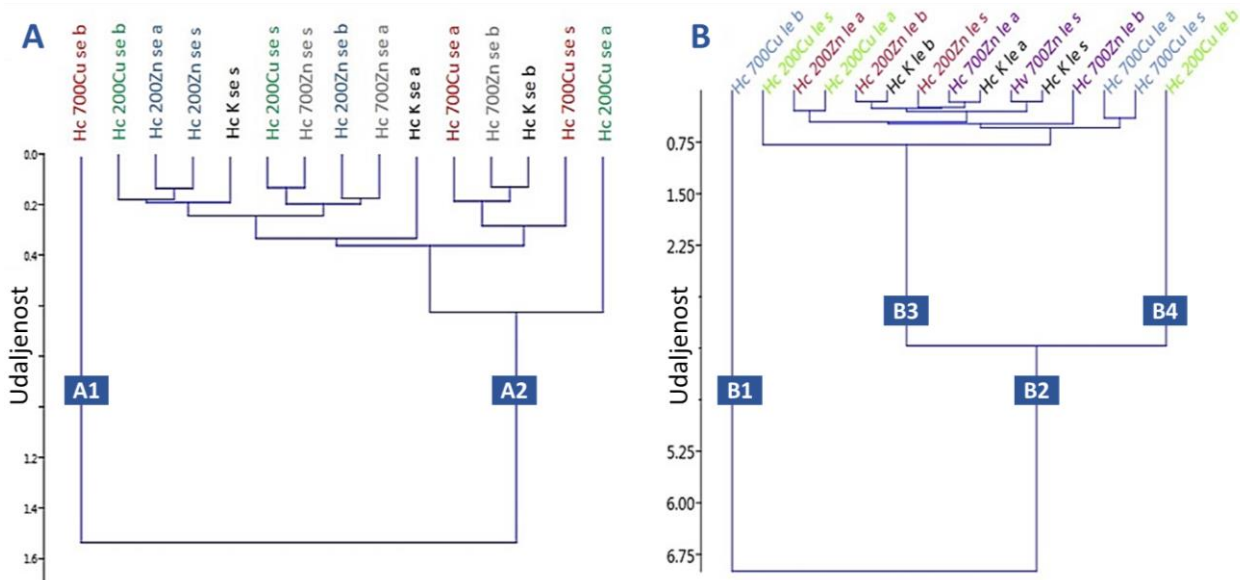




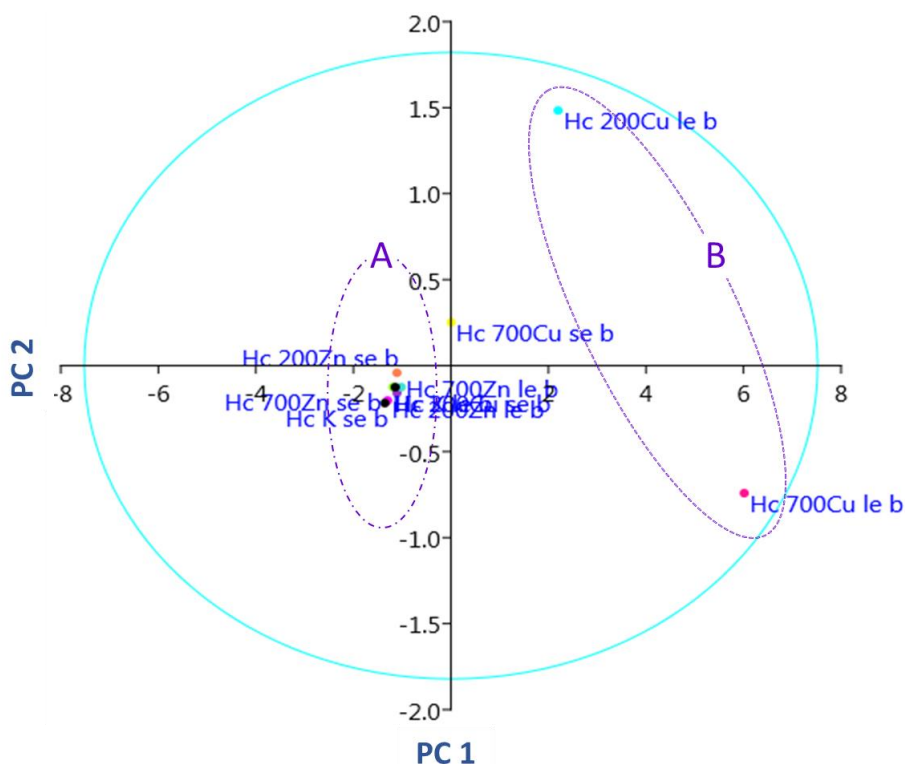
**Grafik 31.** Ramanovi spektri filoida biljaka *H. cupressiforme* gajenih u uslovima kratkotrajnog stresa na podlogama sa različitim koncentracijama Zn- i Cu-acetata. Uzorci su obeleženi skraćenicama koje sadrže skraćeno ime vrste mahovine (*Hc* - *H. cupressiforme*), koncentraciju metala u podlozi u datom tretmanu (K - kontrola, 200 ili 700), vrstu metala kojim su biljke tretirane (Cu, Zn), naznaku tipa eksperimenta (se - kratkotrajni stres) i poziciju ispitivanog filoida duž primarnog modula kauloida (b - baza, s - sredina, a - apeks).



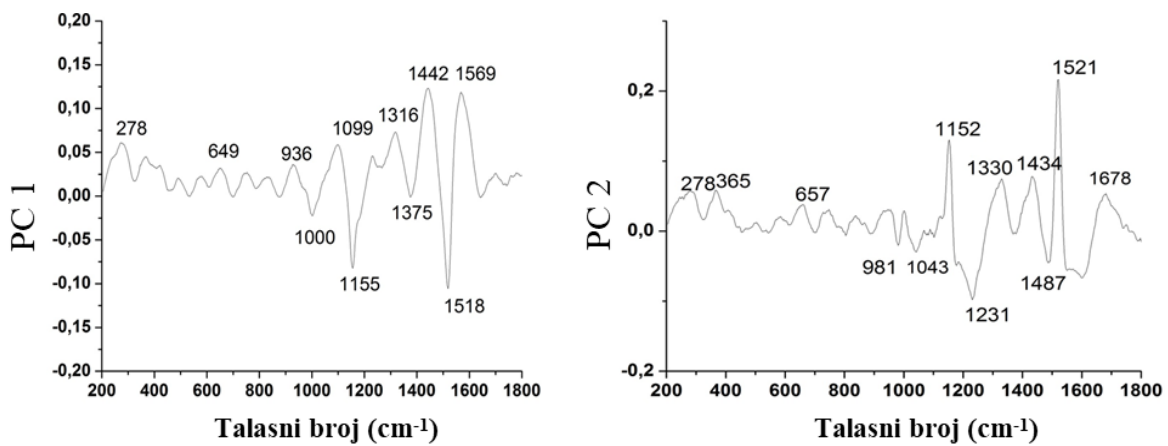
**Grafik 32.** Ramanovi spektri filoida biljaka *H. cupressiforme* gajenih u uslovima dugotrajnog stresa na podlogama sa različitim koncentracijama Zn- i Cu-acetata. Uzorci su obeleženi skraćenicama koje sadrže skraćeno ime vrste mahovine (Hc - *H. cupressiforme*), koncentraciju metala u podlozi u datom tretmanu (K - kontrola, 200 ili 700), vrstu metala kojim su biljke tretirane (Cu, Zn), naznaku tipa eksperimenta (le - dugotrajni stres) i poziciju ispitivanog filoida duž primarnog modula kauloida (b - baza, s - sredina, a- apeks).



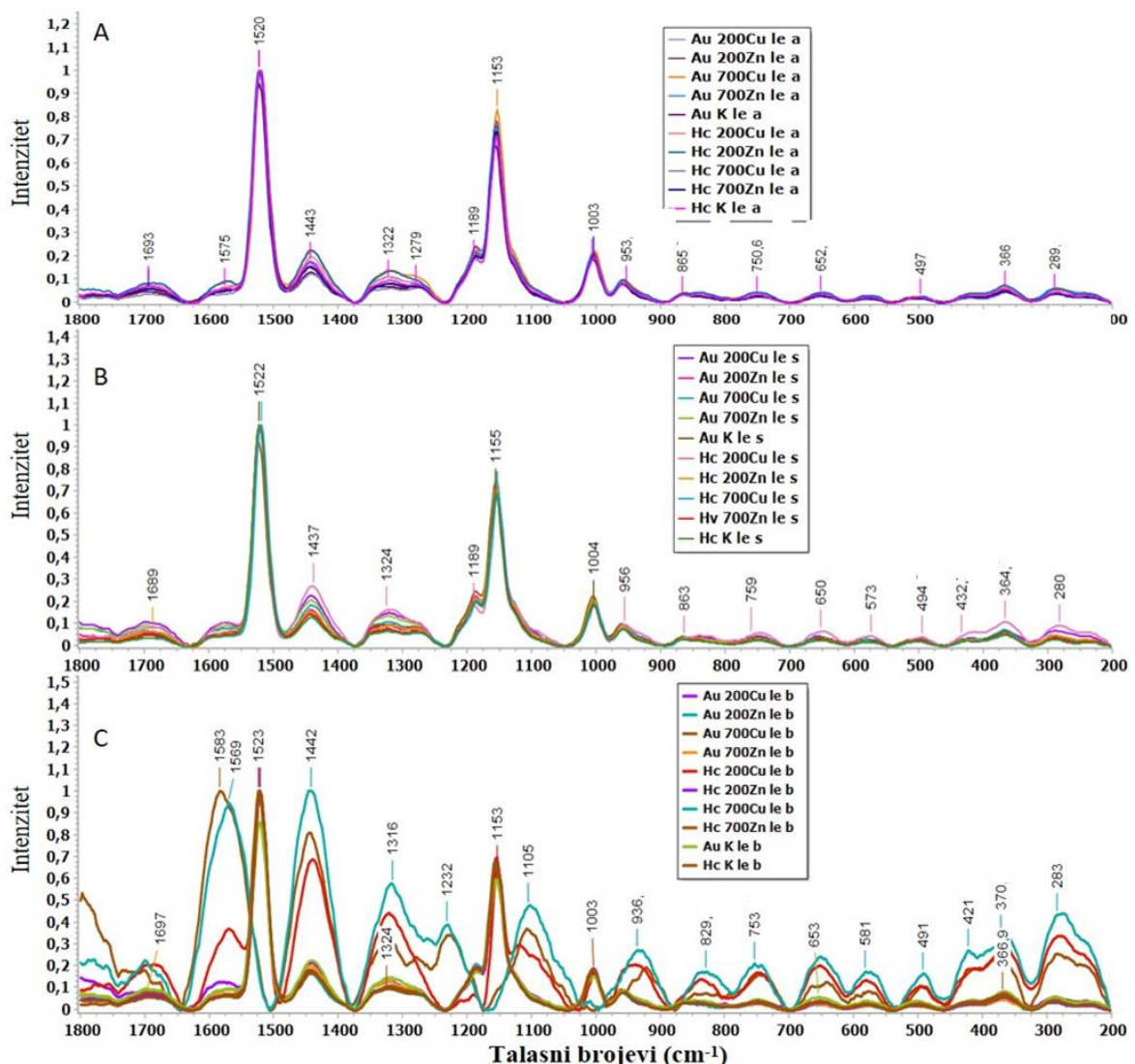
**Grafik 33.** Hijerarhijska klaster analiza filoida biljaka *H. cupressiforme* gajenih u uslovima kratkotrajnog (A) i dugotrajnog (B) stresa na podlogama sa različitim koncentracijama Zn- i Cu-acetata. Uzorci su obeleženi skraćenicama koje sadrže skraćeno ime vrste mahovine (Hc - *H. cupressiforme*), koncentraciju metala u podlozi u datom tretmanu (K - kontrola, 200 ili 700), vrstu metala kojim su biljke tretirane (Cu, Zn), naznaku tipa eksperimenta (se - kratkotrajni stres; le - dugotrajni stres) i poziciju ispitivanog filoida duž primarnog modula kauloida (b - baza, s - sredina, a - apeks).



**Grafik 34.** PCA analiza Ramanovih spektara bazalno pozicioniranih filoida biljaka *H. cupressiforme* gajenih u uslovima dugotrajnog i kratkotrajnog stresa na podlogama sa različitim koncentracijama Zn- i Cu-acetata. Uzorci su obeleženi skraćenicama koje sadrže skraćeno ime vrste mahovine (Hc – *H. cupressiforme*), koncentraciju metala u podlozi u datom tretmanu (K - kontrola, 200 ili 700), vrstu metala kojim su biljke tretirane (Cu, Zn), naznaku tipa eksperimenta (se - kratkotrajni stres; le - dugotrajni stres) i poziciju ispitivanog filoida duž primarnog modula kauloida (b - baza).



**Grafik 35.** Projekcije varijabli PC1 i PC2 komponenti za bazalno pozicionirane filoide biljaka *H. cupressiforme* gajenih u uslovima dugotrajnog i kratkotrajnog stresa na podlogama sa različitim koncentracijama Zn- i Cu-acetata.



**Grafik 36.** Poređenje Ramanovih spektara filoida na istim pozicijama duž logitudinalne ose kauloida *H. cupressiforme* i *A. undulatum* gajenih u uslovima dugotrajnog stresa. A - filoidi apikalne pozicije; B – filoidi središnje pozicije; C - filoidi bazalne pozicije. Uzorci su obeleženi skraćenicama koje sadrže skraćeno ime vrste mahovine (Au - *A. undulatum*, Hc - *H. cupressiforme*), koncentraciju metala u podlozi u datom tretmanu (K - kontrola, 200 ili 700), vrstu metala kojim su biljke tretirane (Cu, Zn), naznaku tipa eksperimenta (se - kratkotrajni stres; le - dugotrajni stres) i poziciju ispitivanih filoida duž primarnog modula kauloida (b - baza, s - sredina, a - apeks).



## 5. DISKUSIJA

### 5.1. Uticaj Zn-acetata, Cu-acetata i Cd-acetata na morfogenezu mahovina *H. cupressiforme* i *A. undulatum* u kulturi *in vitro*

Inhibicija rasta, odnosno redukcija prinosa biomase, predstavlja glavni odgovor biljaka na nivou celog organizma na toksično dejstvo metala. Ovakvi efekti metala mogu se objasniti inhibicijom ćelijskih deoba, kao i inhibicijom izduživanja ćelija (Malecka *et al.*, 2012). Pleurokarpna mahovina *H. cupressiforme* i akrokarpna mahovina *A. undulatum* ispoljile su značajne razlike u morfogenetskom odgovoru na toksične metale čiji efekat je ispitivan u ovom istraživanju. Zbog toga što su svi eksperimenti i umnožavanje biljaka vršeni u kontrolisanim akseničnim uslovima, uočene razlike ne mogu se pripisati potencijalnim sinergističkim ili antagonističkim uticajima usled variranja biotičkih ili drugih abiotičkih faktora sredine.

Prema Sassmann *et al.* (2015a), tolerancijom na toksične metale kod mahovina koje su gajene pet nedelja na čvrstoj podlozi sa povećanom koncentracijom ispitivanih elemenata, može se smatrati sposobnost biljaka da prežive i produkuju nove izdanke ili sekundarnu protonemu. U svim grupama tretmana kod *H. cupressiforme* i *A. undulatum* stopa preživljavanja bila je 100%, iako su u zavisnosti od tipa tretmana bili uočljivi različiti stepeni oštećenja biljaka. S druge strane, nijedna od vrsta u ovom istraživanju nije ispoljila merljiv protonemalni rast (u pogledu prečnika protoneme) nakon izlaganja podlogama sa dodatkom Zn-, Cu- ili Cd-acetata. U drugim istraživanjima vršenim u kontrolisanim laboratorijskim uslovima gde je ispitivan efekat različitih stresora na rastenje mahovina, uočena je promena u razviću gametofita u vidu prelaska iz razvića u kome dominira produkcija gametofora na razviće gde preovladava protonemalni rast (Sassmann *et al.*, 2010, 2015a; Ćosić *et al.*, 2020a, b). S druge strane, kod biljaka *A. undulatum* izlaganih povećanim koncentracijama soli cinka i bakra u uslovima *in vitro* ovakav efekat nije uočen (Sabovljević *et al.*, 2018a).

Jedan od potencijalnih razloga odsustva pojave merljive protoneme u uslovima ovog istraživanja može biti smanjena efektivna koncentracija soli u podlozi. Pokazano je da u prisustvu fosfatnih anjona može doći do precipitacije jona toksičnih metala (Sassmann *et al.*, 2015a). Isti autori zaključili su i da se toksičnost pojedinačnih metala kod različitih mahovina ispoljava drugačije u zavisnosti i od vrste anjona koji su istovremeno prisutni u podlozi na kojoj biljke rastu. U ovoj disertaciji, ispitivan je efekat toksičnih metala vezanih isključivo za acetatni anjon, za koji se smatra da nema negativnih efekata na fiziološke parametre biljaka, te uočene promene ne mogu biti posledica primene različitih anjona (Couto *et al.*, 2004). S druge strane, u prisustvu acetatnog anjona može doći do acetilacije homogalakturonana, što može uzrokovati smanjen afinitet ćelijskih zidova mahovina za vezivanje katjona, a time i smanjenje efektivne koncentracije toksičnih metala kojoj su biljke izložene (Krzyszowska, 2011). U slučaju mahovina ispitivanih u ovoj disertaciji nema dokaza da je do ove pojave došlo nakon izlaganja podlogama sa dodatim metal-acetatima. Značajni negativni efekti metala na produkciju novih izdanaka kod *A. undulatum* i *H. cupressiforme* u pojedinim tretmanima ukazuju na to da su primenjene koncentracije soli sadržale dovoljno katjona koji bi dospeli do ćelija mahovina i doveli do promena u morfogenetskom razviću ovih biljaka. Nasuprot zaključku Sassmann *et al.* (2015a), da je favorizovani rast protoneme u uslovima stresa metalima univerzalna karakteristika briofita, rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da je u pitanju svojstvo koje je specifično za vrstu mahovine, ili da druge promenljive (uslovi sredine) takođe utiču na ovu pojavu. S obzirom na to da do razvića vidljive protoneme nije došlo ni u kontrolnim grupama biljaka, može se zaključiti da je usmeravanje razvića mahovina ka produkciji gametofora kod vrsta *H. cupressiforme* i *A. undulatum* rezultat drugačijih mehanizama u odnosu na one opisane u istraživanjima Sassmann *et al.* (2010, 2015a) i Ćosić *et al.* (2020a, b), ali i biologije i odabira vrsta.

U prisustvu toksičnih metala u podlozi *A. undulatum* je produkovao znatno manje novih izdanaka u poređenju sa *H. cupressiforme*, ispoljavajući najveće smanjenje već pri koncentraciji metala u podlozi od 200  $\mu\text{M}$ . Osim toga, kod vrste *A. undulatum*, najniže zabeležene vrednosti



indeksa multiplikacije dostignute su već nakon kratkotrajnog izlaganja podlogama sa dodatkom metal-acetata. Nasuprot ovome, kod *H. cupressiforme*, sa povećavanjem koncentracije, ali i trajanja izlaganja toksičnim metalima, došlo je do dodatne inhibicije produkcije novih izdanaka. Ovo ukazuje na veću osetljivost ispitivane akrokarpne vrste, u poređenju sa pleurokarpnom, na stres izazvan cinkom, bakrom i kadmijumom.

Istraživanje González & Pokrovsky (2014) u neakseničnim *ex situ* uslovima, pokazalo je da je kod više vrsta mahovina, uključujući *H. cupressiforme*, postojao koncentracioni limit adsorpcije metala, koji je specifičan za vrstu, a takođe zavisi i od tipa metala. Kod biljaka *P. patens* koje su rasle na čvrstoj podlozi sa toksičnim metalima u uslovima *in vitro*, pokazano je da nakon što je dostignuta specifična unutarćelijska koncentracija cinka i bakra, nije dolazilo do dodatnog usvajanja ova dva elementa (Sassmann *et al.*, 2015b). Dodatno, ovi autori su pokazali da koncentracije cinka i bakra u tkivima imaju značajan negativni uticaj na rastenje gametofora mahovina. Na osnovu ovoga, može se pretpostaviti da je u slučaju vrste *A. undulatum* u ovom istraživanju došlo do brzog zasićenja mesta za vezivanje metala u biljkama, zbog čega su najveće promene u vrednostima indeksa multiplikacije uočene već nakon kratkotrajnog izlaganja metal-acetatima i pri nižoj koncentraciji metala u podlozi, bez dodatnih značajnih promena sa produžavanjem vremena izlaganja ili povećanjem koncentracije metala. Ovakav efekat kod *A. undulatum* u slučaju različitih tretmana cinkom detektovali su i Sabovljević *et al.* (2018b).

S druge strane, postojanje unutarćelijskog koncentracionog limita opisanog od strane González & Pokrovsky (2014) i Sassmann *et al.* (2015b) ne bi u potpunosti moglo da objasni dodatno smanjenje broja novoformiranih izdanaka koje je uočeno kod *H. cupressiforme* u uslovima dugotrajnog izlaganja metalima. Kod ove pleurokarpne mahovine iz porodice Hypnaceae, dominantan mehanizam usvajanja i transporta supstanci je ektohidričan. S druge strane, kod *A. undulatum* iz porodice Polytrichaceae, smatra se da je transport dodatno potpomognut prisustvom hidroida u izdanku. Gajenjem gametofora obe vrste u konstantnim i potpuno hidratizanim uslovima omogućeni su uslovi za efikasan ektohidrični transport kod obe vrste. Stoga, kod akrokarpne mahovine u ovom istraživanju, prenos vode i rastvorenih supstanci iz okruženja do vršnih delova gametofora mogao bi biti efikasniji u poređenju sa *H. cupressiforme* i uzrokovati brže zasićenje katjon vezujućih mesta. Sidhu & Brown (1996) su pokazali da kada su gametofori pleurokarpne vrste *R. squarrosus* samo bazalnim delom bili uronjeni u rastvore koji sadrže metale u toku 21 dana, postojala je negativna linearna korelacija između izduživanja biljaka i dužine izlaganja gametofora metalima. Odgovor uočen u ovom istraživanju kod *H. cupressiforme*, koji je takođe bio pozicioniran uspravno i u kontaktu sa medijumom samo bazalnim delom, uporediv je sa rezultatima koje su dobili navedeni autori. S druge strane, kada su celi gametofori *R. squarrosus* prvo bili uronjeni u vodeni rastvor metala 20 minuta, konačne vrednosti izduživanja izdanaka dostignute su već petog dana, najverovatnije usled brzog zasićenja dostupnih katjon vezujućih mesta metalima iz vodenog rastvora. Imajući u vidu neznatno različite indekse multiplikacije *A. undulatum* pri nižoj i višoj koncentraciji metala u medijumu, kao i kada je gajen u uslovima kratkotrajnog i dugotrajnog stresa metalima, može se pretpostaviti da su ovi rezultati posledica dodatnog, endohidričnog, transporta koji uslovljava brže zasićenje vezujućih mesta nego u slučaju *H. cupressiforme* (Stanković *et al.*, 2021).

Kod dve mahovine koje su ispitivane u ovom istraživanju, indeksi multiplikacije opadali su proporcionalno jedan drugom kada su biljke izlagane bakru ili cinku. Međutim, *A. undulatum* je pokazao značajno veću otpornost prema kadmijumu u pogledu produkcije novih izdanaka u poređenju sa *H. cupressiforme*. Kadmijum, koji se smatra neesencijalnim elementom za biljake, pri visokim koncentracijama je obično toksičniji u odnosu na fiziološki značajne mikroelemente, čija je homeostaza unutar ćelija precizno regulisana (Küpper & Andersen, 2016). Imajući u vidu vrednosti indeksa multiplikacije na nivou svih eksperimenata, pri najvišoj primenjenoj koncentraciji metala u medijumu, potvrđeno je da je kadmijum najtoksičniji kada se poredi sa bakrom i cinkom. U skladu sa prethodnim zaključcima o ispitivanim vrstama, veći katjon-vezujući potencijal vrste *H. cupressiforme* može biti potencijalni razlog za veću osetljivost ove vrste na toksične efekte

kadmijuma. Dodatno, *A. undulatum* može posedovati efikasnije mehanizme detoksifikacije kadmijuma u odnosu na *H. cupressiforme*. Istraživanje Sabovljević *et al.* (2018b) pokazalo je da ova akrokarpna vrsta ne vezuje jone cinka iz medijuma, te imajući u vidu hemijsku sličnost cinka sa kadmijumom, jedan od razloga veće otpornosti *A. undulatum* na kadmijum mogla bi biti i smanjena sposobnost vezivanja ovog katjona. Parrotta *et al.* (2015) navode da kada je u pitanju odgovor biljaka na povećane koncentracije kadmijuma, čak i srodne biljne vrste mogu koristiti značajno različite mehanizme i ispoljavati različite stepene otpornosti. Kod mahovina, dominantna mesta vezivanja metala predstavljaju katjon-izmenjivačka mesta u ćelijskim zidovima, koji su istovremeno i jedno od najznačajnijih mesta za detoksifikaciju i akumulaciju metala kod ove grupe briofita (Basile *et al.*, 2012; Parrotta *et al.*, 2015). Specijalizacija *A. undulatum* ka endohidričnosti uključuje stvaranje debelih troslojnih longitudinalnih zidova u hidroidima, koji u toku sazrevanja gube protoplast i plazmodezme preko kojih su povezani sa susednim ćelijama korteksa. Ovi zidovi takođe postaju inkrustrirani polifenolima sličnim ligninu, što u određenoj meri dodatno pospešuje vertikalni umesto lateralnog transporta vode (Scheirer, 1980; Ligrone *et al.*, 2000; Glime, 2017). Lavid *et al.* (2001) su otkrili da do akumulacije kadmijuma u dve vodene vaskularne biljke dolazi pretežno u ćelijama koje sadržale visoke nivoe polifenola, kao i da su vrste koje se karakterišu konstitutivno visokim nivoima ovih supstanci otpornije prema stresu kadmijumom. Kod vrste *H. cupressiforme* transport supstanci kroz spoljašnje delove gametofora mogao bi dovesti do veće akumulacije ovog metala u ćelijama epidermisa i korteksa. Pošto se začeci novih grana kod gametofora mahovina nalaze u spoljašnjim slojevima kauloida, bazalno u odnosu na početak filoida istog segmenta izdanka, veća koncentracija kadmijuma u ovim slojevima kod *H. cupressiforme* mogla bi biti uzrok većeg pada u produkciji izdanaka kod ove vrste (Coudert *et al.*, 2015). Ovo je u skladu sa rezultatima koje su Sabovljević *et al.* (2018b) dobili ispitujući obrasce vezivanja cinka kod različitih vrsta mahovina. Ovi autori su pokazali da kada je *A. undulatum* u uslovima *in vitro* izlagan vodenim rastvorima cinka ili gajen na čvrstom medijumu obogaćenim ovim metalom, na površini ove mahovine gotovo da nisu detektovani joni ispitivanog metala. Na isti način, koristeći boje koje se specifično vezuju za cink, pokazano je da se na čitavoj spoljašnjoj površini gametofora *H. cupressiforme* nalazi značajno veća količina cinka. Imajući u vidu hemijsku sličnost kadmijuma i cinka, cink bi istim mehanizmom koji je prethodno opisan za kadmijum, mogao uzrokovati razlike u indeksima multiplikacije uočene između ispitivanih vrsta mahovina u ovom istraživanju.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju da faktori kao što su vrsta mahovine, vreme izlaganja metalima i primenjena koncentracija značajno utiču na to kakav će biti finalni odgovor i koji stepen toksičnosti će ispoljiti određeni metal na ispitivane parametre morfogeneze. Ovi rezultati u skladu sa rezultatima koje su dobili Sidhu & Brown (1996) kod vrste *R. squarrosus*, koji su takođe potvrdili da vrsta metala i koncentracija, kao i vrsta metala i način izlaganja biljaka metalima ispoljavaju značajne kombinovane efekte na rastenje gametofora ispitivane vrste.

## **5.2. Uticaj Zn-acetata, Cu-acetata i Cd-acetata na koncentraciju fotosintetičkih pigmenata kod mahovina *H. cupressiforme* i *A. undulatum* u kulturi *in vitro***

Jedan od najčešće dokumentovanih efekata toksičnog dejstva metala na ćelijskom nivou kod biljaka je narušavanje strukture i funkcije fotosintetičkog aparata. Stoga, praćenje koncentracije fotosintetičkih pigmenata može predstavljati praktičan metod za procenu uticaja metala na biljke i njihovo razviće (Saxena & Saiful-Arfeen, 2009; Houry *et al.*, 2020). Osim toga, odnos koncentracija hlorofila *a* i *b* smatra se značajnim parametrom za tumačenje fiziološkog stanja organizma usled narušavanja uslova sredine, pri čemu smanjenje ovog odnosa često ukazuje na stresogeni efekat izazvan uslovima u kojima se biljka razvija usled brže hidrolize hlorofila *a* u odnosu na hlorofil *b* (Manios *et al.*, 2003).

U ovom istraživanju kod biljaka koje su rasle na podlogama sa dodatkom 200  $\mu\text{M}$  Zn- ili Cd-acetata koncentracije hlorofila nisu se značajno razlikovale od onih izmerenih u odgovarajućim kontrolnim grupama. Ovakvi rezultati ukazuju na to da količina datih metala u ćelijama mahovina nije značajnije uticala na ove pigmente. Sličan efekat 200  $\mu\text{M}$  Zn- i Cd-acetata na koncentraciju hlorofila kod *H. cuperssiforme* i *A. undulatum* može biti posledica hemijske i fizičke sličnosti i

deljenih mehanizama usvajanja i transporta ova dva metala, kao što se navodi i kod drugih autora na drugim vrstama (Das *et al.*, 1997; Küpper & Andresen, 2016). Osim toga, oba elementa spadaju u redoks-inertne metale, koji dominantno uzrokuju strukturne promene u ćelijama mahovina (Küpper & Andresen, 2016). Pri istoj koncentraciji, bakar je doveo do značajnog smanjenja koncentracije hlorofila *a* i *b* kod obe ispitivane vrste. Jedan od mehanizma preko koga bi toksični metali mogli ispoljiti negativan uticaj na koncentraciju hlorofila je supstitucija magnezijuma u molekulu hlorofila, čime se menja njegova stabilnost, narušava veza sa aksijalnim ligandima i posledično dolazi do gubitka čitavih fotosistema (Küpper *et al.*, 2002; Küpper & Andresen, 2016). Osim toga, metali mogu interagovati sa drugim komponentama koje imaju ulogu u biosintezi fotosintetičkih pigmenata (Zengin & Kirbag, 2007). Küpper *et al.* (1996) su zaključili da je negativan uticaj metala na fotosintetički sistem direktno u vezi sa njihovim afinitetom za vezivanje za centralni deo molekula hlorofila tj. njegov porfirinski prsten. Prema ovim autorima, kod vaskularnih biljaka i zelenih algi, bakar ima najveći afinitet za supstituciju magnezijuma u tetrapirolovom prstenu, kod kadmijuma je on manje izražen, dok je afinitet cinka najniži. Stoga, izražena tendencija  $\text{Cu}^{2+}$  za vezivanje za porfirinsko jezgro hlorofila, čak i pri niskim koncentracijama, mogla bi biti objašnjenje izraženijeg negativnog efekta ovog metala na koncentraciju hlorofila kod mahovina u poređenju sa cinkom i kadmijumom kada su u podlogu bili dodati u obliku 200  $\mu\text{M}$  acetata. Imajući u vidu redoks-aktivnu prirodu bakra, kroz stvaranje ROS i peroksidaciju pigmenata, ovaj metal verovatno dodatno ispoljava svoj negativni uticaj na koncentraciju hlorofila kod mahovina (Zengin & Kirbag 2007; Küpper & Andresen 2016), što podržavaju i rezultati ovog istraživanja.

Kod biljaka izlaganih najvišoj koncentraciji Zn- i Cu-acetata u podlozi (700  $\mu\text{M}$ ) u ovom istraživanju, uočen je mali dodatni pad koncentracija hlorofila u odnosu na vrednosti kod biljaka izlaganih nižoj koncentraciji (200  $\mu\text{M}$ ) istih metala. U poređenju sa druga dva metala, 700  $\mu\text{M}$  Cd-acetat imao je znatno štetniji efekat na koncentraciju hlorofila kod mahovina. Ovo je očekivano, jer su cink i bakar esencijalni mikroelementi čije unutarćelijske koncentracije moraju biti precizno regulisane (Andresen *et al.*, 2018). Kod biljaka, bakar koji se nalazi u hloroplastima može činiti do 30% ukupnog bakra u ćelijama (Aguirre & Pilon, 2016). S obzirom na njegovu redoks-aktivnu prirodu, bakar predstavlja jedan od metala sa najvećim toksičnim potencijalom za ćelije. Razvoj mehanizma za kontrolu unutarćelijskih koncentracija bakra u toku evolucije, specifičnih za tkivo i fazu razvika, omogućio je biljkama održavanje finog balansa između esencijalnih funkcija i toksičnih efekata ovog elementa u ćelijama (Printz *et al.*, 2016). Ovi mehanizmi kontrole evolutivno su visoko očuvani između zelenih algi, mahovina i traheofita (Burkhead *et al.*, 2009). Glavne strategije biljaka (uključujući mahovine) za održavanje unutarćelijske homeostaze cinka i bakra uključuju vezivanje metala za ćelijski zid i spečavanje njihovog ulaska u ćeliju (Lang & Wernitznig, 2011; Basile *et al.*, 2012; Parrotta *et al.*, 2015), helaciju u citosolu i ciljanu akumulaciju u vakuoli (Clemens, 2001; Schmidt *et al.*, 2020), kao i regulisanu ekspresiju specifičnih transportera metalnih jona na plazmalemi, u uslovima povećane koncentracije metala u okruženju (Burkhead *et al.*, 2009; Küpper & Andresen, 2016). Benavides *et al.* (2005) ističu da značaj svakog pojedinačnog mehanizma zavisi od vrste i koncentracije metala, vremena izlaganja, kao i od vrste biljke. Ovde treba dodati i fiziolosko stanje individue, te sinergističke/antagonističke efekte drugih sredinskih faktora. Relativni značaj svakog pojedinačnog mehanizma kontrole kod *H. cupressiforme* i *A. undulatum* ostaje još uvek nedovoljno jasan.

Niske koncentracije kadmijuma u sredini najčešće nisu toksične za biljke. Međutim, usled hemijske sličnosti sa drugim esencijalnim dvovalentim katjonima, kadmijum može ući u ćeliju i relativno lako dostići toksične nivoe (Muradoglu *et al.*, 2015; Küpper & Andresen, 2016; Houri *et al.*, 2020). Dodatno, kadmijum može direktno oštetiti membrane i uticati na gubitak selektivne permeabilnosti, te se akumulirati u znatno većoj koncentraciji unutar ćelije u odnosu na esencijalne elemente. Ovakav mehanizam toksičnosti potvrdili su u svojim istraživanjima Ares *et al.* (2018) na jetrenjači *Marchantia polymorpha* L. i Basile *et al.* (2012) na mahovini *S. circinatum*. Usled visoke koncentracije kadmijuma u hloroplastima, može doći do nespecifičnog vezivanja za različite molekule i oksidativnog stresa koji na kraju uzrokuje peroksidativnu degradaciju pigmenata (Sanità

di Toppi & Gabbrielli 1999; Küpper & Andresen, 2016; Bellini *et al.*, 2020). Ovo objašnjava značajno smanjenje koncentracije hlorofila kod obe vrste mahovina u ovom istraživanju, pod uticajem 700  $\mu\text{M}$  Cd-acetata u podlozi.

Različiti efekti bakra i kadmijuma, u zavisnosti od njihove koncentracije u podlozi, na koncentraciju hlorofila, mogli bi se dodatno objasniti različitim uticajem ova dva elementa na antioksidativni sistem unutar hloroplasta, odnosno na enzim Cu/Zn-SOD 2. Ova izoforma prisutna je samo u hloroplastima viših biljaka, uključujući mahovine, a njena ekspresija i funkcija zavise od dostupnosti bakra. Povećana količina bakra u okruženju, u hloroplastima favorizuje ekspresiju Cu/Zn-SOD 2 izoforme, koja je znatno efikasnija u uklanjanju  $\bullet\text{O}_2^-$  u odnosu na Fe-SOD (Pilon *et al.*, 2011; Andresen *et al.*, 2018). Povećana ekspresija Cu/Zn-SOD izoformi povezana je sa povećanom otpornošću biljaka na oksidativni stres, kao i na abiotičke stresove koji do njega dovode. U uslovima oksidativnog stresa usled narušavanja fotosintetičkog aparata, ekspresija ovog enzima je dodatno pozitivno regulisana povećanom produkcijom ROS formi (Andresen *et al.*, 2018; Dreyer & Schippers, 2019). Stoga, kada je koncentracija bakra u hloroplastima povećana, Cu/Zn-SOD 2 može imati ulogu u zaštiti fotosintetičkih pigmentata, bilo direktnim vezivanjem slobodnog bakra, bilo eliminacijom toksičnih superoksid radikala. S druge strane, vezivanje kadmijuma za ovaj enzim, nakon indukcije Cu/Zn-SOD 2 oksidativnim stresom, može uzrokovati supstituciju  $\text{Zn}^{2+}$  u enzimu usled hemijske sličnosti, izmenu strukture i na kraju degradaciju, što može objasniti izraženiji negativan efekat kadmijuma na koncentraciju hlorofila, kada su biljke gajene na podlogama sa dodatkom 700  $\mu\text{M}$  Cd-acetata.

Rezultati ovog istraživanja, kada su u pitanju hlorofili *a* i *b*, u skladu su sa rezultatima drugih autora koji su ispitivali efekat metala na koncentraciju pigmentata kod različitih vrsta mahovina. Chen *et al.* (2015a) su utvrdili kod mahovina *E. eustegium* i *T. taxirameum* dolazi do znatno manje akumulacije cinka u poređenju sa bakrom i kadmijumom, uprkos rastućim koncentracijama ovih metala u supstratima. Istovremeno, ovi autori pokazali su da cink i bakar dovode do znatno manjeg smanjenja sadržaja hlorofila u odnosu na kadmijum kada su primenjeni u istim koncentracijama. Shakya *et al.* (2008) su detektovali značajno smanjenje koncentracije oba hlorofila kod mahovina *Thuidium delicatulum* (L.) Mitt. i *T. sparsifolium* (Mitt.) Jaeg. nakon njihovog izlaganja rastvorima bakra opsega koncentracija  $10^{-10}$  -  $10^{-2}$  M. Njihovi rezultati takođe su pokazali da su veće razlike uočene između kontrolne grupe biljaka i tretiranih biljaka, nego između različitih tretmana sa povećanom koncentracijom ovog metala. Ovi autori su dokumentovali da povećane koncentracije cinka nisu imale značajan uticaj na koncentracije hlorofila *a* i *b* u odnosu na kontrolnu grupu. Koristeći mnogo niže koncentracije u odnosu na one u ovoj doktorskoj disertaciji, Tremper *et al.* (2004) su otkrili da je najviša koncentracija bakra (približno  $10\mu\text{M}$ ), dovela do statistički značajnog smanjenja koncentracije oba hlorofila kod mahovine *R. squarrosus*, dok cink nije imao statistički značajan efekat. Saxena & Saiful-Arfeen (2009) su pokazali da je pri najnižoj primenjenoj koncentraciji (0,01 M) kadmijum imao stimulatorni efekat na sadržaj hlorofila *a* i *b* kod mahovine *Racomitrium crispulum* (Hook. f. et Wils.) Hook. f. et Wils., dok su više koncentracije dovele do smanjenja sadržaja hlorofila *a*, što je u skladu i sa rezultatima ovog istraživanja. Treba istaći da su pomenuti autori radili u prirodnim odnosno kseničnim uslovima.

Karotenoidi su pomoćni pigmenti u fotosintezi, koji osim ove uloge imaju fotoprotektivnu funkciju, učestvujući u "gašenju"  $^1\text{O}_2$  i tripletnog stanja hlorofila (Havaux, 2014). U zavisnosti od vrste metala i njegove koncentracije u podlozi, koncentracija karotenoida u mahovinama u ovom istraživanju menjala se proporcionalno promenama koncentracija hlorofila odgovarajućih tretmana. Jaka pozitivna korelacija između koncentracija ove dve grupe pigmentata u odgovoru na različite faktore u ovom istraživanju ukazuje na prisustvo zajedničkog mehanizma koji utiče na hlorofile i karotenoide, najverovatnije kroz destabilizaciju odnosno degradaciju fotosintetskih jedinica (fotosistema). U ovoj doktorskoj disertaciji, kao i u istraživanju Saxena & Saiful-Arfeen (2009), koncentracija ukupnih karotenoida značajno je opala pod uticajem bakra ili kadmijuma, ali je efekat pojedinačnih metala zavisio od njihove koncentracije primenjene u podlozi. Nije nađena korelacija između cinka i koncentracije karotenoida. Degradacija karotenoida pod uticajem toksičnih metala

može biti deo mehanizma aklimacije na fotooksidativni stres u uslovima kada je odbrambeni kapacitet hloroplasta dostignut. Pokazano je da degradacioni proizvodi karotenoida dovode do ekspresije gena čija se transkripcija aktivira kada se koncentracija  $^1\text{O}_2$  u ćelijama poveća, kao i da je njihova ekspresija u vezi sa povećanom otpornošću hloroplasta na oksidativni stres (Havaux, 2014). U prilog ove hipoteze govori odsustvo značajne razlike u koncentraciji ukupnih karotenoida kod mahovina gajenih pri nižoj i višoj koncentraciji Cu-acetata u podlozi, kao i statistički jako značajna razlika između koncentracije ovih pigmenata kod kontrolne grupe i grupe mahovina izlaganih nižoj koncentraciji Cu-acetata (Stanković *et al.*, 2021).

Odnos koncentracija hlorofila *a* i *b*, često se koristi kao indikator stresa u biljnim ćelijama (Zengin & Munzuroglu, 2005; Houry *et al.*, 2020, Stanković *et al.*, 2021). Smanjenje odnosa koncentracija hlorofila *a* i *b* može biti posledica oksidativnog stresa izazvanog redoks-aktivnim metalima, pri čemu oksidacijom metil grupe na drugom tetrapirolovom prstenu hlorofila *a* nastaje hlorofil *b*. Prema Shakya *et al.* (2008) smanjenje koncentracije ukupnih hlorofila uz istovremeno smanjenje odnosa hlorofila *a/b*, ukazuje na specifično dejstvo bakra. Međutim, na osnovu odnosa koncentracija dva hlorofila u ovom istraživanju nije bilo moguće uočiti razliku između specifičnih efekata pojedinačnih metala, kao ni između efekata različitih koncentracija metala u podlozi. Vrednosti ovog parametra, takođe su značajno varirale u odnosu na vrstu mahovina, kada su vrednosti ostalih faktora bile iste. Tremper *et al.* (2004) i Chen *et al.* (2015a) takođe su zaključili da je odnos koncentracija hlorofila *a* i *b* manje pouzdan i osetljiv indikator stresa metalima u odnosu na druge parametre poput koncentracije pojedinačnih pigmenata.

U ovom istraživanju, pri istim uslovima gajenja, obrasci promene koncentracije hlorofila *a* kod obe ispitivane vrste mahovina bili su slični. S druge strane, kada su u pitanju koncentracije hlorofila *b* i karotenoida, vrsta *H. cupressiforme* ispoljila je znatno veću osetljivost u odnosu na *A. undulatum* pri izlaganju Cu-acetatu. Imajući u vidu redoks-aktivnu prirodu bakra, uočene razlike između vrsta mahovina mogu odražavati različiti kapacitet za odbranu od oksidativnog stresa izazvanog metalima. Finalni efekat nekog metala na biljke zavisiće od interakcija između osetljivosti datih biljaka, vrste metala i forme u kojoj se primenjuje, kao i od primenjene doze (računate kao proizvod koncentracije metala i trajanja izlaganja) (Baker & Walker 1989), što je potvrđeno i u ovom istraživanju.

### **5.3. Markeri oksidativnog stresa kod mahovina *H. cupressiforme* i *A. undulatum* pod uticajem Zn-acetata i Cu-acetata u podlozi**

#### **5.3.1. Koncentracija $\text{H}_2\text{O}_2$**

Pod dejstvom toksičnih metala, koncentracija  $\text{H}_2\text{O}_2$  u biljnim ćelijama može porasti do 30 puta u odnosu na onu karakterističnu za ćelije u optimalnim uslovima (Demirevska-Kepova *et al.*, 2004). Među reaktivnim kiseoničnim vrstama  $\text{H}_2\text{O}_2$  je najstabilniji, sa vremenom poluživota od 1 ms. Vodonik-peroksid ima mogućnost difundovanja i prolaska kroz akvaporine membrana ćelija, i posledično može interagovati sa različitim komponentama ćelije u relativno udaljenim delovima od mesta nastanka (Demirevska-Kepova *et al.*, 2004; Habibi, 2014; Cuypers *et al.*, 2016). Zbog ovih osobina,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ima dvostruku ulogu u ćelijama – pri niskim koncentracijama ima funkciju signalnog molekula, dok pri visokim koncentracijama dovodi do lipidne peroksidacije, razaranja membrana, denaturacije proteina i oštećenja DNK (Habibi, 2014). Iako je manje reaktivan u poređenju sa drugim ROS radikalske prirode, njegov štetni potencijal je vrlo veliki zbog toga što može preći u jako toksičan hidrosil radikal u kontaktu sa slobodnim redoks-aktivnim metalnim jonima (Cuypers *et al.*, 2016). Do akumulacije  $\text{H}_2\text{O}_2$  u biljnim ćelijama može doći ili usled povećane produkcije ovog molekula ili usled inhibicije antioksidativnog sistema vezanog za njegovo uklanjanje (Wu *et al.*, 2009).

U ovom istraživanju značajno veće koncentracije vodonik-peroksida pri svim primenjenim koncentracijama metala u podlozi, bez obzira na vrstu metala, detektovane su kod vrste *A. undulatum*. Ovakav rezultat ukazuje na potencijalno veću osetljivost ove akrokarpne vrste na toksično dejstvo ispitivanih metala, kada je u pitanju oksidativni stres. Praćenjem produkcije  $\bullet\text{O}_2^-$  i



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u mahovinama gajenim u *in vitro* uslovima, Antreich *et al.* (2016) su ustanovili da vrste tolerantne na povišene koncentracije ovog i drugih metala, produkuju manje količine reaktivnih kiseoničnih vrsta nakon izlaganja datim metalima u odnosu na vrste koje se smatraju senzitivnim. U njihovom istraživanju, nakon gajenja na podlogama sa povećanim koncentracijama bakra, *P. patens*, vrsta osetljiva na bakar, imala je znatno veću produkciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u poređenju sa *Mielichhoferia elongata* (Hoppe & Hornsch.) Nees & Hornsch. i *Pohlia drummondii* (Müll. Hal.) A.L. Andrews, vrstama koje se često sreću na staništima sa povećanom koncentracijom bakra i drugih metala. Ovi autori pokazali su da delovi *P. patens* sa značajno povećanim koncentracijama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> imaju jako malo •O<sub>2</sub><sup>-</sup>, što ukazuje na povećanu aktivnost SOD, efikasno prevođenje superoksid radikala u H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i veću akumulaciju ove ROS. Moguće je da i u ovom istraživanju povećana aktivnost SOD kod *A. undulatum* predstavlja uzrok značajno veće koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u poređenju sa *H. cupressiforme*.

Interesantno je da je koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u kontrolnim grupama *A. undulatum* takođe značajno veća nego u kontrolnim grupama *H. cupressiforme*. Ovo ukazuje na konstitutivno visok nivo produkcije ove reaktivne kiseonične vrste kod ispitivane akrokarpne mahovine, kao i na postojanje različitog praga ispoljavanja toksičnosti H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kod dve ispitivane vrste mahovina u ovom istraživanju. Prema Cheng & Song (2006) različite biljne vrste u optimalnim fiziološkim uslovima mogu se značajno razlikovati u pogledu bazalnog nivoa produkcije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Smatra se da povećana koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pre izlaganja biljaka stresogenim faktorima utiče na povećanu otpornost biljaka kroz povećanje osnovne aktivnosti antioksidativnih enzima ili održavanje povišenog nivoa antioksidativne aktivnosti, što je potvrđeno u istraživanjima sa pretretmanima biljaka vodonik-peroksidom (Cuypers *et al.*, 2016). Visok osnovni nivo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kod kontrolnih biljaka *A. undulatum* mogao bi stoga ukazivati i na veću otpornost ove vrste prema oksidativnom stresu. Povećana produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta (oksidativni prasak) u odgovoru na različite sredinske stresore jedan je od pokretača signalnih kaskada koje mogu uticati na ekspresiju odbrambenih i regulatornih gena i posledično na aklimaciju biljaka na izmenjene uslove razvića ili sredinske faktore (Cuypers *et al.*, 2016). S druge strane, pokazano je i da je oksidativni prasak koji se dešava u apoplastu biljaka aktivacijom NADPH oksidaza i peroksidaza vezanih za ćelijski zid, u toku koga nastaju •O<sub>2</sub><sup>-</sup> i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, esencijalan za kontrolu rastenja i diferencijacije biljnih ćelija (Foreman *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2011; Morales & Munné-Bosch, 2016; Dumanović *et al.*, 2021). Stoga veća koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kod *A. undulatum* može značiti i postojanje intenzivnijih stopa rastenja i diferencijacije ćelija gametofora ove mahovine u odnosu na *H. cupressiforme*. Značajno veća koncentracija hlorofila *a* kod *A. undulatum* u odnosu na onu kod *H. cupressiforme* u ovom istraživanju ukazuje i na intenzivniju fotosintezu kod akrokarpne vrste, što je povezano i sa većom produkcijom ROS u hloroplastima ove mahovine.

U ovom istraživanju, nakon dugotrajnog izlaganja mahovina podlogama sa dodatkom Zn-acetata i Cu-acetata, najmanja produkcija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detektovana je kod biljaka *H. cupressiforme* gajenih na podlogama sa dodatim Zn-acetatima. Isti metal, kod *A. undulatum* doveo je do najveće produkcije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koja je zabeležena u celom istraživanju. Ovakav rezultat ukazuje na povećanu otpornost *H. cupressiforme* i izraženiju osetljivost *A. undulatum* na povećane koncentracije cinka u podlozi. Jedan od potencijalnih razloga može biti različita lokalizacija ovog metala u ćelijama dve ispitivane mahovine nakon gajenja na podlogama sa dodatkom Zn-acetata. Istražujući ćelijsku lokalizaciju cinka kod mahovine *P. drummondii*, koja se smatra vrstom tolerantnom na povećane koncentracije metala, Lang & Wernitznig (2011) pokazali su da joni cinka ne ulaze u unutrašnjost ćelija već bivaju zadržani u ćelijskom zidu. Moguće je da kod vrste *H. cupressiforme* joni istog metala bivaju akumulirani na sličan način, dok je kod *A. undulatum* prolazak jona cinka u unutrašnjost ćelije intenzivniji. Ovo je u skladu i sa rezultatima Sabovljević *et al* (2018b).

Promena koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kod mahovina u ovom istraživanju sa povećanjem koncentracije cinka u podlozi bila je ujednačena za obe primenjene koncentracije, dok je u slučaju izlaganja bakru, primećen nagli porast u produkciji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pri povećanju koncentracije Cu-acetata u podlozi sa 200 na 700 μM. Ovaj skok, naročito je bio izražen kod vrste *A. undulatum*. Isti trend u

akumulaciji vodonik-peroksida pod uticajem rastućih koncentracija cinka i bakra, kao kod *A. undulatum*, detektovan je i kod mahovina *T. taxirameum* i *E. eustegium* u istraživanju Chen *et al.* (2015a), ukazujući na to da su mehanizmi kontrole odgovora na date metale kod sve tri ispitivane vrste mahovina verovatno slični. Wu *et al.* (2009) pokazali su da u prisustvu povećane koncentracije bakra kod mahovine *Plagiomnium cuspidatum* dolazi do značajnog povećanja koncentracije vodonik peroksida. Ovi autori potvrdili su da je povećana aktivnost NAD(P)H oksidaza vezanih za plazmalemu jedan od glavnih mehanizama uključenih u povećanje koncentracije ove reaktivne kiseonične vrste, kao i da inhibicija ovog enzima dovodi do značajnog smanjenja produkcije vodonik-peroksida iako su biljke izložene bakru. S druge strane, u istraživanju Çakmak & Marschner (1988) pokazano je da cink inhibira NADPH-zavisnu produkciju  $\bullet\text{O}_2^-$  u korenovima pamuka i posledično utiče na smanjenu akumulaciju vodonik-peroksida u ovom organu. Imajući u vidu redoks-aktivnu prirodu bakra, i diferencijalni efekat bakra i cinka na aktivnost NAD(P)H oksidaza, moguće je objasniti znatno intenzivnije povećanje produkcije  $\text{H}_2\text{O}_2$  nakon primene najviše koncentracije bakra u odnosu na povećanje izazvano istom koncentracijom cinka. Rezultati ovog istraživanja u skladu su sa rezultatima Aydoğan *et al.* (2017), koji su pokazali da uticaj metala na produkciju  $\text{H}_2\text{O}_2$  kod mahovina *Pleurochaete squarrosa* (Brid.) Lindb. i *Timmiella barbuloides* (Brid.) Moenk. zavisi kako od vrste metala, tako i od vrste ispitivane mahovine. I u njihovom istraživanju, bakar je doveo do značajne produkcije  $\text{H}_2\text{O}_2$  kod obe vrste, dok je nikel, kao redoks-inertan metal, doveo do povećane akumulacije ove ROS forme samo kod *P. squarrosa*, što je uporedivo sa efektom cinka na *A. undulatum* u našem istraživanju.

Kada je praćena produkcija  $\text{H}_2\text{O}_2$  kod *A. undulatum* u uslovima dugotrajnog i kratkotrajnog izlaganja podlogama sa dodatim Zn- i Cu-acetatom, uočeno je postojanje jako značajnog pozitivnog kumulativnog efekta povećanja koncentracije metala u podlozi i trajanja stresa. Osim toga, razlike u uticaju trajanja stresa na produkciju  $\text{H}_2\text{O}_2$  bile su statistički značajno manje u slučaju bakra, nego u slučaju cinka. Dobijeni rezultati lako se mogu objasniti hemijskom prirodom ispitivana dva metala. Bakar, kao redoks-aktivan metal učestvuje u redoks reakcijama i lako dovodi do nastanka ROS, zbog čega ranije dolazi do ispoljavanja simptoma oksidativnog stresa. Činjenica da cink nije redoks-aktivan metal poput bakra, te ne učestvuje u Haber-Weiss i Fenton reakcijama, ukazuje na njegov slabiji efekat na produkciju  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Narušavanjem homeostaze drugih esencijalnih jona, nespecifičnim strukturnim vezivanjem u različitim ćelijskim komponentama koje dovodi do curenja elektrona, kao i kompleksacijom i stabilizacijom fenoksil radikala, cink može indirektno dovesti do povećanja koncentracije  $\text{H}_2\text{O}_2$  u ćelijama (Morina *et al.*, 2010).

### 5.3.2. Koncentracija MDA

U prisustvu tranzicionih metala kao što je bakar, dolazi do povećane produkcije  $\bullet\text{O}_2^-$  i  $\bullet\text{OH}$  koji mogu pokrenuti lipidnu peroksidaciju i dovesti do stvaranja MDA. Ovaj citotoksični produkt smatra se indirektnim pokazateljem povećane akumulacije ove dve radikalske vrste, markerom oksidativnog stresa u ćelijama i pokazateljem očuvanosti integriteta ćelijskih membrana pod dejstvom stresogenih faktora (Choudhary *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2009).

Pri poređenju nivoa MDA kod kontrolnih grupa dve vrste mahovina ispitivanih u ovom istraživanju, nije ustanovljena značajna razlika u koncentraciji ovog citotoksičnog produkta. Ovi rezultati zajedno sa rezultatima za koncentraciju vodonik-peroksida potvrđuju hipotezu da povećana koncentracija  $\text{H}_2\text{O}_2$  kod *A. undulatum* ne znači veći nivo oksidativnog stresa, već da ovaj molekul ima značajniju ulogu kod ove akrokarpane vrste u signalizaciji unutar biljke. Pokazano je da različiti sredinski faktori indukuju produkciju specifičnih ROS formi i utiču na aktivaciju signalnih kaskada koje omogućavaju aklimacioni odgovor specifičan za date uslove rasta. Takođe, utvrđeno je da razlike u dominantom mestu stvaranja  $\text{H}_2\text{O}_2$ , unutarćelijska lokalizacija, kao i razlike u količini produkovanog  $\text{H}_2\text{O}_2$  mogu specifično aktivirati signalne kaskade i dovesti do stvaranja specifičnih transkriptata, koji učestvuju u regulaciji rastenja biljaka u određenim sredinskim uslovima (Suzuki *et al.*, 2011; Cuypers *et al.*, 2016).

Povećanje koncentracije Zn- i Cu- acetata u podlozi, kod *A. undulatum*, izazvalo je znatno veći stepen lipidne peroksidacije u odnosu na *H. cupressiforme*, pri čemu su razlike između vrsta bile izraženije sa porastom koncentracije primenjenih metala. Aydoğan *et al.* (2017) takođe su ustanovili da postoji značajna razlika u produkciji MDA između mahovina *P. squarrosa* i *T. barbuloides* pod uticajem povećanih koncentracija metala, koje nisu uvek korelisale sa koncentracijama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

U ovom istraživanju, bakar je ispoljio znatno toksičniji efekat u pogledu produkcije MDA u odnosu na cink, i taj efekat je bio jako izražen već pri nižoj koncentraciji Cu-acetata u podlozi. Cink je, s druge strane, pri nižoj koncentraciji doveo do smanjenja koncentracije MDA u odnosu na kontrole. Ovako različit efekat dva metala može se objasniti razlikama u njihovoj redoks aktivnosti. Bakar kao redoks aktivni metal, osim indukcijom reaktivnih kiseoničnih vrsta, može direktno pokrenuti lipidnu peroksidaciju (Shaw *et al.*, 2004; Skórzyńska-Polit, 2007; Gaschler & Stockwell, 2017). Ovo objašnjava i različiti trend nakupljanja vododnik peroksida i MDA u mahovinama sa porastom koncentracije Cu-acetata u podlozi. Naime, najveća razlika u produkciji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uočava se između biljaka gajenih na podlogama sa dodatkom 200 i 700 μM Cu-acetata, dok se najveća razlika u sadržaju MDA kod biljaka izlaganih istom metalu uočava između kontrolnih i biljaka gajenih na podlogama sa 200 μM Cu-acetatom. Ovakvi rezultati ukazuju da pri nižoj koncentraciji bakra u podlozi MDA ne prati povećanje ROS u ćelijama, već je povećanje koncentracije MDA znatno intenzivnije u poređenju sa ROS formama, i upućuje na postojanje dodatnih mehanizama produkcije MDA. Znatno izraženiji efekat bakra na produkciju MDA u mahovinama u poređenju sa drugim metalima, potvrđen je i u istraživanju Aydoğan *et al.* (2017) kod vrsta *P. squarrosa* i *T. barbuloides*. Inhibitoran efekat cinka na produkciju MDA pri nižoj koncentraciji može se objasniti njegovim inhibitornim dejstvom na NAD(P)H oksidaze odgovorne za produkciju ROS na membranama i pozitivnim efektom na očuvanje integriteta istih (Çakmak & Marschner, 1988).

U ovom istraživanju, kod vrste *A. undulatum* uočen je izražen kumulativan efekat povećanja dužine izlaganja mahovina metalima i koncentracije metala u podlogama na akumulaciju MDA. Bakar je imao primarni uticaj na razlike u sadržaju MDA, koje su bile najveće između kontrolnih i grupa biljaka gajenih na podlogama sa dodatkom 200 μM Cu-acetata. Razlike u koncentraciji MDA kod kontrolnih biljaka i onih gajenih na 200 μM cinka gotovo da nisu postojale. Značajna produkcija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kod ove vrste pod uticajem cinka, koja je u oba tipa izlaganja bila veća nego kada su biljke izlagane bakru, i vrlo mala promena u koncentraciji MDA nakon izlaganja cinku mogu ukazivati na to da je povećanje peroksidacije masnih kiselina u ćelijskim membranama ove mahovine rezultat pre svega direktne interakcije bakra sa lipidima, a u manjoj meri posledica akumulacije reaktivnih kiseoničnih vrsta pod dejstvom metala. Slične efekte bakra na produkciju MDA potvrdili su i Panda & Choudhury (2005) kod mahovine *P. commune*. Međutim, kod ove mahovine povećanje koncentracije cinka kojoj su biljke izlagane rezultovalo je u proporcionalnom povećanju koncentracije MDA, što u slučaju naših testiranih vrsta nije uočeno.

#### 5.4. Aktivnost POD

Peroksidaze klase III su multifunkcionalni enzimi biljaka koji katalizuju oksidaciju širokog spektra supstrata, primarno fenolnih jedinjenja, koristeći vodonik-peroksid. Izoenzimi peroksidaza nalaze se u vakuolama ili apoplastu, i mogu biti u solubilnoj frakciji ili kovalentno ili jonski vezane za ćelijski zid (Veljović-Jovanović *et al.*, 2018). POD predstavljaju jedine komponente antioksidativnog sistema koje su uključene u uklanjanje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lokalizovanog u vanćelijskom prostoru. Osim oksidacije različitih fenolnih jedinjenja prilikom koje dolazi do redukcije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peroksidatni ciklus), POD mogu učestvovati u stvaranju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> posredstvom jednoelektronske redukcije kiseonika (oksidativni ciklus). U oksidativnom ciklusu, prenosom elektrona sa supstrata, kao što su fenoli, na kiseonik, nastaju •O<sub>2</sub><sup>-</sup> i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kao intermedijeri (Veljović-Jovanović *et al.*, 2018; Blaschek & Pesquet, 2021).

Prema Jouili *et al.* (2011) POD predstavljaju biomarkere stresa izazvanog toksičnim metalima. Pokazano je da peroksidaze kod biljnih vrsta ili populacija osetljivih na određene metale,

u odgovoru na date metale bivaju intenzivnije indukovane, nego kod vrsta koje su otpornije na dati metal (Jouili *et al.*, 2011; Veljović-Jovanović *et al.*, 2018). U ovom istraživanju značajno manje aktivnosti peroksidaza kod biljaka *A. undulatum* izlaganih Zn-acetatu u odnosu na one kod biljaka izlaganih Cu-acetatu, ukazuju na to da je ova vrsta otpornija na povećane doze cinka. Ovo je u skladu i sa koncentracijama MDA detektovanim kod iste vrste u odgovarajućim tipovima tretmana. Rezultati ovog istraživanja saglasni su sa rezultatima Wu *et al.* (2009), koji su pokazali da je kod biljaka *P. cuspidatum* izlaganih bakru aktivnost POD značajno veća u odnosu na onu kod kontrolnih biljaka. Kao i ovom istraživanju, povećane koncentracije POD kod mahovine *P. cuspidatum* bile su praćene i povećanjem stepena lipidne peroksidacije. S druge strane, pokazano je da može doći do redukcije aktivnosti peroksidaza pod dejstvom metala (Jouili *et al.*, 2011)

Kada su biljke *A. undulatum* gajene na podlogama sa cinkom, najveća aktivnost POD postignuta je već pri kratkom izlaganju i pri nižoj primenjenoj koncentraciji metala. U slučaju biljaka gajenih na podlogama sa dodatim bakrom, aktivnost peroksidaza rasla je sa produžetkom perioda izlaganja, kao i sa povećanjem koncentracije Cu-acetata u podlozi. Suprotno od rezultata u ovom istraživanju, Dazy *et al.* (2009) su pokazali da kod biljaka vrste *F. antipyrretica* izlaganih cinku, sa porastom trajanja izlaganja i primenjene koncentracije dolazi i do postepenog porasta aktivnosti POD. S druge strane, u slučaju biljaka *F. antipyrretica* tretiranih bakrom u istom istraživanju, najveća aktivnost POD detektovana je pri najnižoj koncentraciji ovog metala, i sa porastom vremena izlaganja, nije bila značajno drugačija (Dazy *et al.*, 2009). Panda & Choudhury (2005) pokazali su da kod biljaka *P. commune* izlaganih rastućim koncentracijama cinka ili bakra, raste i aktivnost POD, kao i da se ona razlikuje u slučaju oba metala, u zavisnosti od toga da li su biljke izlagane duži ili kraći period. I Dazy *et al.* (2009) i Panda & Choudhury (2005) zaključili su da aktivnost POD zavisi od vrste metala kome su mahovine izložene, međutim, rezultati njihovih istraživanja, zajedno sa rezultatima ovog istraživanja, ne ukazuju na postojanje uniformnog obrasca. U istraživanju Saxena & Saiful-Arfeen (2009) aktivnost POD kod mahovine *R. crispulum* zavisila je od koncentracije bakra ili kadmijuma kojoj su mahovine bile izložene, kao i od trajanja stresa. Nakon inicijalnog povećanja aktivnosti POD pri nižoj koncentraciji metala, dalje povećanje koncentracije metala dovelo je do pada aktivnosti enzima. Ovi autori, zaključili su da je koncentracija metala pri kojoj je aktivnost POD bila najveća, predstavljala gornji koncentracioni limit metala na koji data vrsta može da se aklimizuje (Saxena & Saiful-Arfeen, 2009).

### 5.5. Neenzimske komponente antioksidativne zaštite

Antioksidativna zaštita biljaka vrlo je kompleksna i u različitim delovima ćelije postoje specifično razvijeni antioksidativni mehanizmi. Značajan deo  $H_2O_2$  u ćelijama biva redukovano do vode pod dejstvom katalaza u peroksidomima i različitim peroksidazama u hloroplastu, vakuoli, citosolu ili ćelijskim zidovima, čime se postiže njegovo uklanjanje. Fina regulacija nivoa  $H_2O_2$  u biljnim ćelijama postiže se sadejstvom enzima i metabolita askorbat-glutaminskog ciklusa (Demirevska-Kepova *et al.*, 2004). Prema konceptu unutarćelijske podele antioksidativnog sistema, fenolna jedinjenja mogu predstavljati deo antioksidativne zaštite vakuola i apoplasta zajedno sa askorbatom i POD, gde uklanjaju  $H_2O_2$  preko PPA puta (Sakihama *et al.*, 2002; Veljović-Jovanović *et al.*, 2018). U uslovima stresa izazvanog toksičnim metalima, fenolna jedinjenja mogu učestvovati u antioksidativnoj odbrani ćelija uklanjanjem ROS, ali i heliranjem metalima, čime se umanjuje prooksidativni kapacitet ovih elemenata (Król *et al.*, 2014). Većina biljaka konstitutivno sintetiše fenolna jedinjenja poput flavonoida ili hidrokisicimetine kiseline. Međutim, pokazano je da brojni stresovi izazvani spoljašnjim faktorima, uključujući povećane koncentracije različitih metala, mogu modifikovati sintezu već postojećih ili novih grupa fenola u ćelijama i dovesti ili do povećane akumulacije ovih metabolita u biljkama ili do smanjenja njihovog sadržaja (Sakihama *et al.*, 2002; Król *et al.*, 2014; Kisa *et al.*, 2019).

U ovom istraživanju, vrsta *A. undulatum* karakterisala se znatno većim koncentracijama ukupnih fenolnih jedinjenja nego *H. cupressiforme*, pri svim tretmanima. Istovremeno, sposobnost za uklanjanje DPPH radikala ove akrokarpne vrste bila je značajno veća u poređenju sa kapacitetom *H. cupressiforme* pri istim uslovima. S obzirom na postojanje pozitivne korelacije između sadržaja

ukupnih fenolnih jedinjenja i antioksidativnog kapaciteta dve vrste mahovina, merenog efikasnošću uklanjanja DPPH radikala, može se zaključiti da fenoli imaju neku ulogu u antioksidativnom odgovoru ovih biljaka, kao i da kod vrste *A. undulatum* imaju znatno veći udeo u antioksidativnoj zaštiti nego kod *H. cupressiforme*.

Sa povećanjem koncentracije metala u podlozi kod *A. undulatum* progresivno se smanjivala koncentracija ukupnih fenola, dok taj efekat kod vrste *H. cupressiforme* nije bio izražen. Kod mahovine *H. cupressiforme*, najniža finalna koncentracija ukupnih fenolnih jedinjenja u biljkama, postignuta je već primenom niže koncentracije metal-acetata u podlozi. Kod obe vrste bakar je znatno više uticao na smanjenje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja nego cink, pri čemu je negativni efekat bakra bio značajno izraženiji kod *A. undulatum*. Na osnovu relativno konstantne količine fenola kod pleurokarpne vrste u ovom istraživanju nakon izlaganja podlogama sa dodatim Zn- ili Cu-acetatom, može se pretpostaviti da vrsta *H. cupressiforme* ne koristi antioksidativni potencijal fenola kao glavni mehanizam tolerancije na dugotrajni stres metalima. Smanjenje koncentracije ukupnih fenolnih jedinjenja u biljkama sa porastom koncentracije bakra ili kadmijuma u podlozi uočeno je i u istraživanju Kisa *et al.* (2019) kod listova paradajza (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Isti autori zaključili su da je smanjenje koncentracije fenola nakon izlaganja biljaka metalima verovatno rezultat inhibicije nekog od enzima uključenih u biosintezu ove grupe sekundarnih metabolita.

S druge strane, moguće je da su kod mahovina u ovom istraživanju drugi mehanizmi doveli do uočenih promena u sadržaju fenolnih jedinjenja, naročito kod biljaka tretiranih bakrom. U prisustvu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u biljnim ćelijama, pod dejstvom POD dolazi do oksidacije fenolnih jedinjenja prisutnih u vakuolama, poput flavonola, estara hidroksicimetne kiseline ili antocijanina i nastanka fenoksil radikala. U uslovima kada ima dovoljno redukovano askorbata, fenoksil radikali nastali na ovaj način redukuju se u PPA ciklusu i vraćaju u početni oblik. Međutim, toksični metali, naročito redoks-aktivni poput bakra, mogu dovesti do velike produkcije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i oksidovati dostupne zalihe askorbata. U ovim uslovima, uklanjanje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> posredstvom POD koje koriste fenole u apoplastu i vakuolama, može dovesti do ireverzibilnog stvaranja oksidacionih produkata fenola žutobraonkaste boje i gubljenja inicijalnih fenolnih jedinjenja, kao i njihovog redukcionog potencijala koji se detektuje testovima kao što je Folin-Ciocalteu ili DPPH (Takahama & Oniki, 1997, 2000; Sakihama *et al.*, 2002; Michalak, 2006). U ovom istraživanju, pod dejstvom bakra kod obe ispitivane vrste mahovina uočena je pojava braon boje, kako u kauloidima, tako i u filoidima, naročito u delovima koji su direktno bili izloženi podlozi sa ovim metalom. S druge strane, slabo izražene promene u sadržaju fenolnih jedinjenja i antioksidativnom kapacitetu biljaka pod dejstvom cinka u podlogama, mogu se objasniti činjenicom da ovaj element, kao redoks-inertan metal sporije indukuje oksidativna oštećenja, te omogućava veću efikasnost obnavljanja neenzimskih antioksidanata nego kada su biljke izložene bakru.

Kod biljaka *A. undulatum* iz eksperimenata sa kratkotrajnim stresom efekat Zn-acetata i Cu-acetata na koncentraciju ukupnih fenola bio je gotovo isti, dok je u uslovima dugotrajnog izlaganja biljaka metal-acetatima bakar imao drastično veći negativan uticaj na ovaj parametar u odnosu na cink. Ovi rezultati, zajedno sa rezultatima aktivnosti POD, koje su u oba tipa eksperimenata znatno više indukovane bakrom nego cinkom, ukazuju na to da kod vrste *A. undulatum* PPA mehanizam zaštite od oksidativnih oštećenja ima važnu ulogu, koja je posebno naglašena u uslovima produženog trajanja oksidativnog stresa uzrokovanog redoks-aktivnim metalima. Dodatno, pojava braon boje u delovima biljaka izloženih povećanim koncentracijama bakra ukazuje na to da ova mahovina sadrži značajnu količinu flavonola i drugih fenola u vakuolama ćelija, koji daju oksidacione produkte ove boje.

Iako je u brojnim istraživanjima pokazano da u stresnim uslovima dolazi do akumulacije fenola u biljkama, rezultati ovih istraživanja često su bazirani na kratkotrajnom izlaganju biljaka određenim stresogenim faktorima (Król *et al.*, 2014). Odgovor biljke na dugotrajno izlaganje stresoru može se razlikovati od onog uočenog pri kratkotrajnom stresu, što je potvrđeno u ovom istraživanju prateći koncentraciju ukupnih fenola kod biljaka *A. undulatum*. U istraživanju Król *et*



al. (2014) pokazano je da dugotrajno izlaganje vinove loze stresu sušom dovodi do smanjenja sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja, kao i do smanjenja redukujućeg potencijala u tkivima biljaka. Ovo ukazuje i na usporavanje sekundarnog metabolizma, verovatno kao strategije očuvanja energije i preživljavanja do prestanka nepovoljnih sredinskih uslova (Król *et al.*, 2014).

### **5.6. Ukupna koncentracija odabranih hemijskih elemenata kod biljaka *H. cupressiforme* gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-acetata, Cu-acetata i Cd-acetata u kulturi *in vitro* u uslovima dugotrajnog stresa**

Fundamentalni fiziološki procesi biljaka regulisani su ili se nalaze pod uticajem esencijalnih mineralnih elemenata. Istraživanja vezana za koncentraciju i distribuciju individualnih elemenata u različitim biljnim vrstama, genotipovima, delovima biljke, fazama razvića ili različitim uslovima rastenja omogućavaju bolje razumevanje uloge koju ti elementi imaju u toku normalnog razvića biljaka, ali i pri njihovom odgovoru na stresne uslove (Mesjasz-Przybyłowicz & Przybyłowicz, 2002).

Vrsta *H. cupressiforme* jedna je od najčešće korišćenih vrsta mahovina za biomonitoring toksičnih metala, čiji kapacitet za vezivanje metala poput cinka, bakra i kadmijuma, uz vrste roda *Sphagnum*, se smatra najvećim među prirodnim apsorbentima (Sucharová & Suchara, 1998; Capozzi *et al.*, 2020). U ovom istraživanju, prosečne ukupne koncentracije cinka i bakra u kontrolnim uzorcima bile su u opsegu koncentracija koje su detektovane u drugim istraživanjima kada su biljke iste vrste sakupljene iz prirodnih nezagađenih straništa (Fernández *et al.*, 2000; Sardans & Peñuelas, 2005). Rezultati ovog istraživanja pokazuju da dodatak Zn- ili Cu-acetata u podlogu dovodi do značajne akumulacije datih metala u biljkama, ali i da *H. cupressiforme* različitom efikasnošću usvaja ova dva elementa pri istim uslovima gajenja. Pri najvišoj primenjenoj koncentraciji metal-acetata u podlozi, biljke su sadržale znatno više bakra (približno 3,5 puta više) nego cinka, iako su kontrolni uzorci imali skoro duplo više cinka u odnosu na bakar. Znatno veći kapacitet za akumulaciju bakra u odnosu na cink kod *H. cupressiforme* detektovan je i u istraživanju González & Pokrovsky (2014), ali i kod mahovina *H. splendens* (Rühling & Tyler, 1970) i *Leucodon sciuroides* (Hedw.) Schwägr. (Ucarli *et al.*, 2020). S druge strane, obrnut trend u sposobnosti akumulacije ovih metala od strane mahovina, pri istim koncentracijama u podlozi pokazan je kod *P. patens* (Sassmann *et al.*, 2015b) i *S. circinatum* (Basile *et al.*, 2012).

Prilikom tumačenja vrednosti ukupnih koncentracija ispitivanih metala u mahovinama u ovom istraživanju, važno je istaći da su biljke gajene u kulturi *in vitro* nekoliko godina pre početka eksperimenata čime je kroz sukcesivno subkultivisanje odabirom vršnih delova mahovina i gajenjem u zatvorenim posudama „uklonjena“ svaka potencijalna inicijalna kontaminacija biljaka metalima. Imajući u vidu uniformnost svih uslova gajenja u toku eksperimenata, i uniformnost početnog biljnog materijala, može se zaključiti da dobijene razlike vezane za akumulacioni kapacitet vrste *H. cupressiforme* za bakar, odnosno cink, odražavaju razlike u afinitetu katjon-vezujućih mesta u ćelijskom zidu za ova dva katjona, razlike u afinitetu membranskih transportera, i razlike u kapacitetu za neutralizaciju dva elementa nakupljanjem u vakuolama ili formiranjem kompleksa sa unutarćelijskim ligandima (Tessier & Boisvert, 1999; Vázquez *et al.*, 1999; Esposito *et al.*, 2012). Smatra se da katjon-izmenjivački kapacitet mahovina u najvećoj meri određuju pektini ćelijskih zidova (Lobachevska, 2019). Istraživanje je pokazalo da različite vrste pektina ispoljavaju iste obrasce u vezivanju metala, pri čemu se  $\text{Cu}^{2+}$  vezuje za funkcionalne grupe pektina sa znatno većim afinitetom u odnosu na  $\text{Zn}^{2+}$  ili  $\text{Ca}^{2+}$ , što može objasniti veću ukupnu koncentraciju bakra u ovom istraživanju (Dronnet *et al.*, 1996).

U ovom istraživanju pri nižoj koncentraciji metal-acetata u podlozi (200  $\mu\text{M}$ ) kod biljaka izlaganih cinku usvojeno je oko 75% ukupne koncentracije cinka koja je detektovana kod biljaka gajenih pri višoj koncentraciji (700  $\mu\text{M}$ ) istog metala u podlozi. Kod biljaka izlaganih bakru ovaj procenat bio je još veći (približno 80%). Ovakvo smanjenje efikasnosti usvajanja pri višoj koncentraciji metala u podlozi uočeno je i u istraživanjima Brown & Beckett (1985) kod mahovine *R. squarrosus* izlagane kadmijumu, *H. splendens* izlaganog bakru i cinku (Rühling & Tyler, 1970) i

*P. patens* izlagane cinku (Sassmann *et al.*, 2015b). Dati rezultati ukazuju na postojanje saturacione kinetike pri usvajanju cinka i bakra kod vrste *H. cupressiforme*. To podrazumeva da je pri niskim koncentracijama metala u podlozi, brzina akumulacije proporcionalna koncentraciji u podlozi. S druge strane, pri višim koncentracijama metala u podlozi, usvajanje se smanjuje i približava se stabilnoj asimptotskoj biokoncentraciji (Couto *et al.*, 2004). Prema Pickering & Puia (1969) usvajanje cinka kod mahovine *F. antipyretica* sastoji se iz tri faze. U prvoj fazi, koja se veoma brzo odvija, usvajanje metala u najvećoj meri zasniva se na izmenjivačkoj adsorpciji u ćelijskom zidu. Druga i treća, znatno sporija faza, predstavljaju prolazak metala u protoplast ili organele, adsorpcionim procesima i aktivnom akumulacijom i odgovorne su za manje promene u ukupnoj koncentraciji elementa koje se uočavaju pri izlaganju mahovina visokim koncentracijama cinka (Pickering & Puia, 1969). Rezultati u ovoj doktorskoj disertaciji ukazuju da kod mahovine *H. cupressiforme* ukupna koncentracija cinka, ali i bakra, predstavlja rezultat pretežno adsorpcionih tj. katjon-izmenjivačkih procesa karakterističnih za ćelijski zid mahovina, dok manji doprinos predstavlja unutarćelijska frakcija (Pickering & Puia, 1969; Lang & Wernitznig, 2011). Bar u slučaju cinka, ovo je potvrđeno i u istraživanju Sabovljević *et al.* (2018b), gde je fluorescentnim bojama specifičnim za cink najveća koncentracija cinka u biljakama *H. cupressiforme* potvrđena upravo u ćelijskim zidovima, a znatno manje u protoplastima.

Kalijum je esencijalni makroelement i najzastupljeniji katjon u unutrašnjosti biljnih ćelija (Garcia-deblas *et al.*, 2007). Ranija istraživanja kod mahovina pokazala su da je kalijum u najvećem procentu lokalizovan u unutrašnjosti ćelije u normalnim fiziološkim uslovima (Brown & Bates, 1990; Brown & Brūmelis, 1996; Vázquez *et al.*, 1999; Spagnuolo *et al.*, 2011). S druge strane, pokazano je da povišena koncentracija cinka ili bakra u sredinama gde rastu mahovine može dovesti do smanjenja ukupnog sadržaja kalijuma u biljkama (Özdemir *et al.*, 2010). Analiza sadržaja kalijuma u unutarćelijskoj i vanćelijskoj frakciji mahovina izloženih povećanim koncentracijama metala u sredini, omogućava procenu efekta ovih polutanata na integritet membrana i nivo stresa kome su biljke izložene (Spagnuolo *et al.*, 2011).

U ovom istraživanju, sva tri metala (cink, bakar i kadmijum) dovela su do značajnog smanjenja ukupne koncentracije kalijuma u mahovinama, pri čemu je efekat kadmijuma na ovo smanjenje bio najizraženiji. Visoka koncentracija ili veći afinitet metala prelazne grupe za vezivna mesta u apoplastnom prostoru mogu dovesti do disocijacije kalijuma sa katjon-vezujućih mesta prisutnih u apoplastu i smanjenja ukupne koncentracije ovog elementa u analiziranim biljkama (Aničić *et al.*, 2009). Kod vrste *H. splendens* pokazano je da bakar ima naročito jak afinitet za vezivna mesta u ćelijskom zidu i da se nakon vezivanja jako teško uklanja, čak i kada se poveća koncentracija drugih katjona u okruženju (Rühling & Tyler, 1970). S druge strane, u istraživanjima Sorrentino *et al.* (2017) na *Sphagnum palustre* L. i Esposito *et al.* (2012) na *Leptodyctium riparium* Hedw. gajenim u medijumu sa rastućim koncentracijama kadmijuma, potvrđeno je da se kadmijum u najvećoj meri akumulirao u unutarćelijskoj frakciji mahovina. Imajući u vidu ovo, značajno smanjenje koncentracije kalijuma u ovom istraživanju uočeno kod biljaka izalaganih kadmijumu i bakru može ukazivati i na to da je pod uticajem visokih koncentracija ova dva metala došlo do narušavanja integriteta plazmaleme i curenja kalijuma u spoljašnju sredinu (Aničić *et al.*, 2009). Osim toga, toksični metali prisutni u velikoj koncentraciji u podlozi, mogu direktnom kompeticijom za transportere na plazmalemi uticati na smanjenje usvajanja esencijalnih elemenata kao što je kalijum (Clemens, 2001; Bellini *et al.*, 2021). Vázquez *et al.* (1999) ističu da se gubitak  $K^+$  iz unutarćelijske frakcije mahovina pod dejstvom toksičnih metala ne mora odraziti na ukupnu koncentraciju ovog elementa u biljkama, jer se kalijum može vezati za vezujuća mesta u apoplastu. Međutim, u prisustvu povećanih koncentracija dvovalentnih katjona ispitivanih u okviru istraživanja predstavljenih u ovoj disertaciji, vezivanje kalijuma za ćelijski zid biljaka *H. cupressiforme* bilo bi praktično onemogućeno, usled većeg afiniteta dvovalentnih katjona prema funkcionalnim grupama prisutnim u apoplastu (Tessier & Boisvert, 1999). Stoga, veliki gubitak kalijuma kod biljaka izalaganih Cu- i Cd-acetatu iz podloge, bar delimično je posledica izlaska unutarćelijskih zaliha ovog makroelementa. S druge strane, znatno manji gubitak kalijuma pod

uticajem cinka može se objasniti manjim afinitetom ispitivane vrste za vezivanje ovog elementa u apoplastu, što potvrđuju i rezultati u ovom istraživanju.

Kalcijum je esencijalni makroelement biljaka koji u membranama i ćelijskom zidu ima važne strukturne uloge dok istovremeno u citosolu ima ulogu sekundarnog glasnika u brojnim razvojnim i fiziološkim procesima. Visoke koncentracije kalcijuma su citotoksične, te se koncentracija ovog elementa u citosolu ćelija održava u submikromolarnim koncentracijama, uz istovremeno održavanje visoke koncentracije u apoplastu i organelama poput vakuole i endoplazmatičnog retikuluma. Unutarćelijsko povećanje koncentracije kalcijuma smatra se primitivnim, univerzalnim odgovorom na stres, i neophodno je za transdukciju signala i pokretanje adekvatnog fiziološkog odgovora. Međutim, velike amplitude koncentracija kalcijuma ili dugotrajno povećanje koncentracije ovog jona u citosolu dovode do apoptoze ćelija (White & Broadley, 2003; Thor, 2019). Kalcijum je kod mahovina dominantno lokalizovan u apoplastu (Spagnuolo *et al.*, 2011). U ovom istraživanju, kod biljaka *H. cupressiforme* izlaganih pet nedelja bakru ili kadmijumu došlo je do značajnog pada ukupne koncentracije kalcijuma u odnosu na koncentraciju izmerenu kod kontrolnih biljaka. S druge strane, cink je doveo do značajnog povećanja ukupnog sadržaja ovog elementa u mahovinama. Ovakav obrazac uticaja bakra, kadmijuma i cinka na ispitivani parametar detektovan je i kod mahovina *L. riparium* izlaganih povišenim koncentracijama datih metala u podlozi (Esposito *et al.*, 2012). Kod protoneme mahovine *Scopelophila cataractae* gajene 90 dana na podlozi sa bakrom, takođe je zapažena znatno manja ukupna koncentracija kalcijuma nego u kontrolnoj grupi (Konno *et al.*, 2010). Ovi autori zaključili su da je kompeticija između  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Ca}^{2+}$  za vezujuća mesta u apoplastu uzrok uočenih razlika između kontrolnih i tretiranih biljaka. Kao što je već opisano, pektini u najvećoj meri određuju kapacitet i afinitet za vezivanje katjona u ćelijskom zidu, a njihov afinitet za vezivanje bakra značajno je veći od afiniteta prema kalcijumu (Dronnet *et al.*, 1996). Kao i u ovoj doktorskoj disertaciji, značajna pozitivna korelacija između akumulacije cinka i kalcijuma utvrđena je kod biljaka *Pleurozium schreberi* (Willd. ex Brid.) Mitt. sakupljenih iz sredine u kojoj su detektovane povećane koncentracije metala (Kapusta & Godzik, 2013). Istraživanja na vaskularnim biljkama takođe su pokazala da visoke koncentracije cinka u vakuolama i apoplastu epidermalnih ćelija uvek pozitivno korelišu sa koncentracijama kalcijuma u istim delovima ćelije (Dinh *et al.*, 2015).

Pod uticajem kadmijuma u podlozi kod biljaka u ovom istraživanju došlo je do značajnog smanjenja ukupne koncentracije sumpora, dok kod biljaka izlaganih cinku nije bilo značajne promene. Osim toga, iako promena nije bila statistički značajna, kod *H. cupressiforme* gajenog na podlozi sa bakrom, primećen je mali porast ukupne koncentracije S. Analizirajući *P. purum* iz prirode, Varela *et al.* (2018) su pokazali postojanje značajne pozitivne korelacije između povećanog zagađenja sredine toksičnim metalima i koncentracije glutaciona u biljakama. Kapusta & Godzik, (2013) su takođe pokazali da kod *P. schreberi* postoji jaka pozitivna korelacija između ukupne koncentracije bakra i sumpora kod biljaka koje su bile izložene povećanim koncentracijama metala u spoljašnjoj sredini. Prema ovim autorima, ovakvo povećanje sadržaja sumpora posledica je povećane sinteze glutaciona i drugih peptida (derivata glutaciona) koji su bogati sumporom usled njihove uloge u helaciji metala. Bruns *et al.* (2001) su analizirali koncentraciju glutaciona kod 19 vrsta mahovina gajenih pri povećanoj koncentraciji kadmijuma u podlozi u trajanju od dva do 10 dana. Ovi autori su ustanovili da kod 17 vrsta, uključujući *H. cupressiforme*, dolazi do povećanja koncentracije glutaciona ili drugih jedinjenja koja sadrže sumpor. Isti autori u eksperimentima sa mahovinom *F. antipyretica* koja je na isti način izlagana cinku ili bakru, nisu uočili porast koncentracije glutaciona pod uticajem cinka, dok je bakar doveo do značajnog pada ovog peptida. Istražujući obrasce akumulacije metala u biljakama i njihovo hemijsko okruženje, Zhao *et al.* (2014) su zaključili da vrste koje nemaju sposobnost hiperakumulacije metala u znatno većoj meri svoju otpornost prema metalima zasnivaju na jakim ligandima poput tiolnih jedinjenja nego vrste hiperakumulatori. U ovom istraživanju, koncentracije metala u podlozi bile su nekoliko puta od onih u eksperimentima Bruns *et al.* (2001). Moguće je da pri nižim koncentracijama toksičnih metala u ćelijama dolazi do indukcije sinteze tiolnih jedinjenja, dok visoke koncentracije

neesencijalnih metala kao što je kadmijum mogu inaktivirati enzime i negativno uticati na nakupljanje sumpornih jedinjenja. Bruns *et al.* (2001) takođe su pokazali da kod vrste *F. antipyretica* povećana sinteza glutationa zavisi od količine i prirode metala koji je dodat u medijum i mogu biti posledica različitih mehanizma usvajanja i lokalizacije različitih elemenata, što može objasniti i rezultate dobijene u ovom istraživanju.

## **5.7. Koncentracija i distribucija odabranih elemenata u poprečnim presecima gametofora mahovina *H. cupressiforme* i *A. undulatum* izlaganih različitim koncentracijama metala u podlozi**

### **5.7.1. Sadržaj i distribucija odabranih elemenata u poprečnim presecima kauloida biljaka *H. cupressiforme* gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-acetata, Cu-acetata i Cd-acetata u kulturi *in vitro* u uslovima dugotrajnog stresa**

Mehanizme tolerancije na povećane koncentracije metala biljke mogu ispoljiti na ćelijskom, na nivou tkiva ili nivou celog organizma. Savremena istraživanja uglavnom su fokusirana na ispitivanje ćelijskih mehanizma (Pongrac *et al.*, 2010). Iako se mahovine relativno dugo izučavaju u odnosu na njihovu sposobnost akumulacije različitih elemenata iz sredine, manji broj ovih istraživanja fokusirao se na lokalizaciju akumuliranih elemenata u različitim delovima biljaka na supračelijskom nivou (Satake *et al.*, 1988; Esposito *et al.*, 2012; Sassmann *et al.*, 2015b; Antreich *et al.*, 2016; Sabovljević *et al.*, 2018b). Detekcija lokalizacije i kvantifikacija toksičnih metala kod biljaka mogu ukazati na potencijalne načine usvajanja i prenosa ovih elemenata kroz biljku, kao i na moguće mehanizme detoksifikacije i aklimacije biljaka u prisustvu povišenih koncentracija ovih elemenata u sredini (Mesjasz-Przybyłowicz & Przybyłowicz, 2002). Mikro-PIXE tehnika je naročito pogodna za ovakav tip istraživanja jer pruža informacije o lokalizaciji većeg broja elemenata istovremeno u ispitivanom tkivu, njihovoj koncentraciji i preraspodeli između različitih delova, što je ključno za istraživanje strategija tolerancije metala u biološkim sistemima (Pongrac *et al.*, 2010). Prema dostupnoj literaturi, do sada je PIXE tehnika u istraživanjima vezanim za mahovine korišćena jedino pri proceni ukupnog sadržaja metala u ovim biljakama izloženim atmosferskom zagađenju (Ohnuki *et al.*, 2002; Popescu *et al.*, 2006). Rezultati mikro-PIXE analiza u ovoj disertaciji predstavljaju prvi konkretan primer korišćenja ove tehnike za lokalizaciju toksičnih metala i esencijalnih makroelemenata kod mahovina.

Bez obzira na vrstu metala, u ovom istraživanju pokazano je da do usvajanja katjona iz podloge dolazi, kao i da se transport svakog od njih vrši akropetalno duž longitudinalne ose mahovine *H. cupressiforme*. Do ovakvih zapažanja kod drugih vrsta mahovina došli su i Brown & Brümelis (1996), Sidhu & Brown (1996), Antreich *et al.* (2016) i Tabors *et al.* (2004). S druge strane, biljke *H. cupressiforme* izlagane rastućim koncentracijama Zn-, Cu- ili Cd-acetata u podlozi ispoljavaju značajno drugačije obrasce akumulacije ova tri metala.

Cink je dominantno bio lokalizovan u epidermalnom sloju bez obzira na poziciju preseka duž longitudinalne ose kauloida. Specifičnost u obrascu akumulacije ovog elementa na poprečnim presecima bila je pojava nehomogene distribucije u okviru sloja gde je najviše akumuliran – u epidermisu. Sličnu nehomogenost u distribuciji cinka unutar epidermisa detektovali su i Pongrac *et al.* (2010) analizirajući poprečni presek lista hiperakumulatora *Noccaea praecox* (Wulfen) F.K.Mey. (syn. *Thlaspi praecox* Wulf.). U bazalnim i apikalnim presecima mahovina gajenih pri nižoj koncentraciji Zn-acetata u podlozi, koncentracija ovog elementa bila je slična, što upućuje na relativno veliku mobilnost ovog elementa duž longitudinalne ose sloja u kome se najviše akumulira. S obzirom na to da je cink esencijalni mikroelement, moguće je da se povećana akumulacija cinka u apikalnim delovima dešava i aktivno usled intenzivnog rasteñja i metaboličke aktivnosti vršnih delova kauloida (Rühling & Tyler, 1970; Boquete *et al.*, 2014a).

Kod biljaka izlaganih nižoj koncentraciji Cu-acetata u podlozi, presek bazalnog dela biljke sadržao je znatno veću koncentraciju bakra u odnosu na apikalni. Sličan odnos koncentracija između ova dva tipa preseka održan je i kod gametofora koji su gajeni pri višoj koncentraciji Cu-acetata u podlozi. Ovakvi rezultati upućuju na to da se bakar manje efikasno prenosi akropetalno u

poređenju sa cinkom, ali da do longitudinalnog transporta svakako dolazi. Slabija mobilnost bakra, rezultat je formiranja snažnijih veza između bakra i organskih liganada, što otežava izmeštanje i akropetalno kretanje ovih jona nakon inicijalnog vezivanja (Brūmelis & Brown, 1997). I druga istraživanja na mahovinama pokazala su slabiju mobilnost bakra duž kauloida u odnosu na cink i veće koncentracije u bazalnim delovima gametofora ispitivanih vrsta (Rühling & Tyler, 1970; Sidhu & Brown, 1996; Boquete *et al.*, 2014a; Antreich *et al.*, 2016).

Za razliku od cinka, bakar se mogao detektovati na znatno većoj površini na poprečnim presecima biljaka *H. cupressiforme* pri svim primenjenim koncentracijama, s tim što je sadržaj opadao od spoljašnjih delova kauloida ka centru preseka. Proporcionalni pad koncentracije bakra u presecima gornjeg i donjeg dela biljaka izlaganih 700  $\mu\text{M}$  Cu-acetatu, u odnosu na koncentracije u odgovarajućim presecima biljaka izlaganih 200  $\mu\text{M}$  Cu-acetatu, ukazuje na to da je smanjenje koncentracija bakra u ovim presecima uzrokovano narušavanjem procesa usvajanja metala iz podloge. Moguće je da je sličan mehanizam koji dovodi do pojava takozvanih „zona smrti“, kod mahovina izloženih povećanim koncentracijama metala u supstratu, doveo i do pada koncentracije u bazalnom i posledično apikalnom preseku kauloida biljke gajene na podlozi sa dodatkom 700  $\mu\text{M}$  Cu-acetata. „Zone smrti“ predstavljaju fenomen opisan kod različitih vrsta mahovina, gde ćelije biljaka iste vrste pri niskim ili jako visokim koncentracijama metala u okruženju preživaljavaju, dok intermedijarne koncentracije dovode do njihovog oštećenja i odumiranja. Autori istraživanja u kojima je ova pojava detektovana formirali su hipotezu da kada se biljke nađu u supstratu sa jako visokom koncentracijom metala, usled formiranja nepropustljivog precipitacionog sloja sa spoljašnje strane plazmaleme, sprečava se njegovo dalje usvajanje i time štetan efekat na ćeliju (Shaw, 1990; Lang & Wernitznig; 2011; Petschinger *et al.*, 2021). Pokazano je da je bakar kod mahovina dominantno vezan u ćelijskim zidovima i da je njegov afinitet za vezivanje i zadržavanje kada se jednom veže jako veliki u poređenju sa drugim katjonima kao što su  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  (Bisang *et al.*, 2008; Esposito *et al.*, 2012; Antreich *et al.*, 2016). Imajući u vidu navedeno, moguće je da je u ovom istraživanju niža koncentracija Cu-acetata u podlozi omogućila vezivanje ovog elementa za ćelijske zidove epidermalnih i parenhimskih ćelija korteksa, usvajanje u ćelije i međućelijski simplastni transport kroz gametofor mahovine *H. cupressiforme* (Brūmelis & Brown, 1997; Sokołowska *et al.*, 2017). S druge strane, na podlozi sa dodatim 700  $\mu\text{M}$  Cu-acetatom, formiranje tankog precipitata na membranama ćelija dovelo bi do prekida usvajanja i prenosa ovog elementa ka gornjim delovima biljke simplastnim transportom kroz ćelije korteksa. Posledično, usvajanje i prenos bakra bili bi omogućeni preko spoljašnje površine izdanka, odakle bi u delovima biljke iznad podloge bila moguća horizontalna redistribucija ovog elementa.

Na koncentracijskim mapama raspodele kadmijuma poprečnih preseka kauloida vrste *H. cupressiforme*, ovaj element se akumulirao proporcionalno primenjenoj koncentraciji u podlozi, pri čemu su razlike u koncentraciji ovog elementa u različitim delovima istog preseka bile slabo naglašene. Ovakvi rezultati ukazuju da se kadmijum nakon popunjavanja katjon-izmenjivačkih mesta u apoplastu i dalje akumulira u biljkama, verovatno na račun unutarćelijske frakcije. Pošto kod biljaka nisu otkriveni transporteri specifični za kadmijum, smatra se da je njegov ulazak u ćeliju nekontrolisan, a koncentracija u biljci odražava koncentracije u podlozi (Pérez-Llamazares *et al.*, 2011; Basile *et al.*, 2012). Kao i u slučaju bakra, postojala je značajna razlika u sadržaju kadmijuma u bazalnim i apikalnim delovima gametofora, pri čemu su znatno veće koncentracije bile u bazalnim segmentima. Rastenje i izduživanje gametofora mahovina zavisi samo od aktivnosti apikalnog dela izdanka, koji ujedno predstavlja i najmlađi deo biljke. Ovaj deo kauloida sadrži ćelije sa slabije razvijenim ćelijskim zidovima i manjim CEC, te svi ovi faktori, zajedno sa dužim vremenom izlaganja bazalnog dela kauloida metalima iz podloge mogu dovesti do stvaranja velikog koncentracionog gradijenta metala duž izdanka (Boquete *et al.*, 2014a; Antreich *et al.*, 2016). Dodatno, usled toksičnih koncentracija metala u podlozi, može doći do oštećenja ćelija u starijim (bazalnim) delovima gametofora i izlaganja novih mesta za vezivanje katjona koja omogućavaju dodatnu akumulaciju metala u ovom regionu (Leblond *et al.*, 2004).



Razlike u raspodeli metala kao što su cink, bakar i kadmijum duž kauloida, mogu donekle upućivati na razlike u otpornosti ispitivane vrste prema datom metalu. Kod *P. patens* gajene na podlozi sa sulfatnim i hloridnim solima bakra, raspodela ovog elementa duž izdanka bila je uniformna, dok je u slučaju dve vrste koje se smatraju otpornijim na povećane koncentracije toksičnih metala (*M. elongata* i *P. drummondii*), bakar u povišenoj koncentraciji bio akumuliran samo u donjim delovima izdanka (Antreich *et al.*, 2016). S druge strane, u istraživanju ovih autora ne može se isključiti mogućnost da su sinergistički ili antagonistički efekti različitih vrsta anjona vezanih za bakar uticali na obrasce raspodele ovog elementa u mahovinama.

Sokołowska *et al.* (2017) su primenom fluorescentnih boja za simplast i apoplast pokazali da se kod pleurokarpne mahovine *H. splendens* transport apoplastnog obeleživača ka vrhu biljke odvija dominantno kroz epidermis. U korteksu izdanka ova boja je bila uočljiva jedino u ćelijama pri bazi biljke. Isti autori pokazali su da se simplastni obeleživači prenose i ćelijama korteksa i ćelijama epidermisa u bazalnom delu biljke, sporim međućelijskim transportom, ali da do vrha biljke boja stiže jedino kroz ćelije korteksa. Upoređivanjem ovih rezultata sa koncentracijskim mapama raspodele cinka kod vrste *H. cupressiforme* u ovom istraživanju, može se zaključiti da se cink od baze ka vrhu biljke prenosi dominantno apoplastnim putem, kroz epidermis gametofora, dok se u apikalnom regionu može redistribuirati simplastnim putem i ka unutrašnjosti kauloida. Ova redistribucija može ukazivati na veću potrebu metabolički aktivnog vrha za ovim elementom (Rühling & Tyler, 1970; Boquete *et al.*, 2014a). Raspodela kadmijuma na poprečnim presecima gametofora *H. cupressiforme* u ovom istraživanju ukazuje na to da se usvajanje i transport ovog elementa iz podloge do vrha biljke odvija i apoplastnim i simplastnim putem, pri čemu je u donjim delovima kauloida međućelijski transport koji uključuje simplast znatno intenzivniji nego u apikalnim delovima. Na osnovu koncentracijskih mapa raspodele bakra kod vrste *H. cupressiforme* u ovom istraživanju i rezultata istraživanja koje su sprovedi Sokołowska *et al.* (2017) može se zaključiti da se prenos bakra kroz kauloid iz podloge takođe vrši kombinovano – putem simplasta i putem apoplasta, ali da udeo ova dva puta zavisi od koncentracije metala u podlozi. Pri nižim koncentracijama bakra u podlozi, veći je udeo međućelijskog simplastnog transporta, dok se pri višim, transport dominantno odvija apoplastnim putem.

Na udeo različitih puteva transporta metala kroz mahovine može značajno uticati hidratisanost sredine i izdanaka, pri čemu veća hidratisanost pospešuje prenos rastvorenih metala u vodi preko spoljašnjih površina gametofora, kapilarnim kretanjem (Proctor, 2000).

U ovom istraživanju, kod biljaka gajenih na podlogama sa kadmijumom i bakrom, koncentracije kalijuma u bazalnim presecima kauloida *H. cupressiforme* bile su znatno niže u poređenju sa koncentracijama u apikalnim presecima. S obzirom na to da je sadržaj bakra i kadmijuma opadao od baze ka vrhu biljke, može se zaključiti da su ova dva elementa imala negativan uticaj na sadržaj kalijuma, verovatno preko mehanizama opisanih u Clemens (2001) i Bellini *et al.* (2021). Različita istraživanja na mahovinama potvrdila su da između delova gametofora može doći do relokalizacije esencijalnih elemenata u toku razvića kao i da stariji i odumirući delovi, mogu biti izvor nutrijenata mlađim rastućim tkivima (Brūmelis *et al.*, 2000; Bisang *et al.*, 2008; Sokołowska *et al.*, 2017). Kod mahovine *Scorpiurum circinatum*, Basile *et al.* (2012) pokazali su da pod dejstvom visokih koncentracija bakra, kadmijuma ili cinka dolazi do gubitka selektivne permeabilnosti membrana. Znatno veće koncentracije bakra i kadmijuma u bazalnim nego u apikalnim delovima kauloida *H. cupressiforme* u ovom istraživanju, verovatno su na sličan način uticale na membranske sisteme. Ovo bi dovelo do izlaganja novih mesta za izmenu katjona unutar ćelija, koja su inače bila zaštićena plazmalemom, te bi se u kompeticiji sa divalentnim katjonima kao što su  $Cd^{2+}$  i  $Cu^{2+}$ , kalijum u jako malom procentu zadržavao (Brown & Buck, 1978). Prema Brūmelis & Brown (1997) i Bisang *et al.* (2008), u ovakvim uslovima kalijum se ne bi zadržavao ni u vanćelijskoj apoplastnoj frakciji već bi dominantno ulazio u tanki sloj vodenog rastvora koji se nalazi na spoljašnjoj površini ili u unutrašnjosti izdanka (međućelijski ratvor), odakle bi se mogao kretati na gore dejstvom evapotranspiracije i dovesti do uočenih razlika u koncentracijama kalijuma između bazalnih i vršnih delova kauloida.

Obrnut odnos koncentracija kalijuma bazalnog i apikalnog dela uočen je kod biljaka gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-acetata, koji je imao tendenciju ravnomerne distribucije duž kauloida. Kalijum je neophodan za funkcionisanje brojnih enzima u biljkama i uključen je u regulaciju obrasca akumulacije metabolita u višim biljkama, utičući na njihove finalne koncentracije. Kod biljaka sa dovoljnom količinom kalijuma, povećana je sinteza jedinjenja sa velikom molekulskom masom poput proteina, skroba i celuloze, dok se istovremeno smanjuje koncentracija jedinjenja male molekulske mase, poput rastvorljivih šećera, organskih kiselina, amino-kiselina i amida u biljnim tkivima (Wang *et al.*, 2013). Jedinjenja male molekulske mase učestvuju u uklanjanju slobodnih jona bakra, cinka i kadmijuma u ćelijama (Maret & Moulis, 2013; Aguirre & Pilon, 2016). Moguće je da smanjenje koncentracije kalijuma u apikalnim delovima biljaka izloženih Zn-acetatu, predstavlja deo aktivnog odgovora kojim se reguliše nakupljanje protektivnih jedinjenja, kako bi se zaštitio vrh biljke i sprečilo njeno odumiranje. Veće koncentracije peptida bogatih sumporom kod mahovina izlaganih povećanim koncentracijama metala potvrđene su u istraživanjima koja su vršili Bruns *et al.* (2001) i Varela *et al.* (2018). Povećana koncentracija sumpora u apikalnim delovima biljaka *H. cupressiforme* izlaganih cinku detektovana je i u ovom istraživanju i može ukazivati da su pri istoj koncentraciji cinka u različitim delovima biljke aktuelni različiti protektivni mehanizmi. Petschinger *et al.* (2021) su pokazali da vrste mahovina koje imaju deblje ćelijske zidove i izdužene ćelije, pri istoj koncentraciji metala u okruženju, imaju veću otpornost nego vrste sa tankim zidovima i okruglastim ćelijama. Na nivou gametofora *H. cupressiforme*, ćelije sa razvijenijim i zrelijim zidovima, koje se nalaze pri bazi izdanka, mogle bi omogućiti vezivanje veće količine cinka u apoplastnom prostoru (Sabovljević *et al.*, 2018b), dok bi se uklanjanje ovog elementa u apikalnim delovima biljke moglo vršiti zahvaljujući protektivnim helirajućim jedinjenjima male molekulske mase.

U ovom istraživanju, koncentracije kalcijuma određene mikro-PIXE tehnikom kod preseka biljaka gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-, Cu- ili Cd-acetata u odnosu na koncentracije istog elementa u odgovarajućim poprečnim presecima kontrolnih grupa bile su značajno veće. Osim toga, regioni povećane koncentracije toksičnih metala duž biljke poklapali su se sa regionima povećane koncentracije kalcijuma. Kod klijanaca *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (var. Columbia) gajenih na podlozi sa 200  $\mu$ M kadmijumom, pokazano je da dodatak kalcijuma u podlogu značajno povećava preživljavanje ćelija korena, kao i da smanjuje inhibitorne efekte kadmijuma na rast biljaka. Osim toga, sadržaj kadmijuma u biljkama opao je za trećinu u uslovima kada je u podlogu za gajenje bio dodat kalcijum. Autor tog istraživanja zaključio je da usled kompeticije ova dva jona dolazi do smanjenog influksa štetnog metala (Suzuki, 2005). U drugim istraživanjima pokazano je da u uslovima stresa izazvanog metalima kalcijum ima važnu ulogu u održavanju aktivnosti antioksidativnih enzima, smanjenju lipidne peroksidacije membrana i pospešivanju ključnih biohemijjskih i fizioloških procesa biljnih ćelija (Mukta *et al.*, 2019). U ovom istraživanju, sve biljke gajene su na hranljivim podlogama koje su sadržale  $(\text{Ca}(\text{NO}_3)_2)$ . Stoga, dobijeni rezultati ukazuju da kod mahovine *H. cupressiforme*, u uslovima povećane koncentracije Zn-, Cu- i Cd-acetata u podlozi, kalcijum može imati značajnu ulogu u smanjenju toksičnih efekata ovih elemenata u biljakama.

### **5.7.2. Sadržaj i distribucija odabranih elemenata u poprečnim presecima gametofora *A. undulatum* gajenih na podlogama sa dodatkom Zn-acetata i Cu-acetata u kulturi *in vitro* u uslovima dugotrajnog i kratkotrajnog stresa**

Kauloidi mahovine *A. undulatum* u ovom istraživanju, pokazali su znatno manji kapacitet za akumulaciju cinka iz podloge, u poređenju sa kauloidima *H. cupressiforme*. U zonama kauloida u kojima su detektovane najveće koncentracije ovog elementa kod dve mahovine, pleurokarpni *H. cupressiforme* imao je preko 100 puta veću koncentraciju cinka, u odnosu na *A. undulatum*. Ovo je u skladu sa rezultatima istraživanja Sabovljević *et al.* (2018b). Na presecima bazalnih delova kauloida biljaka *A. undulatum* gajenih na podlogama sa povećanom koncentracijom Zn-acetata, ovaj element bio je dominantno zastupljen u epidermisu i spoljašnjem sloju korteksa. S druge strane, na preseku apikalnog dela gametofora cink je bio prisutan u sva tri anatomski različita dela -

epidermisu, korteksu i hadromu. Ovakvi rezultati potvrđuju veliku mobilnost cinka unutar kauloida *A. undulatum*, kako duž longitudinalne ose, gde je njegovo kretanje ka vršnim regionima potpomognuto hidroidima, tako i lateralno između različitih slojeva kauloida, gde simplastni transport može imati značajnu ulogu (Sokołowska *et al.*, 2017). Leblond *et al.* (2004) zaključili su da veća koncentracija cinka u vršnim delovima mahovine *P. purum* predstavlja posledicu intenzivnih metaboličkih procesa u ovom delu biljke. S druge strane, redistribucija elemenata unutar gametofora mahovine može predstavljati strategiju za smanjenje efektivne koncentracije metala kojoj su pojedinačna tkiva izložena. Kao i kod vrste *H. cupressiforme*, kod biljaka *A. undulatum* gajenih na podlogama sa dodatim Zn-acetatom, veća koncentracija kalijuma bila je u bazalnim presecima, dok je kalcijum kolokalizovao sa cinkom.

Iako je bakar generalno manje mobilan u tkivima mahovina od cinka (Sidhu & Brown, 1996), na osnovu mapa njegove raspodele u gametoforima mahovine *A. undulatum*, može se zaključiti da se ovaj element usvaja iz podloge i prenosi kroz biljku kako lateralno tako i akropetalno. Analizom mapa može se zaključiti da bakar do vršnih delova kauloida *A. undulatum* stiže pretežno hidroidima hadroma, dok su u inicijalno usvajanje iz podloge uključene i parenhimske ćelije kore i epidermalne ćelije. Osim u hidroidima kauloida, zone povećane koncentracije bakra uočavaju se i u regionu koste filoida što upućuje na povezanost ovih struktura i njihovu aktivnu ulogu u transportu mineralnih elemenata iz podloge. Brodribb *et al.* (2020) su pokazali da mahovina *P. commune* (Polytichaceae), ima sposobnost efikasnog kontinuiranog prenosa vode iz podloge kroz hidroide do vršnih delova biljke i listova, na način koji je donekle analog prenosu vode kroz ksilem vaskularnih biljaka. Postojanje funkcionalnog endohidričnog transporta potvrđeno je i kod pleurokarpne vrste *P. schreberi* koja poseduje slabije diferencirane hidroide u poređenju sa *A. undulatum* (Sokołowska *et al.*, 2017). Ovi autori pokazali su da se u bazalnim delovima gametofora *P. schreberi* usvajanje i transport fluorescentnih boja iz podloge vrši preko parenhimskih ćelija korteksa i hidroida, kao i da u prenosu materija na male distance u ovom delu biljke, plazmodezme i simplast imaju značajnu ulogu, uz apoplastni transport i transport kroz lumen hidroida. Udaljavanjem od baze gametofora, međućelijski simplastni transport kod *P. schreberi* je prestajao, a boje su dominantno detektovane u hadromu, gde su se u zavisnosti od afiniteta za vezivanje različitih liganada, kretale kroz apoplast ili lumen hidroida do vršnih delova gametofora, gde su ponovo izlazile iz hidroida u okolne parenhimske ćelije. Zajedno sa rezultatima Brodribb *et al.* (2020) i Sokołowska *et al.* (2017), rezultati ovog istraživanja vezano za vrstu *A. undulatum* predstavljaju značajnu potvrdu postojanja endohidričnog transporta supstanci kod mahovina. Smatra se da NADPH oksidaza i jonski kanali za kalcijum participiraju u formiranju "regulatornog centra" koji je odgovoran za percepciju, transdukciju i kodiranje stresnih stimulusa, i koji određuju tip i amplitudu ćelijskog odgovora na dati stresogeni faktor (Demidchik, 2015).

#### **5.8. Ramanova spektroskopija filoida mahovina *H. cupressiforme* i *A. undulatum* gajenih na podlogama sa dodatkom različitih koncentracija Zn-acetata i Cu-acetata u kulturi *in vitro***

Ramanovi spektri analiziranih filoida snimljeni u regionu od 200-1800  $\text{cm}^{-1}$  korišćeni su za identifikaciju glavnih funkcionalnih grupa i karakterističnih molekularnih otisaka jedinjenja karakterističnih za filoide mahovina *A. undulatum* i *H. cupressiforme*, kao i za njihov odgovor na rastuće koncentracije Zn-acetata ili Cu-acetata u podlozi u eksperimentima sa kratkotrajnim i dugotrajnim stresom.

U spektrima filoida apikalnih i središnjih delova svih biljaka vrsta *A. undulatum* i *H. cupressiforme* analiziranih Ramanovom spektroskopijom u ovom istraživanju, detektovano je prisustvo dominantnih pikova za koje je utvrđeno da potiču od molekularnih vibracija karotenoida (Merlin, 1985; Schulz & Baranska, 2007; Gall *et al.*, 2015; Ibarrondo *et al.*, 2016; Horiue *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020). Ovi pikovi formiraju karakterističnu sekvencu signala opadajućeg intenziteta ( $\nu_1 - \nu_4$ ) i uočavaju se na pozicijama 1518-1522, 1152-1156, 1000-1009 i oko 956  $\text{cm}^{-1}$ . Prvi, najintenzivniji pik, pripisuje se vibracijama istezanja dvostrukih veza (C=C) u polienskom lancu karotenoida ( $\nu_1$  modalitet), i tipično se nalazi u regionu talasnih brojeva od 1490-1550  $\text{cm}^{-1}$

(Schulz & Baranska, 2007). Njegova tačna pozicija predstavlja direktni marker dužine konjugovanih lanaca pobuđenih karotenoida, i on se u Ramanovom spektru sa povećanjem stepena konjugacije pomera ka manjim talasnim brojevima. Njegova precizna lokalizacija u manjoj meri zavisi i od bočnih grupa i savijanja pod uticajem drugih jedinjenja u biljnoj ćeliji (Schulz & Baranska, 2007). Pik koji se uočava u spektrima filoida u regionu  $1152-1156\text{ cm}^{-1}$  rezultat je kombinacije vibracija istezanja jednostukih (C-C) veza u polienskom lancu (modalitet  $v_2$ ). U strukturi ovog pika vide se manji satelitni pikovi koji predstavljaju senzitivni otisak konfiguracije karotenoida, dok pozicija glavnog pika zavisi i od prisustva i pozicija metil grupa duž lanca (Merlin, 1985; Gall *et al.*, 2015; Vitek *et al.*, 2020). U regionu od  $1000$  do  $1009\text{ cm}^{-1}$  spektara svih apikalnih i središnjih filoida uočava se pik srednjeg intenziteta koji potiče od planarno ljujlajućih vibracija (eng. in-plane rocking vibrations) metil grupa, vezanih za konjugovani lanac, zajedno sa savijanjem u ravni susednih C-H (modalitet  $v_3$ ). Novija istraživanja ukazuju da je ovaj pik senzitivan na konformaciju prstenova na krajevima cikličnih karotenoida (Gall *et al.*, 2015). Četvrti pik na poziciji  $956\text{ cm}^{-1}$ , relativno je niskog intenziteta i potiče od pokreta njihanja (eng. wagging motions) C-H van ravni u kombinaciji sa torzijama C=C (modalitet  $v_4$ ). Iako je najčešće nižeg intenziteta u odnosu na ostala tri, u drugim istraživanjima pokazano je da u uslovima molekularnih distorzija oko C-C veza prilikom vezivanja za druge molekule njegov intenzitet može biti blizu intenziteta  $v_1$  modaliteta (Gruszecki *et al.*, 2009; Gall *et al.*, 2015; Macernis *et al.*, 2015). Pikovi karakteristični za karotenoide identifikovani su i u spektrima filoida bazalnih regiona biljaka u većini tretmana u ovom istraživanju. Oni nisu bili prisutni jedino u spektrima bazalno pozicioniranih filoida biljaka obe ispitivane vrste gajenih pri najvećoj koncentraciji Cu-acetata u podlozi u uslovima dugog stresa, što može ukazivati na to da je u njima došlo do potpunog gubitka ovih pigmenta. Ramanovi spektri svih filoida na apikalnoj poziciji u ovom istraživanju nisu se značajno razlikovali, ni u odnosu na poziciju signala poreklom od molekulskih vibracija karotenoida, ni u odnosu na njihov intenzitet. To znači da bez obzira na vrstu mahovine, koncentraciju i vrstu metala u podlozi i dužinu izlaganja nisu postojale značajne strukturne, a moguće ni razlike u koncentraciji ovih pigmenta u apikalnim delovima biljaka. Spektri filoida na središnjoj poziciji gametofora imali su veći stepen varijabilnosti među tretmanima, koja se ogledala pre svega u razlikama u intenzitetu signala kao posledice različite koncentracije pigmenta u filoidima.

Prema Baranski *et al.* (2005) karotenoidi sa 11 konjugovanih dvostrukih veza u glavnom polienskom lancu u Ramanovom spektru imaju  $v_1$  pik na oko  $1510\text{ cm}^{-1}$ , dok će pozicija ovog pika kod karotenoida sa 9 konjugovanih dvostrukih veza u glavnom polienskom lancu biti u spektralnom regionu od  $1517$  do  $1526\text{ cm}^{-1}$ . Na osnovu simetričnosti i pozicije  $v_1$  pika u spektrima analiziranih filoida u ovom istraživanju, zaključeno je da kod obe ispitivane vrste mahovina, nezavisno od tretmana, dominantnu grupu karotenoida čine karotenoidi sa 9 konjugovanih C=C veza u glavnom polienskom lancu (Withnall *et al.*, 2003; Baranski *et al.*, 2005). Prema Gómez Gómez *et al.* (2016) najzastupljenije karotenoide kod mahovina predstavljaju lutein, zeaksantin,  $\beta$ -kriptoksantin, i  $\beta$ -karoten. Poređenjem Ramanovih spektara dobijenih u ovom i istraživanjima drugih autora u kojima je korišćen laser iste ekscitacione talasne dužine ( $532\text{ nm}$ ) može se zaključiti da dominantni pikovi karotenoida kod ispitivanih mahovina u ovoj doktorskoj disertaciji mogu poticati od zeaksantina i  $\beta$ -karotena (Ruban *et al.*, 2001; Maguregui *et al.*, 2012; Ibarondo *et al.*, 2016; Vitek *et al.*, 2020). Zbog integracije spektara snimljenih u tri različite tačke filoida na istoj poziciji duž gametofora kod tri različite biljke istog tretmana, potencijalne razlike u lokaciji signala  $v_1$  u polaznim spektrima neće biti uočljive u reprezentativnom finalnom Ramanovom spektru, te jednoznačno određivanje svih vrsta karotenoida u uzorku na osnovu vizuelnog pregledanja spektara nije moguće.

PC analiza svih Ramanovih spektara bazalno pozicioniranih filoida mahovina *A. undulatum* pokazala je da se na osnovu PC1 ose izdvaja grupa filoida biljaka gajenih na podlogama sa dodatkom  $700\text{ }\mu\text{M}$  Cu-acetata u oba tipa eksperimenata, i druga grupa koju čine svi ostali spektri. Pikovi komponenti koje najviše doprinose odvajanju prve grupe identifikovani su na pozicijama  $1445$  i  $1583\text{ cm}^{-1}$ . Pik na oko  $1440-1445\text{ cm}^{-1}$  karakterističan je za alifatična jedinjenja i potiče od

savijanja  $-\text{CH}_2$  zasićenih veza (Samek *et al.*, 2010; Sanchez *et al.*, 2020; Payne & Kourouski, 2021). Porast intenziteta pika na ovom talasnom broju proporcionalan je broju zasićenih C-C veza u masnim kiselinama i lipidima biljnih ćelija (De Gelder *et al.*, 2007; Samek *et al.*, 2010; Mateu *et al.*, 2014; 2016). Mahovine se generalno karakterišu velikim procentom nezasićenih masnih kiselina sa četiri i pet dvostrukih veza (Guschina & Harwood, 2002). U istraživanju Guschina & Harwood (2002) pokazano je da dugotrajno izlaganje mahovine *R. squarrosus* povećanim koncentracijama olova u sredini dovodi do smanjenja udela nezasićenih masnih kiselina sa tri i više dvostrukih veza, i povećava zastupljenost oleinske, linoleinske i palmitinske kiseline. Ovakvi rezultati u skladu su i sa rezultatima Ramanove spektroskopije dobijenim u ovom istraživanju za bazalno pozicionirane filoide vrste *A. undulatum* pod uticajem najviše koncentracije Cu-acetata u podlozi i ukazuju na to da pod dejstvom toksičnih metala dolazi do promena u lipidnom metabolizmu mahovina. Povećani intenzitet pika na oko  $1445\text{ cm}^{-1}$  u Ramanovim spektrima bazalnih filoida biljaka *A. undulatum* tretiranih najvećom koncentracijom Cu-acetata može se dodatno povezati i sa nedostatkom esencijalnih makroelemenata. Kod vaskularnih biljaka pokazano je da do povećanja signala u ovom spektralnom regionu može doći u uslovima deficijencije esencijalnih elemenata, kao i kada su biljke izložene biotičkom stresu (Sanchez *et al.*, 2020; Payne & Kourouski, 2021).

Drugi pik (na poziciji  $1583\text{ cm}^{-1}$ ) karakterističan za grupu bazalnih filoida biljaka izlaganih najvećoj koncentraciji bakra može se pripisati C=C savijajućem modalitetu fenilalanina (Movasaghi *et al.*, 2007). Osim toga, region Ramanovog spektra od  $1550$  do  $1588\text{ cm}^{-1}$  smatra se marker-regionom glikozilovanih flavonola (Gamsjaeger *et al.*, 2011). Pikovi koji su najviše doprineli odvajanju druge grupe bazalnih filoida vrste *A. undulatum* u odnosu na PC1 osu nalaze se na pozicijama 1003, 1152 i 1518 i identifikovani su kao pikovi poreklom od karotenoida (Ibarrondo *et al.*, 2016; Vitek *et al.*, 2020). Ovakvi rezultati u skladu su sa rezultatima biohemijskih analiza ukupnih koncentracija karotenoida u mahovinama, gde je bakar doveo do značajnog gubitka sadržaja ovih pigmenata.

Na osnovu druge PC ose kod bazalno pozicioniranih filoida biljaka *A. undulatum* jasno se izdvojila grupa poreklom od biljaka koje su izlagane povišenim koncentracijama Zn-acetata- i Cu-acetata u podlozi u toku kraćeg perioda, u odnosu na grupu svih ostalih bazalnih filoida. Pikovi sa najvećim doprinosom na izdvajanje prve grupe nalaze se na pozicijama  $1144$  i  $1510\text{ cm}^{-1}$ , dok se druga grupa odvajala na osnovu pikova na poziciji  $1164$  i  $1529\text{ cm}^{-1}$ . Nakon *in situ* analize pigmenata u tkivima *Viola × wittrockiana*, Gamsjaeger *et al.* (2011) su zaključili da spektralni region od  $1140$  do  $1172\text{ cm}^{-1}$  predstavlja pouzdan marker prisustva karotenoida, dok pozicija  $v_1$  modaliteta karotenoida od  $1509$  do  $1529$  može omogućiti identifikaciju prisutnih vrsta karotenoida u odnosu na dužinu polienskog lanca. Prema Robert (1999) modaliteti  $v_1$  i  $v_2$   $\beta$ -karotena u osnovnom stanju nalaze se na  $1529$  odnosno  $1164\text{ cm}^{-1}$ , dok se njegov prelazak u tripletno stanje karakteriše pomeranjem  $v_1$  pika na poziciju  $1509\text{ cm}^{-1}$  uz istovremenu modifikaciju položaja  $v_2$  ka manjim talasnim brojevima. U ovom istraživanju, intenzivni pik na  $1510\text{ cm}^{-1}$  kod grupe bazalnih filoida biljaka izlaganih kraći vremenski period povećanim koncentracijama Zn- i Cu-acetata u podlozi, ukazuje na dominantno prisustvo karotenoida sa 11 konjugovanih dvostrukih veza u polienskom lancu ili da se  $\beta$ -karoten pretežno nalazi u tripletnom stanju (Robert, 1999; Baranski *et al.*, 2005; Vitek *et al.*, 2020). Pokazano je da su veća dužina polienskog lanca i viši stepen konjugacije povezani sa većim kapacitetom za uklanjanje ili sprečavanje nastanka ROS u biljnim ćelijama (Vitek *et al.*, 2020). Osim toga, tripletno stanje karotenoida u hloroplastima u vezi je sa njihovom zaštitnom ulogom - gašenje tripletnog stanja hlorofila triplet-triplet energetskim transferom i sprečavanje nastanka  $^1\text{O}_2$  (Burke *et al.*, 2000; Havaux, 2014). Ovakvi rezultati ukazuju da kod biljaka izlaganih kratkotrajnom stresu metalima karotenoidi aktivno učestvuju u zaštiti od toksičnih efekata cinka i bakra.

Nakon PC analize spektara dobijenih snimanjem bazalnih filoida kod vrste *H. cupressiforme*, utvrđeno je da komponente koje objašnjavaju najveći deo varijabilnosti utiču na izdvajanje grupe filoida biljaka izlaganih dugotrajnom stresu Cu-acetatom od ostalih bazalnih filoida. Ove komponente u Ramanovom spektru davale su signal na  $1442\text{ cm}^{-1}$  i  $1569\text{ cm}^{-1}$ . Kao i u



slučaju filoida biljaka *A. undulatum* gajenih na podlogama sa najvećom koncentracijom Cu-acetata u eksperimentima sa kratkotrajnim ili dugotrajnim stresom, ovi pikovi ukazuju na povećanje broja zasićenih veza u alifatičnim jednjenjima (Samek *et al.*, 2010; Payne & Kurouski, 2021) i na prisustvo glikozilovanih flavonola (Gamsjaeger *et al.*, 2011) kod date grupe filoida. Na odvajanje druge grupe po PC1 osi, kao i kod vrste *A. undulatum*, uticali su pre svega pikovi poreklom od karotenoida na pozicijama 1000, 1155 i 1518  $\text{cm}^{-1}$  (Ibarrondo *et al.*, 2016; Vítek *et al.*, 2020). Na samoj PC1 osi, deleći osobine prve i druge grupe filoida, nalazili su se bazalni filoidi biljaka gajenih pri najvećoj koncentraciji bakra u eksperimentima sa kratkotrajnim stresom. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da kod obe vrste mahovina dolazi do pokretanja sličnog odgovora u filodima izloženim povećanoj koncentraciji bakra, koji može uključivati izmene u metabolizmu glikozilovanih flavonola i promenu stepena zasićenosti masnih kiselina i drugih alifatičnih jedinjenja. U uslovima dugotrajnog stresa, bazalni filoidi vrste *H. cupressiforme* osetljiviji su u odnosu na filoide *A. undulatum*, jer se ove promene u njima uočavaju i pri nižoj koncentraciji Cu-acetata u podlozi. Razdvajanje po PC2 osi dalo je manje definisane grupe, gde se bazalni filoidi biljaka gajenih na podlozi sa dodatkom 200  $\mu\text{M}$  Cu-acetata duži vremenski period i biljaka izlaganih u toku kraćeg perioda na podlogama sa dodatkom 700  $\mu\text{M}$  Cu-acetata izdvajaju od svih ostalih filoida po prisustvu pikova na pozicijama 1152 i 1521  $\text{cm}^{-1}$ . Pomeranje  $\nu_1$  pika karotenoida kod ove grupe ka većim talasnim brojevima u odnosu na poziciju istog pika kod druge grupe, može ukazivati na prelazak inicijalnih pigmenata u apokarotenoide, signalne molekule koji se sintetišu u toku razvoja stresnog odgovora u hloroplastima biljaka (Payne & Kurouski, 2021). Vítek *et al.* (2020) pokazali su da izlaganje delova listova *Chenopodium album* L. herbicidu metribuzinu ( $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_5$ ) dovodi do pomeranja pozicije  $\nu_1$  pika sa 1522-1523  $\text{cm}^{-1}$  na oko 1517-1519  $\text{cm}^{-1}$ . Ovi autori su zaključili da razlog, između ostalog, može biti promena udela različitih karotenoida ksantofilnog ciklusa u uzorcima, s obzirom na to da se pozicije njihovih  $\nu_1$  pomeraju ka većim talasnim brojevima počevši od zeaksantina i rastu sa luteinom, violaksantinom i neoksantinom. Pokazano je da u uslovima stresa izazvanog visokim intenzitetom svetlosti u listovima *A. thaliana* dolazi do povećane degradacije  $\beta$ -karotena i povećane produkcije  $\beta$ -apokarotenoida, dok je gubitak ksantofila u ovim uslovima manji (Havaux, 2014). U ovom istraživanju, pomeranje datog pika sa 1518  $\text{cm}^{-1}$  na 1521  $\text{cm}^{-1}$  može značiti da je došlo do sličnih promena kod uzoraka u kojima je bakar doveo do oksidativnog stresa, ali ne i do potpunog gubitka karotenoida.

Karotenoidi poseduju dug ugljovodonični lanac sa sistemom konjugovanih dvogubih veza koji im omogućava apsorpciju u vidljivom delu spektra (Schulz & Baranska, 2007). S obzirom na to da je u ovom istraživanju korišćena ekscitaciona talasna dužina od 532 nm (vidljivi deo spektra), koja je u rezonanci sa  $S_0 \rightarrow S_2$  ( $\pi-\pi^*$ ) elektronskim prelazom karotenoida, pikovi ovih jedinjenja su selektivno pojačani više od 10000 puta. Zbog ovoga, nerezonantni pikovi koji potiču od drugih biomolekula znatno su slabiji ili maskirani izraženo visokim pikovima karotenoida (Jorge Villar & Edwards, 2006; Horiue *et al.*, 2020). Iako i hlorofili apsorbuju u vidljivom delu elektromagnetnog spektra, ekscitaciona talasna dužina od 532 nm nije pogodna za njihovu analizu, naročito u prisustvu karotenoida, već se u ovu svrhu koriste laseri veće talasne dužine (npr. 785 nm) (Baranski *et al.*, 2005; Jorge Villar & Edwards, 2006).

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu svih dobijenih rezultata mogu se izneti sledeći zaključci:

Vrsta *H. cupressiforme* imala je znatno veći stepen produkcije novih izdanaka u poređenju sa *A. undulatum*, kako u kontroli, tako i u svim eksperimentalnim tretmanima.

Na osnovu promene morfoloških parametara pri delovanju različitih metala, može se zaključiti da cink ima najmanji negativan efekat kod obe analizirane vrste mahovina. Akrokarpna vrsta *A. undulatum* ispoljava značajniju osetljivost na bakar, dok su najnegativniji efekti kod pleurokarpne *H. cupressiforme* mahovine uočeni pod dejstvom kadmijuma. Efekat različite dužine trajanja stresa na produkciju novih izdanaka bio je statistički značajan kod *H. cupressiforme*, ali ne i kod *A. undulatum*.

Cink uzrokuje najmanje promene u sadržaju fotosintetičkih pigmenata kod obe vrste mahovina. U tretmanima sa nižom koncentracijom metala u podlozi, bakar ima najnegativniji uticaj na koncentraciju hlorofila *a*, *b* i karotenoida, dok u tretmanima sa višom koncentracijom metala najnegativniji efekat na sadržaj svih analiziranih pigmenata ispoljava kadmijum. Promene koncentracija hlorofila *a*, *b* i karotenoida imaju isti trend kod obe vrste mahovine tretirane istim metalom. Trajanje stresa kod vrste *H. cupressiforme* ne dovodi do značajnih razlika u koncentracijama bilo kog od ispitivanih pigmenata, dok se kod *A. undulatum* efekat različitog trajanja stresa ispoljava na način da je koncentracija hlorofila *b* i karotenoida značajno veća kod biljaka izlaganih dugotrajnom stresu.

Povećane koncentracije bakra u podlozi kod obe vrste mahovina uzrokuju povećanu produkciju  $H_2O_2$ , dok su pod uticajem cinka ovakve promene uočene samo kod vrste *A. undulatum*, pri čemu cink indukuje produkciju  $H_2O_2$  u većoj meri u odnosu na bakar. S druge strane, na osnovu produkcije MDA u čitavim biljakama i smanjenja udela nezasićenih masnih kiselina u filoidima gametofora, može se zaključiti da kod obe vrste mahovina bakar izaziva izraženija oksidativna oštećenja u poređenju sa cinkom. Dugotrajni stres kod vrste *A. undulatum* ima veći uticaj na produkciju  $H_2O_2$  i MDA nego kratkotrajni.

Vrsta *A. undulatum* poseduje veći antioksidativni kapacitet u poređenju sa vrstom *H. cupressiforme*, pri čemu fenoli kod vrste *A. undulatum* imaju znatno veću ulogu u antioksidativnoj zaštiti nego kod *H. cupressiforme*. Dugotrajni stres Cu-acetatom kod obe vrste mahovina dovodi do smanjenja koncentracije ukupnih fenolnih jedinjenja, dok se efekat Zn-acetata razlikuje između vrsta. Kod *H. cupressiforme* cink uzrokuje povećanje, a kod *A. undulatum* smanjenje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja, pri čemu se koncentracija fenola kod vrste *A. undulatum* pri svim tretmanima održava na nekoliko puta višem nivou nego što je to slučaj kod vrste *H. cupressiforme*.

Kod akrokarpne vrste, peroksidaze klase III imaju značajnu ulogu u antioksidativnom odgovoru na povećane koncentracije bakra u podlozi bez obzira na dužinu stresa. S druge strane, kod iste vrste do indukcije peroksidaza pod uticajem cinka dolazi samo pri nižoj koncentraciji Zn-acetata u podlozi.

*Hypnum cupressiforme* ima sposobnost usvajanja značajne količine cinka, bakra i kadmijuma iz podloge, kao i njihove akropetalne translokacije duž longitudinalne ose gametofora. Obe vrste esencijalnih mikronutrijenata kod *H. cupressiforme* karakterišu se saturacionom kinetikom akumulacije, ali se pri istim uslovima gajenja bakar znatno efikasnije akumulira.

Obrasci akumulacije cinka, bakra i kadmijuma unutar gametofora *H. cupressiforme* značajno se razlikuju. Cink se primarno akumulira u epidermisu kauloida uz formiranje specifičnih nehomogenih zona znatno povećane koncentracije unutar ovog sloja. Cink se od baze ka vrhu biljke prenosi apoplastnim putem, ali dominantno i ektohidričnim rastvorom (kroz epidermis gametofora i spoljašnom površinom), dok se u apikalnom regionu može vršiti redistribucija ovog elementa

simplastnim putem ka unutrašnjosti kauloida. Veći sadržaj cinka u apikalnom regionu biljaka *H. cupressiforme* ukazuje na njegov lakši unos u mlade i još nedovoljno diferencirane ćelije apikalnog dela mahovine.

Kod vrste *H. cupressiforme* bakar se manje efikasno prenosi u apikalne delove kauloida u poređenju sa cinkom, pri čemu je dominantno lokalizovan u korteksu i epidermisu izdanka. Kadmijum se, poput bakra, manje efikasno prenosi u vršne delove kauloida u odnosu na cink, ali je lateralno mobilniji u poređenju sa druga dva elementa.

Kod vrste *H. cupressiforme* bakar i kadmijum negativno utiču na ukupni sadržaj esencijalnih makronutrijenata, kalijuma i kalcijuma. Povećane koncentracije cinka u podlozi dovode do povećanja ukupne koncentracije kalcijuma i smanjenja ukupne koncentracije kalijuma kod ove pleurokarpne mahovine.

Kod biljaka *H. cupressiforme* u uslovima povećane koncentracije Zn-, Cu- i Cd-acetata u podlozi, prisustvo kalcijuma u podlozi može doprineti smanjenju toksičnih efekata ovih metala.

Kauloidi vrste *A. undulatum* poseduju nizak kapacitet za akumulaciju cinka u poređenju sa vrstom *H. cupressiforme*. Obrasci raspodele cinka i bakra unutar gametofora akrokarpne vrste razlikuju se između apikalnih i bazalnih delova izdanka, ali i u odnosu na obrasce raspodele istih elemenata kod gametofora vrste *H. cupressiforme*. U apikalnim delovima, cink i bakar se pretežno nalaze u regionu hadroma i epidermisu. Distribucija metala u bazalnim delovima kauloida *A. undulatum* razlikovala se u zavisnosti od vrste ispitivanog metala i dužine trajanja stresa.

Visoke koncentracije cinka i bakra u hadromu apikalnog dela gametofora *A. undulatum* ukazuju na to da ova vrsta ili translocira metale u vršni deo biljke putem hadroma, što je manje verovatno, ili da se metali iz drugih delova kauloida usmeravaju u ovu centralnu strukturu i zadržavaju u neživim ćelijama, kako bi se minimizirali negativni efekti na žive ćelije ostalih delova gametofora.

Ramanovi spektri pokazali su da povećano prisustvo cinka i bakra u podlozi, kod apikalno postavljenih filoida mahovina *H. cupressiforme* i *A. undulatum* ne uzrokuje promene po tipu i koncentraciji organskih jedinjenja. Nasuprot tome, najveća varijabilnost u efektima različitih tretmana uočena je u bazalno pozicioniranim filoidima obe vrste.

Na osnovu rezultata Ramanove spektroskopije, može se zaključiti da u filoidima mahovina *H. cupressiforme* i *A. undulatum* izloženim povećanim koncentracijama bakra u podlozi dolazi do pokretanja sličnog odgovora koji najverovatnije uključuje izmene u metabolizmu glikozilovanih flavonola i promenu stepena zasićenosti masnih kiselina i drugih alifatičnih jedinjenja.

Rezultati Ramanove spektroskopije ukazuju na to da kod vrste *A. undulatum* u uslovima kratkotrajnog stresa cinkom i bakrom karotenoidi aktivno učestvuju u zaštiti od toksičnih efekata ova dva metala. U uslovima dugotrajnog stresa, bazalni filoidi vrste *H. cupressiforme* osetljiviji su na toksične efekte bakra u odnosu na filoide *A. undulatum*.

*In situ* analize Ramanovom spektroskopijom i mikro-PIXE metodom potvrdile su da je kod biljnih vrsta sa nedovoljno razvijenim provodnim sistemom, pri ispitivanju efekata susptanci iz podloge na rastenje i razviće biljaka, važno uzeti u obzir poziciju ispitivanog tkiva duž longitudinalne ose izdanka.

Na osnovu svega analiziranog u ovoj tezi, može se zaključiti da mahovine poseduju izvesnu toleranciju na stres izazvan toksičnim koncentracijama metala, kao i da je više različitih fizioloških i biohemijskih mehanizama uključeno u odgovor na ovakav stres, odvojeno ili istovremeno. Međutim, na osnovu dobijenih rezultata ne može se doneti jednoznačan zaključak o tome koja vrsta mahovina poseduje veću otpornost na povećane koncentracije pojedinačnih metala u podlozi.

## 7. LITERATURA

- Abd Mutalib M, Rahman MA, Othman MH, Ismail AF, Jaafar J. 2017. Scanning electron microscopy (SEM) and energy-dispersive X-ray (EDX) spectroscopy. In: Hilal N, Ismail AF, Matsuura T, Oatley-Radcliffe D (eds.), *Membrane Characterization*, pp. 161-179, Elsevier.
- Abderrahman S, Smith AJE. 1982. Studies on the cytotypes of *Atrichum undulatum* (Hedw.) P. Beauv. I. Morphology and distribution. *Journal of Bryology* **12**(2): 265-271.
- Adriano DC. 1986. *Trace elements in the terrestrial environment*. Springer-Verlag, New York.
- Aguirre G, Pilon M. 2016. Copper delivery to chloroplast proteins and its regulation. *Frontiers in Plant Science* **6**: 1250.
- Ahmad P, Sarwat M, Sharma S. 2008. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Biology* **51**(3): 167-173.
- Ainsworth EA, Gillespie KM. 2007 Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols* **2**(4): 875-877.
- Alloway BJ. 2012. *Heavy metals in soils: trace metals and metalloids in soils and their bioavailability* **22**. Springer Science & Business Media.
- Altangerel N, Ariunbold GO, Gorman C, Alkahtani MH, Borrego EJ, Bohlmeier D, Hemmer P, Kolomiets MV, Yuan JS, Scully MO. 2017. In vivo diagnostics of early abiotic plant stress response via Raman spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**(13): 3393-3396.
- Andresen E, Peiter E, Küpper H. 2018. Trace metal metabolism in plants. *Journal of Experimental Botany* **69**(5): 909-954.
- Aničić M, Tomašević M, Tasić M, Rajsić S, Popović A, Frontasyeva MV, Lierhagen S, Steinnes E. 2009. Monitoring of trace element atmospheric deposition using dry and wet moss bags: accumulation capacity versus exposure time. *Journal of Hazardous Materials* **171**(1-3): 182-188.
- Antreich S, Sassmann S, Lang I. 2016. Limited accumulation of copper in heavy metal adapted mosses. *Plant Physiology and Biochemistry* **101**: 141-148.
- Ares Á, Itouga M, Kato Y, Sakakibara H. 2018. Differential metal tolerance and accumulation patterns of Cd, Cu, Pb and Zn in the Liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **100**: 444-450.
- Atherton I, Bosauquet S, Lawley M. 2010. *Mosses and Liverworts of Britain and Ireland, a field guide*. British Bryological Society, Plymouth, UK.
- Axelsen KB, Palmgren MG. 2001. Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in Arabidopsis. *Plant Physiology* **126**(2): 696-706.
- Aydoğan S, Erdağ B, Aktaş LY. 2017. Bioaccumulation and oxidative stress impact of Pb, Ni, Cu, and Cr heavy metals in two bryophyte species, *Pleurochaete squarrosa* and *Timmiella barbuloidea*. *Turkish Journal of Botany* **41**(5): 464-475.
- Baker AJM. 1981. Accumulators and excluders - strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition* **3**(1-4): 643-654.
- Baker AJM, Walker PL. 1989. Physiological responses of plants to heavy metals and the quantification of tolerance and toxicity. *Chemical Speciation & Bioavailability* **1**(1): 7-17.
- Baranska M, Roman M, Dobrowolski JC, Schulz H, Baranski R. 2013. Recent advances in Raman analysis of plants: alkaloids, carotenoids, and polyacetylenes. *Current Analytical Chemistry* **9**(1): 108-127.

- Baranski R, Baranska M, Schulz H. 2005. Changes in carotenoid content and distribution in living plant tissue can be observed and mapped in situ using NIR-FT-Raman spectroscopy. *Planta* **222**(3): 448-457
- Basile A, Sorbo S, Aprile G, Conte B, Castaldo Cobianni R, Pisani T, Loppi S. 2009. Heavy metal deposition in the Italian “triangle of death” determined with the moss *Scorpiurum circinatum*. *Environmental Pollution* **157**(8-9): 2255-2260.
- Basile A, Sorbo S, Pisani T, Paoli L, Munzi S, Loppi S. 2012. Bioaccumulation and ultrastructural effects of Cd, Cu, Pb and Zn in the moss *Scorpiurum circinatum* (Brid.) Fleisch. & Loeske. *Environmental Pollution* **166**: 208-211.
- Bellini E, Betti C, Sanità di Toppi L. 2021. Responses to cadmium in early-diverging Streptophytes (Charophytes and Bryophytes): current views and potential applications. *Plants* **10**(4): 770:1 – 770:18.
- Bellini E, Maresca V, Betti C, Castiglione MR, Fontanini D, Capocchi A, Sorce C, Borsò M, Bruno L, Sorbo S, Basile A, Sanità di Toppi L. 2020. The moss *Leptodictyum riparium* counteracts severe cadmium stress by activation of glutathione transferase and phytochelatin synthase, but slightly by phytochelatin. *International Journal of Molecular Sciences* **21**(5): 1583:1 – 1583:17.
- Benavides MP, Gallego SM, Tomaro ML. 2005. Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **17**: 21-34.
- Berg T, Røyset O, Steinnes E. 1995. Moss (*Hylocomium splendens*) used as biomonitor of atmospheric trace element deposition: estimation of uptake efficiencies. *Atmospheric Environment* **29**(3): 353-360.
- Berg T, Steinnes E. 1997. Use of mosses (*Hylocomium splendens* and *Pleurozium schreberi*) as biomonitors of heavy metal deposition: from relative to absolute deposition values. *Environmental Pollution* **98**(1): 61-71.
- Bisang I, Ehrlén J Hedenäs, L. 2008. Are annual growth intervals independent units in the moss *Pseudocalliergon trifarium* (Amblystegiaceae). *The Bryologist* **111**(3): 435-443.
- Blaschek L, Pesquet E. 2021. Phenoloxidases in plants—How structural diversity enables functional specificity. *Frontiers in Plant Science* **12**: 754601:1-754601:24.
- Blindauer CA, Schmid R. 2010. Cytosolic metal handling in plants: determinants for zinc specificity in metal transporters and metallothioneins. *Metallomics* **2**(8): 510-529.
- Blockeel TL, Stevenson CR. 2006. *Hypnum cupressiforme* Hedw. var. *heseleri* (Ando & Higuchi) M.O. Hill (Bryopsida, Hypnales) in Norfolk, new to the British Isles. *Journal of Bryology* **28**(3): 190-193.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**(4617): 1199–1200.
- Bolan NS, Curtin D, Adriano DC. 2005. Acidity. In: Hillel D, Hatfield JH, Powlson DS, Rosenzweig C, Scow KM, Singer MJ, Sparks DL (eds.), *Encyclopedia of Soils in the Environment*, pp. 11-17, Academic Press, New York.
- Boquete MT, Aboal JR, Carballeira A, Fernández JA. 2014a. Effect of age on the heavy metal concentration in segments of *Pseudoscleropodium purum* and the biomonitoring of atmospheric deposition of metals. *Atmospheric Environment* **86**: 28-34.
- Boquete MT, Bermúdez-Crespo J, Aboal JR, Carballeira A, Fernández JÁ. (2014b). Assessing the effects of heavy metal contamination on the proteome of the moss *Pseudoscleropodium purum* cross-transplanted between different areas. *Environmental Science and Pollution Research* **21**(3): 2191-2200.



- Boquete MT, Fernández JA, Aboal JR, Carballeira A, Martínez-Abaigar J, Tomás-Las-Heras R, Núñez-Olivera E. 2016. Trace element concentrations in the moss *Hypnum cupressiforme* growing in a presumably unpolluted area. *Chemosphere* **158**:177-183.
- Boquete MT, Lang I, Weidinger M, Richards CL, Alonso C. 2021. Patterns and mechanisms of heavy metal accumulation and tolerance in two terrestrial moss species with contrasting habitat specialization. *Environmental and Experimental Botany* **182**: 104336.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248–254.
- Brodribb TJ, Carriquí M, Delzon S, McAdam SA, Holbrook NM. 2020. Advanced vascular function discovered in a widespread moss. *Nature Plants* **6**(3): 273-279.
- Brooks RR. 1971. Bryophytes as a guide to mineralisation. *New Zealand Journal of Botany* **9**(4): 674-677.
- Brouwer P. 2006. *Theory of XRF*. PANalytical BV, Almelo.
- Brown DH, Bates JW. 1990. Bryophytes and nutrient cycling. *Botanical Journal of the Linnean Society* **104**(1-3): 129-147.
- Brown DH, Beckett RP. 1985. Intracellular and extracellular uptake of cadmium by the moss *Rhytidiadelphus squarrosus*. *Annals of Botany* **55**(2): 179-188.
- Brown DH, Brūmelis G. 1996. A biomonitoring method using the cellular distribution of metals in moss. *Science of the Total Environment* **187**(2): 153-161.
- Brown DH, Buck GW. 1978. Distribution of potassium, calcium and magnesium in the gametophyte and sporophyte generations of *Funaria hygrometrica* Hedw. *Annals of Botany* **42**(4): 923-929.
- Brūmelis G, Brown DH. 1997. Movement of metals to new growing tissue in the moss *Hylocomium splendens* (Hedw.) BSG. *Annals of Botany* **79**(6): 679-686.
- Brūmelis G, Lapina L, Tabors G. 2000. Uptake of Ca, Mg and K during growth of annual segments of the moss *Hylocomium splendens* in the field. *Journal of Bryology* **22**(3): 163-174.
- Bruns I, Sutter K, Menge S, Neumann D, Krauss GJ. 2001. Cadmium lets increase the glutathione pool in bryophytes. *Journal of Plant Physiology* **158**(1): 79–89.
- Budke JM, Bernard EC, Gray DJ, Huttunen S, Piechulla B, Trigiano RN. 2018. Introduction to the special issue on bryophytes. *Critical Reviews in Plant Sciences* **37**: 102-112.
- Burke M, Land EJ, McGarvey DJ, Truscott TG. 2000. Carotenoid triplet state lifetimes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **59**(1-3):132-138.
- Burkhead JL, Gogolin Reynolds KA, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Pilon M. 2009. Copper homeostasis. *New Phytologist* **182**(4): 799-816.
- Büscher P, Koedam N, Van Speybroeck D. 1990. Cation-exchange properties and adaptation to soil acidity in bryophytes. *New Phytologist* **115**(1): 177-186.
- Butler HJ, Ashton L, Bird B, Cinque G, Curtis K, Dorney J, Esmonde-White K, Fullwood NJ, Gardner B, Martin-Hirsch PL, Walsh MJ, McAinsh MR, Stone N, Martin FL. 2016. Using Raman spectroscopy to characterize biological materials. *Nature Protocols* **11**(4): 664-687.
- Çakmak İ, Marschner H. 1988. Zinc-dependent changes in ESR signals, NADPH oxidase and plasma membrane permeability in cotton roots. *Physiologia Plantarum* **73**(1): 182-186.
- Capozzi F, Di Palma A, Sorrentino MC, Adamo P, Giordano S, Spagnuolo V. 2020. Morphological traits influence the uptake ability of priority pollutant elements by *Hypnum cupressiforme* and *Robinia pseudoacacia* leaves. *Atmosphere* **11**(2): 148.

- Carballeira CB, Aboal JR, Fernández JA, Carballeira A. 2008. Comparison of the accumulation of elements in two terrestrial moss species. *Atmospheric Environment* **42**(20): 4904-4917.
- Carginale V, Sorbo S, Capasso C, Trinchella F, Cafiero G, Basile A. 2004. Accumulation, localisation, and toxic effects of cadmium in the liverwort *Lunularia cruciata*. *Protoplasma* **223**(1): 53–61.
- Castello M. 2007. A comparison between two moss species used as transplants for airborne trace element biomonitoring in NE Italy. *Environmental Monitoring and Assessment* **133**(1): 267-276.
- Chen YE, Cui JM, Yang JC, Zhang ZW, Yuan M, Song C, Yang H, Liu HM, Wang CQ, Zhang HY, Zeng XY, Yuan S. 2015a. Biomonitoring heavy metal contaminations by moss visible parameters. *Journal of Hazardous Materials* **296**: 201-209.
- Chen YE, Wu N, Zhang ZW, Yuan M, Yuan S. 2019. Perspective of monitoring heavy metals by moss visible chlorophyll fluorescence parameters. *Frontiers in Plant Science* **10**: 35:1 – 35:7.
- Chen YE, Yuan M, Zhang H, Zeng X, Liu H, Du XG. 2015b. Influences of Cu and Cr stress on antioxidant system and chlorophyll fluorescence in terrestrial moss *Taxiphyllum taxirameum*. *Fresenius Environmental Bulletin* **24**: 2211-2219.
- Cheng Y, Song C. 2006. Hydrogen peroxide homeostasis and signaling in plant cells. *Science in China: Series C Life Sciences* **49**(1): 1-12
- Choudhary M, Jetley UK, Khan MA, Zutshi S, Fatma T. 2007. Effect of heavy metal stress on proline, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium *Spirulina platensis*-S5. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **66**(2): 204-209.
- Choudhury S, Panda SK. 2005. Toxic effects, oxidative stress and ultrastructural changes in moss *Taxithelium nepalense* (Schwaegr.) Broth. under chromium and lead phytotoxicity. *Water, Air, and Soil Pollution* **167**(1):73-90.
- Clayton SR, Heurlier K, Oshima T, Hobman JL. 2011. Copper and zinc stress in bacteria. In: Kidd SP (ed.), *Stress response in pathogenic bacteria* **19**, pp. 245-265, CABI Publishing.
- Clayton-Greene KA, Collins NJ, Green TGA, Proctor MCF. 1985. Surface wax, structure and function in leaves of Polytrichaceae. *Journal of Bryology* **13**(4): 549-562.
- Clemens S. 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* **212**(4): 475-486.
- Clijsters H, Cuypers A, Vangronsveld J. 1999. Physiological responses to heavy metals in higher plants; defence against oxidative stress. *Zeitschrift für Naturforschung C* **54**(9-10): 730-734.
- Coudert Y, Bell NE, Edelin C, Harrison CJ. 2017. Multiple innovations underpinned branching form diversification in mosses. *New Phytologist* **215**(2): 840-850.
- Coudert Y, Harris S, Charrier B. 2019. Design principles of branching morphogenesis in filamentous organisms. *Current Biology* **29**(21): R1149-R1162.
- Coudert Y, Palubicki W, Ljung K, Novak O, Leyser O & Harrison CJ. 2015. Three ancient hormonal cues co-ordinate shoot branching in a moss. *Elife* **4**: e06808:1 - e06808:26.
- Couto JA, Fernández JA, Aboal JR, Carballeira A. 2004. Active biomonitoring of element uptake with terrestrial mosses: a comparison of bulk and dry deposition. *Science of the Total Environment* **324**(1-3): 211-222.
- Cowden P, Liang T, Aherne J. 2015. Mosses as bioindicators of air pollution along an urban–agricultural transect in the Credit River Watershed, Southern Ontario, Canada. *Annali di Botanica* **5**: 63-70.

- Crandall-Stotler BJ, Bartholomew-Began SE. 2007. Morphology of mosses (phylum Bryophyta). *Flora of North America North of Mexico* **27**: 3-13.
- Cuypers A, Hendrix S, Amaral dos Reis R, De Smet S, Deckers J, Gielen H, Jozefczak M, Loix C, Vercampt H, Vangronsveld J, Keunen E. 2016. Hydrogen peroxide, signaling in disguise during metal phytotoxicity. *Frontiers in Plant Science* **7**:470.
- Čeburnis D, Valiulis D. 1999. Investigation of absolute metal uptake efficiency from precipitation in moss. *Science of the Total Environment* **226**(2-3): 247-253.
- Ćosić M, Vujičić MM, Sabovljević MS & Sabovljević AD. 2020a. Effects of salt on selected bryophyte species tested under controlled conditions. *Botanica Serbica* **44**(1): 27–35.
- Ćosić M, Vujičić MM, Sabovljević MS & Sabovljević AD. 2020b. Effects of ABA and NaCl on physiological responses in selected bryophyte species. *Botany* **98**: 639-650.
- Das P, Samantaray S, Rout GR. 1997. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environmental Pollution* **98**: 29–36.
- Dazy M, Masfaraud JF, Féraud JF. 2009. Induction of oxidative stress biomarkers associated with heavy metal stress in *Fontinalis antipyretica* Hedw. *Chemosphere* **75**(3): 297-302.
- De Bolster MWG. 1997. Glossary of terms used in bioinorganic chemistry (IUPAC recommendations 1997). *Pure and Applied Chemistry* **69**(6): 1251-1303.
- De Forest Heald F. 1898. A study of regeneration as exhibited by mosses. *Botanical Gazette* **26**(3): 169-210.
- De Gelder J, De Gussem K, Vandenabeele P, Moens L. 2007. Reference database of Raman spectra of biological molecules. *Journal of Raman Spectroscopy: An International Journal for Original Work in all Aspects of Raman Spectroscopy, Including Higher Order Processes, and also Brillouin and Rayleigh Scattering* **38**(9):1133-47.
- De Keijzer J, Freire Rios A, Willemsen V. 2021. *Physcomitrium patens*: A single model to study oriented cell divisions in 1d to 3d patterning. *International Journal of Molecular Sciences* **22**(5): 2626.
- Degola F, De Benedictis M, Petraglia A, Massimi A, Fattorini L, Sorbo S, Basile A, Sanità di Toppi L. 2014. A Cd/Fe/Zn responsive phytochelatin synthase is constitutively present in the ancient liverwort *Lunularia cruciata* (L.) dumort. *Plant and Cell Physiology* **55**(11): 1884–1891
- Demidchik V. 2015. Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany* **109**: 212-228.
- Demirevska-Kepova K, Simova-Stoilova L, Stoyanova Z, Hölzer R, Feller U. 2004. Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese. *Environmental and Experimental Botany* **52**(3): 253-266.
- DiMario RJ, Clayton H, Mukherjee A, Ludwig M, Moroney JV. 2017. Plant carbonic anhydrases: structures, locations, evolution, and physiological roles. *Molecular Plant* **10**(1): 30-46.
- Dinh NT, Vu DT, Mulligan D, Nguyen AV. 2015. Accumulation and distribution of zinc in the leaves and roots of the hyperaccumulator *Noccaea caerulescens*. *Environmental and Experimental Botany* **110**: 85-95.
- Dreyer BH, Schippers JH. 2019. Copper-Zinc superoxide dismutases in plants: evolution, enzymatic properties, and beyond. *Annual Plant Reviews Online* **2**:1–36.
- Dronnet VM, Renard CMGC, Axelos MAV, Thibault JF. 1996. Heavy metals binding by pectins: selectivity, quantification and characterisation. *Progress in Biotechnology* **14**: 535-540.

- Duffus JH. 2002. "Heavy metals" a meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* **74**(5): 793-807.
- Dumanović J, Nepovimova E, Natić M, Kuča K, Jačević V. 2021. The significance of reactive oxygen species and antioxidant defense system in plants: A concise overview. *Frontiers in Plant Science* **11**: 552969:1 – 552969:13.
- During HJ. 1979. Life strategies of bryophytes: a preliminary review. *Lindbergia* **5**(1): 2-18.
- Esposito S, Sorbo S, Conte B, Basile A. 2012. Effects of heavy metals on ultrastructure and HSP70s induction in the aquatic moss *Leptodictyum riparium* Hedw. *International Journal of Phytoremediation* **14**(4): 443-455.
- Fabure J, Meyer C, Denayer F, Gaudry A, Gilbert D, Bernard N. 2010. Accumulation capacities of particulate matter in an acrocarpous and a pleurocarpous moss exposed at three differently polluted sites (industrial, urban and rural). *Water, Air, & Soil Pollution* **212**(1): 205-217.
- Fatoba PO, Udoh EG. 2008. Effects of some heavy metals on chlorophyll accumulation in *Barbula lambarenensis*. *Ethnobotanical Leaflets* **12**: 776-783.
- Fernández JA, Ares A, Rey-Asensio A, Carballeira A, Aboal JR. 2009. Effect of growth on active biomonitoring with terrestrial mosses. *Journal of Atmospheric Chemistry* **63**(1): 1-11.
- Fernández JA, Pérez-Llamazares A, Carballeira A, Aboal JR. 2013. Temporal variability of metal uptake in different cell compartments in mosses. *Water, Air, & Soil Pollution* **224**(3):1-9.
- Fernández JA, Rey A, Carballeira A. 2000. An extended study of heavy metal deposition in Galicia (NW Spain) based on moss analysis. *Science of the Total Environment* **254**(1): 31-44.
- Fernández JA, Vázquez MD, Lopez J, Carballeira A. 2006. Modelling the extra and intracellular uptake and discharge of heavy metals in *Fontinalis antipyretica* transplanted along a heavy metal and pH contamination gradient. *Environmental Pollution* **139**(1): 21-31.
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JHF, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JDG, Davies JM, Dolan L. 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* **422**(6930): 442-446.
- Foyer CH, Shigeoka S. 2011. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant Physiology* **155**(1): 93-100.
- Frangedakis E, Shimamura M, Villarreal JC, Li FW, Tomaselli M, Waller M, Sakakibara K, Renzaglia KS, Szövényi P. 2021. The Hornworts: Morphology, evolution and development. *New Phytologist* **229**(2): 735-754.
- Gahtori D, Chaturvedi P. 2019. Bryophytes: A Potential Source of Antioxidants. In: Sabovljević SM, Sabovljević DA (eds.), *Bryophytes*. IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.84587. Available at: <https://www.intechopen.com/chapters/67501>
- Gall A, Pascal AA, Robert B. 2015. Vibrational techniques applied to photosynthesis: Resonance Raman and fluorescence line-narrowing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1847**(1): 12-8.
- Galsomiès L, Ayrault S, Carrot F, Deschamps C, Letrouit-Galinou MA. 2003. Interspecies calibration in mosses at regional scale—heavy metal and trace elements results from Ile-de-France. *Atmospheric Environment* **37**(2): 241-251.
- Gamsjaeger S, Baranska M, Schulz H, Heiselmayer P, Musso M. 2011. Discrimination of carotenoid and flavonoid content in petals of pansy cultivars (*Viola x wittrockiana*) by FT-Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy* **42**(6):1240-1247.

- Garciadeblas B, Barrero-Gil J, Benito B, Rodríguez-Navarro A. 2007. Potassium transport systems in the moss *Physcomitrella patens*: pphak1 plants reveal the complexity of potassium uptake. *The Plant Journal* **52**(6): 1080-1093.
- Garman EF, Grime GW. 2005. Elemental analysis of proteins by microPIXE. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **89**(2): 173-205.
- Gaschler MM, Stockwell BR. 2017. Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **482**(3): 419-425.
- Gecheva G, Yurukova L. 2008. Chlorophyll response of aquatic moss *Fontinalis antipyretica* Hedw. to Cu, Cd and Pb contamination *ex situ*. In: Velcheva GI, Tsekov GA (eds.), *Proceedings of Anniversary Scientific Conference of Ecology*, pp. 293-299, Plovdiv.
- Gemmell AR. 1953. Regeneration from the Leaf of *Atrichum undulatum* (Hedw.) P. Beauv. *Transactions of the British Bryological Society* **2**(2): 203-213.
- Gerdol R, Bragazza L, Marchesini R, Medici A, Pedrini P, Benedetti S, Bovolenta A, Coppi S. 2002. Use of moss (*Tortula muralis* Hedw.) for monitoring organic and inorganic air pollution in urban and rural sites in Northern Italy. *Atmospheric Environment* **36**(25): 4069-4075.
- Gill M. 2014. Heavy metal stress in plants: a review. *International Journal of Advanced Research* **2**(6): 1043-1055.
- Glime JM. 2017. *Bryophyte Ecology*. Ebook, Michigan Technological University and the International Association of Bryologists, Available at: <http://digitalcommons.mtu.edu/bryophyte-ecology> [Accessed 20 July 2020]
- Goffinet B, Buck WR. 2012. The evolution of body form in bryophytes. *Annual Plant Reviews* **45**: 51-89.
- Goffinet B, Buck WR, Shaw AJ. 2009. Morphology, anatomy, and classification of the Bryophyta. In: Goffinet B, Shaw AJ (eds.), *Bryophyte biology 2<sup>nd</sup> edition* **2**, pp. 55-138, Cambridge University Press, New York
- Gómez Gómez JM, Estébanez B, Sanz Arranz A, Mateo Martí E, Medina García J, Rull Pérez F. 2016. Survival of moss reproductive structures under simulated martian environmental conditions and extreme thermal stress: Vibrational spectroscopic study and astrobiological implications. *Journal of Astrobiology & Outreach* **4**(2): 1000151:1- 1000151:11.
- González AG, Pokrovsky OS. 2014. Metal adsorption on mosses: toward a universal adsorption model. *Journal of Colloid and Interface Science* **415**: 169-178.
- González-Miqueo L, Elustondo D, Lasheras E, Santamaría JM. 2010. Use of native mosses as biomonitors of heavy metals and nitrogen deposition in the surroundings of two steel works. *Chemosphere* **78**(8): 965-971.
- Gorelova SV, Frontasyeva MV, Volkova EM, Vergel KN, Babicheva DE. 2016. Trace element accumulating ability of different moss species used to study atmospheric deposition of heavy metals in Central Russia: Tula Region case study. *International Journal of Biology and Biomedical Engineering* **10**: 271-285.
- Govindaparyi H, Leleeka M, Nivedita M, Uniyal PL. 2010. Bryophytes: indicators and monitoring agents of pollution. *NeBIO* **1**(1): 35-41.
- Greger M. 1999. Metal availability and bioconcentration in plants. In: Prasad MNV, Hagemeyer J (eds.), *Heavy metal stress in plants*, pp. 1-27, Springer, Berlin, Heidelberg.
- Grimsrud PA, Xie H, Griffin TJ, Bernlohr DA. 2008. Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. *Journal of Biological Chemistry* **283**(32): 21837-21841.



- Gruszecki WI, Gospodarek M, Grudzinski W, Mazur R, Gieczewska K, Garstka M. 2009. Light-induced change of configuration of the LHCII-bound xanthophyll (tentatively assigned to violaxanthin): a resonance Raman study. *The Journal of Physical Chemistry B* **113**(8): 2506-2512.
- Guschina IA, Harwood JL. 2002. Lipid metabolism in the moss *Rhytidiadelphus squarrosus* (Hedw.) Warnst. from lead-contaminated and non-contaminated populations. *Journal of Experimental Botany* **53**(368): 455-463.
- Habibi G. 2014. Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) generation, scavenging and signaling in plants. In: Ahmad P (ed.), *Oxidative Damage to Plants*, pp. 557-584, Elsevier Inc., USA.
- Haig D. 2013. Filial mistletoes: the functional morphology of moss sporophytes. *Annals of Botany* **111**(3): 337-345.
- Hammer Ø, Harper DA, Ryan PD. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica* **4**(1): 1-9.
- Hänsch R, Mendel RR. 2009. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biology* **12**(3): 259-266.
- Hasanuzzaman M, Fujita M. 2013. Heavy Metals in the Environment: Current Status, Toxic Effects on Plants and Phytoremediation. In: Anjum NA, Pereira ME, Ahmad I, Duarte AC, Umar S, Khan NA (eds.), *Phytotechnologies: Remediation Of Environmental Contaminants*, pp. 7-73, CRC Press/Taylor And Francis Group, Boca Raton.
- Havaux M. 2014. Carotenoid oxidation products as stress signals in plants. *The Plant Journal* **79**(4): 597-606.
- Heath RL, Packer L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **125**(1): 189-198.
- Helsen JA, Kuczumow A. 2001. Wavelength-dispersive x-ray fluorescence. In: Van Grieken RE, Markowicz AA (eds.), *Handbook of X-Ray Spectrometry, Second Edition*, pp. 114-217, CRC Press, Boca Raton.
- Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* **207**(4): 604-611.
- Holy M, Leblond S, Pesch R, Schröder W. 2009. Assessing spatial patterns of metal bioaccumulation in French mosses by means of an exposure index. *Environmental Science and Pollution Research International* **16**(5): 499-507.
- Horiue H, Sasaki M, Yoshikawa Y, Toyofuku M, Shigeto S. 2020. Raman spectroscopic signatures of carotenoids and polyenes enable label-free visualization of microbial distributions within pink biofilms. *Scientific Reports* **10**(1):1-10.
- Houri T, Khairallah Y, Al Zahab A, Osta B, Romanos D, Haddad G. 2020. Heavy metals accumulation effects on the photosynthetic performance of geophytes in Mediterranean reserve. *Journal of King Saud University - Science* **32**(1): 874-880.
- Hu R, Xiao L, Bao F, Li X, He Y. 2016. Dehydration-responsive features of *Atrichum undulatum*. *Journal of Plant Research* **129**(5): 945-954.
- Huang D, Ou B, Prior RL. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**(6): 1841-1856.
- Hudz N, Yezerska O, Shanaida M, Sedláčková VH, Wiczorek PP. 2019. Application of the Folin-Ciocalteu method to the evaluation of *Salvia sclarea* extracts. *Pharmacia* **66**(4): 209-215.

- Huttunen S, Bell N, Hedenäs L. 2018. The evolutionary diversity of mosses—taxonomic heterogeneity and its ecological drivers. *Critical Reviews in Plant Sciences* **37**(2-3):128-174.
- Ibarrondo I, Prieto-Taboada N, Martínez-Arkarazo I, Madariaga JM. 2016. Resonance Raman imaging as a tool to assess the atmospheric pollution level: carotenoids in Lecanoraceae lichens as bioindicators. *Environmental Science and Pollution Research* **23**(7):6390-6399.
- Ignatov MS, Hedenäs L. 2007. Homologies of stem structures in pleurocarpous mosses, especially of pseudoparaphyllia and similar structures. In: Newton AE, Tangney RS (eds), *Pleurocarpous mosses: systematics and evolution*, pp. 269-286, CRC Press, Boca Raton.
- Ishii K. 2019. PIXE and its applications to elemental analysis. *Quantum Beam Science* **3**(2): 12:1-12:14.
- Izquieta-Rojano S, Elustondo D, Ederra A, Lasheras E, Santamaría C, Santamaría JM. 2016. *Pleurochaete squarrosa* (Brid.) Lindb. As an alternative moss species for biomonitoring surveys of heavy metal, nitrogen deposition and  $\delta^{15}\text{N}$  signatures in a Mediterranean area. *Ecological Indicators* **60**: 1221-1228.
- Izquieta-Rojano S, López-Aizpún M, Irigoyen JJ, Santamaría JM, Santamaría C, Lasheras E, Ochoa-Hueso R, Elustondo D. 2018. Eco-physiological response of *Hypnum cupressiforme* Hedw. to increased atmospheric ammonia concentrations in a forest agrosystem. *Science of the Total Environment* **619**: 883-895.
- Jenkins R. 2006. X-ray techniques: overview. In: Meyers RA (ed.), *Encyclopedia of analytical chemistry*, pp. 13269-13288, Wiley, Chichester.
- Jesson LK, Cavanagh AP, Perley DS. 2011. Polyploidy influences sexual system and mating patterns in the moss *Atrichum undulatum* sensu lato. *Annals of Botany* **107**(1):135-143.
- Johnson MP, Wientjes E. 2020. The relevance of dynamic thylakoid organisation to photosynthetic regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1861**(4): 148039:1-148039:11.
- Jorge Villar SE, Edwards HG. 2006. Raman spectroscopy in astrobiology. *Analytical and bioanalytical chemistry* **384**(1):100-113.
- Jouili H, Bouazizi H, El Ferjani E. 2011. Plant peroxidases: biomarkers of metallic stress. *Acta Physiologiae Plantarum* **33**: 2075–2082.
- Kapusta P, Godzik B. 2013. Does heavy metal deposition affect nutrient uptake by moss *Pleurozium schreberi*? In: Pirrone N (ed.), *E3S Web of Conferences 1*. Proceedings of the 16<sup>th</sup> International Conference on Heavy Metals in the Environment, pp. 29005:1 – 29005:2, EDP Sciences.
- Kehrer JP. 2000. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* **149**(1): 43-50.
- Kirkby EA. 2005. Essential elements. In: Hillel D, Hatfield JH, Powlson DS, Rosenzweig C, Scow KM, Singer MJ, Sparks DL (eds.), *Encyclopedia of Soils in the Environment*, pp. 478-485, Academic Press, New York.
- Kisa D, Kayir Ö, Sağlam N, Şahin S, Öztürk L, Elmastaş M. 2019. Changes of phenolic compounds in tomato associated with the heavy metal stress. *Bartın University International Journal of Natural and Applied Sciences* **2**(1): 35-43.
- Kłós A, Czora M, Rajfur M, Waclawek M. 2012. Mechanisms for translocation of heavy metals from soil to epigeal mosses. *Water, Air, & Soil Pollution* **223**(4): 1829-1836.
- Kohen R, Nyska A. 2002. Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology* **30**(6): 620-650.

- Kolaj-Robin O, Russell D, Hayes KA, Pembroke JT, Soulimane T. 2015. Cation diffusion facilitator family: structure and function. *FEBS Letters* **589**(12): 1283-1295.
- Konno H, Nakashima S, Katoh K. 2010. Metal-tolerant moss *Scopelophila cataractae* accumulates copper in the cell wall pectin of the protonema. *Journal of Plant Physiology* **167**(5): 358-364.
- Kováčik J, Dresler S, Babula P. 2020. Long-term impact of cadmium in protonema cultures of *Physcomitrella patens*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **193**: 110333:1-110333:6.
- Krämer U, Clemens S. 2005. Functions and homeostasis of zinc, copper, and nickel in plants. In: Tamas MJ, Martinoia A (eds.). *Molecular biology of metal homeostasis and detoxification*, pp. 215-271, Springer, Berlin, Heidelberg.
- Król A, Amarowicz R, Weidner S. 2014. Changes in the composition of phenolic compounds and antioxidant properties of grapevine roots and leaves (*Vitis vinifera* L.) under continuous of long-term drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum* **36**(6): 1491-1499.
- Krzyszowska M. 2011. The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy. *Acta Physiologiae Plantarum* **33**: 35-51.
- Krzyszowska M, Rabeda I, Lewandowski M, Samardakiewicz S, Basinska A, Napieralska A, Mellerowicz EJ, Wozny A. 2013. Pb induces plant cell wall modifications – in particular – the increase of pectins able to bind metal ions level. *E3S Web of Conferences* **1**: 26008:1-26008:3.
- Kubalt K. 2016. The role of phenolic compounds in plant resistance. *Biotechnology and Food Sciences* **80**(2): 97-108.
- Kump P, Nečemer M, Rupnik Z, Pelicon P, Ponikvar D, Vogel-Mikuš K, Regvar M, Pongrac P. 2011. Improvement of the XRF quantification and enhancement of the combined applications by EDXRF and Micro PIXE. In: Markowicz A, Will K (eds.), *Integration of Nuclear Spectrometry Methods as a New Approach to Material Research: Final report of a coordinated research project 2006–2009*, pp. 101-109, IAEA, Vienna.
- Küpper H, Andresen E. 2016. Mechanisms of metal toxicity in plants. *Metallomics* **8**(3): 269-285.
- Küpper H, Džedić R, Svoboda A, Hála J, Kroneck PM. 2002. Kinetics and efficiency of excitation energy transfer from chlorophylls, their heavy metal-substituted derivatives, and pheophytins to singlet oxygen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **1572**:107–113.
- Küpper H, Kochian LV. 2010. Transcriptional regulation of metal transport genes and mineral nutrition during acclimatization to cadmium and zinc in the Cd/Zn hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens* (Ganges population). *New Phytologist* **185**(1): 114-129.
- Küpper H, Küpper F, Spiller M. 1996. Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. *Journal of Experimental Botany* **47**(2): 259-266.
- Küpper H, Küpper F, Spiller M. 1998. *In situ* detection of heavy metal substituted chlorophylls in water plants. *Photosynthesis Research* **58**(2): 123-133.
- Lang I, Wernitznig S. 2011. Sequestration at the cell wall and plasma membrane facilitates zinc tolerance in the moss *Pohlia drummondii*. *Environmental and Experimental Botany* **74**: 186-193.
- Lavid N, Schwartz A, Lewinsohn E&Tel-Or E. 2001. Phenols and phenol oxidases are involved in cadmium accumulation in the water plants *Nymphoides peltata* (Menyanthaceae) and *Nymphaeae* (Nymphaeaceae). *Planta* **214**: 189–195.

- Leblond S, Gombert S, Colin JL, Losno R, De Trautenberg CR. 2004. Biological and temporal variations of trace element concentrations in the moss species *Scleropodium purum* (Hedw.) Limpr. *Journal of Atmospheric Chemistry* **49**(1):95-110.
- Lee JA, Stewart GR. 1971. Desiccation injury in mosses. I. Intra-specific differences in the effect of moisture stress on photosynthesis. *New Phytologist* **70**(6): 1061-1068.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Stadtman ER. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* **186**: 464-478.
- Lichtenthaler HK. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* **148**: 350-382.
- Ligrone R, Duckett JG, Renzaglia KS. 2000. Conducting tissues and phyletic relationships of bryophytes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **355**(1398): 795-813.
- Lin YF, Aarts MG. 2012. The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* **69**(19): 3187-3206.
- Little P, Martin MH. 1974. Biological monitoring of heavy metal pollution. *Environmental Pollution (1970)* **6**(1): 1-19.
- Liu Y, Johnson MG, Cox CJ, Medina R, Devos N, Vanderpoorten A, Hedenäs L, Bell NE, Shevock JR, Aguero B, Quandt D, Wickett NJ, Shaw AJ, Goffinet B. 2019. Resolution of the ordinal phylogeny of mosses using targeted exons from organellar and nuclear genomes. *Nature Communications* **10**: 1485:1 - 1485:11..
- Lobachevska OV, Kyyak NY, Rabyk IV. 2019. Ecological and physiological peculiarities of bryophytes on a post-technogenic salinized territory. *Biosystems Diversity* **27**(4): 342-348.
- Macernis M, Galzerano D, Sulskus J, Kish E, Kim YH, Koo S, Valkunas L, Robert B. 2015. Resonance Raman spectra of carotenoid molecules: influence of methyl substitutions. *The Journal of Physical Chemistry A* **119**(1): 56-66.
- Mägdefrau K. 1982. Life-forms of bryophytes. In: Smith AJE (ed.), *Bryophyte ecology*, pp. 45-58, Springer, Dordrecht.
- Maguregui M, Knuutinen U, Trebolazabala J, Morillas H, Castro K, Martinez-Arkarazo I, Madariaga JM. 2012. Use of in situ and confocal Raman spectroscopy to study the nature and distribution of carotenoids in brown patinas from a deteriorated wall painting in Marcus Lucretius House (Pompeii). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **402**(4):1529-1539.
- Mahapatra B, Dhal NK, Dash AK, Panda BP, Panigrahi, KCS, Pradhan A. 2019. Perspective of mitigating atmospheric heavy metal pollution: using mosses as biomonitoring and indicator organism. *Environmental Science and Pollution Research International* **26**(29): 29620-29638.
- Malecka A, Piechalak A, Mensinger A, Hané A, Baralkiewicz D, Tomaszewska B. 2012. Antioxidative defense system in *Pisum sativum* roots exposed to heavy metals (Pb, Cu, Cd, Zn). *Polish Journal of Environmental Studies* **21**(6): 1721-1730.
- Malmqvist KG. 1986. Comparison between PIXE and XRF for applications in art and archaeology. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **14**(1): 86-92.
- Manios T, Stentiford EI, Millner PA. 2003. The effect of heavy metals accumulation on the chlorophyll concentration of *Typha latifolia* plants, growing in a substrate containing sewage sludge compost and watered with metaliferous water. *Ecological Engineering* **20**(1): 65-74.

- Mano J. 2012. Reactive carbonyl species: their production from lipid peroxides, action in environmental stress, and the detoxification mechanism. *Plant Physiology and Biochemistry* **59**: 90-97.
- Maret W, Moulis JM. 2013. The bioinorganic chemistry of cadmium in the context of its toxicity. In Sigel A, Sigel H, Sigel R (eds.), *Cadmium: from toxicity to essentiality*. Metal Ions in Life Sciences **11**, pp.1-29, Springer, Dordrecht.
- Marguí E, Queralt I, Hidalgo M. 2009. Application of X-ray fluorescence spectrometry to determination and quantitation of metals in vegetal material. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **28**(3): 362-372.
- Markowicz AA. 2002. X-ray Physics. In: Van Grieken RE, Markowicz AA (eds.), *Handbook of X-Ray Spectrometry, Second Edition*, pp. 15-108, Marcel Dekker, New York.
- Marschall M. 2017. Ecophysiology of bryophytes in a changing environment. *Acta Biologica Plantarum Agriensis* **5**(1): 34.
- Martins RJ, Pardo R, Boaventura RAR. 2004. Cadmium (II) and zinc(II) adsorption by the aquatic moss *Fontinalis antipyretica*: effect of temperature, pH and water hardness. *Water Research* **38**(3): 693-699.
- Mateu BP, Hauser MT, Heredia A, Gierlinger N. 2016. Waterproofing in Arabidopsis: following phenolics and lipids in situ by confocal Raman microscopy. *Frontiers in Chemistry* **4**:10:1-10:13.
- Mateu BP, Stefke B, Hauser MT, Gierlinger N. 2014. Elucidating structural and compositional changes in plant tissues and single cells by Raman spectroscopic imaging. *Research Gate* **26**: 11-14.
- Mauseth JD. 2014. *Botany: an introduction to plant biology*. Jones & Bartlett Publishers.
- Menand B, Calder G, Dolan L. 2007. Both chloronemal and caulonemal cells expand by tip growth in the moss *Physcomitrella patens*. *Journal of Experimental Botany* **58**(7): 1843-1849.
- Merlin JC. 1985. Resonance Raman spectroscopy of carotenoids and carotenoid-containing systems. *Pure and Applied Chemistry* **57**(5): 785-792.
- Mesjasz-Przybyłowicz J, Przybyłowicz WJ. 2002. Micro-PIXE in plant sciences: present status and perspectives. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* **189**: 470-481.
- Michalak A. 2006. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies* **15**(4): 523-530.
- Mićić N, Đurić G. 1994. Diskusija statističkih pokazatelja u faktorijalnim ogledima u voćarstvu: I Analiza i diskusija interakcijskih efekata. *Jugoslovensko Voćarstvo* **105-106**: 79-88.
- Migocka M. 2015. Copper-transporting ATPases: The evolutionarily conserved machineries for balancing copper in living systems. *IUBMB Life* **67**(10): 737-745.
- Milner MJ, Seamon J, Craft E, Kochian LV. 2013. Transport properties of members of the ZIP family in plants and their role in Zn and Mn homeostasis. *Journal of Experimental Botany* **64**(1): 369-381.
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**(9): 405-410.
- Mittler R. 2017. ROS are good. *Trends in Plant Science* **22**(1): 11-19.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* **9**(10):490-498.



- Mohandas GG, Kumaraswamy M. 2018. Antioxidant activities of terpenoids from *Thuidium tamariscellum* (C. Muell.) Bosch. and Sande-Lac. a Moss. *Pharmacognosy Journal* **10**(4): 645-649.
- Moody LA. 2019. The 2D to 3D growth transition in the moss *Physcomitrella patens*. *Current Opinion in Plant Biology* **47**: 88-95.
- Morales M, Munné-Bosch S. 2016. Oxidative stress: a master regulator of plant trade-offs?. *Trends in Plant Science* **21**(12): 996-999.
- Morina F, Jovanovic L, Mojovic M, Vidovic M, Pankovic D, Veljovic-Jovanovic S. 2010. Zinc-induced oxidative stress in *Verbascum thapsus* is caused by an accumulation of reactive oxygen species and quinhydrone in the cell wall. *Physiologia Plantarum* **140**(3): 209-224.
- Movasaghi Z, Rehman S, Rehman IU. 2007. Raman spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews* **42**(5): 493-541.
- Mukta RH, Khatun MR, Nazmul Huda AKM. 2019. Calcium induces phytochelatin accumulation to cope with chromium toxicity in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Interactions* **14**(1): 295-302.
- Muradoglu F, Gundogdu M, Ercisli S, Encu T, Balta F, Jaafar HZ, Zia-Ul-Haq M. 2015. Cadmium toxicity affects chlorophyll a and b content, antioxidant enzyme activities and mineral nutrient accumulation in strawberry. *Biological Research* **48**:11:1–11:7.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* **15**(3): 473–497.
- Myśliwa-Kurdziel B, Prasad MNV, Strzałka K. 2004. Photosynthesis in heavy metal stressed plants. In: Prasad MNV (ed.). *Heavy metal stress in plants*, pp. 146-181, Springer, Berlin, Heidelberg.
- Newton AE. 2007. Branching Architecture in Pleurocarpous Mosses. In: Newton AE, Tangney RS, (eds.). *Pleurocarpous mosses: systematics and evolution*, pp. 287-307, CRC Press, London.
- Nickel S, Schröder W. 2017. Reorganisation of a long-term monitoring network using moss as biomonitor for atmospheric deposition in Germany. *Ecological Indicators* **76**: 194-206.
- Nieboer E, Richardson DHS. 1980. The replacement of the nondescript term 'heavy metals' by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical* **1**(1): 3-26.
- Nomura T, Hasezawa S. 2011. Regulation of gemma formation in the copper moss *Scopelophila cataractae* by environmental copper concentrations. *Journal of plant research* **124**(5): 631-638.
- Ohnuki T, Sakamoto F, Kozai N, Samadfam M, Sakai T, Kamiya T, Satoh T, Oikawa M. 2002. Application of the micro-PIXE technique for analyzing arsenic in biomat and lower plants of lichen and mosses around an arsenic mine site, at Gunma, Japan. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, **190**(1-4): 477-481.
- Özdemir T, Apaydın G, Mendil D, Bulut VN, Cengiz E, Gündoğdu A, Aylıkçı V. 2010. Determination of some elements in moss samples from north eastern Anatolia, Turkey. *Asian Journal of Chemistry* **22**(1): 346-352.
- Panda SK, Choudhury S. 2005. Changes in nitrate reductase activity and oxidative stress response in the moss *Polytrichum commune* subjected to chromium, copper and zinc phytotoxicity. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **17**(2): 191-197.

- Paolillo Jr DJ, Reighard JA. 1967. Ultrastructural features of some polytrichaceous moss leaves. *Bryologist* **70**(1): 61-69.
- Parab NDT, Tomar V. 2012. Raman spectroscopy of algae: a review. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology* **3**(2): 1-7.
- Parrotta L, Guerriero G, Sergeant K, Cai G, Hausman JF. 2015. Target or barrier? The cell wall of early-and later-diverging plants vs cadmium toxicity: differences in the response mechanisms. *Frontiers in Plant Science* **6**: 133.
- Payne WZ, Kurouski D. 2021. Raman spectroscopy enables phenotyping and assessment of nutrition values of plants: a review. *Plant Methods* **17**(1): 78:1-78:20.
- Pérez-Llamazares A, Aboal JR, Carballeira A, Fernández JA. 2011. Cellular location of K, Na, Cd and Zn in the moss *Pseudoscleropodium purum* in an extensive survey. *Science of the Total Environment* **409**(6):1198-204.
- Perley DS, Jesson LK. Hybridization is associated with changes in sexual system in the bryophyte genus *Atrichum*. 2015. *American Journal of Botany* **102**(4):555-65.
- Petschinger K, Adlassnig W, Sabovljevic MS, Lang I. 2021. Lamina cell shape and cell wall thickness are useful indicators for metal tolerance—An example in bryophytes. *Plants* **10**(2): 274:1-274:11.
- Pickering DC, Puia IL. 1969. Mechanism for the uptake of zinc by *Fontinalis antipyretica*. *Physiologia Plantarum* **22**(4): 653-661.
- Pilon M, Ravet K, Tapken W. 2011. The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **1807**: 989–998.
- Pisoschi AM, Negulescu GP. 2011. Methods for total antioxidant activity determination: A review. *Biochemistry and Analytical Biochemistry* **1**(1):106.
- Pongrac P, Vogel-Mikuš K, Vavpetič P, Tratnik J, Regvar M, Simčič J, Grlj N, Pelicon P. 2010. Cd induced redistribution of elements within leaves of the Cd/Zn hyperaccumulator *Thlaspi praecox* as revealed by micro-PIXE. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, **268**(11-12): 2205-2210.
- Popescu IV, Stihi C, Gheboianu A, Badica T, Gugu MM, Constantinescu O, Vargolici M, Bancuta I. 2006. Air quality study by the PIXE method and mosses as bioindicators. *Romanian Reports in Physics* **58**(4): 409-414
- Pressel S, Ligrone R, Duckett JG. 2008. Cellular differentiation in moss protonemata: a morphological and experimental study. *Annals of Botany* **102**(2): 227-245.
- Printz B, Lutts S, Hausman JF, Sergeant K. 2016. Copper trafficking in plants and its implication on cell wall dynamics. *Frontiers in Plant Science* **7**: 601:1-601:16.
- Proctor MCF. 1982. Physiological ecology: water relations, light and temperature responses, carbon balance. In: Smith AJE (ed.), *Bryophyte ecology*, pp. 333-381, Springer, Dordrecht.
- Proctor MCF. 2000. The bryophyte paradox: tolerance of desiccation, evasion of drought. *Plant Ecology* **151**(1): 41-49.
- Proctor MCF. 2011. Climatic responses and limits of bryophytes: comparisons and contrasts with vascular plants. In: Tuba Z, Slack NG, Stark LR (eds.), *Bryophyte Ecology and Climate Change*, pp. 35-54, Cambridge University Press, Cambridge.
- Proctor MCF, Oliver MJ, Wood AJ, Alpert P, Stark LR, Cleavitt NL, Mishler BD. 2007. Desiccation-tolerance in bryophytes: a review. *The Bryologist* **110**(4): 595-621.

- Pyszko P, Drgová M, Ožana S, Dornák O, Rožek D, Lee Číp D, Plášek V, Drozd P. 2021. Could Bryophagous Beetles (Coleoptera: Byrrhidae) Help Us Understand Bryophyte Taxonomy? Preferences within the *Hypnum cupressiforme* Hedw. Species Complex. *Plants* **10**(3): 469:1-469:14.
- Rai R, Agrawal M, Agrawal SB. 2016. Impact of heavy metals on physiological processes of plants: with special reference to photosynthetic system. In: Singh A, Prasad MS, Singh PR (eds.), *Plant responses to xenobiotics*, pp. 127-140. Springer, Singapore.
- Reilly C. 2004. Introduction. In: Reilly C (ed.), *The Nutritional Trace Metals*, pp. 1-34, Blackwell Publishing, Oxford.
- Reimann C, Arnoldussen A, Boyd R, Finne TE, Nordgulen Ø, Volden T, Englmaier P. 2006. The influence of a city on element contents of a terrestrial moss (*Hylocomium splendens*). *Science of the Total Environment* **369**(1-3): 419-432.
- Renzaglia KS, Aguilar JS, Garbary DJ. 2018. Morphology supports the setaphyte hypothesis: mosses plus liverworts form a natural group. *Bryophyte Diversity and Evolution* **40**(2): 11-7.
- Reski R, Abel WO. 1985. Induction of budding on chloronemata and caulonemata of the moss, *Physcomitrella patens*, using isopentenyladenine. *Planta* **165**(3): 354–358.
- Rice AJ, Park A, Pinkett HW. 2014. Diversity in ABC transporters: type I, II and III importers. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **49**(5): 426-437.
- Richter H, Lieberei R, Strnad M, Novák O, Gruz J, Rensing SA, von Schwartzberg K. 2012. Polyphenol oxidases in *Physcomitrella*: functional PPO1 knockout modulates cytokinin-dependent development in the moss *Physcomitrella patens*. *Journal of Experimental Botany* **63**(14): 5121-5135.
- Ringnér M. 2008. What is principal component analysis?. *Nature Biotechnology* **26**(3): 303-304.
- Robert B. 1999. The electronic structure, stereochemistry and resonance Raman spectroscopy of carotenoids. In: Frank HA, Young AJ, Britton G, Cogdell RJ (eds), *The Photochemistry of Carotenoids*, pp. 189-201, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Romero-Puertas MC, Palma JM, Gómez M, Del Rio LA, Sandalio LM. 2002. Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant, Cell & Environment* **25**(5): 677-686.
- Rostron P, Gaber S, Gaber D. 2016. Raman spectroscopy, review. *International Journal of Engineering and Technical Research* **6**(1): 50-64.
- Ruban AV, Pascal AA, Robert B, Horton P. 2001. Configuration and dynamics of xanthophylls in light-harvesting antennae of higher plants: spectroscopic analysis of isolated light-harvesting complex of photosystem II and thylakoid membranes. *Journal of Biological Chemistry* **276**(27): 24862-24870.
- Rühling Å, Tyler G. 1970. Sorption and retention of heavy metals in the woodland moss *Hylocomium splendens* (Hedw.) Br. et Sch. *Oikos* **21**(1): 92-97.
- Sabovljević A, Cvetić T, Sabovljević M. 2006. Establishment and development of the Catherine's moss *Atrichum undulatum* (Hedw.) P. Beauv. (Polytrichaceae) in *in vitro* conditions. *Archives of Biological Sciences* **58**(2): 87–93.
- Sabovljević A, Vujičić M, Stanković J, Sabovljević M. 2018a. Effects of zinc and copper on development and survival of the moss *Atrichum undulatum* in controlled conditions. *Botanica Serbica* **42**(2):181–184.
- Sabovljević M, Vujičić M, Sabovljević A. 2014. Plant growth regulators in bryophytes. *Botanica Serbica* **38**(1): 99-107.

- Sabovljević MS, Sabovljević AD. 2020. Introductory Chapter: Bryophytes 2020. In: Sabovljević MS, Sabovljević AD. (eds.), *Bryophytes*, IntechOpen, London, Available from: <https://www.intechopen.com/books/bryophytes/introductory-chapter-bryophytes-2020> [Accessed 25 July 2021]
- Sabovljević MS, Weidinger M, Sabovljević AD, Adlassnig W, Lang I. 2018b. Is the binding pattern of zinc (II) equal in different bryophyte species?. *Microscopy and Microanalysis* **24**: 69–74.
- Sabovljević MS, Weidinger M, Sabovljević AD, Stanković J, Adlassnig W, Lang I. 2020. Metal accumulation in the acrocarp moss *Atrichum undulatum* under controlled conditions. *Environmental Pollution* **256**:113397.
- Sakihama Y, Cohen MF, Grace SC, Yamasaki H. 2002. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* **177**(1): 67-80.
- Salemaa M, Derome J, Helmisaari HS, Nieminen T, Vanha-Majamaa I. 2004. Element accumulation in boreal bryophytes, lichens and vascular plants exposed to heavy metal and sulfur deposition in Finland. *Science of the Total Environment* **324**(1-3): 141-160.
- Samek O, Jonáš A, Pilát Z, Zemánek P, Nedbal L, Tříška J, Kotas P, Trtílek M. 2010. Raman spectroscopy for the characterization of algal cells. In: Müllerová J, Senderáková D, Jurecka S (eds.), *Proceedings of SPIE - 17th Slovak-Czech-Polish Optical Conference on Wave and Quantum Aspects of Contemporary Optics* **7746**, pp. 293-299, SPIE.
- Sanchez L, Ermolenkov A, Biswas S, Septiningsih EM, Kurouski D. 2020. Raman spectroscopy enables non-invasive and confirmatory diagnostics of salinity stresses, nitrogen, phosphorus, and potassium deficiencies in rice. *Frontiers in Plant Science* **11**: 573321:1- 573321:8.
- Sanità di Toppi L, Gabbriellini R. 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* **41**:105–130.
- Saraswat S, Rai JPN. 2011. Complexation and detoxification of Zn and Cd in metal accumulating plants. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* **10**(4): 327-339.
- Sardans J, Peñuelas J. 2005. Trace element accumulation in the moss *Hypnum cupressiforme* Hedw. and the trees *Quercus ilex* L. and *Pinus halepensis* Mill. in Catalonia. *Chemosphere* **60**(9): 1293-1307.
- Sassmann S, Adlassnig W, Puschenreiter M, Cadenas EJP, Leyvas M, Lichtscheidl IK, Lang I. 2015a. Free metal ion availability is a major factor for tolerance and growth in *Physcomitrella patens*. *Environmental and Experimental Botany* **110**: 1–10.
- Sassmann S, Weidinger M, Adlassnig W, Hofhansl F, Bock B, Lang I. 2015b. Zinc and copper uptake in *Physcomitrella patens*: Limitations and effects on growth and morphology. *Environmental and Experimental Botany* **118**: 12–20.
- Sassmann S, Wernitznig S, Lichtscheidl IK & Lang I. 2010. Comparing copper resistance in two bryophytes: *Mielichhoferia elongata* Hornsch. versus *Physcomitrella patens* Hedw. *Protoplasma* **246**:119–123.
- Satake K, Shibata K, Nishikawa M, Fuwa K. 1988. Copper accumulation and location in the moss *Scopelophila cataractae*. *Journal of Bryology* **15**(2): 353-376.
- Saxena DK, Saiful-Arfeen M. 2009. Effect of Cu and Cd on oxidative enzymes and chlorophyll content of moss *Racomitrium crispulum*. *Taiwania* **54**(4): 365-374.
- Scheirer DC. 1978. Cell wall chemistry and fine structure in leptoids of *Dendroligotrichum* (Bryophyta): the end wall. *American Journal of Botany* **65**(9): 1027-1031.

- Scheirer DC. 1980. Differentiation of bryophyte conducting tissues: structure and histochemistry. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **107**:298–307.
- Scheirer DC. 1990. Mosses. In: Behnke HD, Sjolund RD (eds.), *Sieve Elements*, pp. 19-33, Springer, Berlin, Heidelberg.
- Schmidt SB, Eisenhut M, Schneider A. 2020. Chloroplast transition metal regulation for efficient photosynthesis. *Trends in Plant Science* **25**: 817–828.
- Schröder W, Nickel S. 2019. Moss species-specific accumulation of atmospheric deposition?. *Environmental Sciences Europe* **31**: 78:1-78:18.
- Schulz H, Baranska M. 2007. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* **43**(1):13-25.
- Schützendübel A, Polle A. 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany* **53**(372): 1351-1365.
- Scimeca M, Bischetti S, Lamsira HK, Bonfiglio R, Bonanno E. 2018. Energy Dispersive X-ray (EDX) microanalysis: A powerful tool in biomedical research and diagnosis. *European journal of histochemistry: EJH*. **62**(1): 2841:1-2841:10.
- Sergeeva A, Zinicovscaia I, Vergel K, Yushin N, Urošević MA. 2021. The effect of heavy industry on air pollution studied by active moss biomonitoring in Donetsk Region (Ukraine). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **80**(3): 546-557.
- Shakya K, Chettri MK, Sawidis T. 2008. Impact of heavy metals (copper, zinc, and lead) on the chlorophyll content of some mosses. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **54**:412'421.
- Sharma A, Shahzad B, Rehman A, Bhardwaj R, Landi M, Zheng B. 2019. Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules* **24**(13): 2452.
- Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany* **2012**: 217037:1- 217037:26.
- Shaw, AJ. 1990. Metal tolerance in bryophytes. In: Shaw AJ (ed.), *Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects*, pp. 133-152, CRC Press, Boca Raton.
- Shaw BP, Sahu SK, Mishra RK. 2004. Heavy metal induced oxidative damage in terrestrial plants. In: Prasad MNV (ed.). *Heavy metal stress in plants*, pp. 84-126, Springer, Berlin, Heidelberg.
- Shaw J. 1987. Evolution of heavy metal tolerance in bryophytes. II. An ecological and experimental investigation of the “copper moss,” *Scopelophila cataractae* (Pottiaceae). *American Journal of Botany* **74**(6): 813-821.
- Shaw J, Beer SC, Lutz J. 1989. Potential for the evolution of heavy metal tolerance in *Bryum argenteum*, a moss. I. Variation within and among populations. *Bryologist* **92**(1): 73-80.
- Shaw J, Renzaglia K. 2004. Phylogeny and diversification of bryophytes. *American Journal of Botany* **91**(10): 1557-1581.
- Sidhu M, Brown DH. 1996. A new laboratory technique for studying the effects of heavy metals on bryophyte growth. *Annals of Botany* **78**(6): 711-717.
- Sies H. 2018. On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. *Current Opinion in Toxicology* **7**: 122-126.



- Singh J, Thakur JK. 2018. Photosynthesis and abiotic stress in plants. In: Vats S (ed.), *Biotic and Abiotic Stress Tolerance in Plants*, pp. 27-46, Springer, Singapore.
- Singleton VL, Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* **16**: 144-158.
- Skórzyńska-Polit E. 2007. Lipid peroxidation in plant cells, its physiological role and changes under heavy metal stress. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **76**(1): 49-54.
- Sokołowska K, Turzańska M, Nilsson MC. 2017. Symplasmic and apoplasmic transport inside feather moss stems of *Pleurozium schreberi* and *Hylocomium splendens*. *Annals of Botany* **120**(5): 805-817.
- Sorrentino MC, Capozzi F, Giordano S, Spagnuolo V. 2017. Genotoxic effect of Pb and Cd on in vitro cultures of *Sphagnum palustre*: An evaluation by ISSR markers. *Chemosphere* **181**: 208-215.
- Soudzilovskaia NA, Cornelissen, JHC, During HJ, Van Logtestijn, RSP., Lang SI, Aerts R. 2010. Similar cation exchange capacities among bryophyte species refute a presumed mechanism of peatland acidification. *Ecology* **91**(9): 2716-2726.
- Souri Z, Cardoso AA, da-Silva CJ, de Oliveira LM, Dari B, Sihi D, Karimi N. 2019. Heavy metals and photosynthesis: recent developments. In: Ahmad P, Ahanger MA, Alyemeni MN, Alam P (eds.). *Photosynthesis, Productivity and Environmental Stress*, pp. 107-134, Wiley Blackwell, Chichester.
- Sousa F, Civián P, Brazão J, Foster PG, Cox CJ. 2020b. The mitochondrial phylogeny of land plants shows support for Setaphyta under composition-heterogeneous substitution models. *PeerJ* **8**: e8995:1-e8995:18.
- Sousa F, Civián P, Foster PG, Cox CJ. 2020a. The chloroplast land plant phylogeny: analyses employing better-fitting tree-and site-heterogeneous composition models. *Frontiers in Plant Science* **11**: 1062:1-1062:10.
- Spagnuolo V, Zampella M, Giordano S, Adamo P. 2011. Cytological stress and element uptake in moss and lichen exposed in bags in urban area. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **74**(5): 1434-1443.
- Sparks DL. 2005. Toxic metals in the environment: the role of surfaces. *Elements* **1**(4): 193-197.
- Stanković JD, Janković S, Lang I, Vujičić MM, Sabovljević MS, Sabovljević AD. 2021. The toxic metal stress in two mosses of different growth forms under axenic and controlled conditions. *Botanica Serbica* **45**(1):31-47.
- Stanković JD, Sabovljević AD, Sabovljević MS. 2018. Bryophytes and heavy metals: a review. *Acta Botanica Croatica* **77**:109–118.
- Stevenson DW. 1974. Ultrastructure of the nacreous leptoids (sieve elements) in the polytrichaceous moss *Atrichum undulatum*. *American Journal of Botany* **61**(4): 414-421.
- Sucharová J, Suchara I. 1998. Atmospheric deposition levels of chosen elements in the Czech Republic determined in the framework of the International Bryomonitoring Program 1995. *Science of the Total Environment* **223**(1): 37-52.
- Sun SQ, He M, Cao T, Yusuyin Y, Han W, Li JL. 2010. Antioxidative responses related to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> depletion in *Hypnum plumaeforme* under the combined stress induced by Pb and Ni. *Environmental Monitoring and Assessment* **163**(1): 303-312.
- Sun SQ, He M, Cao T, Zhang YC, Han W. 2009. Response mechanisms of antioxidants in bryophyte (*Hypnum plumaeforme*) under the stress of single or combined Pb and/or Ni. *Environmental Monitoring and Assessment* **149**(1-4): 291-302.

- Sun SQ, He M, Wang GX, Cao T. 2011. Heavy metal-induced physiological alterations and oxidative stress in the moss *Brachythecium piligerum chad*. *Environmental Toxicology* **26**(5): 453-458.
- Sun SQ, Wang DY, He M, Li XY, Zhang C. 2007. Retention capacities of several bryophytes for hg(II) with special reference to the elevation and morphology of moss growth. *Environmental Monitoring and Assessment* **133**(1): 399-406.
- Sutter K, Jung K, Krauss GJ. 2002. Effects of heavy metals on the nitrogen metabolism of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. *Environmental Science and Pollution Research* **9**(6): 417-21.
- Suzuki N. 2005. Alleviation by calcium of cadmium-induced root growth inhibition in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Biotechnology* **22**(1): 19-25.
- Suzuki N, Miller G, Morales J, Shulaev V, Torres MA, Mittler R. 2011. Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Current opinion in Plant Biology* **14**(6): 691–699.
- Sytar O, Kumar A, Latowski D, Kuczynska P, Strzałka K, Prasad MNV. 2013. Heavy metal-induced oxidative damage, defense reactions, and detoxification mechanisms in plants. *Acta Physiologiae Plantarum* **35**(4): 985-999.
- Šljivić-Ivanović MZ, Smičiklas ID, Marković JP, Milenković AS. 2013. Analiza faktora koji utiču na sorpciju Cu (II) jona klinoptilolitom. *Hemijska Industrija* **67**(5): 739-745.
- Tabors G, Brūmelis G, Lapina L, Pospelova G, Nikodemus O. 2004. Changes in element concentrations in moss segments after cross-transplanting between a polluted and non-polluted site. *Journal of Atmospheric Chemistry* **49**(1): 191-197.
- Takahama U, Oniki T. 1997. A peroxidase/phenolics/ascorbate system can scavenge hydrogen peroxide in plant cells. *Physiologia Plantarum* **101**(4): 845-852.
- Takahama U, Oniki T. 2000. Flavonoids and some other phenolics as substrates of peroxidase: physiological significance of the redox reactions. *Journal of Plant Research* **113**(3): 301-309.
- Tang H, Duijts K, Bezanilla M, Scheres B, Vermeer JEM, Willemsen V. 2020. Geometric cues forecast the switch from two- to three-dimensional growth in *Physcomitrella patens*. *New Phytologist* **225**(5): 1945-1955.
- Tessier L, Boisvert JL. 1999. Performance of terrestrial bryophytes as biomonitors of atmospheric pollution. A review. *Toxicological & Environmental Chemistry* **68**(1-2): 179-220.
- Thor K. 2019. Calcium—nutrient and messenger. *Frontiers in Plant Science* **10**: 440:1-440:7.
- Tipping E, Vincent CD, Lawlor AJ, Lofts S. 2008. Metal accumulation by stream bryophytes, related to chemical speciation. *Environmental Pollution* **156**(3): 936-943.
- Tremper AH, Agneta M, Burton S, Higgs DE. 2004. Field and laboratory exposures of two moss species to low level metal pollution. *Journal of Atmospheric Chemistry* **49**: 111–120.
- Turner BL, Baxter R, Ellwood, NTW, Whitton BA. 2001. Characterization of the phosphatase activities of mosses in relation to their environment. *Plant, Cell & Environment* **24**(11): 1165-1176.
- Tyagi R, Gupta P, Uniyal PL. 2007. The effect of lead and zinc concentrations on the growth of four species of bryophytes. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* **1**(2): 128-135.
- Ucarli O, Yayintas OT, Engin MS, Cay S, Saglikoglu G, Yilmaz S. 2020. Investigation of Competitive and Noncompetitive Adsorption of Some Heavy Metals Ions on *Leucodon sciuroides* (Hedw.) Schwagr. *Langmuir* **36**(28): 8265-8271.

- Ulery, AL. 2005. Edaphology. In: Hillel D, Hatfield JH, Powlson DS, Rosenzweig C, Scow KM, Singer MJ, Sparks DL (eds.). *Encyclopedia of Soils in the Environment*, pp. 419-425, Academic Press, New York.
- Urošević MA, Vuković G, Jovanović P, Vujičić M, Sabovljević A, Sabovljević M, Tomašević M. 2017. Urban background of air pollution: Evaluation through moss bag biomonitoring of trace elements in Botanical garden. *Urban Forestry & Urban Greening* **25**: 1-10.
- Vanderpoorten A, Goffinet B. 2009. *Introduction to bryophytes*. Cambridge University Press.
- Varela Z, Debén S, Saxena DK, Aboal JR, Fernández JÁ. 2018. Levels of antioxidant compound glutathione in moss from industrial areas. *Atmosphere* **9**(7): 284:1-284:8.
- Varela Z, Fernández JA, Real C, Carballeira A, Aboal JR. 2015. Influence of the physicochemical characteristics of pollutants on their uptake in moss. *Atmospheric Environment* **102**: 130-135.
- Varela Z, Roiloa SR, Fernández JA, Retuerto R, Carballeira A, Aboal JR. 2013. Physiological and growth responses of transplants of the moss *Pseudoscleropodium purum* to atmospheric pollutants. *Water, Air, & Soil Pollution* **224**: 1753:1-1753:10.
- Vázquez MD, López J, Carballeira A. 1999. Uptake of heavy metals to the extracellular and intracellular compartments in three species of aquatic bryophyte. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **44**(1): 12-24.
- Velikova V, Yordanov I, Edreva A. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. *Plant Science* **151**(1): 59-66.
- Veljović-Jovanović S, Kukavica B, Vidović M, Morina F, Menckhoff L. 2018. Class III peroxidases: functions, localization and redox regulation of isoenzymes. In: Gupta D, Palma J, Corpas F (eds.), *Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants*, pp. 269-300, Springer, Cham.
- Viswanath KK, Varakumar P, Pamuru RR, Basha SJ, Mehta S, Rao AD. 2020. Plant lipoxygenases and their role in plant physiology. *Journal of Plant Biology* **63**(2): 83-95.
- Vítek P, Veselá B, Klem K. 2020. Spatial and temporal variability of plant leaf responses cascade after PSII inhibition: Raman, chlorophyll fluorescence and infrared thermal imaging. *Sensors* **20**(4):1015:1-1015:13.
- Vogel-Mikuš K, Arčon I, Kump P, Pelicon P, Nečemer M, Vavpetič P, Koren Š, Regvar M. 2012. Analytical Tools for Exploring Metal Accumulation and Tolerance in Plants. In: Anjum NA, Pereira ME, Ahmad I, Duarte AC, Umar S, Khan NA (eds.), *Phytotechnologies: Remediation Of Environmental Contaminants* **1** pp. 443-495, CRC Press/Taylor And Francis Group, Boca Raton.
- Vogel-Mikuš K, Pongrac P, Pelicon P. 2014. Micro-PIXE elemental mapping for ionome studies of crop plants. *International Journal of PIXE* **24**(03n04): 217-233.
- Vogel-Mikuš K, Pongrac P, Pelicon P, Vavpetič P, Povh B, Bothe H, Regvar M. 2009. Micro-PIXE analysis for localization and quantification of elements in roots of mycorrhizal metal-tolerant plants. In: Varma A, Kharkwal AC (eds.), *Symbiotic Fungi*, pp. 227-242, Springer, Berlin, Heidelberg.
- Vogel-Mikuš K, Regvar M, Mesjasz-Przybyłowicz J, Przybyłowicz WJ, Simčič J, Pelicon P, Budnar M. 2008. Spatial distribution of cadmium in leaves of metal hyperaccumulating *Thlaspi praecox* using micro-PIXE. *New Phytologist* **179**(3): 712-721.

- Vujičić M, Sabovljević A, Sabovljević M. 2011. Axenically culturing the bryophytes: Establishment and propagation of the moss *Hypnum cupressiforme* Hedw. (Bryophyta, Hypnaceae) in *in vitro* conditions. *Botanica Serbica* **35**(1): 71-77.
- Wang M, Zheng Q, Shen Q, Guo S. 2013. The critical role of potassium in plant stress response. *International Journal of Molecular Sciences* **14**(4): 7370-7390.
- Wells JM, Brown DH. 1987. Factors affecting the kinetics of intra-and extracellular cadmium uptake by the moss *Rhytidiadelphus squarrosus*. *New Phytologist* **105**(1): 123-137.
- Wells JM, Brown DH, Beckett RP. 1995. Kinetic analysis of Cd uptake in Cd-tolerant and intolerant populations of the moss *Rhytidiadelphus squarrosus* (Hedw.) Warnst and the lichen *Peltigera membranacea* (Ach.) Nyl. *New Phytologist* **129**(3): 477-486.
- White PJ, Broadley MR. 2003. Calcium in plants. *Annals of Botany* **92**(4): 487-511.
- Whitton BA, Al-Shehri AM, Ellwood NTW, Turner BL. 2005. Ecological aspects of phosphatase activity in cyanobacteria, eukaryotic algae and bryophytes. In: Turner BL, Frossard E, Baldwin DS (eds.), *Organic phosphorus in the environment*, pp. 205-241, CABI Publishing.
- Williams LE, Mills RF. 2005. P(1B)-ATPases – an ancient family of transmembrane metal pumps with diverse functions in plants. *Trends in Plant Science* **10**(10): 491-502.
- Withnall R, Chowdhry BZ, Silver J, Edwards HG, de Oliveira LF. 2003. Raman spectra of carotenoids in natural products. *Spectrochimica Acta Part a: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **59**(10): 2207-12.
- Wolterbeek, B. 2002. Biomonitoring of trace element air pollution: principles, possibilities and perspectives. *Environmental Pollution* **120**: 11–21.
- Wolterbeek HT, Verburg TG. 2001. Predicting metal toxicity revisited: general properties vs. specific effects. *Science of the Total Environment* **279**(1-3): 87-115.
- Wu Y, Chen Y, Yi Y, Shen Z. 2009. Responses to copper by the moss *Plagiomnium cuspidatum*: hydrogen peroxide accumulation and the antioxidant defense system. *Chemosphere* **74**(9): 1260-1265.
- Yadav SK. 2010. Heavy metals toxicity in plants: an overview on the role of glutathione and phytochelatin in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany* **76**(2): 167–179.
- Yruea I. 2005. Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **17**:145-156.
- Zechmeister HG. 1998. Annual growth of four pleurocarpous moss species and their applicability for biomonitoring heavy metals. *Environmental Monitoring and Assessment* **52**(3): 441-451.
- Zechmeister HG, Dirnböck T, Hülber K, Mirtl M. 2007. Assessing airborne pollution effects on bryophytes: lessons learned through long-term integrated monitoring in Austria. *Environmental Pollution* **147**(3): 696-705.
- Zechmeister HG, Grodzińska K, Szarek-Łukaszewska G. 2003. Bryophytes. In: Markert BA, Breure AM, Zechmeister HG (eds.), *Bioindicators & Biomonitors: Principles, Concepts, and Applications* **1**, pp. 329–375, Elsevier Science Ltd., Amsterdam.
- Zeng J, Ping W, Sanaeifar A, Xu X, Luo W, Sha J, Huang Y, Liu X, Zhan B, Zhang H, Li X. 2021. Quantitative visualization of photosynthetic pigments in tea leaves based on Raman spectroscopy and calibration model transfer. *Plant Methods* **17**(1): 4:1-4:13.
- Zengin FK, Kirbag S. 2007. Effects of copper on chlorophyll, proline, protein and abscisic acid level of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedlings. *Journal of Environmental Biology* **28**: 561–566.

- Zengin FK, Munzuroglu O. 2005. Effects of some heavy metals on content of chlorophyll, proline and some antioxidant chemicals in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* **47**: 157–164.
- Zhang Y, Gao W, Cui C, Zhang Z, He L, Zheng J, Hou R. 2020. Development of a method to evaluate the tenderness of fresh tea leaves based on rapid, in-situ Raman spectroscopy scanning for carotenoids. *Food Chemistry* **308**:125648:1-125648:8.
- Zhao FJ, Moore KL, Lombi E, Zhu YG. 2014. Imaging element distribution and speciation in plant cells. *Trends in Plant Science* **19**(3): 183-192.
- Zvereva EL, Kozlov MV. 2011. Impacts of industrial pollutants on bryophytes: a meta-analysis of observational studies. *Water, Air, & Soil Pollution* **218**(1): 573-586.



## BIOGRAFIJA AUTORA

Jelena Stanković (rođena Janković) rođena je 08.11.1988. godine u Kraljevu. Osnovnu školu „Petar Nikolić“ u Lascu završila je 2003. godine, nakon koje je pohađala Gimnaziju u Kraljevu. Na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2012. godine završila je osnovne akademske studije, program Molekularna biologija i fiziologija. Master akademske studije na istom fakultetu, studijski program Biologija (modul Primenjena genetika) upisala je školske 2012/13. godine. Master rad pod naslovom „Interakcije između gena mitohondrija i jedra u procesima starenja: Analiza laboratorijskih populacija *Acanthoscelides obtectus* (Say)“, rađen na Institutu za Biološka istraživanja „Siniša Stanković“ pod rukovodstvom prof. dr Biljane Stojković, odbranila je sa ocenom 10.

Školske 2013/14. godine upisala je doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, modul Fiziologija i molekularna biologija biljaka. Od oktobra 2016. godine zaposlena je na Katedri za fiziologiju biljaka, Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu kao istraživač saradnik, gde je u periodu 2014-2016. godine bila zaposlena kao istraživač pripravnik na nacionalnom naučnom projektu OI 173024. Od 2014. godine uključena je u izvođenje praktične nastave na dva obavezna predmeta na Katedri za fiziologiju biljaka. Bila je član komisije za odbranu dva master i jednog diplomskog rada. Do sada je objavila devet naučnih radova, od kojih 6 u međunarodnim časopisima i ima 13 saopštenja na međunarodnim i domaćim naučnim skupovima.

Član je Društva za fiziologiju biljaka Srbije i Srpskog biološkog društva.

## Прилог 1

### Изјава о ауторству

Potpisani: **Јелена Д. Станковић**

Број индекса: Б3026/2013

#### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

**„Екофизиолошки одговор маховина *Atrichum undulatum* (Hedw.) P. Beauv. и *Hypnum cupressiforme* Hedw. на стрес изазван металима у условима *in vitro*“**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Прилог 2

### Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: **Јелена Д. Станковић**

Број индекса: **Б3026/2013**

Студијски програм: **Биологија (Молекуларна биологија и физиологија биљака)**

Наслов рада: **„Екофизиолошки одговор маховина *Atrichum undulatum* (Hedw.) P. Beauv. и *Hypnum cupressiforme* Hedw. на стрес изазван металима у условима *in vitro*“**

Ментори: **др Анета Сабовљевић, редовни професор**

**др Марко Сабовљевић, редовни професор**

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Прилог 3

### Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**„Екофизиолошки одговор маховина *Atrichum undulatum* (Hedw.) P. Beauv. и *Hypnum cupressiforme* Hedw. на стрес изазван металима у условима *in vitro*“**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

**③ Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)**

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.