



UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA HEMIJU



**Biohemijska i fiziološka karakterizacija klonova
topole (*Populus* spp.) u procesu fitoekstrakcije bakra,
nikla i kadmijuma**

- doktorska disertacija -

Mentori:
Prof. dr Neda Mimica-Dukić
Prof. dr Dubravka Štajner

Kandidat:
Marko Kebert

Novi Sad, 2014.

SADRŽAJ:

1. UVOD	2
2. PREGLED LITERATURE	5
2.1. Poreklo teških metala u zemljištu.....	5
2.2. Teški metali i biljke	6
2.3. Teški metali i mikroorganizmi	8
2.4. Proces fitoremedijacije	9
2.4.1. Prednosti i mane fitoremedijacije.....	11
2.4.2. Upotreba drvenastih biljaka u u fitoremedijaciji	14
2.5. Helacija, homeostaza, tolerancija i detoksifikacija teških metala u biljkama	14
2.5.1. Fitohelatini	15
2.5.2. Metalotioneini	16
2.5.3. Organske kiseline kao helatori teških metala	16
2.6. Uticaj glutationa u rezistenciji na stres	17
2.7. Teški metali kao uzročnici oksidativnog stresa kod biljaka	19
2.7.1. Toksičnost jona Cu^{2+} u biljkama	20
2.7.2. Toksičnost jona Cd^{2+} u biljkama	22
2.7.3. Toksičnost jona Ni^{2+} u biljkama	24
2.8. Efekti teških metala na fotosintezu	27
2.9. Nitrozativni stres kod biljaka izazvan abiotičkim stresom	28
2.10. Fitohormoni	31
2.10.1. Abscisinska kiselina (ABA)	31
2.10.1.1. Biosinteza ABA.....	33
2.10.1.2. Koncentracije ABA u tkivima	34
2.10.1.3. Inaktivacija ABA putem oksidacije ili konjugacije.....	34
2.10.1.4. Transport ABA kroz tkiva	35
2.10.1.5. Funkcije ABA u biljnoj ćeliji	36
2.10.1.6. ABA i oksidativni stres	37
2.10.2. Auksin-hormon rasta	39
2.10.2.1. Putevi biosinteze indol-3-sirćetne kiseline	40
2.10.2.2. Konjugovane forme IAA	42

2.10.2.3. Metabolički putevi degradacije IAA	43
2.10.2.4. Distribucija i transport IAA unutar ćelije	44
2.10.2.5. Fiziološki efekti auksina	47
2.10.2.6. Putevi signalne transdukcije auksina.....	49
2.11. Poliamini: esencijalni faktori rasta i opstanka.....	50
2.11.1. Biosinteza poliamina	51
2.11.2. Katabolizam poliamina.....	52
2.11.3. Uloga poliamina u biljnom opstanku	53
2.11.4. Uloga poliamina u a/biotičkom stresu.....	54
2.11.5. Konjugovani poliamini-fenilamidi (PhA)	56
3. CILJ I RADNE HIPOTEZE	59
4. MATERIJAL I METODE.....	61
4.1. Biljni materijal.....	61
4.1.1. <i>Populus x euramericana</i> (Dode) Guinier vrsta	61
4.1.2. <i>Populus deltoides</i> Marshall vrste	61
4.1.3 Izabrani klonovi u eksperimentu	61
4.2. Ogled u polukontrolisanim uslovima	62
4.3. Priprema matičnih rastvora mikrotalasnom digestijom.....	64
4.4. Atomska apsorpciona spektrofotometrijska (AAS) analiza	65
4.5. Određivanje sadržaja indol-3 sirćetne kiseline (IAA) i abscisinske kiseline (ABA) metodom gasne hromatografije kuplovane sa masenom spektrometrijom (GC/MS).....	67
4.5.1. Ekstrakcija fitohormona	67
4.5.2. Prečišćavanje uzoraka upotrebom ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE).....	68
4.5.3. Priprema diazometana i derivatizacija analita	69
4.5.4. Gasno-hromatografska analiza biljnih hormona	70
4.6. Određivanje sadržaja slobodnih i konjugovanih poliamina primenom HPLC analize.....	71
4.6.1. Ekstrakcija i derivatizacija poliamina	71
4.7. CHN elementarna analiza.....	72
4.8. Biohemijske metode merenja antioksidantne aktivnosti	74
4.8.1. Priprema ekstrakata	76
4.8.2. Sposobnost neutralizacije radikala (RSC-radical scavenger capacity).....	76
4.8.2.1. Određivanje sposobnosti neutralizacije ABTS radikala.....	76
4.8.2.2. Određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala.....	78

4.8.2.3. Određivanje sposobnosti neutralizacije OH radikala	79
4.8.2.4. Određivanje sposobnosti neutralizacije NO radikala	81
4.8.3. Određivanje intenziteta lipidne peroskidacije	82
4.8.4. Određivanje redukcione sposobnosti ekstrakta FRAP testom	82
4.8.5. Određivanje sadržaja ukupnih fenola (TPC- total phenolic content)	84
4.8.6. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida	85
4.8.7. Određivanje sadržaja rastvorljivih proteina.....	86
4.8.8. Određivanje aktivnosti superoksid-dizmutaze (SOD: EC 1.15.1.1)	86
4.8.9. Određivanje aktivnosti gvajakol-peroksidaze (GPx).....	87
4.8.10. Određivanje glutation reduktaze (GR: EC 1.6.4.2)	88
4.8.11. Određivanje aktivnosti glutation peroksidaze (GSH-Px: EC 1.1 1.1.9).....	89
4.9. Pedološke analize zemljišta	90
4.10. Mikrobiološke analize zemljišta.....	91
4.10.1. Određivanje ukupne brojnosti oligotrofnih bakterija	91
4.10.2. Određivanje brojnosti filametoznih gljiva.....	92
4.10.3. Određivanje ukupne brojnosti algi	92
4.11. Fiziološke analize listova	93
4.11.1. Neto fotosinteza, transpiracija i stomatalna provodljivost	93
4.11.2. Određivanje sadržaja pigmenata hloroplasta.....	94
4.12. Statistička obrada podataka	94
5. REZULTATI I DISKUSIJA.....	96
5.1. Fizičko-hemijska svojstva zemljišta.....	96
5.2. Akumulacija nikla po organima i procena potencijala za fitoekstrakciju klonova topola.....	96
5.3. Akumulacija bakra po organima i procena potencijala za fitoekstrakciju klonova topola	100
5.4. Akumulacija kadmijuma po organima i procena potencijala za fitoekstrakciju klonova topola.....	103
5.5. Uticaj teških metala na morfološke karakteristike klonova topola.....	106
5.6. Uticaj teških metala na parametre fotosinteze kod ispitivanih klonova topola	108
5.7. Uticaj teških metala na sadržaj hlorofila a,b,ukupnih hlorofila i karotenoida kod klonova topola.....	114
5.8. Uticaj teških metala na sadržaj makronutrijenata u klonovima topola.....	118
5.9. Uticaj teških metala na sposobnost ekstrakata klonova topola da vrše neutralizaciju slobodno-radikaliskih vrsta.....	128
5.10. Uticaj teških metala (Ni, Cu i Cd) na sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u klonovima topola.....	136
5.11. Uticaj teških metala (Ni, Cu i Cd) na redukcioni kapacitet listova i korenova klonova topola	142

5.12. Uticaj teških metala na intenzitet lipidne peroksidacije u listovima i korenovima klonova topola...	143
5.13. Uticaj teških metala na sadržaj rastvornih proteina u listovima i korenovima klonova topola	146
5.14. Uticaj teških metala na aktivnosti enzima uključenih u antioksidantni odgovor topola	147
5.14.1. Uticaj teških metala na aktivnosti enzima superoksid-dizmutaze u listovima i korenovima klonova topola	148
5.14.2. Uticaj teških metala na enzimsku aktivnost GPx u listovima i korenovima klonova topola	149
5.14.3. Uticaj teških metala na enzimsku aktivnost GSH-Px u listovima i korenovima klonova topola	152
5.14.4. Uticaj teških metala na enzimsku aktivnost GR u listovima i korenovima klonova topola ..	154
5.15. Uticaj teških metala na sadržaj biljnih hormona u topolama	160
5.15.1. Uticaj jona Cu^{2+} na sadržaj abscisinske kiseline (ABA) u listovima i korenovima različitih klonova topola	160
5.15.2. Uticaj jona Cu^{2+} na sadržaj indol-3-sirćetne kiseline (IAA) u listovima i korenovima klonova topola	161
5.15.3. Uticaj teških metala na sadržaj fitohormona u listovima i korenovima topole <i>P. deltoides</i>	161
5.16. Uticaj jona teških metala na sadržaj slobodnih poliamina	164
5.17. Uticaj različitih jona teških metala (Ni, Cu i Cd) na sadržaj konjugovanih poliamina (Put, Spd i Spm)	169
5.17.1. Uticaj jona Cu^{2+} na sadržaj konjugovanih poliamina (Put, Spm, Spd) u listovima i korenovima klonova topola	172
5.18. Uticaj teških metala na brojnost mikroorganizama u zemljištu	179
5.19. Uticaj jona Ni^{2+} , Cu^{2+} i Cd^{2+} na brojnost filametoznih gljiva	182
5.20. Uticaj jona Ni^{2+} , Cu^{2+} i Cd^{2+} na broj algi	183
6. ZAKLJUČAK	185
7. LITERATURA	190
8. PRILOG	231
9. BIOGRAFIJA	249

*“What you get by achieving your goals is not as important
as what you become by achieving your goals.”*

Henry David Thoreau

“Gratitude is the music of the heart, when its chords are swept by the breeze of kindness.”
~Author Unknown

Veliku zahvalnost dugujem svojim mentorkama, profesoricama dr Nedi Mimici-Dukić i dr Dubravki Štajner koje su svojim sugestijama, dobronamernim savetima i detaljnim ispravkama, umnogome doprinele unapređivanju ovog rada. Posebno sam im zahvalan na ekspeditivnosti i domišljatim idejama prilikom ispravke ovog rada.

Veliku zahvalnost dugujem i svom direktoru dr Saši Orloviću, na njegovom ogromnom ukazanom poverenju i velikoj slobodi koju mi je pružio u naučno-istraživačkom radu. Profesor dr Orlović je svojom otvorenošću za nove ideje, razumevanjem potrebe za interdisciplinarnošću u nauci kao i iskrenom podrškom ovog rada omogućio „stvaranje mostova“ između istraživanja u oblasti šumarstva i biohemije po prvi put u Srbiji.

Profesoru dr Đorđu Malenčiću zahvaljujem na veoma korektnoj saradnji, vedrom duhu i optimizmu koji je širio za vreme rada u laboratorijama Poljoprivrednog fakulteta.

Docentu dr Dejanu Orčiću zahvaljujem na stručnim i često genijalnim savetima i rešenjima, sa kojima se pojavljivao uvek kada je bilo najpotrebnije, kada je dolazilo do problema sa analizama ili kad se one nisu odvijale u željenom pravcu.

Neizmernu zahvalnost dugujem dr Frančeski Raparini, naučnom savetniku na Institutu za Biometeorologiju u Bolonji, za njemu nesebično pruženu pomoć i uloženi trud, rad i vreme prilikom učestvovanja u eksperimentalnom delu ovog rada. Dr Raparini je pokazala da je izuzetan čovek, izvrstan naučnik i veliki prijatelj i zaista se smatram srećnim što imam priliku da saradujem sa njom i njenim timom. Veliko hvala i dr Luizi Neri koja mi je pomogla u pripremi uzoraka za GC/MS analizu u ovom radu.

Neizrecivu zahvalnost zaslužila je i profesorica dr Stefaniya Biondi koja mi je ukazala gostoprinstvo u svojoj laboratoriji na Biološkom fakultetu u Bolonji i bezrezervno se posvetila radu sa mnom kako bi me naučila više o poliaminima i tačnoj hromatografiji, ali i naučnoj etici i važnim životnim vrednostima kao što su skromnost i dostojanstvo.

Docentu dr Borisu Popović zahvaljujem na ukazanoj pomoći u postavljanju i modifikaciji biohemijskih metoda prema našim uzorcima, i za divne i poučne razgovore o temama koje su između fizike i metafizike, hemije i alhemije.

Docent dr Maja Karaman je imala velikog udela u dobijanju rezultata mikrobioloških istraživanja u ovom radu, te njoj i njenom timu kom pripadaju Milena Rašeta i Milana Rakić neizostavno dugujem veliku zahvalnost.

Srdačno zahvaljujem Sanji Muzikravić i dr Milanu Boriševu na ogromnoj pomoći pri postavljanju i održavanju ogleda pod kontrolisanim uslovima u staklarama Biološkog fakulteta, kao i na dugogodišnjoj saradnji protkanoj pozitivnom energijom i kolegijalnošću.

Od samog početka mog istraživačkog rada, nesebičnu pomoć ukazala mi je dr Tijana Zeremski sa Instituta za ratarstvo i povrtarstvo kojoj takođe želim da zahvalim na savetima, što stručnim, što prijateljskim.

Laborantima, gospođi Nadi Čordarov, Mari Umićević i Igoru Guzini želim da zahvalim na tehničkoj pomoći i na divnoj radnoj atmosferi koju su održavali tokom rada u laboratoriji.

Koleginicama, ali i prijateljima dr Biljani Kiprovske i Sanji Vlasiavljević zahvaljujem na svim korisnim savetima, ohrabrenjima i podršci koju su mi pružale tokom izrade ove disertacije.

Prijateljima, Jovani Vilipić, Dragani Pilipović i Milici Savin posebno zahvaljujem na ukazanoj pomoći i spremnosti da priteknu u pomoć u bilo koje doba dana i noći.

Želim da se zahvalim i mojoj sestri Adrijani i svim ostalim mnogobrojnim prijateljima koje sam možda izostavio, a koji su na direktan ili indirektan način doprineli izradi ove teze.

Najveću zahvalnost zaslužuju moji roditelji, Marija Kebert i Žarko Ačanski, koji su me vaspitali da se vrednim, istrajnim i posvećenim radom postižu najbolji rezultati i koji su oduvek sa ljubavlju podržavali moju kreativnost, interesovanja i radoznalost, te njima i posvećujem ovu tezu.

Marko

Biochemical and physiological characterization of three poplar clones (*Populus spp.*) during the cooper, nickel and cadmium phytoextraction process

SUMMARY

Heavy metals are severe environmental pollutants and their toxicity represents an increasing problem at different levels: ecological, evolutionary, nutritional and environmental. Because they cannot be degraded or destroyed, heavy metals are persistent in all parts of the environment. Phytoremediation, the use of plants to extract, sequester and detoxify pollutants is a new and powerful technique for environmental clean-up. In the process of phytoremediation the plants are introduced into the environment to accumulate the contaminants in their roots and aboveground parts. Due to their advantages (fast-growth, large biomass production, feasible reproduction, high transpiration rate and recently sequenced genome of *P. trichocarpa* etc.), poplars (*Populus spp.*) present great candidate for investigation in aspect of so called phytoextraction, but continued research is necessary to fully exploit their potential. An accurate assessment of poplar response to heavy metal induced stress and understanding of its mechanism for acclimation to stress are of crucial importance. Complex metabolic pathways and mechanisms have been evolved to cope with stressful conditions in environment and beside enzymatic and antioxidant response, plants show subtle but significant changes in plant hormones content which could be indicators of metabolic status of plant and give information about adaptive response of plant to stress and give more information about plant tolerance or sensitivity. Beside plant hormones, polyamines (PAs), putrescine (Put), spermidine (Spd) and spermine (Spm), as low molecular-weight organic polycations, display a high biological activity and have important role in antistress action. Since they represent universal multifunctional regulators of physiological processes, they are also involved in biological response to detrimental effects of heavy metals in soils.

The aim of this study was to estimate and compare phytoextraction capacities of three different poplar clones (M1, B229 and Pe 19/66) according to their bioconcentration and translocation factors (BCF and TF) during phytoextraction process in soil. Furthermore, the goal was to assess different biological responses among the poplar clones during exposure to different concentration of three heavy metals (Ni, Cu and Cd) and to track changes in their mineral, physiological, biochemical, antioxidant and metabolomic status that occur during the abiotic stress. To accomplish this, the greenhouse pot experiment was designed under the controlled conditions. Cuttings of tree poplar clones (M1, B229 and Pe 19/66) belonging to two poplar species (*Populus deltoides* and *Populus x euramericana*) were exposed for three months to different concentration of three heavy metals (Ni^{2+} , Cu^{2+} and Cd^{2+}) in soil, separately. The soil was treated with maximum allowed amount (MAA) and tripled MAA of each metal according to National legislation. Quantification of physiological properties (net photosynthesis, transpiration rate and water use efficiency), mineral (N, P, C, Mg and Ca contents) and metabolomic composition (polyamines, total phenolics and flavonoid contents), as well as phytohormones (indol-3-acetic and abscisic acid) and polyamine quantification was done. Furthermore, assessment of disturbances in root and leaf antioxidant potential by tracking radical scavenger capacities (RSC) against DPPH, ABTS, OH and NO radicals and by measuring ferric reducing antioxidant power (FRAP) and enzymes activities (SOD, POD, GPx, GR) *in vitro* was performed.

Obtained results indicate that there was significant variability among the poplar clones in phytoextraction capacity. According to BCF and TF factors, clone B229 appears to be the most efficient in nickel accumulation at its higher concentrations in the soil, while clone M1 was the most efficient at

treatments with lower nickel concentration. The same poplar clone, M1 was the most efficient in phytoextraction of copper ions, while clone Pe19/66 distinguishes itself as the best accumulator of Cd ions. Due to low TF, concentration of accumulated heavy metals was the most abundant in roots comparing to the aboveground parts, which makes these poplar clones good candidates for phytostabilization and rhizofiltration processes. In this study, disturbances in mineral composition, as a consequence of heavy metal exposure were found, especially in the uptake of Mg^{2+} and Ca^{2+} in roots of poplar clones. Significant differences in the biochemical and physiological stress responses among poplar clones, depending on heavy metal concentration, were observed. Undoubtedly, applied metal concentrations caused oxidative stress and process of lipid peroxidation in poplar clones, due to high MDA accumulation and significant changes in antioxidative enzymes activities and disturbances in radical scavenger capacities (RSC) of poplar extracts compared to the controls. Obtained results showed that poplar clones responded with increased amounts of IAA, ABA, free and conjugated polyamines as well as increased total phenolic and flavonoid contents to elevated concentration of all applied metals.

These parameters indicate that poplar clones M1 and Pe19/66 are more tolerant to copper induced stress than clone B229. Obtained results should be used in selection of heavy metal tolerant poplar clones with interesting perspectives for application in phytoremediation technologies and as a platform for forestation programs of heavy metal polluted soils. Still, there are problems in natural habitats where overlapping stress factors could be present. Beside these, some further molecular analysis regarding specific gene expression are needed.

Key words: Poplar clones, heavy metals, phytoextraction, oxidative stress, phytohormones, polyamines, reactive oxygen species, antioxidants, phenolic compounds

SKRAĆENICE:

AAPK- ABA aktivirane protein kinaze

ABA- abscisinska kiselina (eng. abscisic acid)

ABA-GE- ABA- β -glukozil estar

ABC transporteri- transporteri koji koriste ATP (eng. ATP binding cassette transporters)

ADC-arginin-dekarboksilaza

AK-aminokiselina

APx-askorbat-peroksidaza

ATP- adenzotrifosfat

BCF- biokoncentracijski faktor-(eng. bioconcentration factor)

CAT- katalaza (eng. catalase)

Cyt_{B559}-citohrom _{B559}

DAO-diamin-oksidaza

DNK-deoksiribonukleinska kiselina

DPPH-2,2,-difenilpikril-hidrazil radikal

DW- suva masa (eng. dried weight)

EDTA- etilendiamintetrasirćetna kiselina

FAD- flavinadenin dinukleotid

FCR-Folin-Ciocalteu reagens

FW-sveža masa (eng. fresh weight)

GA-giberelinska kiselina (eng. gibberelic acid)

GMO-genetski modifikovani organizmi

GR-glutation-reduktaza

GSH-redukovani glutation

GSH-Px- glutation-peroksidaza

GSHS- glutation-sintetaza

GSNOR- S-nitrozoglutation reduktaza

GSNO- S-nitrozoglutation

GSSG- oksidovani glutation

GST- glutation-S- transferaza

HAT-prenos atoma vodonika (eng. hydrogen atom transfer)

HR-hipersenzitivna reakcija

IAA-indol-3-sirćetna kiselina

IAN-indol-3-acetonitril

IC₅₀-inhibitorna koncentracija

JA-jasmonska kiselina (eng. jasmonic acid)

MAPK-mitogen aktivirajuće protein kinaze

MDK-maksimalna dozvoljena koncentracija

MTs-metalotioneini (eng. metalothioneins)

NAD-nikotinamid-adenin dinukleotid

NADPH-nikotinamid-adenin dinukleotid fosfat

NA-nikotinamid

NBT-nitroblutetrazolijum

NCED-9-cis-epoksi-karotenoid dioksigenaza

NR-nitrat-reduktaza

OASTL-O-acetilserin-tiolijaza

OXO-oksalat-oksidaza

PA-fazeična kiselina

PAO-poliamin-oksidaza

PAs-poliamini

PCA-perhlorna kiselina (eng. perchloric acid)

PCB-polihlorovani bifenili (eng. polychlorinated biphenyls)

PCS-fitohelatin-sintaza

PCs-fitohelatini (eng. phytochelatin)

PhA-fenilamidi

Put-putrescin

QA-plastohinon A

RNK-ribonukleinska kiselina

RNS-reaktivne azotove vrste (eng. reactive nitrogen species)

ROS-reaktivne kiseonične vrste (eng. reactive oxygen species)

rpm-obrtaja po minuti (eng. rotation per minute)

SA-salicilna kiselina (eng. salicylic acid)

SAT-serin-acetil- transferaza

SET-prenos jednog elektoktrona (eng. single-electron transfer)

Smd-spermidin

SMO-spermin-oksidaza

SNO-nitrozotoli

SOD- superoksid-dizmutaza

SPDS-spermidin-sintetaza

Spm-spermin

TCD- termokonduktometrijski detektor (eng. thermal conductivity detector)

TCE- trihloretilen

TEAC-troloks ekvivalent (eng. trolox equivalent antioxidant capacity)

TF- faktor translokacije (eng. translocation factor)

TFs- transkripcioni faktori

TPC- sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (eng. total phenolic content)

WUE- stepen iskorištenosti vode (eng. water use efficiency)

ZEP- zeoksantin-epoksidaza

γ-ECS-γ-glutamyl-cistein sintetaza

1. UVOD

Poslednjih decenija procesi urbanizacije i naglog razvoja industrije doveli su do sve bržeg zagađivanja životne sredine (zemljišta, vode i vazduha), globalnog zagrevanja i klimatskih promena. Povećane koncentracije teških metala predstavljaju veoma toksične zagađivače koji ukoliko dospeju u lance ishrane se akumuliraju u živim bićima, što nosi veliki rizik po zdravlje životinja i ljudi. Teški metali najčešće dospevaju u lanac ishrane konzumacijom kontaminiranih biljaka. Iako su u niskim koncentracijama neki teški metali esencijalni za funkcionisanje živih bića, u povišenim koncentracijama zbog kumulativnog efekta izazivaju toksične efekte kod svih živih organizama i predstavljaju rastući ekološki problem (Wang et al., 2004).

Maksimalne dozvoljene koncentracije teških metala u zemljištu su definisane uredbama na nacionalnom nivou sa određenim regionalnim razlikama, dok na pojedinim lokalitetima mogu prevazići dozvoljene granice deset, pa i pedeset puta (Jackson i Alloway, 1991). Problem nagomilavanja teških metala u zemljištu do sada je rešavan skupim, abrazivnim, hemijskim i fizičkim metodama, koje zbog nedostatka univerzalne hemikalije koja bi se koristila za sve metale (Chaney et al., 1997) nisu bile dovoljno efikasne, lako primenjive i isplative. Poslednjih godina, sve više pažnje se posvećuje primeni bioloških, manje opstruktivnih tehnologija iz domena nove interdisciplinarne naučne discipline tzv. fitoremedijacije. Fitoremedijacija koristi biljke ili genetski modifikovane organizme (GMO) koji imaju sposobnost akumulacije i detoksifikacije teških metala ili organskih polutanata sa ciljem da obnove i očiste zagađena staništa, translocirajući ih u svoje nadzemne delove (Baker et al., 2000).

Topole zbog svojih osobina (brzog rasta, velike biomase, visokog stepena transpiracije, nedavno sekvenciranog genoma *Populus trichocarpa*, neučestvovanja u lancu ishrane itd.) su naročito pogodne za proces fitoekstrakcije, koji i dalje nije potpuno rasvetljen. Zbog navedenog, neophodno je da se u procese

fitoremedijacije uključuje novi klonovi topola koji bi se pokazali kao efikasni u remedijaciji zemljišta zagađenih teškim metalima i koji imaju bolje razvijene mehanizme detoksifikacije i odbane od štetnih uticaja teških metala.

Tolerancija na teške metale kod biljaka može biti definisana kao sposobnost da se preživi na zemljištu koje je toksično za druge biljke i predstavlja rezultat interakcije genotipa i uslova životne sredine. Tolerantnost biljaka prema teškim metalima može da bude tokom filogeneze stečeno svojstvo (konstitutivna tolerantnost) i da ima genetsku osnovu i/ili da predstavlja stresnu adaptaciju tj. odgovor na nepovoljne uslove sredine (indukovana tolerantnost). Poznavanje genetske i fiziološke osnove tolerantnosti biljaka prema teškim metalima je od izuzetnog značaja za selekciju i stvaranje podesnih, više tolerantnih genotipova za regione koji se odlikuju većim sadržajem teških metala.

Teški metali, faktori abiotičkog stresa, izazivaju niz štetnih pojava kod biljaka dovodeći do anatomskih, morfoloških, fizioloških i biohemijskih poremećaja narušavanjem niza fundamentalnih metaboličkih procesa (fotosinteze, ćeljkog disanja, mineralne ishrane itd.). Jedan od načina delovanja teških metala je i narušavanje redoks ravnoteže u biljnim ćelijama, što dovodi do proizvodnje slobodno-radikalnih vrsta kiseonika, koje mogu da oštete biomolekule (lipide, proteine, nukleinske kiseline i dr.) i izazovu oksidativni stres kod biljaka. Da bi se zaštitile od negativnog uticaja teških metala, biljke su tokom evolucije razvile mehanizme kojima smanjuju unos metala u citosol ćelije. Ovi mehanizmi obezbeđuju kompleksiranje teških metala po ulasku u ćeliju sa fitohelatinima, metalotioneinima, organskim kiselinama i dr. time sprečavajući metale da inaktiviraju katalitički aktivne ili strukturne proteine.

Adaptiranost biljke na abiotički stres izazvan teškim metalima, zavisi od efikasnosti odbrambenih mehanizama biljke koji aktiviraju biosintezu molekula sa antioksidantnom funkcijom (enzimski antioksidantni sistemi, fenolna jedinjenja, glutation, poliamini i dr.). Ova jedinjenja učestvuju u neutralizaciji reaktivnih kiseoničnih i azotovih radikalnih vrsta, te značajno doprinose održavanju jonske i redoks homeostaze biljne ćelije.

Biljke koriste složene signalne puteve kako bi prepoznale prisustvo teških metala u zemljištu. U sprovođenju signala abiotičkog stresa, važnu ulogu igraju sekundarni glasnici koji stvaraju biološke odgovore putem regulacije ekspresije odbrambenih gena koji učestvuju u detoksifikaciji ili gena koji kodiraju transportne proteine za jone metala. Ulogu sekundarnih glasnika u sprovođenju signala o abiotičkom i oksidativnom stresu, pored biljnih hormona, enzima kinaza ili transkripcionih faktora, imaju i reaktivne kiseonične i azotove vrste kao što su vodonik-peroksid i azot-oksidi. Smanjenju stresa koji izazivaju teški metali doprinosi i akumulacija osmolita poput prolina, rastvorljivih šećera, poliamina ili pak biljnih hormona kao što je abscisinska kiselina (ABA), koja važi za "antistres hormon". Ukrštenost signalnih puteva koji se aktiviraju pod uticajem teških metala i onih koje aktiviraju drugi faktori

abiotičkog stresa (suše, zaslanjenosti, povišene i snižene temperature, uticaj pesticida i dr.), još uvek nije potpuno rasvetljena.

Testiranje novih klonova topola sa aspekta fitoekstrakcije, kao i dobijanje informacija o biološkim odgovorima i tolerantnosti na teške metale je od velikog značaja za pravljenje programa pošumljavanja staništa zagađenih ovim polutantima. Ovaj rad se bavi upoređivanjem sposobnosti tri do sada nedovoljno ispitana klona topola da vrše fitoekstrakciju bakra, nikla i kadmijuma. Takođe se porede njihovi biološki odgovori na prisustvo ovih metala u koncentracijama koje su više od maksimalno dozvoljenih u zemljištu prema nacionalnoj legislaciji. U radu je izvršena komparacija uticaja nitritnih soli tri teška metala, te su praćeni i biološki odgovori ispitivanih klonova topola koji se manifestuju akumulacijom metabolita, posebno fitohormona (abscisinske kiseline i indol-3-sirćetne kiseline), poliamina ili promenom aktivnosti enzima uključenih u antioksidantnu zaštitu u korenovima i listovima topola. Ovaj rad ukazuje na mogućnost primene biohemijskih parametara kao indikatora zagađenosti životne sredine teškim metalima, koji bi se u budućnosti mogli koristiti u programima za monitoring šumskih ekosistema.

Slična istraživanja biohemijske i fiziološke karakterizacije klonova topola pod uticajem teških metala su dosada sprovedena u vodenoj kulturi i kulturi tkiva (Franchin et al., 2007, Pajević et al. 2007; Nikolić et al., 2007). Ovo istraživanje predstavlja pionirski rad u oblasti fitoremedijacije u zemljišnom medijumu, koje kao najsloženije, najpribližnije oponaša interakciju biljaka topola sa teškim metalima prisutnim u prirodnim staništima. Klonovi topola, koji su istraživani u ovom radu, dosada nisu sveobuhvatno i sistematski ispitani sa fiziološkog, biohemijskog i aspekta fitoremedijacije.

2. PREGLED LITERATURE

Zagađenost životne sredine predstavlja veliku pretnju kako za dobrobit čovečanstva, tako i drugih bioloških zajednica. Teški metali predstavljaju značajne neorganske zagađivače životne sredine, te je njihova toksičnost rastući problem zbog ekoloških, evolucijskih, prehrambenih i razloga očuvanja životne sredine (Benavides et al., 2005). Upravo zbog osobine da se ne mogu degradirati ili uništiti, oni ostaju perzistentni u svim delovima životne sredine, te se njihova koncentracija u zemljištu kumulativno povećava kao posledica ubrzane industrijske aktivnosti širom sveta. Upravo zbog svoje ubikvitarnosti, toksičnosti, biodostupnosti, mobilnosti i perzistentnosti, teški metali su danas postali najviše proučavani zagađivači životne sredine.

Pod izrazom "teški metali" se podrazumeva velika grupa prelaznih elemenata koji ispoljavaju izuzetnu toksičnost po žive organizme, odnosno životnu sredinu. Epitet "teški" potiče od činjenice da većina ovih elemenata ima zapreminsku masu veću od 6 kg/dm^3 i atomski broj veći od 40, međutim zbog svoje poznate toksičnosti u ovu grupu se ubrajaju i neki metali sa manjom zapreminskom masom, npr. Be, zatim metaloidi (As i At), pa čak i neki nemetali (Se). Upotreba izraza "toksični elementi" bi više odgovarala, međutim neki od ovih elemenata (Co, Cr, Cu, Mn, Mo i Zn) su u niskim koncentracijama esencijalni za žive organizme, a tek pri višim koncentracijama ispoljavaju toksično dejstvo. Nova težnja u terminologiji ovih elemenata je da se oni označe kao "elementi u tragovima" (eng. trace elements), jer se u prirodi nalaze u malim količinama, a u upotrebi je, sve češće, i termin „potencijalno toksični elementi“ (PTE). U našem zakonodavstvu (Sl. Glasnik RS 23/94) ovi elementi su označeni kao štetne (Cu, Zn i B) i opasne materije (Cd, Pb, Hg, As, Cr, Ni, F) (Zeremski, 2005).

2.1. Poreklo teških metala u zemljištu

U svetu je trenutno više od 235 miliona hektara zemljišta zagađeno teškim metalima. Poreklo teških metala u zemljištu može biti prirodno (geohemijsko) i antropogeno (zagađenje izazvano ljudskom aktivnošću) (Alloway et al., 1995). Teški metali u prirodnim, nezagađenim zemljištima vode poreklo isključivo iz litosfere, odnosno iz mineralnog dela zemljišta koji čine stene i minerali koji sačinjavaju Zemljinu koru. U toku procesa pedogeneze (formiranja zemljišta) dolazi do raspadanja stena, a teški metali se oslobađaju iz matičnog supstrata najčešće putem hidratacije, hidrolize, rastvaranja, oksidacije, redukcije, a zatim se koncentrišu u gornjim ili donjim slojevima zemljišta u zavisnosti od tendencije da se vezuju za glinu, hidratizane okside ili organsku materiju. Jedan deo teških metala u zemljištu nastaje kao posledica geohemijskih procesa, ali i kao posledica vulkanskih erupcija i raznošenja kontinentalne prašine, te mnogi regioni predstavljaju prirodna mineralna skladišta. Višak teških metala prvenstveno se javlja na zemljištima nastalim od minerala bogatih teškim metalima, kao npr. zemljištima nastalim na sulfatnim, bakarnim i silikatnim mineralima, ili na serpentinским stenama zbog čega se odlikuju visokim

sadržajem nikla i hroma. Zemljišta nastala na sedimentnim i metamorfnim stenama odlikuju se velikim udelom kadmijuma. Sulfatna i lateritna zemljišta su bogata gvožđem, a tresetna cinkom. Na dreniranim i plavljenim područjima dolazi do viška gvožđa, mangana i molibdena (Zeremski, 2005).

Pored prirodnih, izvori teških metala mogu biti i antropogenog porekla što uključuje atmosferske polutante iz motornih vozila nastalih sagorevanjem fosilnih goriva u saobraćaju, deponija urbanih i industrijskih otpadaka, kanalizacijskog mulja, emisije prašine, aerosola i letećeg pepela sa mesta industrijske prerade metala. Metaloprerađivačka industrija, galvanoindustrija i topionice ruda drastično doprinose širenju teških metala u ruralne oblasti, te i u poljoprivredno zemljište. Poljoprivredno zemljište, sa druge strane, može biti zagađeno teškim metalima kao posledica đubrenja kanalizacijskim muljem iz okolnih opština ili povećanom upotrebom fosfatnih i organskih đubriva i pesticida (Huttermann et al., 1999). S obzirom da se teški metali nalaze kao nečistoće u đubrivima (Cd, Cr, Mo, Pb, U, V, Zn i dr.), kanalizacionom mulju (Cd, Ni, Cu, Pb, Zn), pesticidima (Cu, As, Pb), pa čak i stajskom đubrivu (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn), upotreba ovih poljoprivrednih sredstava treba da je pod strogom kontrolom. Tretirano zemljište se u razvijenim poljoprivrednim regionima podvrgava čestom monotoringu na opterećenost teškim metalima (Kabata-Pendias i Pendias, 1992).

2.2. Teški metali i biljke

Teški metali su danas postali jedan od glavnih abiotičkih činioca koji negativno utiču na žive organizme. Biljke imaju veoma važnu ulogu u kruženju teških metala u prirodi, pre svega zato što konzumacijom biljaka teški metali ulaze u lanac ishrane i negativno utiču na zdravlje ljudi. Tip zemljišta, pH vrednost, kao i sadržaj organskih materija u zemljištu posebno utiču na nakupljanje i dostupnost teških metala biljkama (Zeremski, 2005). Teški metali, poput Zn i Cu, su esencijalni za normalan rast i razvoj biljaka jer predstavljaju delove mnogih enzimskih kompleksa i nekih proteina. Povećane koncentracije esencijalnih i neesencijalnih metala u zemljištu dovode do simptoma toksičnosti i inhibicije rasta biljke, što može biti posledica vezivanja za SH grupe proteina, što rezultuje u inhibiciji enzimske aktivnosti i narušavanju njihove strukture, zameni esencijalnog jona neesencijalnim dovodeći do deficita esencijalnih metala i stimulacije proizvodnje slobodno-radikalnih vrsta i uzrokovanja oksidativnog stresa (Shah et al., 2001). Izlaganje toksičnim nivoima teških metala uzrokuje makroskopske posledice po biljku, poput inhibicije rasta nadzemnih i podzemnih delova, lisne hloroze i nekroze, gubitka turgora, smanjenja klijanja semena i smanjenja fotosintetičkog aparata, što je u vezi sa ubrzanim procesima starenja i smrti same biljke. Svi nabrojani efekti dovode do promena u biohemijskim i molekulskim procesima, te i samoj strukturi biljnog tkiva i ćelija u prisustvu teških metala (Štajner i Popović, 2008).

U cilju da održe koncentraciju esencijalnih metala u fiziološkim granicama i da minimalizuju štetne efekte neesencijalnih metala, biljke kao i drugi organizmi, su tokom evolucije razvile kompleksnu

mrežu homeostatskih mehanizama, koji služe da kontrolišu i regulišu unos, akumulaciju, transport i detoksifikaciju metala. Tolerancija na teške metale dosad je najviše proučavana na jonima Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} i Cd^{2+} , a proučavanje ovih mehanizama dodatno usložnjava i činjenica da se neki od metala javljaju u različitim oksidacionim stanjima, kao npr. redoks-aktivni Cu^{2+} , dok su neki, kao Zn^{2+} i Cd^{2+} , redoks inertni. U tabeli 1. se mogu videti redoks potencijali pojedinih teških metala.

Tabela 1. Elektrohemijski potencijal pojedinih teških metala u vodenom medijumu (Weast et al., 1984)

Metalni katjon	Redox potential (mV)
Zn^{2+}	-1.18
Cd^{2+}	-0.82
Ni^{2+}	-0.65
Pb^{2+}	-0.55
Cu^{2+}	-0.26
Fe^{2+}	+0.35
Hg^{2+}	+0.43
Ag^{2+}	+1.57

Teški metali utiču na biljke posredno i/ili neposredno. Teški metali utiču na mineralnu ishranu, vodni režim, fotosintezu, disanje, praktično na sve fiziološko-biohemijske procese i dovode do anatomskih i morfoloških promena, smanjenja organske proizvodnje i promene hemijskog sastava biljaka. Neki teški metali (Hg, U, Cd i Fe) mogu da stupe u reakciju sa konstituentima ćelijske membrane, te dovedu do promena u permeabilnosti i fluidnosti membrane. Teški metali, helirajući se za određene kompleksone i ligande, povećavaju mogućnost prolaska kroz nepolarne lipidne dvosloje ćelijskih membrana. Arsenat, telurat i tugstenat zauzimaju mesto nekih anjona u metabolizmu, te predstavljaju poznate antimetabolite, dok se gvožđe i njemu slični teški metali helatiraju sa nekim metabolitima stvarajući talog i onemogućavajući pritom učešće ovog metabolita u prometu materija.

Danas se pridaje velika pažnja proučavanju uticaja različitih koncentracija teških metala na biljke, i to ne samo sa stanovišta njihovog metabolizma, već u cilju stvaranja genotipova tolerantnih prema njihovom višku, koji bi se odlikovali visokom hiperakumulacijom teških metala i tako našli primenu u dekontaminaciji zagađenih zemljišta. Proces dekontaminacije zagađenih zemljišta upotrebom biljaka naziva se fitoremedijacija, a process koji se odnosi na uklanjanje neorganskih zagađivača, poput teških metala, iz zemljišta upotrebom biljaka se naziva fitoekstrakcija. Neke biljke, ne samo što tolerišu visoke koncentracije metala, nego vrše i hiperakumulaciju istih. Više od 400 različitih vrsta koje pripadaju taksonomski vrlo različitim grupama su opisane kao hiperakumulatori. Hiperakumulatorima se zvanično smatraju biljke koje su sposobne da akumuliraju više od 0.1% suve materije elemenata poput Ni, Co ili Pb. Granica za Zn je više od 1%, za Cd >0.01% suve materije. Hiperakumulacija je najčešće primećena za Ni, Zn, Co i Se. Interesantno je da je približno 75% hiperakumulatora okarakterisano kao Ni hiperakumulatori (Baker i Brooks, 1989).

2.3. Teški metali i mikroorganizmi

Rast i razviće biljaka nalazi se u direktnoj zavisnosti od efektivne plodnosti zemljišta koja je prvenstveno uslovljena sadržajem organske materije i delatnošću mikroorganizama u zemljištu. Mikroorganizmi svojom aktivnošću učestvuju u stvaranju zemljišta, kao i održavanju njegove plodnosti. Brojnost i enzimski aktivnost mikroorganizama može da posluži kao jedan od pokazatelja plodnosti zemljišta, te na njih značajno utiču svojstva zemljišta, klima, uneta organska i mineralna đubriva, pesticidi i kontaminacija teškim metalima (Govedarica et al., 1993). U zemljištu žive različite vrste mikroorganizama: bakterije, gljive, alge, protozoe, virusi i lišajevi. Njihova brojnost se kreće od nekoliko desetina do nekoliko miliona u 1,0 g apsolutno suvog zemljišta, a biomasa iznosi 5-20 kg sirove mase po 1 ha zemljišta. U celokupnoj organskoj materiji zemljišta ćelije mikroorganizama učestvuju sa 0.1-3 %. Ta ogromna brojnost mikroorganizama je svojom aktivnošću u stanju da razloži tone biljnih ostataka, da učestvuje u sintezi humusa i da stvara i pribavlja sve asimilate za biljku. Pored biomase mikroorganizama važna je i njihova enzimski aktivnost, zahvaljujući kojoj mikroorganizmi izazivaju najznačajnije promene u organskim i mineralnim sastojcima zemljišta. U rizosfernom zemljištu brojnost i enzimski aktivnost je veća u odnosu na okolno zemljište jer je u njemu veća i količina korenovih ekshudata. Na kraju vegetacije biljaka, i brojnost i enzimski aktivnost mikroorganizama se obično smanjuje. Mikroorganizmi sintetišu i izlučuju u spoljnu sredinu fiziološki aktivne materije: vitamine, auksine, gibereline, enzime, aminokiseline, itd. Pod uticajem ovih stimulativnih materija povećava se intenzitet disanja biljnog tkiva, aktivnost njihovi enzima povećava, stimuliše se fotosinteza, pospešuje bolje iskorišćavanje hranjivih materija od strane korenovog sistema, povećava otpornost i prinos biljaka. Povećan unos teških metala mehanizacijom i razvojem savremenih tehnologija u zemljište, utiče veoma toksično na mikroorganizme i njihovu enzimski aktivnost, što može izazvati katastrofalne posledice na plodnost i biogenost zemljišta.

Kao bioindikatori zagađenja zemljišta sa teškim metalima, pored brojnosti pojedinih sistematskih i fizioloških grupa mikroorganizama, može poslužiti i njihova biohemijska aktivnost. Enzimi katalizujući biohemijske procese u zemljištu mogu biti pokazatelji mikrobiološke aktivnosti. Učestvujući u biološkim ciklusima i kruženju C, N, P i S, mikroorganizmi imaju značajnu ulogu u sintezi humusa, a samim tim i plodnosti zemljišta. Enzimi mikroorganizama su najbrojniji, mada su u zemljištu zastupljeni i enzimi korenovog sistema biljaka. Najčešće su prisutni enzimi iz grupa oksidoreduktaza, hidrolaza, transferaza i liaza. Takođe i enzimi mrtvih ćelija mogu značajno učestvovati na biohemijske procese u zemljištu. Enzimi mogu biti slobodni u zemljišnom rastvoru ili vezani za organske ili neorganske delove zemljišta. Na aktivnost enzima drastično utiče i kontaminacija zemljišta teškim metalima. Kao opšti pokazatelj nivoa biološke aktivnosti može da posluži određivanje dehidrogenazne aktivnosti zemljišta, jer dehidrogenaze (DHA) učestvuju u ciklusu di- i trikarbonskih kiselina, anaerobnim i aerobnim fermentacijama, kao i

drugim energetskim putevima. Utvrđeno je smanjenje dehidrogenazne aktivnosti u zemljištu kontaminiranom metalima. Veoma negativan uticaj teški metali imaju i na aktivnosti enzima nitrogenaze, celulaze i proteaza. U šumskom zemljišta sa povećanim koncentracijama jona Cu^{2+} i Zn^{2+} , zabeležio smanjene aktivnosti ureaze i kisele fosfataze, dok negativan uticaj na β -glikozidaze nije ustanovljen (Govedarica et al., 1995).

2.4. Proces fitoremedijacije

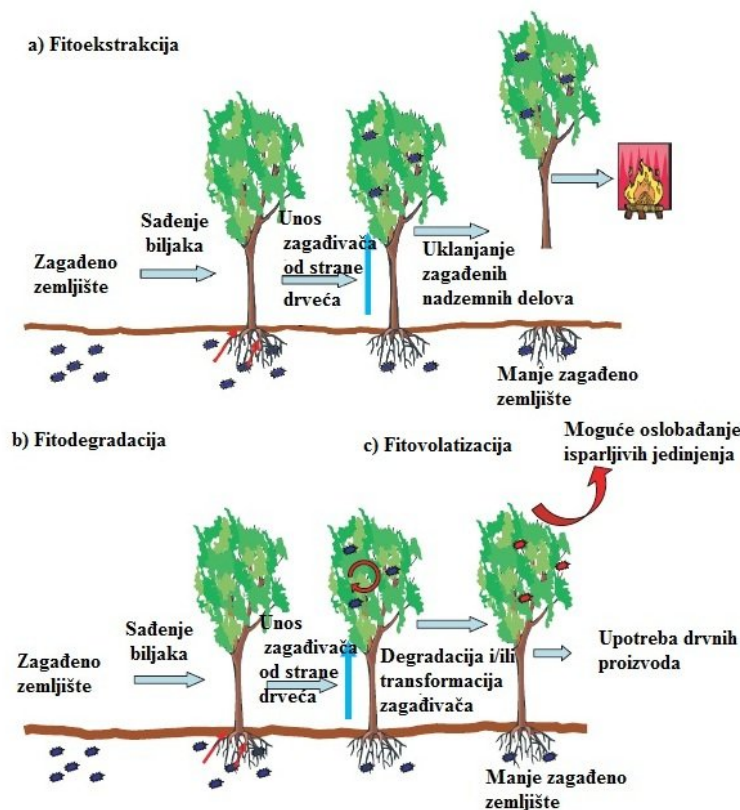
Upotreba bioloških sredstava, radi čišćenja životne sredine od zagađivača, uključuje i tehnike bioremedijacije. Ova tehnologija je bazirana na upotrebi prirodnih ili genetski modifikovanih organizama (GMO) i njihovoj sposobnosti da obnove i očiste zagađena staništa i zaštite životnu sredinu (Baker et al., 2000). Fitoremedijacija je tehnologija koja koristeći biljke vrši uklanjanje ili degradaciju različitih polutanata iz životne sredine. Tokom poslednjih decenija ova tehnologija poprimila je naučni značaj i dobila komercijalnu upotrebu (Kramer i Chardonnens, 2001). Dietz i Schnoor (2001) razlikuju više tipova fitoremedijacije:

- 1) Fitoekstrakcija
- 2) Fitodegradacija/fitotransformacija
- 3) Rizofilizacija/rizofiltracija (uklanjanje polutanata iz vodene faze od strane korenova biljke)
- 4) Fitostabilizacija
- 5) Fitovolatizacija (upotreba biljaka za isparavanje polutanata)
- 6) Uklanjanje polutanata iz vazduha od strane biljaka

Najviše pažnje dosada posvećeno je fitoekstrakciji, fitodegradaciji i fitostabilizaciji (slika 1).

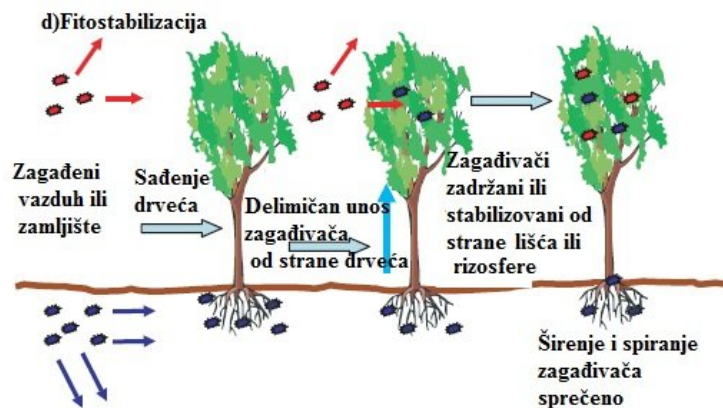
Kod fitoekstrakcije biljke rastu na zagađenom zemljištu i sečene su s vremena na vreme kako bi njihova biomasa sa akumuliranim neorganskim polutantima mogla biti korišćena u razne svrhe u zavisnosti od vrste zagađenja. Na primer, drvni materijal može biti spaljen za energetske potrebe. Glavni cilj je uklanjanje zagađivača iz zemljišta i njegovo koncentrovanje u biomasu nadzemnih delova biljke, gde će krajnjim spaljivanjem biljnog materijla doći do koncentrisanja zagađivača do biokoncentracijskog faktora 10 i više po suvoj materiji. U razvijenim zemljama danas postoje posebne procedure i politika oko odlaganja takvog pepela. Prinos metala iz biljnog tkiva tzv. fitorudarstvo (eng. phytomining), koje je vekovima primenjivano na primeru kalijuma, može imati i ekonomski značaj (Meagher, 2000). Fitorudarstvo kao zelena tehnologija može da zameni destruktivne, abrazivne, neekonomične, konvencionalne metode (Brooks et al., 1998). Biljke su takođe sposobne da usvajaju i radioizotope poput ^{134}Cs i ^{137}Cs koji predstavljaju veliki problem životne sredine nakon ispuštanja iz nuklearnih postrojenja (White i Broadley, 2000).

Sa druge strane, biljke su takođe sposobne da transformišu organske polutante usvojene iz životne sredine u manje toksične, i taj proces se naziva fitodegradacija. Ovo je naročito značajno za širok spektar štetnih organskih jedinjenja, uključujući i ona koja su najviše prisutna, kao što su najveći загаđivači životne sredine, poput polihlorovanih bifenila (PCB), hlorovanih ugljovodonika, kao i municijski otpad bogat nitroaromatičnim jedinjenjima (Hannink et al., 2002). Proces biotransformacije organskih polutanata, od konjugacije do enzimske degradacije, prikazan je na slici 1.



Slika 1. Ilustracija procesa fitoekstrakcije i fitodegradacije (Peuke i Rennenberg, 2005)

Neki elementi poput As, Hg, Fe, Se ili Cr postoje u raznim katjonskim, oksianjonskim, tio- i organo metalnim kompleksnim oblicima. Fitostabilizacija predstavlja upotrebu biljaka koje zagadenja zadržavaju *in situ* i sprečavaju eroziju izazvanu vetrom i vodom (slika 2). U ovom slučaju industrijske oblasti ili deponije su okružene plantažama drveća (npr. topola), kako bi se izbeglo širenje kontaminacije vetrom. Gajenje biljaka na zagadenom zemljištu dodatno sprečava eroziju.



Slika 2. Ilustracija procesa fitostabilizacije (Peuke i Rennenberg, 2005)

2.4.1. Prednosti i mane fitoremedijacije

Uslovi koje biljke treba da ispune da bi se koristile u fitoremedijaciji, nalaze se u njihovim naslednim agonomskim osobinama, poput velike biomase, visokog stepena transpiracije, dubokog korenovog sistema i sposobnosti da podnose stres u zagađenoj životnoj sredini. Kako je ceo proces vođen solarnom energijom, nema zahteva za veštačkim izvorima energije, što čini ovu tehnologiju jeftinom i prijateljski nastrojenom po okolinu, gde su troškovi i do 10 puta niži u odnosu na konvencionalne hemijske i mehaničke metode (Vassilev et al., 2004; Pilon-Smits, 2005). Bilans emisije CO₂ je neutralan, s obzirom da tokom sagorevanja količina oslobođenog CO₂ nije veća od količine CO₂ fiksiranog ranije tokom rasta biljke. Biljke smanjuju eroziju izazvanu vetrom ili vodom, i predstavljaju konstantnu, samoobnovljivu metodu uklanjanja polutanata iz zemljišta. Biljke omogućavaju zadržavanje korisnih makro- i mikronutrijenata u zemljištu, kao i očuvanje mikrobioloških osobina zemljišta, te zadržavaju vrednost zemljišta, što je ekonomski isplativo i za investitore (Sykes et al., 1999).

Svakako da je ovaj metod daleko sporiji od mehaničkih metoda jer je ograničen brzinom rasta biljaka i zavisi od klimatskih faktora i sezone, ali i od osetljivosti primenjenih biljaka na bolesti i štetočine. Efikasnost remedijacije je ograničena dubinom korenovog sistema, te i biodostupnošću i rastvorljivošću zagađivača u zemljišnom supstratu. Primenjiva je samo kod zagađenja u niskim koncentracijama koje ne izazivaju letalni efekat po biljku, dok je manje primenjiva kod kombinovane organske i neorganske kontaminacije. Nije preporučljivo uvođenje invazivnih vrsta koje mogu da ugroze biodiverzitet.

Najveća mana fitoremedijacije je to što je spor i dugotrajan proces, s obzirom da je potrebno nekoliko godina ili decenija, u zavisnosti od uslova sredine, vrste zagađenja i primenjene biljne vrste, kako bi došlo do smanjenja zagađenja (Schwitzguebel et al., 2002). Dodatno, nakon sagorevanja biomase,

pepeo iz fitoekstrakcije metalima zagađenog zemljišta se mora skladištiti na specijalan način. Slično drugim novim tehnologijama, fitoremedijacija nailazi na otpor u javnosti zbog nepredvidivosti rezultata. Osporavanje i javno negodovanje je posebno naglašeno ako su genetski modifikovane biljke uključene u ovaj proces. Pritom, ova tehnologija fitoremedijacije je više prihvatljiva za niska i umerena zagađenja u plitkim površinskim zonama, za koja se pretpostavlja nizak do umeren rizik na ljudsko zdravlje (Wolfe i Bjornstad, 2002).

Sposobnost biljke da vrši fitoekstrakciju ili fitodegradaciju polutanata iz zemljišta zavisi od nekoliko fizioloških procesa: 1) unosa putem korena, 2) ulaska u ksilem, 3) transporta ksilemom u izbojke tokom transpiracionog toka, 4) unosa od strane lisnog tkiva, 5) akumulacije, skladištenja i detoksifikacije (helatacije, degradacije i transformacije), 6) kompartmentizacije-raspodele polutanata po ćelijskim organelama tokom održavanja metabolizma, rasta i proizvodnje biomase (Clemens et al., 2002; Pilon-Smits i Pilon, 2002).



Slika 3. Ilustracija translokacije metala kroz biljku od unosa do sekvestracije (Peuke i Rennenberg, 2005)

McGrath (2006) je pokazao da je efikasnost fitoekstrakcije određena proizvodnjom biomase i biokoncentracijskim faktorom metala (odnos koncentracije metala u izbojku prema onoj u zemljištu). Sa izuzetkom hiperakumulatora, većina biljaka ima biokoncentracijski faktor manji od 1, te za čišćenje zemljišta od polovine koncentracije od ukupnog zagađenja nije dovoljna dužina ljudskog života. Da bi se postigla primetna redukcija teških metala uzemljištu za kraći period, kao npr. od 20 godina, bilo bi potrebno koristiti useve sa biokoncentracijskim faktorom od oko 20 i produkcijom biomase od 10 tona/ha ili useve sa biokoncentracijskim faktorom 10 sa 20 tona/ha proizvedene biomase. Postoje dve strategije za unapređenje efektivnosti fitoekstrakcije teških metala- da biljke vrše hiperakumulaciju teških metala u nadzemne delove i/ ili da proizvode veliku biomasu sa prosečnom koncentracijom teških metala u

nadzemnim delovima u kratkom vremenu kod brzorastućih biljaka. Obe osobine su poželjne, kako bi se dobile specijalne biljke- brzorastući hiperakumulatori velike biomase. Ovo se može postići upotrebom transgenih biljaka u svrhe fitoremedijacije (Guerinot i Salt, 2001).

Nasuprot rastu biljke koji može zavistiti od velikog broja faktora (unosa vode i hranjivih materija, fotosinteze i dr.), pretpostavlja se da je akumulacija teških metala vezana za samo za nekoliko genskih lokusa (Pilon-Smits i Pilon, 2002). Efikasnost fitoremedijacije može biti povećana molekularnim inženjeringom, putem introdukcije gena koji kodiraju enzime potrebne za biosintezu fitohelatina ili glutaciona (Cobbett 2000; Cobbett i Goldbrough 2002). Genetskom manipulacijom na nekoliko metalnih transportera koji učestvuju u unosu i translokaciji je pokazano da se menja i tolerancija i akumulacija metala. Transformacija toksičnih formi elemenata u manje štetne oblike (npr. Hg (II) u Hg (0)) delovanjem transgenih biljaka je drugi pristup fitoremedijaciji (Guerinot i Salt, 2001).

Do sada najveći broj testova sa transgenim biljkama sproveden je strogo u laboratorijskim uslovima. Skoro je Pilon-Smits (2005) objavio rad o dva ogleda u polju sa transgenim biljkama. U jednom od njih, uljana repica sa prekomerno ekspresovanim enzimom za sulfat/selenat redukciju je bila ispitana na polju zagađenim Se, B i drugim solima. Na ovu tematiku rađeni su i ogledi u okolini rudnika bakra gde su transgene topole sa prekomerno ekspresovanom γ -glutamincistein-sintetazom (γ -ECS), enzimom koji je uključen u biosintezu glutaciona, pokazale veću otpornost i veći kapacitet uklanjanja teških metala u poređenju sa divljim tipom topole (Peuke i Rennenberg, 2005).

2.4.2. Upotreba drvenastih biljaka u fitoremedijaciji

Kada se fitoremedijacija ograniči na upotrebu drvenastih biljaka, onda je reč o dendroremedijaciji (st. grč. dendron-drvo; lat. remediare-vratiti u upotrebu, izlečiti).

Veći broj drvenastih vrsta je istraživan ili korišćen u fitoremedijaciji iz rodova vrba (*Salix* spp.), topola (*Populus* spp.), breza (*Betula* spp.), jove (*Alnus* spp.) i javora (*Acer* spp). Za potrebe fitoremedijacije najveća pažnja je data brzorastućim vrstama, među kojima posebno mesto zauzimaju vrbe i topole.

Topole kao brzorastuće vrste su naročito pogodne za primenu u fitoremedijaciji zemljišta, zahvaljujući visokoj proizvodnji biomase, dobro razvijenom korenovom sistemu, visokom stepenu transpiracije i mogućnosti topola da rastu u širokom opsegu klimatskih uslova. Plantaže topola mogu biti korišćene u tzv. zasadima niske ophodnje (eng. short rotation coppice).

Drvenate vrste su manje skupe za fitoremedijaciju od zeljastih biljaka jer imaju mogućnost nekoliko ciklusa dekontaminacije bez obavezne žetve cele biljke i ponovne setve svake godine. Dodatno, plantaže drveća na zagađenom zemljištu sprečavaju eroziju i širenje kontaminanata vetrom (fitostabilizacija). Nakon prve sadnje, troškovi održavanja polja su relativno niski, a proizvodi, biomasa-

drvo mogu biti korišćeni za proizvodnju struje ili toplote. U zavisnosti od vrste i nivoa zagađenosti drveta koje je raslo pokraj rudnika, ono može biti korišćeno u komercijalne svrhe, ukoliko ne prevazilazi maksimalne dozvoljene vrednosti metala za razne drvene proizvode (Rademacher, 2005). S druge strane, veoma je teško da toksični materijal iz topola dospe do lanca ishrane koji uključuje ljude. Uprkos ovome, najveći broj eksperimenata i transformacija je urađen na zeljastim biljkama (van der Lelie et al., 2001).

Rod *Populus* spp. je pokazao visoku prirodnu toleranciju prema organskim kontaminantima. Topole su efikasne u uklanjanju atrazina i trihloretilena iz zemljišta. Listovi *Populus nigra* bili su vrlo tolerantni na hloroacetilidenske herbicide, zahvaljujući visokim nivoima GSH i GST (Komives et al., 2003). Kod hibrida topole, *Populus trichocarpa x deltoids*, koji pokazuje visoku toleranciju prema jonima Cd^{2+} , dokazana je povećana ekspresija gena koji kodira metalotioneine (*PtdMTs*) (Kohler et al., 2004). *PtdMts* mRNA je povišen i pri uticaju jona Zn^{2+} , dok joni Cd^{2+} i Cu^{2+} nisu doveli do promene u ekspresiji ovog gena. *Populus* spp. su takođe sposobne da transformišu i detoksifikuju eksplozive (Hannink et al., 2002).

Laureyesens i saradnici (2005) su istraživali klonalne varijacije kod 13 različitih klonova topola u pogledu akumulacije teških metala i proizvodnje biomase u zasadima visoke ophodnje, zasađenim na mestima odlaganja otpada i deponija, koja su bila umereno zagađena teškim metalima. U ovom istraživanju uočene su značajne razlike među klonovima u akumulaciji većine ispitivanih metala. Najmanja koncentracija je nađena u drvetu, dok je najviša nađena u opadajućem lišću.

Zbog ogromnog potencijala topola u oblasti fitoekstrakcije, neophodna je dalja identifikacija vrsta i genotipova koji poseduju osobine brzog rasta, velike biomase, kao i potencijal za akumulaciju teških metala.

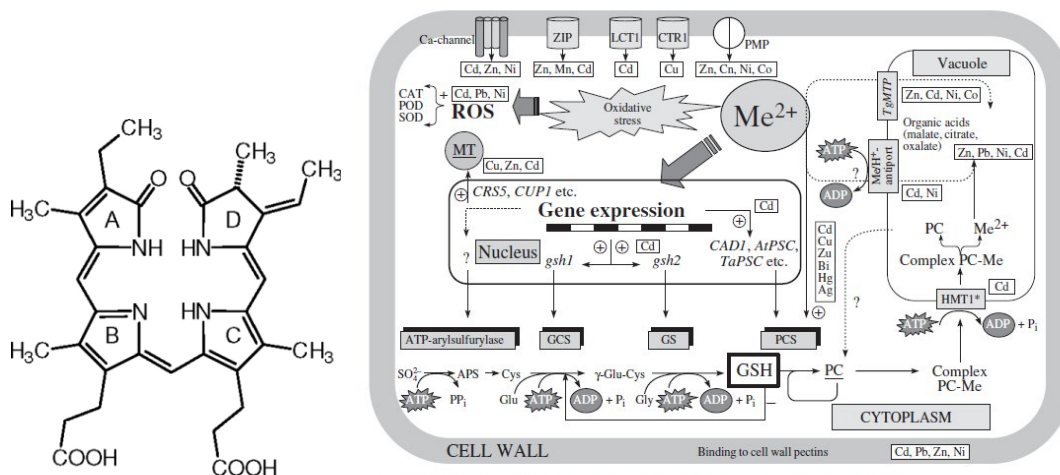
2.5. Helacija, homeostaza, tolerancija i detoksifikacija teških metala u biljkama

Za većinu fizioloških i metaboličkih procesa u biljci, potrebna je optimalna koncentracija metala u zemljištu. Veliki broj ćelijskih struktura i fizioloških procesa igra bitnu ulogu u održavanju homeostaze optimalnih koncentracija metala u biljnim organizmima. Akumulacija metala u mikorizi, vezivanje metala za ćelijski zid, kao i ekskrecija organskih helatora predstavljaju mehanizme kojima biljke smanjuju toksične efekte teških metala i omogućavaju njihov brži transport do vakuole, gde dolazi do njihovog nagomilavanja (Hall, 2002; Clemens et al., 2002). Važan mehanizam detoksifikacije i stvaranja tolerancije na teške metale kod biljaka predstavlja helatacija teških metala u citosolu sa organskim ligandima, koji ispoljavaju visok afinitet i specifičnost u vezivanju za jone metala (Cobbett i Goldsbrough 2002; Rea et al., 1995). Helatori vrše detoksifikaciju metala i regulišu citosolne koncentracije metala, dok čaperoni specifično dostavljaju jone metala do određenih organela i proteina kojima su dati metali neophodni za ispoljavanje funkcije bilo katalitičke ili gradivne. Peptidi koji su bogati sumporom, poput

genetski kodiranih metalotioneina (MTs) i enzimski sintetizovanih fitohelatina (PCs), su od posebne važnosti za procese helatacije i detoksifikacije teških metala u ćeliji.

2.5.1. Fitohelatini

Fitohelatini (PCs) su detaljno opisani u literaturi, kao sumporom bogati peptidi koji imaju sposobnost da vezuju teške metale u biljkama (Grill et al., 1986). PCs predstavljaju familiju oligopeptida sa ponavljajućim segmentom γ -glutamilcisteina koji na C-terminalnom kraju peptida poseduju ostatak glicina. Opšta formula se može predstaviti kao $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, gde je za n najviša pronađena vrednost 11, dok se uobičajeno kreće između 2 i 5. Kao izuzeci od opšte formule, pronađene su strukture fitohelatina u kojima se na C-terminalnom kraju javljaju aminokiseline poput β -Ala, Cys, Ser ili Glu (Rausser 1999; Cobbet i Goldsbrough, 2002). PCs se sintetisu iz tripeptida glutaciona (GSH), i to zahvaljujući aktivnosti fitohelatin-sintaze (PCS), enzima koji zahteva prisustvo jona teških metala ili metaloida za posttranslacionu aktivaciju. Nakon izloženosti jonima Cd^{2+} ili Cu^{2+} , PCs su nađeni u kvascu, algama, nižim i višim biljkama (Gekeler et al., 1989; Cobbet, 2000). Kadmijum je najefikasniji metal po pitanju izazivanja sinteze PCs, mada i metali poput Cu, Pb, Zn, Sb, Ag, Zn ili Hg takode indukuju njihovo nastajanje (Cobbet 2000; Cobbet i Goldsbrough, 2002). PCs sa teškim metalima formiraju metal-ligand komplekse koji se potom nagomilavaju u vakuoli. Biljke “knock-out” mutanti koje ne poseduju gen za fitohelatin sintazu su se pokazale kao hipersenzitivne na prisustvo jona Cd^{2+} i drugih metala (Howden et al., 1995). Osim glutaciona, prekursori za sintezu PCs mogu biti homoglutation, hidroksimetil-glutacion ili γ -glutamilcistein. Struktura fitohelatina, biosintetski put, aktivacija fitohelatin sintaze (PCS) metalom, te kompleksiranje jona metala sa fitohelatinima, kao i njihovo skladištenje u vakuoli, prikazani su na slici 4 (Hall, 2002).

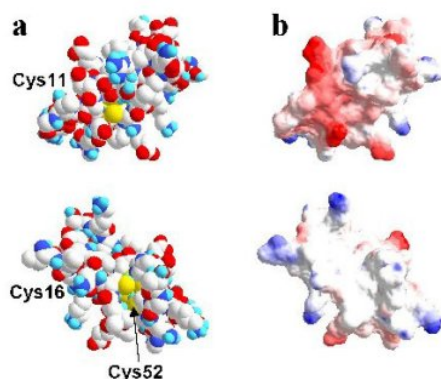


Slika 4. Struktura fitohelatina (levo) i biosintetski put fitohelatina i akumulacija PC- Cd^{2+} kompleksa u vakuolu (Seregini i Kozhevnikova, 2006)

Pored uloge u održavanju homeostaze teških metala u biljkama, fitohelatini sa druge strane prenose esencijalne teške metale do tek sintetisanih apoenzima, kojima su ti metali neophodni za ispoljavanje katalitičke funkcije ili za stabilizaciju strukture (Thumann et al., 1991). Detektovana je i serija strukturnih homologa helatirajućih peptida koji se razlikuju od fitohelatina samo po terminalnim aminokiselinskim ostacima koji mogu biti npr. alanin (Grill et al., 1986), serin (Klapheck et al., 1992), glutaminska kiselina (Meuwly et al., 1995) ili glutamin (Maitani et al., 1999), i koji su nazvani izofitohelatini. Izofitohelatini, kao i PCs, formiraju komplekse sa teškim metalima, poput jona kadmijuma, dok samo fitohelatini grade stabilne komplekse sa jonima srebra, bakra (Maitani et al., 1996) i arsena (Schmoger et al., 2000).

2.5.2. Metalotioneini

Metalotioneini (MTs) su ubikvitarni niskomolekularni proteini bogati cisteinskim ostacima, koji vezuju metalne jone u metal-tiolatnom klasteru koji je prvi put identifikovan kod pšenice (Hamer, 1986). MTs su proteini koji se sastoje od 60-80 AK od kojih su 9-16 cisteinski ostaci, koji su nađeni, ne samo u biljkama, već i u životinjama i nekim prokariotima (Rauser 1999; Cobbet 2000, Cobett i Goldsbrough 2002). U raznim biljnim vrstama do sada je identifikovano više od 50 vrsta MTs, koji su kategorisani u 4 klase (Cobbet i Goldbrough, 2002). Utvrđeno je da MTs igraju važnu ulogu u detoksifikaciji jona teških metala, pogotovo Cu^{2+} , Zn^{2+} i u manjoj meri Cd^{2+} . Usled izlaganja biljaka ovim metalima, dolazi do prekomerne ekspresije gena koji kodiraju metalotioneine, što dovodi do povećanja tolerantnosti biljaka na prisustvo teških metala (Rauser, 1999). Takođe, ističe se mogućnost i antioksidantnog delovanja metalotioneina, kao i njihova uloga u reparaciji oštećenja ćelijske membrane (Salt et al., 1998; Dietz et al., 1999). Kristalografske strukture okarakterisanih metalotioneina su prilazane na slici 5.



Slika 5. Kristalografske strukture metalotioneina (MTs)

2.5.3. Organske kiseline kao helatori teških metala

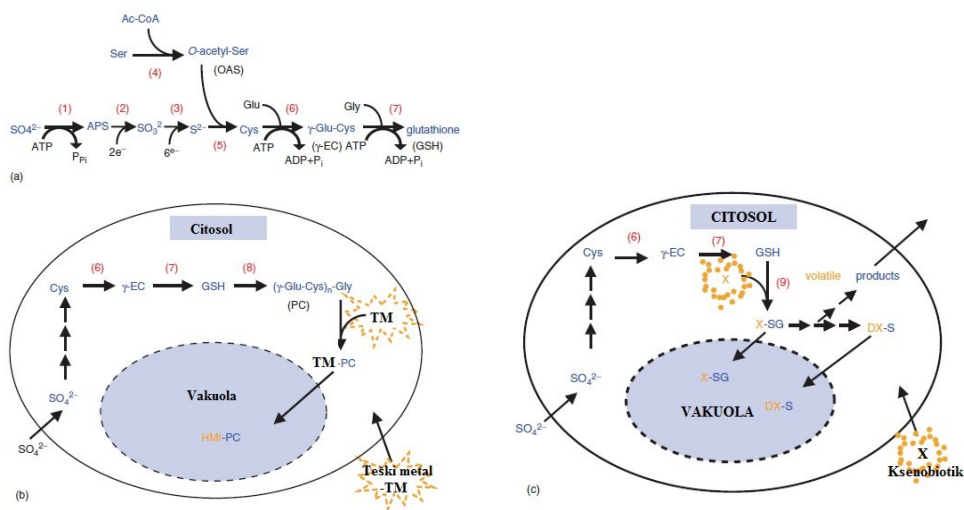
Nisko-molekulske organske kiseline (malat, citrat), aminokiseline (O-acetilserin, histidin) i nikotinamid takođe učestvuju kao helatori u biljkama i procesima detoksifikacije i transporta (Cobbet,

2000). Organske kiseline i aminokiseline koje sadrže atome S, N i O pokazuju razlike u afinitetu prema određenim atomima unutar liganada. Ove razlike zavise od fizičkih i hemijskih osobina jona teških metala, koji se mogu klasifikovati u meke i tvrde Lewisove kiseline. Prema toj klasifikaciji, joni tvrdih kiselina, poput Li, Sr i drugih, pre reaguju sa jonima tvrdih baza nego sa jonima mekih baza. Joni Cu^{2+} , Cd^{2+} i Ni^{2+} pripadaju srednjoj klasi, gde joni Ni^{2+} imaju veću tendenciju vezivanja sa tvrdim, dok joni Cd^{2+} sa mekim bazama. Postoje četiri klase atoma donora u ligandima, među kojima su atom kiseonika i alifatični atom azota klasifikovani kao tvrde baze, aromatični azot kao intermedijerna, dok je sumpor okarakterisan kao meka baza. Stoga, sledi da se Ni najlakše vezuje za aromatični azot, dok se metali poput Cd, Hg i Ag najlakše vezuju za sulfhidilne grupe (Hall, 2002).

Limunska kiselina je najbitniji ligand za vezivanje jona Cd^{2+} , ali je utvrđeno da stvara komplekse i sa Ni. Malat je predložen kao dominantni helator za jone Zn^{2+} kod Zn-tolerantnih biljaka (Mathys, 1997). Oven et al., (2002) su zabeležili porast citrata pod uticajem jona kobalta. Uloga histidina (His) kao helatora je ispitana u ksilemskom soku *Alyssum lesbiacum*, hiperakumulatorske vrste za Ni, gde je pod uticajem nikla zabeležen porast koncentracije His 36 puta (Kramer et al., 1996). Dodavanje His neakumulirajućim biljkama značajno povećava toleranciju, usvajanje i transport Ni do izbojaka.

2.6. Uticaj glutationa u otpornosti na stres

Glutation (GSH) zauzima centralnu ulogu u mehanizmima odbrane od oksidativnog stresa usled zagađenja teškim metalima i ksenobioticima (Foyer et al., 2001). Tripeptid glutation ($\gamma\text{-Glu-Cys-Gly}$) ima više uloga u ćeliji, uključujući uklanjanje hidroperoksida, zaštite od jonizujućih zračenja, održavanje redukovanih sulfhidridnih grupa proteina, kompleksiranje ksenobiotika i endogenih reaktivnih jedinjenja, pospešujući njihovu detoksifikaciju i ekskreciju (Malenčić et al., 2012).



Slika 6. Metabolizam ksenobiotika i teških metala, konjugacija sa jedinjenjima bogatih sumporom u biljnim ćelijama (Peuke i Rennenberg, 2005)

Povećana biosinteza i visoki nivoi GSH, kao i njegovog metaboličkog prekursora cisteina, povećaju otpornost biljke prema stresu. Biosinteza cisteina počinje redukcijom sulfata i katalizovana je serin-acetil-transferazama (SAT) i O-acetilserin-tiolijazama (OASTL) (OASTL je takođe poznata kao i cistin-sintaza (CS)) (Saito, 2004) (Slika 6a).

GSH se sintetiše u dva ATP zavisna koraka koja su katalizovana γ -glutamilcistein sintetazom (γ -ECS) i glutation sintetazom (GSHS). Oba enzima su pronađena u citosolu, hloroplastima i mitohondrijama biljnih ćelija (Foyer et al., 2001). Biosinteza GSH zavisi od dostupnosti njegovih konstitutivnih aminokiselina i regulisana je putem transkripcije i aktivnosti enzima koji učestvuju u biosintezi glutaciona, kao i putem hormonalne kontrole (Noctor et al., 1998; Foyer et al., 2001).

Zahvaljujući dominantnoj ulozi GSH u odbrani od stresa, značajni naponi su uloženi kako bi se dobile biljke sa povećanim nivoima GSH ili njegovih prekursora, jer se smatra da su ovakve biljke više tolerantne na stres izazvan teškim metalima. Freeman i saradnici (2004) su primetili da su koncentracije GSH, kao i cisteina i O-acetil-L-serina, u visokoj korelaciji sa sposobnošću biljke da akumulira jone Ni^{2+} u prirodnim staništima i u kontrolisanim uslovima. Akumulacija metala je dovela do povišene ekspresije enzima SAT i glutation-reduktaze (GR) (Freeman et al., 2004). Harada i saradnici (2001) su transformisali duvan sa genom za citosolnu cistein sintetazu (CS) iz pirinča. Transgeni duvan je pokazao tri puta veću aktivnost CS i veće koncentracije fitohelatina pod uticajem jona Cd^{2+} i pokazao se kao tolerantniji na jone Cd^{2+} u odnosu na divlji tip. Sirko i saradnici (2004) su dokazali da kod transgenih biljaka koje imaju povišenu ekspresiju enzima SAT i /ili OASTL, dolazi do povećanja ne samo nivoa njihovih produkata, O-acetil-serina i cisteina, nego i glutaciona, čime je i objašnjena njihova povećana otpornost na prisustvo teških metala u podlozi u odnosu na divlji tip biljaka. Kod *Brassica juncea* povećana sinteza GSH dovela je do povećane akumulacije i tolerancije na jone Cd^{2+} (Zhu et al., 1999).

U svim ćelijama su istovremeno prisutne obe forme glutaciona, te odnos koncentracija redukovanog i oksidovanog glutaciona utiče na redoks status čitave ćelije. Pritom, samo redukovani oblik glutaciona ima ulogu u odbrani od kiseoničnih radikala i oksidanata, te je stoga aktivnost glutacion reduktaze (GR), enzima koja vrši redukciju oksidovanog glutacion (GSSG) koristeći NADPH kao koenzim, od velikog značaja za održavanje redoks ravnoteže (May et al., 1998; Noctor et al., 1998). Osim glutaciona i izoenzimski familija glutacion-S-transferaza (GST) igra važnu ulogu u detoksifikaciji od teških metala i odbrani od oksidativnog stresa, kao i transportu teških metala kroz biljnu ćeliju (Edwards et al., 2000; Štajner i Popović, 2008; Foyer et al., 2001).

2.7. Teški metali kao uzročnici oksidativnog stresa kod biljaka

Tokom životnog veka, šumsko drveće je izloženo raznim stresogenim faktorima poput suše, visokih i niskih temperatura, povišenog intenziteta svetlost, teških metala, saliniteta i ograničenja u nutrijentima. Osim ovih, i faktori kao što su invazija patogena, UV zračenje i drugi oblici zračenja, zagađenje vazduha, pesticidi, hipoksija, ozon i drugi, neizostavno dovode do povećane proizvodnje slobodno-radikalnih vrsta kod većine aerobnih organizama (Malenčić et al., 2010). Teški metali uzrokuju stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. reactive oxygen species, ROS) različitim mehanizmima, što dovodi do oksidativnog stresa čitave biljke (Štajner i Popović, 2008; Trudić et al., 2012). Intermedijeri ROS-a nastaju ekscitacijom kiseonika do singletne forme ($^1\text{O}_2$) ili delimičnom redukcijom atmosferskog kiseonika prelaskom jednog, dva, ili tri elektrona na O_2 , stvarajući superoksid-radikal (O_2^-), vodonik-peroksid (H_2O_2) ili hidroksil-radikal (OH) (Asada, 1999).

Ovi radikali se privremeno stvaraju u aerobnim organizmima i tokom normalnog metabolizma, poput respiracije i fotosinteze. Neki od njih imaju funkciju signalnih molekula koji menjaju gensku ekspresiju i modeliraju aktivnost specifičnih odbrambenih proteina. S druge strane, ROS vrste mogu da budu ekstremno štetne u visokim koncentracijama, zbog sposobnosti da oksiduju proteine, lipide, nukleinske kiseline, dovodeći do poremećaja u ćelijskoj strukturi i mutageneze (Halliwell i Gutteridge, 1989). Održavanje "steady-state" nivoa različitih reaktivnih kiseoničnih i azotovih vrsta je u biljnoj ćeliji obezbeđeno raznim mehanizama neutralizacije ROS-a, koji zavise od uslova sredine i opštih fizioloških uslova u biljci, kao i faze razvoja (Asada, 1999). Veliki broj enzima učestvuje u hvatanju superoksid-anjona i peroksida, između ostalih superoksid-dizmutaza (SOD), katalaza (CAT), askorbat-peroksidaza (APx), glutation-reduktaza (GR), tioredoksin i peroksi-redoksinska familija proteina (Asada, 1999; Mittler, 2004). Antioksidantna odbrana, pored proteina uključuje i neproteinske hvatače ROS-a, poput askorbata i glutationa, karotenoida, tokoferola, hinona, lipoične kiseline, fenolnih jedinjenja, poliamina i dr. (Noctor i Foyer, 1998). Svi ovi sistemi odbrane od oksidativnog stresa, određuju redoks stanje ćelije i pojedinih organela, i regulišu gensku ekspresiju koja je povezana sa abiotičkim i biotičkim stresom u cilju preživljavanja. Oksidanti, kao i antioksidanti, učestvuju u procesima signalinga kako bi obezbedili neophodne informacije o potrebi aktivacije odbrambenih mehanizama, u zavisnosti od redoks ravnoteže, koristeći redoks osetljive receptore, koji nadalje pokreću kinaza zavisne ili nezavisne metaboličke kaskade kod viših biljaka. Visoke unutarćelijske koncentracije antioksidanata sprečavaju nekontrolisanu oksidaciju ključnih ćelijskih komponenti. Aproximativni redoks potencijali i unutarćelijske koncentracije najbitnijih redoks parova u biljnoj ćeliji prikazani su u tabeli 2.

Tabela 2. Redoks potencijali i unutarćelijske koncentracije glavnih redoks parova u biljnim ćelijama (Foyer i Noctor, 2005)

Redoks parovi	Redoks potencijal (V)	Koncentracioni opseg (uM)
O_2/H_2O	+0.82	200-300 (O_2)
$O_2/O_2^{\cdot -}$	-0.30	<0.001 ($O_2^{\cdot -}$)
$O_2^{\cdot -}/H_2O_2$	+0.94	1-100 (H_2O_2)
H_2O_2/OH^{\cdot}	+0.54	zanemarljivo niski (OH^{\cdot})
OH^{\cdot}/H_2O	+2.20	—
DHA/ASC	-0.10	10, 000-20, 000
GSSG/GSH	-0.24	2, 000-5, 000
TRX _{ox} /TRX _{red}	-0.33	10-100
NAD (P)/NAD (P)H	-0.32	200-500
Fd _{ox} /Fd _{red}	-0.42	10-100

Pored reakcija normalnog metabolizma u kojima ROS vrste mogu da budu generisane, postoje i drugi potencijalni izvori ROS-a. Na primer, zagađenja izazvana teškim metalima mogu da izazovu oksidativni stres zbog toga što su uključeni u različite tipove mehanizama proizvodnje ROS-a (Stojs i Bagchi, 1995; 2001). Prelazni metali poput Fe^{3+} i Cu^{2+} učestvuju u dobro poznatom Haber-Weiss-ovom ciklusu proizvodeći OH^{\cdot} radikal iz $O_2^{\cdot -}$ i H_2O_2 (Štajner et al., 2013; 2011; Mimica-Dukić et al., 1997). Metali bez redoks kapaciteta kao što su (Cd^{2+} , Pb^{2+} ili Hg^{2+}) mogu povećati prooksidativne procese redukujući antioksidante poput glutationa (GSH), blokiranjem kalcijum-zavisnih kanala i interferiranjem sa reakcijama metabolizma gvožđa. Ovi teški metali mogu takođe da poremete i fotosintetički elektron-transportni niz, dovodeći do produkcije superoksid-anjona ($O_2^{\cdot -}$) i singletnog kiseonika (1O_2) (Štajner et al, 2011; Štajner i Popović, 2008). Još uvek nije potpuno razjašnjeno na koji način su povezani redoks signaling i hormonska regulacija kod biljaka, niti kako su ovi signalni putevi vremenski koordinisani unutar različitih ćelijskih kompartmenata, kako bi se obezbedila dinamička homeostaza i tolerancija na stres u konstantno promenjivim uslovima životne sredine.

2.7.1. Toksičnost jona Cu^{2+} u biljkama

Bakar (Cu) je esencijalni redoks-aktivni prelazni metal koji je uključen u mnogobrojne fiziološke procese u biljkama i koji postoji u različitim oksidacionim stanjima *in vivo*. Pri fiziološkim uslovima Cu postoji kao Cu^{2+} i Cu^+ . Bakar je vrlo važan mikronutrient gde su nivoi kritične deficijencije u rasponu od 1-5 mg/ kg, odgovarajući nivo od 6-12 mg/ kg i toksični iznad 20-30 mg/kg po suvoj masi (Marschner, 1995). Međutim, postoje vrlo izražene različitosti u zavisnosti od vrste u pogledu sposobnosti usvajanja jona Cu^{2+} . Određene metalofite mogu čak da akumuliraju i do 1000 mg Cu/kg u listovima (Morrison et al., 1981). Cu je prelazni metal sa elektrohemijjskim potencijalom od -260 mV koji se dobro uklapa u redoks opseg aerobnih ćelija od -420 mV pa sve do + 800 mV. Cu učestvuje kao vrlo važna redoks komponenta u ćelijskim elektron-transportnim nizovima, kao kofaktor enzima, posebno iz grupe oksidaza. Cu deluje kao strukturni element regulaturnih proteina i učestvuje u fotosintetičkom elektron-

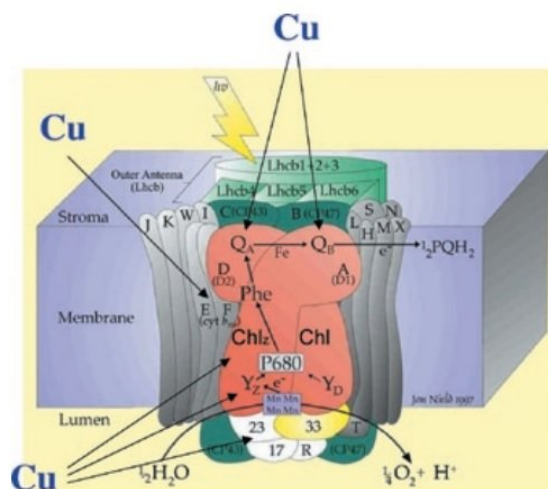
transportnom nizu, mitohondrijalnom oksidativnom disanju, u odgovorima na oksidativni stres, metabolizmu i signalingu hormona (Raven et al., 1999). U reakcijama Fentonovog tipa, joni Cu^{2+} dovode do formiranja O_2^- i transformacije H_2O_2 do visoko reaktivnog OH radikala. Oksidativna oštećenja izazvana prelaznim metalima Cu^+ ili Fe^{2+} su dokumentovana kod mikroba, biljaka i životinja (Schutzendubel i Polle, 2002), a višak jona Cu^{2+} može da izazove hipersenzitivnu reakciju i programiranu ćelijsku smrt kod biljaka (Pontier et al., 1999).

Joni Cu^{2+} predstavljaju i kofaktore u mnogim enzima kao što su Cu/Zn superoksid-dizmutaza (SOD), citohrom c oksidaza, amino-oksidge, laktaza, plastocijanin i polifenol-oksidge. Biljka zahteva jone Cu^{2+} kao esencijalni mikronutrijent za normalan rast i razvoj, te ukoliko ovaj jon nije prisutan u dovoljnim količinama, biljka razvija specifične simptome deficijencije, najviše na mladim listovima i reproduktivnim organima. Redoks osobine jona bakra čine ga esencijalnim, ali u isto vreme doprinose njegovoj toksičnosti. Narušavanje redoks ciklusa između $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ para može dovesti do proizvodnje ROS-a i nastajanja visoko toksičnog hidroksilnog radikala, sa posledičnim oštećenjima DNK, lipida, proteina, i drugih biomolekula (Halliwell i Gutteridge, 1984; Štajner i Popović, 2008). Pri visokim koncentracijama, Cu postaje drastično toksičan uzrokujući simptome kao što su hloroza i nekroza, obezbojavanje lišća i inhibiciju rasta korenja i redukciju biomase (Van Assche i Klijsters, 1990; Marschner, 1995). Na ćelijskom nivou rezultati toksičnosti su sledeći: a) vezivanje za sulfhidrilne grupe proteina, te izazivanje inhibicije enzimske aktivnosti ili druge funkcije datog proteina, b) izazivanje deficita drugih esencijalnih metalnih jona, c) onemogućavanje ćelijskog transporta i d) oksidativna oštećenja (Van Assche i Clister, 1990; Meharg 1994).

Kako su slobodni metali potencijalno opasni, njihov unos i ćelijska koncentracija moraju biti striktno regulisani. S obzirom da joni Cu^{2+} imaju visok afinitet prema peptidima i sulfhidrilnim, karboksilnim i fenolnim grupama, u živim ćelijama je obično prisutan u vezanoj formi, a prema nekim proračunima koncentracija slobodnog Cu^{2+} u kvascu je manja nego jedan jon po ćeliji pri tretmanu sa 70 μM Cu, što ukazuje da nevezani joni Cu^{2+} u ćeliji praktično i ne postoje (Rea et al., 1999).

Mehanizam toksičnosti bakra na fotosintetički elektron-transportni lanac je intenzivno istraživano *in vitro*, te je dokazano da je fotosistem II (PSII) osetljiviji na prisustvo jona Cu^{2+} nego fotosistem I (PSI) (Ouzounidou et al., 1997). Efekti toksičnosti jona Cu^{2+} i njegovo inhibitorno delovanje na PSII lako se vizualizuje praćenjem fluorescencije. Kako akceptorska, tako i donorska strana PSII su mete toksičnog napada jona Cu^{2+} . Na redukujućoj strani PSII, plastohinon B (Q_B) i feotitin Pheo-Fe- Q_A domen (Yruela et al., 2000) predstavljaju mesta najveće osetljivosti na toksične efekte jona Cu^{2+} . Takođe, prikupljeni su dokazi da joni Cu^{2+} remete i oksidujuću stranu PSII, reagujući sa tirozinskim ostacima iz D2 proteina. Dokazano je da joni Cu^{2+} interaguju i sa jonima Ca^{2+} na donorskoj strani fotosistema II, kao i sa

histidinskim ostacima proteina iz Mn klastera koji učestvuje u stvaranju kiseonika. Na akceptorskoj strani joni Cu^{2+} interaguju sa nehemskim Fe^{2+} i dovode do promena redoks potencijala citohroma b_{559} (cyt b_{559}) (Bernal et al., 2004).



Slika 7. Mesta delovanja jona Cu^{2+} u fotosistemu II na tilakoidnoj membrani hloroplasta (Yruela, 2000)

Posebno je elektron-transportni niz svetle faze fotosinteze izmenjen pod uticajem povećanih, ali i smanjenih koncentracija jona Cu^{2+} . Višak ili manjak ovog jona može izazvati i poremećaje u rastu i razvoju i negativno uticati na važne fiziološke procese u biljkama.

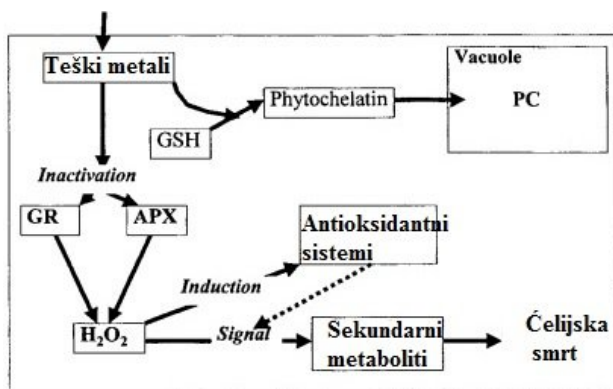
2.7.2. Toksičnost jona Cd^{2+} u biljkama

Kadmijum je relativno redak element koji se po zastupljenosti u zemljinoj kori nalazi na 67 mestu. Nasuprot jonima Cu^{2+} , joni Cd^{2+} nemaju poznate biološke funkcije u višim biljkama, i veoma su toksičani za biljke i životinje. Kritična koncentracija u tkivu, pri kojima metal uzrokuje smanjenje biomase, je u opsegu 3-10 mg/kg suve mase. Joni Cd^{2+} imaju viši afinitet prema tiolnim grupama nego bilo koji drugi metalni mikronutrient, npr. trostruko veći afinitet prema sulfhidrilnim grupama nego joni Cu^{2+} . Ova osobina Cd^{2+} je zapravo i najvažnija i najviše zaslužna za njegovu toksičnost. Cd^{2+} direktno utiče na sulfhidrilnu homeostazu i inhibira SH grupe enzima promenom redoks potencijala (Schutzendubel i Polle, 2002). Cd^{2+} se takođe može vezati i za druge funkcionalne grupe koje sadrže azot ili kiseonik. Kada je vezivanje Cd^{2+} ispitivano putem apsorpcione spektroskopije X-zracima, interakcije sa N i O-ligandima su pronađene u ksilemu, dok su interakcije sa S-ligandima nađene u korenovima (Salt et al., 1995).

Iako kadmijum ne učestvuje direktno u ćelijskim redoks reakcijama, ustanovljeno je da dovodi do oksidativnih oštećenja, kao što su lipidna peroksidacija i karbonilacija proteina (Romero-Pueras et al., 1999; Schutzendubel, 2002a). Pod uticajem jona Cd^{2+} , *Arabidopsis* pokazuje povećanu ekspresiju

proteina temperaturnog šoka (eng. heat shock proteins HSP70), čaperona koji je uključen u procese ponovnog uvijanja denaturisanih proteina, verovatno u pokušaju spašavanja ćelijskog metabolizma. Povećana koncentracija jona Cd^{2+} dovodi do denaturacije proteina, kao i zamene i istiskivanja drugih dvovalentnih katjona iz proteina, kao što su Fe^{2+} i Cu^{2+} , koji dalje mogu izazvati oksidativna oštećenja putem Fentonove reakcije, te na taj način posredno dovode do oksidativnih oštećenja (Suzuki et al., 2001).

Joni Cd^{2+} remete redoks ravnotežu u ćeliji. Zbog povišenih zahteva glutationa kao prekursora za biosintezu fitohelatina, jedan od najuočljivijih bioloških odgovora na uticaj jona Cd^{2+} kod biljaka je početno prolazno smanjivanje koncentracije redukovanog glutationa (GSH) (Madhava Rao i Sresty, 2000; Shcutzendubel, 2001). Tokom produženog uticaja jona Cd^{2+} , GSH rezervoari se regenerišu. Razlog tome je što se pod takvim uslovima povećavaju zahtevi za sumporom, što zauzvrat dovodi do povišene ekspresije transportera sa visokim afinitetom za sumpor, te se stoga povećava i unos sumpora (Nocito et al., 2002). Inicijalno snižavanje nivoa GSH je u korelaciji sa inhibicijom antioksidantnih sistema (Shcutzendubel i Polle, 2002b). Dokazano je da joni Cd^{2+} izazivaju i akumulaciju H_2O_2 (Scutzendubel et al., 2001; Scutzendubel 2002a).



Slika 8. Pretpostavljeni mehanizam delovanja jona Cd^{2+} na ćelijsku redoks kontrolu (Shcutzendubel i Polle, 2002a).

Usled delovanja jona Cd^{2+} , akumulacija H_2O_2 nastaje kao rezultat oksidativne “eksplozije” izazvane dejstvom NADPH oksidaza koje su lokalizovane na plazma membrani (Levine et al., 1994) ili aktivacijom enzima koji proizvode H_2O_2 , poput oksalat-oksidaze (OXO). Oksalat-oksidaza je aktivirana pri izlaganju jonima Cd^{2+} i Cu^{2+} , a povišena aktivnost ovog enzima primećena je i pod uticajem patogena ili pri egzogenoj primeni nekih od biljnih hormona rasta, čime je dokazana ukrštenost puteva biljnog razvoja i signalnih puteva koji se aktiviraju pri stresu izazvanom jonima Cd^{2+} (Berni i Bernier, 1999).

Dugo vremena H_2O_2 je smatran prvenstveno štetnim oksidantom, čija akumulacija kao odgovor na stres vodi do nespecifične oksidacije i nekroze. Međutim, danas je poznato da se H_2O_2 takođe ponaša

kao i sekundarni signalni molekul koji služi kao okidač odbrambenih metaboličkih puteva. Visoke koncentracije H_2O_2 pokreću mitogen aktivirajuće protein kinazne (MAPK) kaskade (Kovtum et al., 2000), koje posredstvom histidin kinaza aktiviraju transkripciju odbrambenih gena koji kodiraju metaločaperone, metalotioneine i enzime za GSH biosintezu. Sintetisani GSH se koristi za sintezu fitohelatina ili se direktno vezuje za Cd^{2+} i omogućava nagomilavanje Cd^{2+} u vakuoli. Poređenjem podataka o broju transkripata gena iz *Arabidopsis* koji reaguju na H_2O_2 i gena koji su uključeni u odgovor na Cd^{2+} pokazano je da značajan broj zajedničkih gena reaguje na oba stimulus (Desikan et al., 2001).

Indirektno, joni kadmijuma istiskivanjem i izmeštanjem prelaznih metala iz čaperona (Me^{2+} Cha) ili enzima (Me^{2+} Enz) dovode do odvijanja enzima, koji ukoliko nisu ponovo uvijeni od strane metaločaperona, bivaju degradirani, a oslobođeni prelazni metal nadalje dovodi do oksidativnog stresa. Metalotioneini i metaločaperoni kombinovano utiču na premeštanje metala i oksidativni stres. Takođe, joni Ca^{2+} se lako zamenjuju jonima Cd^{2+} što izaziva značajne poremećaje kod Ca-zavisnih enzimima (Das et al., 1997).

Glutation-S-transferaza (GST) je neophodna za detoksifikaciju ksenobiotika i može biti uključena u transport GSH-konjugata do vakuole. Nije poznato da li je GST zadužena za detoksifikaciju jona Cd^{2+} . S druge strane, enzimi biosintetskog puta GSH su aktivirani jasmonskom kiselinom, što dodatno ukazuje na umreženost puteva opštih signaling kaskada i onih izazvani uticajem teških metala (Desikan et al., 2001).

Cho i Seo (2004) su zaključili da je akumulacija H_2O_2 krajnji rezultat oksidativnog stresa izazvanog jonima Cd^{2+} kod *Arabidopsis*. Romero Puertas i saradnici (2004) su dokazali da pri stresu izazvanom jonima Cd^{2+} kod biljke graška, H_2O_2 i O_2^- učestvuju kao signalni molekuli u regulaciji ekspresije gena za CAT, GR i Cu/Zn-SOD. Takođe, kod korenova topole joni Cd^{2+} uzrokovali su inhibiciju askorbat peroksidaze (APx) i katalaze, koja je bila praćena akumulacijom H_2O_2 i smanjenjem rasta biljke. Biološki odgovor biljaka na uticaj jona Cd^{2+} se razlikuje kod različitih vrsta, a zavisi i od starosti biljke, ispitivanog organa i vremena izloženosti tretmanu (Schutzendubel i Polle, 2002b).

2.7.3. Toksičnost jona Ni^{2+} u biljkama

Još 1751. godine švedski hemičar Cronstedt prvi je izolovao Ni, koji je po svojoj zastupljenosti u Zemljinoj kori dvadeset i prvi element. U periodnom sistemu elemenata atomski broj nikla je 28, a atomska masa 58.71. Za razliku od nekoliko drugih teških metala, poput Cd^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} i Ag^{2+} koji ne ulaze u sastav enzimskih sistema, joni Ni^{2+} predstavljaju konstituent ureaze, te su stoga male količine (između 0.01 i 5 $\mu\text{g/g}$ suve materije) esencijalne za biljke (Nieminen et al., 2007). Nikal je identifikovan kao strukturna komponenta i drugih enzima, uključujući glioksilaze, peptid-deformilaze, metil-CoM-reduktaze i nekoliko tipova superoskid-dizmutaza i hidrogenaza. Stoga, Ni igra bitnu ulogu u mnogim

važnim metaboličkim procesima, uključujući ureolizu, metabolizam vodonika, biogenezu metana i acidogenezu (Mulrooney i Hausinger, 2003).

Nikal dospeva u životnu sredinu iz rudnika metala, sagorevanjem fosilnih goriva, iz topionica, putem emisije iz saobraćaja, iz otpada koji potiču iz domaćinstava i industrije, od primene veštačkih đubriva i dr. (Salt et al., 2000). Nikal se najčešće koristi kao sirov materijal u metalurgiji i galvanizaciji, kao katalizator u hemijskoj industriji i hemiji hrane, te kao komponenta električnih baterija. Poslednjih godina, zagađenje niklom je postalo svetski problem jer su zemljišta sa povišenim koncentracijama nikla zabeležena na svim kontinentima (Papadopoulos et al., 2007). Sa porastom koncentracije nikla u zemljištu, opasnost od prevelike akumulacije nikla u biljkama koje učestvuju u lancu ishrane je veći problem i mnogo češća pojava nego njegov deficit. Kao toksični uticaji povišenih koncentracija nikla zabeleženi su inhibicija mitotičke aktivnosti (Madhava Rao i Sresty, 2000), redukcija rasta biljke i dvojadi efekti na prinos ploda i njegov kvalitet (Gajewska et al., 2006). Ekstremno povišena koncentracija Ni^{2+} u zemljištu može uzrokovati gubitak sposobnosti zemljišta za gajenje useva, voća i povrća (Duarte et al., 2007).

Unos jona Ni^{2+} u biljke je omogućen zahvaljujući pasivnoj difuziji i aktivnom transportu unutar korenovog sistema (Seregin i Kozhevnikova, 2006). Joni Cu^{2+} i Zn^{2+} kompetitivno inhibiraju unos Ni^{2+} jer se ova tri rastvorna metalna jona najverovatnije usvajaju putem istog transportnog sistema (Kochian, 1991). Sekundarni transport helatizovanih jona Ni^{2+} je moguć i putem odgovarajućih specifičnih proteina koji se vežu za jone Ni^{2+} tzv. HoxN (eng. high-affinity nickel transport proteins) permeaza, metalotioneina i metaločaperona. Na primer, kod *Lathyrus sativus* unos Ni^{2+} se povećava sa porastom pH vrednosti iznad 5.0 i ponovo smanjuje sa porastom pH iznad 8.0. Apsorpcija Ni^{2+} kod *Datura innoxia* je bila povećana usled primene EDTA (etilendiaminotetrasirćetne kiseline) u zemljištu (Jean et al., 2008). Takođe, primećeno je da dužina godišnjih doba, geohemijske osobine zemljišta i metode sađenja utiču na unos Ni^{2+} u biljke. (Antoniadis et al., 2008).

Silom transpiracije joni Ni^{2+} se prenose iz korenova do izbojaka i listova kroz ksilem. Ligandi metala kao što su nikotinamid (NA), histidin (His) i organske kiseline (limunska i malatna), mogu da deluju kao intracelularni helatori koji vezuju jone Ni^{2+} u citosolu ili subcelularnom kompartmentu i olakšavaju transport i akumulaciju unutar biljke (Kerkeb i Kramer 2003). Primećeno je da se joni Ni^{2+} u različitim vrstama akumuliraju u različitim kompleksima, pa je tako u korenju *Thlaspi caerulesens* nikl u obliku Ni-NA kompleksa (Vacchina et al., 2003), dok je u korenju *Alyssum lesbiacum*, *Alyssum montanum* i *Brassica juncea* u obliku kompleksa sa histidinom (Douchkov et al., 2005), a kod listova *Thlaspi goesingense* i *Thlaspi arvense* u obliku kompleksa Ni-citrata (Rauser 1999). Koji će oblik Ni^{2+}

formirati u ksilemskim ekskudatima zavisi u velikoj meri od pH. Tako pri pH vrednosti oko 5, Ni^{2+} je uglavnom helatiran citratom, dok je pri pH 6.5 helatiran histidinom.

Pod uslovima stresa izazvanih jonima Ni^{2+} , jedan od glavnih puteva detoksifikacije ovih toksičnih jona, predstavlja formiranje kompleksa Ni^{2+} -organska kiselina ili kompleksa Ni-NA (Persans et al., 2001). Zbog toga je kod velikog broja biljnih vrsta u uslovima kontaminacije biljke jonima nikla primećena povišena biosinteza nikotinamida (NA) i povećane koncentracije slobodnog histidina. Drugi odgovori uključuju indukciju metalotioneina i glutationa, cisteina i O-acetil-L serina (OAS) (Bellion et al., 2007; Freeman et al., 2004).

Takođe, usled stresa izazvanog jonima nikla aktivnosti određenih enzima, poput serin-acetil-transferaza (SAT) i glutation-reduktaza, mogu biti značajno povećane (Ali et al., 2008). Biološki odgovori na toksične efekte jona nikla su različiti i zavise od biljne vrste, faze rasta, uslova uzgajanja, koncentracije Ni, kao i vremena izloženosti (Kabata-Pendias i Pendias, 2001). Kritični nivoi toksičnosti su >10 mg/kg suve materije kod osetljivih biljaka, >50 mg/kg suve mase u srednje tolerantnim biljkama i >1000 mg/kg u biljkama hiperakumulatorima, kao što su *Alyssum*, *Thlaspi* (Pollard et al., 2002; Kozlow, 2005). Stoga se simptomi toksičnosti nikla manifestuju kod različitih vrsta pri različitim koncentracijama ovog metala. U osetljivim biljnim vrstama, kao što su ječam, spanać i pšenica, hloroze i nekroze lišća mogu da se pojave nakon što su biljke tretirane veoma niskim koncentracijama Ni (<0.2 mM ili 11.74 mg/kg), pri vremenu izlaganja manjim od nedelju dana (Gajewska et al., 2006). Prema Molasu (2001), fitotoksičnost i akumulacija nikla u kupusu opada u sledećem nizu nakon tretmana različitim hemijskim formama Ni: $\text{Ni(II)Glu} > \text{NiSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O} > \text{Ni(II) citrat} > \text{Ni(II)-EDTA}$. Biljke koje su rasle na zemljištima ili drugim medijumima zagađenim niklom, pokazivale su različite odgovore i simptome toksičnosti, poput smanjene klijavosti, inhibicije rasta, redukcije prinosa, indukcije hloroze lišća i venjenje, poremećaja u fotosintezi, inhibicije asimilacije CO_2 , kao i redukcije stomalne provodljivosti (Gajewska et al., 2006; 2007; Kozlow, 2005).

Toksični efekti metala na enzimske aktivnosti *in vitro* se ne slažu uvek sa *in vivo* efektima pri istim koncentracijama, što je objašnjeno postojanjem efikasnih ćelijskih mehanizama detoksifikacije. U zavisnosti od koncentracije, joni nikla mogu vršiti i stimulaciju i inhibiciju enzimskih aktivnosti u biljnim tkivima. Stoga, aktivnost oksidaze indol-sirćetne kiseline (IAA), askorbat-oksidaze, katalaze i peroksidaze u sadnicama *O. sativa* su bili pri najvišim nivoima pri $50 \mu\text{M NiCl}_2$, dok je enzimska aktivnost značajno opadala pri višim koncentracijama Ni, a rasla pri nižim koncentracijama. Dalje, u šećernoj repi koja je uzgajana na zemljišnom medijumu posle dodavanja 1 mM rastvora NiSO_4 , došlo je do smanjivanja aktivnosti nitrat-reduktaze, što je izazvalo smanjenje usvajanja nitrata i njegov transport do izbojaka, gde se nitrati redukuju. Nitrat u citosolu indukuje ekspresiju gena za nitrat-reduktazu, stoga

smanjenje nitrata u biljci prvenstveno dovodi do smanjenja koncentracije enzima. Pored toga, aktivnosti glutamin-sintetaze i alanin-amonijum transferaze su takođe snižene, jer obe aktivnosti značajno zavise od citoplazmatskih nivoa nitrata i njihovih supstrata (Kevrešan et al., 1998; El-Shintinawy i El-Ansary 2000). Sličan mehanizam indirektnog uticaja nitrat-reduktazne aktivnosti je ustanovljen i za druge teške metale (Seregin i Ivanov, 2001).

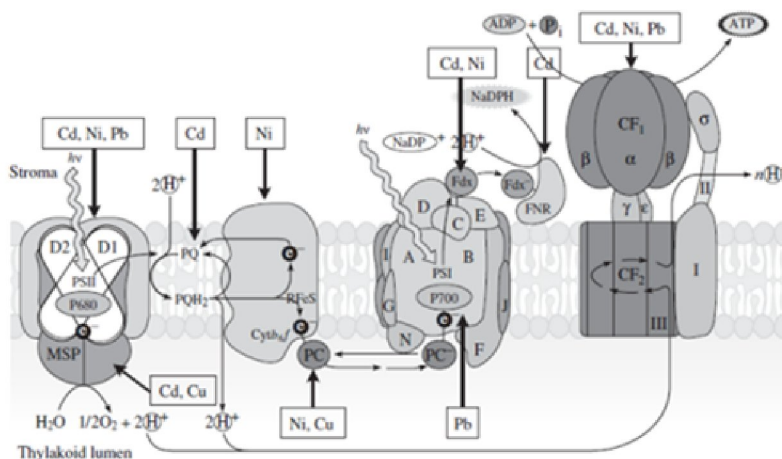
Osim izazivanja inhibicije navedenih enzima, primećeno je da joni Ni^{2+} mogu i da vrše aktivaciju pojedinih enzima, posebno onih koji su uključeni u procese antioksidantne zaštite poput glutation-peroksidaze (GSH-Px), gvajakol-peroksidaze (GPx), glutation-reduktaze (GR), glutation-S-transferaze (GST) i askorbat peroksidaze (APx) (Gajewska i Sklodowska, 2005; 2007). Smatra se da promene u enzimskoj aktivnosti potiču od vezivanja jona Ni^{2+} za SH-grupe ili histidinske ostatke unutar aktivnih centara enzima, ili usled zamene metala sa metalom iz katalitičkog centra enzima.

Indirektno, joni Ni^{2+} mogu da utiču na promenu permeabilnosti ćelijske membrane i jonski balans, menjajući kompoziciju sterola i fosfolipida u plazma membranama izbojaka *Oryza sativa* putem aktivacije Mg^{2+} zavisne ATP-aze koja je tamo smeštena (Ros et al., 1990).

Nedovoljne količine jona Ni^{2+} u medijumu dovode do niske aktivnosti ureaze što dovodi do poremećaja u metabolizmu azota i akumulacije toksičnih nivoa uree u izbojcima, što se fenotipski manifestuje kao nekroza lisnih vrhova ili hloroza u starijim listovima. Slične nekroze na vrhovima listova primećene su i kod tretiranja zemljišta velikim količinama uree (Gerendas i Sattelmacher, 1999).

2.8. Efekti teških metala na fotosintezu

Poznato je da teški metali mogu da izazovu inhibiciju fotosinteze na direktne ili posredne načine. Smanjenje intenziteta fotosinteze može biti posledica oštećenja koje teški metali izazivaju u strukturi hloroplasta ili nastaje usled sposobnosti teških metala da blokiraju biosintezu hlorofila i inhibiraju aktivnosti enzima uključenih u Kalvinov ciklus (Seregin i Ivanov, 2001).



Slika 9. Uticaj teških metala na proteine svetle faze fotosinteze (Seregin i Kozhevnikova, 2006)

Dokazano je da Ni inhibira elektron transportni lanac od feofitina preko plastohinona A (QA) i Fe iz plastohinona B (QB), menjajući strukturu ovih elektronskih nosača ili menjajući strukturu reakcionog centra. Takođe, u tilakoidima joni Ni^{2+} smanjuju sadržaj citohroma *b6f* i *b559*, kao i sadržaj ferodoksina i plastocijana, što kao krajnji rezultat smanjuje efikasnost elektron-transportnog lanca (Krupa i Baszynski, 1995). Slika 9. ilustruje opštu shemu uticaja teških metala na reakcije svetle faze fotosinteze.

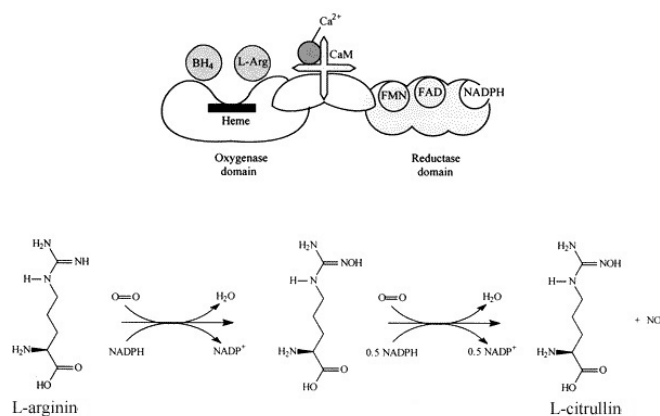
Inhibiranjem aktivnosti ključnih enzima, kao što su Rubisco, 3-fosfoglicerat kinaze, fruktoza-1,6-bisfosfataze, aldolaze i NAD- i NADP-zavisne fosfogliceraldehid dehidrogenaze, teški metali mogu onemogućiti ili usporiti tamnu fazu fotosinteze. Ovakvi efekti su dokazani u listovima *Cajanus cajan* nakon nekoliko dana inkubacije sa rastvorom 1 mM NiCl_2 (Sheoran et al., 1990). Blokiranje reakcija Kalvinovog ciklusa dovodi do akumulacije ATP i NADPH proizvedenih u reakcijama svetle faze fotosinteze, koji kasnije u povratku kroz tilakoidnu membranu prave visok pH gradijent na membrani (Krupa i Baszynski, 1995). Drugi mehanizam kojim teški metali smanjuju fotosintetičku produktivnost potiče od zatvaranja stoma kod biljaka koje su tretirane teškim metalima, čime se smanjuje unos CO_2 neophodan za izgradnju šećera (Bishnoi et al., 1993). Posledice smanjenja aktivnosti fotosinteze se odražavaju i na inhibiciju rasta biljke i dovode do poremećaja u morfogenezi, kao i stvaranju simptoma fitotoksičnosti koji su karakteristični za delovanje metala, poput hloroze listova.

Mnogi enzimi, kao što je superoksid-dizmutaza (SOD) i katalaza (CAT), su metaloenzimi koji sadrže jone Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} ili Mn^{2+} u svojim prostetičkim grupama. Kako višak jona Ni^{2+} ograničava unos jona Fe^{2+} , Cu^{2+} i Zn^{2+} u biljna tkiva, usled deficita ovih esencijalnih metala dolazi do redukcije biosinteze ovih metaloenzima koji učestvuju u antioksidantnoj odbrani kod biljaka (Gajewska et al., 2006). Istraživanja fotosinteze kod biljaka ukazuju da joni Ni^{2+} mogu kompetitivno ukloniti jone Ca^{2+} iz njihovih vezujućih mesta u proteinskom kompleksu koji vrši produkciju kiseonika, te zameniti jone Mg^{2+} u fotosistemu II (PSII) čime se elektron-transportni lanac inhibira (Solymosi et al., 2004).

2.9. Nitrozativni stres kod biljaka izazvan abiotičkim stresom

Prema analogiji sa konceptom oksidativnog stresa, razvijen je koncept nitrozativnog stresa koji predstavlja akumulaciju reaktivnih azotovih radikalskih vrsta (reactive nitrogen species-RNS) pre svega azot-(II)-oksida (NO) i njegovih derivata ili smanjeno uklanjanje nitrozilovanih proizvoda (Ridnour et al., 2004). Metabolizam i funkcije NO radikala prvo su objašnjene kod sisara, kada je otkrivena struktura do tada poznatog endotelijalnog faktora relaksacije (EDRF), dok se o ulogama NO kod biljaka manje znalo. NO u životinjskim ćelijama igra važnu ulogu u patofiziološkim procesima, procesima starenja i kontroliše fundamentalne procese, kao što su respiracija, programirana ćelijska smrt, genska ekspresija, biogeneza mitohondrija, kao i ostvarivanju ćelijskih pokreta, krvnom pritisku i razvoju nervnih ćelija (Valderrama et al., 2007).

Azot-oksidi (NO) je kratkoživeći, lipofilni, endogeno proizvedeni radikal, koji se ponaša kao signalni molekul u svim višim organizmima s obzirom na njegovu mogućnost brze difuzije kroz ćelijske membrane (Delledonne, 2005; Besson-Bard et al., 2008). Kod biljaka, nastajanje NO radikala je mnogo kompleksnije nego kod životinja i uključuje dva različita mehanizma nastajanja, nitrat i arginin-zavisani put. Prvi put sinteze NO⁻ predstavlja sukcesivnu redukciju nitrata do nitrita katalitičkom aktivnošću nitrat-reduktaze (NR), praćenu konverzijom nitrita do NO⁻ radikala. Drugi put nastajanja NO radikala se odvija zahvaljujući aktivnosti NO sintaze, koja vrši NADPH zavisnu oksidaciju L-Arg do citrulina preko N-hidroksi arginina, pri čemu kao nusproizvod nastaje i NO radikal (Guo, 2006). U nekim slučajevima, NO se može nastati i neenzimskim putem, gde se joni nitrita (NO₂⁻) prevode u NO pri kiselim uslovima u apoplastu biljke (Bethke et al., 2004).



Slika 10. Sintaza azotmonoksida aktivnošću NO sintaze

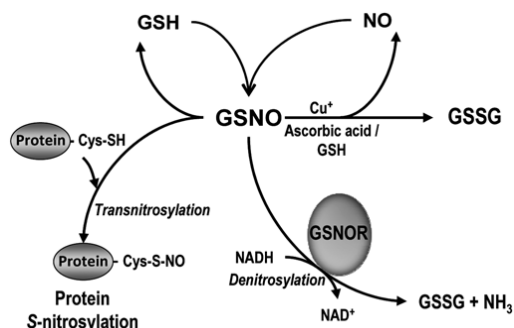
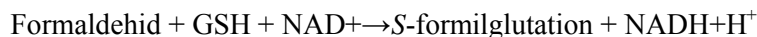
Kod biljaka, NO radikal ima važnu ulogu u različitim fiziološkim procesima, koji uključuju klijanje semena, odbrambene mehanizme biljke, lisnu senescenciju, stomalne pokrete, hormonski signaling, kao i samo cvetanje biljke (Simpson, 2005; Garcia-Mata et al., 2003; Delledonne, 2005; Bethke et al., 2006; Zeidler et al., 2004). Takođe, NO je uključen u odgovore biljke na mehanička oštećenja, odbranu biljke od patogena, kao i abiotički stres gde ima važnu ulogu kao signalni molekul (Lamattina et al., 2003; Crawford, 2006; Delledonne, 2005; Simpson, 2005).

Uprkos jednostavnoj strukturi, razumevanje kompleksnih funkcija i mehanizama delovanja NO u biološkim sistemima je usložnjeno postojanjem sekundarnih i tercijalnih produkata njihovih reakcija (Ridnour et al., 2004). Direktno ili posredno, kroz različite hemijske transformacije, NO radikal vrši signalnu i modulatornu funkciju, reagujući bilo sa antioksidantima (npr. glutationa) ili sa prooksidantima (npr. superoksid anjonom gradeći peroksinitritni anjon) stvarajući time reaktivne azotove vrste (RNS). NO direktno utiče na redoks status čitave ćelije jer pored mogućnosti nastajanja drugih RNS, dovodi i do nitrozilovanja, nitrifikacije i nitrovanja drugih biomolekula. Posttranslacione proteinske modifikacije,

nitrozilaciju hema, nitrifikacija tirozina, kao i glutationa su regulisane posredstvom NO radikala (Wang et al., 2006; West et al., 2006).

Zbog mnogobrojnih mogućih hemijskih reakcija i različitih meta NO, precizno određivanje mehanizma delovanja NO predstavlja veliki izazov u biohemiji. NO-izvedene azotove radikalske vrste (RNS) vrlo lako reaguju sa jednim od najvažnijih ćelijskih antioksidanata glutationom (GSH), te formiraju S-nitrozoglutation (GSNO). Glavna funkcija nitrozoglutationa u biološkim sistemima je upravo transfer NO grupe na druge ćelijske tirole, pri čemu nastaju dugoživeće nitrozotioli (SNO) kroz reakcije tipične trans-nitrozilacije. Endogeni GSNO je značajni molekul u NO regulatornim mehanizmima, posebno u S-nitrozilaciji proteinskih tiola, procesu koji je u nekim radovima nazvan ‘nova fosforilacija’ (Liu et al., 2001). Do sada je otkriven veliki broj biljnih proteina koji mogu biti reverzibilno podvrgnuti reakciji nitrozilacije na cisteinskim ostacima, a takve modifikacije često rezultiraju u inhibiciji enzimske aktivnosti ili u promeni proteinske funkcije. (Perazzolli et al., 2004; Belenghi et al., 2007).

Biotransformacija S-nitrozoglutationa (GSNO) je najvažniji deo NO metabolizma koji može uticati na mnoge regulatorne procese. Otkriveno je da enzim GSH-zavisna formaldehid dehidrogenaza (FALDH; EC 1.2.1.1), tip III alkohol dehidrogenaze, ima i GSNO reduktaznu aktivnost. Novootkrivena GSNO reduktaza katalizuje GSNO do smeše proizvoda zavisno od uslova, uključujući GSSG, hidroksilamine, NH₃ i GSH-sulfonske kiseline (Jensen et al., 1998; Liu et al., 2001).



Slika 11. Shematski model metabolizma GSNO u biljnoj ćeliji (Leterrier et al., 2010)

Glavna uloga ovog enzima je da se redukcijom GSNO smanjuje mogućnost nitrozilacije proteina od strane S-nitrozoglutationa u procesima trans-nitrozilacije (Rusterucci et al., 2007).

Pored uloge u održavanju homeostaze NO i njegovog metabolizma, GSNOR učestvuje u odgovoru i aklimaciji biljke na abiotički i biotički stres, kao i u procesu stvaranja sistemske stečene otpornosti (Rustecrucci et al., 2007). Aktivnost i ekspresija ovog enzima promatrana je i pod različitim uslovima abiotičkog stresa. Tako je kod biljaka graška koje su rasle na 50 μM kadmijuma došlo do redukcije

ekspresije GSNOR za 31%, što je praćeno smanjenjem sadržaja NO, GSH i GSNO (Barroso et al., 2006). Međutim, suprotno ponašanje pronađeno je kod *Arabidopsis* koji je rastao u prisustvu 0.5 mM arsena, gde je aktivnost GSNOR značajno povećana sa paralelnim porastom koncentracije NO (Leterrier et al, 2010).

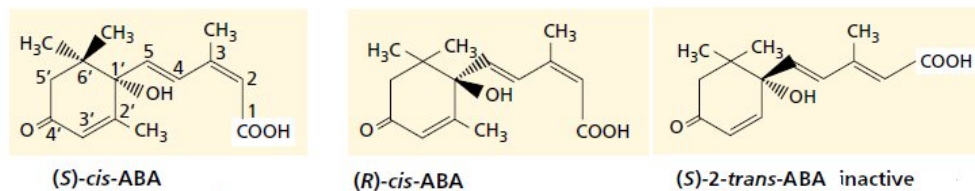
2.10. Fitohormoni

Biljke, poput životinja, proizvode signalne molekule koji imaju važan uticaj na razvoj i rast biljke pri zapanjujuće niskim koncentracijama. Radi razlikovanja od životinjskih hormona nazvani su fitohormonima. Do skora se mislilo da razvoj biljke reguliše svega pet tipova hormona: auksini, gibberelini, citokinini, etilen i abscisinska kiselina. Međutim, postoje čvrsti dokazi da i kod biljaka postoje biljni steroidni hormoni, brazinosteroidi, koji imaju širok opseg uticaja na morfolologiju i razvoj biljke. Razni signalni molekuli koji igraju važnu ulogu u stvaranju rezistencije na patogene i odbranu od herbivora su takođe identifikovani, poput jasmonske kiseline (eng. jasmonic acid- JA), salicilne kiseline (eng. salicylic acid-SA) i polipeptida, sistemina. Hormon koji je prvi otkriven u biljkama i čija je fiziološka uloga i mehanizam delovanja rasvetljen je auksin. Štaviše, i auksini i citokinini se razlikuju od ostalih biljnih hormona i signalnih molekula po važnoj činjenici da su esencijalni za viabilnost. Stoga, nijedan mutant kome nedostaje bilo auksin ili citokinin nije pronađen niti stvoren, što ukazuje na važnu funkciju ovih molekula u biljkama. Bez obzira na njihovu prisutnost u vrlo niskim koncentracijama, oni ispoljavaju širok spektar fizioloških funkcija.

2.10.1. Abscisinska kiselina (ABA)

Abscisinska kiselina (ABA) je ubikvitaran biljni hormon u vaskularnim biljkama. ABA je detektovana u mahovinama i kod nekoliko rodova gljiva, gde nastaje kao proizvod sekundarnog metabolizma (Milborrow, 2001). ABA se nalazi u svim organima i tkivima od korenskih dlačica do apikalnih pupoljaka. Sintetiše se u svim ćelijama koje imaju hloroplaste ili amiloplaste. ABA je važan hormon zbog svog inhibitornog dejstva prema rastu, sposobnosti regulacije otvaranja stoma u uslovima stresa, regulacije dormacije i sazrevanja semena. Iako se u literaturi već uvrstio termin abscinska kiselina, prvobitan naziv dormin je više odgovarajući za ovaj hormon, jer je danas poznato da je zapravo etilen hormon koji izaziva abscisiju, a da se pomenuta abscisija ploda pamuka zbog koje je ABA dobila ime desila zahvaljujući sposobnosti ABA da stimuliše proizvodnju etilena. ABA je jedinjenje sa 15 C atoma koji podsećaju na završni deo nekih od molekula karotenoida. Orijenatacija karboksilne grupe na drugom ugljeniku određuje *cis* i *trans* izomere ABA. Skoro sva ABA koja se javlja u prirodi je u *cis* formi i po konvenciji ime abscisinska kiselina se odnosi na taj izomer. ABA sadrži asimetrični ugljenikov atom na poziciji 1' unutar prstena, rezultirajući u postojanju S i R (+ i -, respektivno) enantiomera. S enantiomer je prirodna forma, a komercijalno dostupna sintetska ABA je racemska smeša odgovarajućeg odnosa S i R

oblika. Samo S enantiomer je aktivan u izazivanju brzih odgovora na ABA, kao što je stomalno zatvaranje. U dugotrajnim odgovorima kao što su sazrevanje semena, oba enantiomera su aktivna. Za razliku od *cis* i *trans* izomera, S i R forme ne mogu biti prevedene iz jednog oblika u drugi u biljnom tkivu.

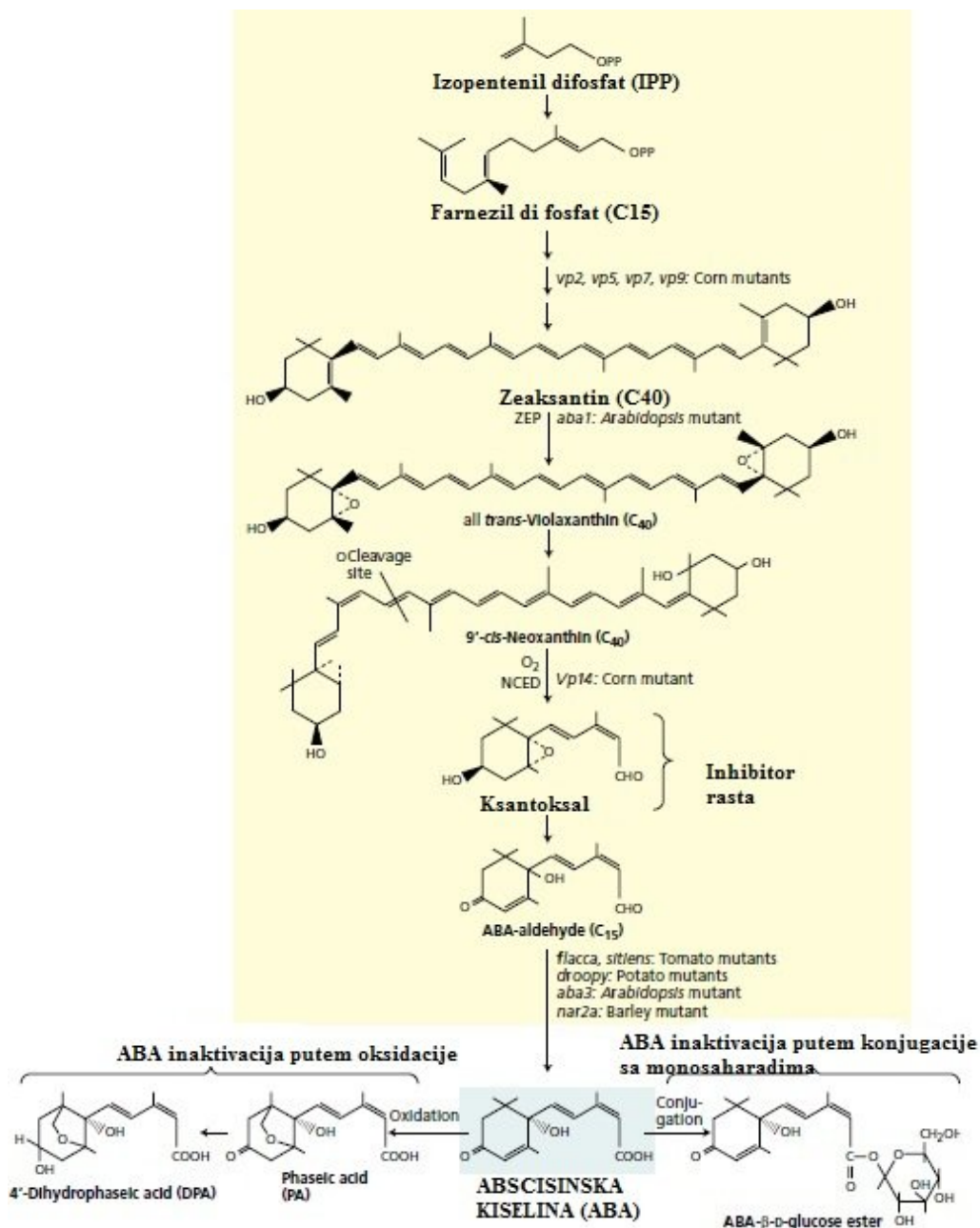


Slika 12. Različite izomerne strukture abscisinske kiseline (Taitz i Zeiger, 2002)

Razni bioeseji se koriste za detekciju ABA, uključujući inhibiciju rasta koleoptila, klijanje, ili giberelinskom kiselinom (GA)-indukovana sinteza α -amilaze. Alternativno, ubrzano stomalno zatvaranje i ekspresija gena su primeri brzih odgovora. Instrumentalne metode detekcije su mnogo pouzdanije od bioeseja zbog specifičnosti i pogodnosti za kvantitativnu analizu. Najšire zastupljena tehnika je zasnovana na gasnoj hromatografiji ili tečnoj hromatografiji visokih performansi (HPLC). Gasna hromatografija omogućava detekciju za mase niže od 10^{-13} g, ali to zahteva nekoliko preliminarnih koraka prečišćavanja. Imunoeseji su takođe osetljivi i specifični.

2.10.1.1. Biosinteza ABA

Kao i sa drugim hormonima, ABA odgovor zavisi od njene koncentracije unutar organa i osetljivosti tkiva na hormon. Procesi biosinteze, katabolizma, kompartmentizacije i transporta doprinose koncentrisanju aktivnog hormona u tkiva u svakoj fazi razvoja. Kompletna biosinteza ABA je rasvetljena uz pomoć ABA-deficitarnih mutanata koji su blokirali biosintezu u određenim koracima. Biosinteza ABA se dešava u hloroplastima i drugim plastidima po metaboličkom putu prikazanom na slici 13. Do sada je identifikovano nekoliko prirodnih mutanata koji se zbog prekida u određenim koracima biosinteze odlikuju deficitom ABA i pokazuju abnormalan fenotip, koji se može ispraviti primenom egzogenog ABA (Milborrow, 2001).



Slika13. Biosintetski put abscisinske kiseline (Taitz i Zeiger, 2002)

Metabolički put počinje sa izopenteniil-difosfatom (IPP), biološkom izoprenskom jedinicom, i vodi ka sintezi C₄₀ ksantofila (oksidovanog karotenoida), violaksantina. Sintaza violaksantina je katalizovana zeaksantini epoksidazom (ZEP). Ovo dokazuje da se biosinteza ABA-e odvija indirektnim putem, razgradnjom karotenoida, pre nego sintezom malog molekula *de novo*. Violaksantini se prevodi do C₄₀ jedinjenja 9-cis-neoksantina, koji se posle cepa i formira C₁₅ jedinjenje-ksantoksal, prethodno nazvano ksantoksin, koji je neutralni inhibitor rasta sa sličnim fiziološkim svojstvima kao i ABA. Capanje C₄₀

jedinjenja je katalizovano 9-cis-epoksi-karotenoid dioksigenazom (NCED), koja je nazvana tako jer može da vrši cepanje i 9-cis-neoksantina i 9-cis-violaksantina (slika 13).

U uslovima vodnog stresa i suše dolazi do brze indukcije biosinteze enzima NCED, što ukazuje da je reakcija koju katalizuje regulatorni korak u sintezi ABA. Enzim je lokalizovan na tilakoidima, gde se nalaze i visoke koncentracije karotena kao supstrat. Konačno, ksantoksal se prevodi do ABA u oksidativnom koraku koji uključuje intermedijere kao što su ABA-aldehid i/ili ksantoksična kiselina. Ovaj poslednji korak biosinteze je katalizovan familijom aldehyd oksidaza (AAO) koje zahtevaju molibden kao kofaktor (MoCo). MoCo je neophodan i za aktivnost ksantin dehidrogenaze. Mutant *Arabidopsis* kome nedostaje funkcionalni molibden kao kofaktor je nesposoban da sintetise ABA.

2.10.1.2. Koncentracije ABA u tkivima

U različitim biljnim tkivima i organima intenzitet biosinteze i koncentracija ABA mogu drastično da variraju tokom različitih faza razvoja, u zavisnosti od promenljivih uslova životne sredine. Na primer, u semenima nivoi ABA tokom razvijanja mogu da porastu i 100 puta u nekoliko dana i onda da se naglo spuste do iščezavajuće niskih koncentracija kako sazrevanje napreduje. U uslovima vodnog stresa, koncentracije ABA u listovima mogu da se povećaju i 50 puta za samo 4 do 8 sati. Nakon ponovnog zalivanja, ABA koncentracije se vraćaju na normalni nivo za isti vremenski period.

Biosinteza nije jedini faktor koji reguliše koncentracije ABA u biljnim tkivima. Kao i kod drugih hormona, koncentracija slobodne ABA u citosolu su takođe regulisane degradacijom, konjugacijom, kompartmentizacijom i transportom. Na primer, citosolna ABA raste tokom vodnog stresa, kao rezultat sinteze u listu, redistribucije unutar ćelija mezofila, dopremanju iz korena i recirkulacijom iz drugih listova. Koncentracija ABA opada nakon ponovnog zalivanja vodom usred degradacije i smanjenja brzine sinteze, ali i zbog otpremanja iz listova u druge organe.

2.10.1.3. Inaktivacija ABA putem oksidacije ili konjugacije

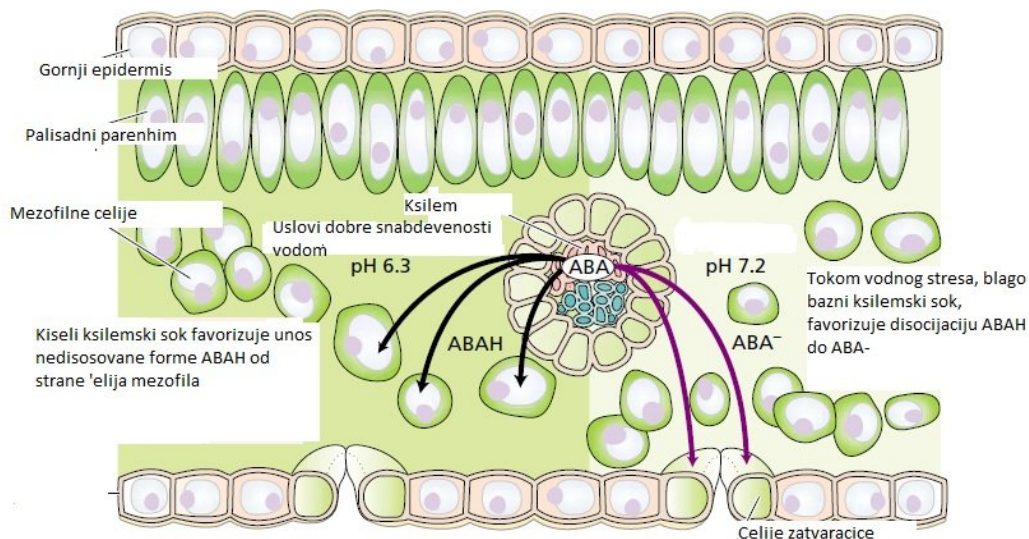
Najveći uzrok inaktivacije slobodne abscisinske kiseline je njena oksidacija koja dovodi do nestabilnog intermedijera 6-hidroksimetil-abscisinske kiseline, koji se brzo prevodi do fazeične kiseline (PA) i dihidrofazeične kiseline (DPA). PA je fiziološki inaktivna ili pokazuje vrlo redukovanu aktivnost u bioesejima. Međutim, kod nekih biljnih vrsta PA ipak može da izazove stomatalno zatvaranje i pokazuje aktivnost kao i ABA u inhibiranju giberelinskom kiselinom izazvane proizvodnje α -amilaze u aleuronskim slojevima kod ječma. Ovi efekti ukazuju da je i PA sposobna da se veže za ABA receptore, dok za razliku od PA, DPA nema detektovanu aktivnost ni u jednom od bioeseja.

Slobodna ABA se inaktivira kovalentnom konjugacijom sa drugim molekulima, poput monosaharida gradeći na primer konjugate poput ABA- β -D-glukozil estra (ABA-GE). Ovaj konjugat osim što inaktivira ABA-u i menja njenu polarnost i ćelijsku distribuciju. Dok je slobodna ABA

lokalizovana u citsolu, estar ABA-GE se akumulira u vakuoli i stoga se može smatrati oblikom hormona koji služi za skladištenje. Enzimi esteraze mogu da oslobode ABA-u iz ovih konjugata, međutim ne postoje dokazi da hidroliza ABA-GE doprinosi drastičnom porastu ABA u listu tokom vodnog stresa. Kada su biljke praćene nakon serije naizmeničnog izlaganja stresu suše i ciklusima ponovnog zalivanja vodom, koncentracija ABA-GE je rasla polako, ukazujući da se konjugovana forma ne razlaže tokom vodnog stresa (Taitz i Zeiger, 2002).

2.10.1.4. Transport ABA kroz tkiva

Transport ABA-e se vrši i ksilemom i floemom, ali je mnogo uobičajnije floemskim sokom, što je dokazano dodavanjem radioaktivno obeležene ABA-e na list, koja je pokazala dvosmerno kretanje jednako i uz stablo i niz stablo prema korenu, mada je nakon 24h većina radiokativno obeležene ABA-e nađena u korenu. Takođe, ABA koja je sintetisana u korenu može biti transportovana do izbojaka putem ksilema. Dok je količina ABA u ksilemskom soku redovno zalivanog suncokreta između 1 i 15 nM, koncentracija ABA u suncokretu koji je izložen suši je porasla čak do 3000 nM (Schurr et al., 1992). Red veličine stresom izazvane promene u ksilemskom sadržaju ABA vrlo varira među vrstama, a takođe ukazuje da se ABA transportuje i u konjugovanoj formi, pa tek onda osloboda hidrolizom u listovima. Kada stres izazvan vodnim deficitom počne, deo ABA koja se sintetiše u korenovima koji su u direktnom kontaktu sa isušenim zemljištem se prenosi ksilemom do listova, što predstavlja signal listu da smanji transpiraciju zatvaranjem stoma (Davies i Zhang, 1991).



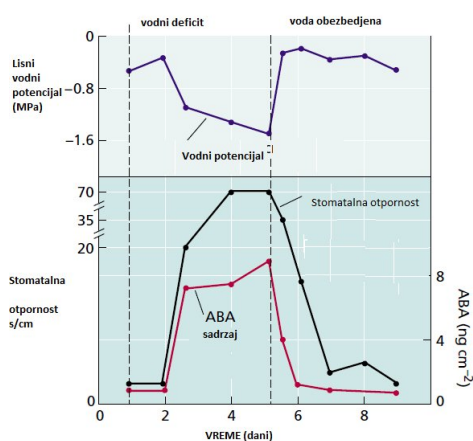
Slika 14. Transport ABA kroz mezofil lista (Taitz i Zeiger, 2002)

Mada je koncentracija od 3 μM ABA u apoplastu dovoljna za zatvaranje stoma, ne doseže sva ksilemska ABA u ćelije zatvaračice. Tokom prvih faza stresa sušom, pH ksilemskog soka postaje sve više bazan, rastući od pH 6.3 do pH 7.2 (Wilkison i Davies, 1997). Glavna kontrola raspodele ABA među

kompartimentima biljne ćelije prati koncept tzv. “anjonske zamke”; disosovane anjonske forme slabih kiselina se akumuliraju u kompartimentima sa baznom sredinom odakle mogu biti premeštene u zavisnosti od pH gradijenta kroz membranu. Osim ovog razdvajanja prema relativnim vrednostima pH po kompartimentima, specifični nosači za unos doprinose održavanju niskih koncentracija ABA u apoplastu u nestresiranim biljkama. Stres uzrokuje alkalizacija apoplasta što favorizuje disocijaciju abscisinske kiseline do ABA⁻, koja zbog naelektrisanja vrlo teško prolazi membranu, tako da manje ABA ulazi u ćelije mezofila, a više dopire do ćelija zatvaračica putem transpiracionog toka. Ova preraspodela ABA u listu ne uzrokuje nikakve promene u ukupnom nivou ABA. Porast pH ksilemskog soka je signal korena koji izaziva ranije zatvaranje stoma (Taitz i Zeiger, 2002).

2.10.1.5. Funkcije ABA u biljnoj ćeliji

ABA ispoljava različite efekte na rast korena i izbojaka i ti efekti zavise od vodnog statusa biljke. Endogena ABA pospešuje rast izbojaka u dobro navodnjenim biljkama supresujući proizvodnju etilena. Dok se pri ograničenim uslovima navodnjenosti i niskom vodnom potencijalu dešava suprotno. Takođe, pri uslovima suše endogena ABA se ponaša kao signal koji smanjuje rast izbojaka, a pospešuje rast korena, inhibirajući sintezu etilena (Spollen et al., 2000). ABA je glavni signalni molekul koji posreduje u prenosu signala stresa između korena i izbojka. Rasvetljavanje signalne uloge ABA u uslovima zaslanjenosti, vodnog deficita, stresa izazvanog teškim metalima i izlaganja niskim i visokim temperaturama, dovelo je do označavanja ABA kao hormona stresa. ABA je veoma efektivna u zatvaranje stoma, te akumulacija ABA u listovima usled stresa igra važnu ulogu u smanjenju gubitka vode transpiracijom. Stomalno zatvaranje može biti uzrokovano i ABA-om koja je sintetisana u korenu i prenesena do izbojaka. Grafik na slici 15. pokazuje promene vodnog potencijala, stomalne otpornosti (recipročne vrednosti od stomalne provodljivosti), koncentracije ABA u kukuruзу pri stresu sušom, gde vodni potencijal listova opada, dok sadržaj ABA i stomalna otpornost rastu. (Beardsell i Cohen, 1975).



Slika 15. Grafik vremenske zavisnosti koncentracije ABA i stomalne otpornosti

2.10.1.6. ABA i oksidativni stres

Abiotički stres uzrokuje promene u signalnim putevima u svim ćelijskim komponentama. Dokazano je da postoje ABA-zavisni i ABA-nezavisni putevi u odgovorima na abiotički stres. ABA igra glavnu ulogu u aklimaciji na hiperosmotski stres izazvan visokim salinitetom, sušom ili teškim metalima (Finkelstein et al., 2002). Hiperosmotski stres pokreće ABA biosintezu, što dovodi do promena u genskoj ekspresiji, kroz mrežu signalnih puteva.

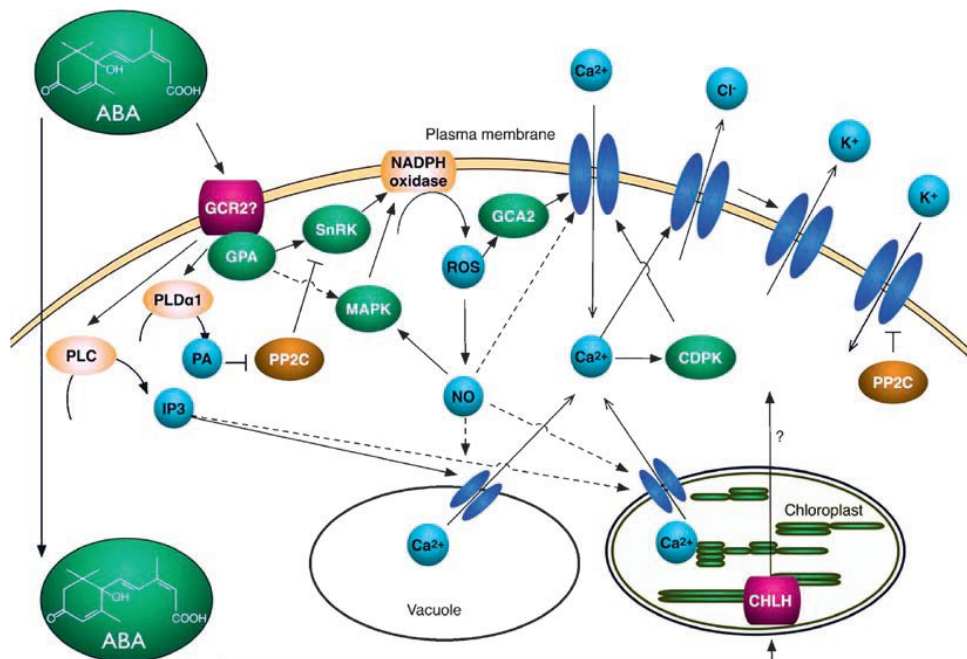
ABA je uključena u kratkoročne fiziološke efekte, poput zatvaranja stoma, kao i u dugoročne procese razvića (sazrevanje semena). Stomalno zatvaranje izazvano delovanjem ABA se koristi kao model sistem za praćenje brzih odgovora na ABA (vremenski okvir od milisekunda do sekunda). Brzi fiziološki odgovori deluju kroz promene fluksa jona kroz membranu, a mogu uključiti i gensku regulaciju, dok dugoročni procesi neizbežno uključuju promene u obrascima genske ekspresije. Putevi prenošenja signala koji pojačavaju primarni signal, koji se stvara kada se hormon veže za receptor, su neophodni i za kratkoročne i dugoročne efekte ABA.

Hiperosmotski stres, kao i ABA, uzrokuje povećanje fosfolipida, reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS), kalcijuma, i azot-oksida (NO) koji deluju kao sekundarni glasnici u prevođenju signala za zatvaranje stoma (Miller et al., 2008; Neill et al., 2008).

ABA modulacijom fosfolipaze C (PLC) i D (PLD) posredstvom inozitol-1,4,5-trifosfata (IP₃) ili fosfatične kiseline (PA) vrši aktivaciju vakuolarnih kalcijumovih kanala i povećava koncentracije citosolnog Ca²⁺ koji predstavlja ključni signal u procesu zatvaranja stoma (Takashi et al., 2001). Skoro je otkriveno i postojanje Ca-senzornih receptora (CAS) koji su lokalizovani na membrani hloroplasta i koji posredstvom IP₃ oslobađaju Ca²⁺ iz unutrašnjih depoa u vanćelijski prostor, što dovodi do stomalnog zatvaranja kod *Arabidopsis* (Tang et al., 2007; Nomura et al., 2008). Oba puta, katalizovana bilo fosfolipazom C- diacilglicerol kinazom (PLC-DGK) ili PLD, su uključena u odgovor na stres (Hong et al., 2008).

Poznato je i da ABA aktivira ROS signaling procese koji povezuju čitavu mrežu metaboličkih puteva, a započinju produkcijom H₂O₂ usled izloženosti raznim faktorima stresa. Pretpostavlja se da ABA izaziva proizvodnju H₂O₂ aktivacijom NAD(P)H oksidaze (Murata et al., 2001; Neill et al., 2008). Dva gena koja kodiraju katalitičku subjedinicu NAD(P)H oksidaze (*AtrbohD* i *AtrbohF*) su pod uticajem abiotičkog stresa povišeno ekspresovana u ćelijama zatvaračicama, a ta ekspresija je regulisana od strane ABA. Mutacije na ova dva gena dovode i do zatvaranja stoma i povišene produkcije ROS-a (Kwak et al., 2003). ROS signaling aktivira Ca²⁺ kanale na plazma membrani u ćelijama zatvaračicama i tako pospešuje stomalno zatvaranje. Kod kukuruza ABA-indukovana proizvodnja ROS-a može da aktivira i gene za antioksidantnu odbranu (Guan et al., 2000). Veliki broj istraživanja potvrđuje učešće NO[•] radikala

kao endogenog signalnog posrednika u odgovoru na stimule iz živone sredine kod biljaka (Besson-Bard et al., 2008). Gen *HOT5* koji je neophodan za ostvarivanje termoregulacije takođe kodira i S-nitrozoglutation reduktazu (GSNOR) koja metaboliše S-nitrozoglutation, prenosni oblik NO[•] signala (Lee et al., 2008a). Egzogeni NO[•] uzrokuje zatvaranje stoma (Garcia-Mata i Lamattina, 2002), a ABA uzrokuje proizvodnju NO[•] koja opet zavisi od proizvodnje H₂O₂ (Bright et al., 2006). Slika 16. pokazuje međusobnu ukrštenost signalnih puteva ABA i oksidativnog stresa, te ukazuje i na blisku vezu između regulacije oksidativnog stresa i adaptacije na promenjive uslove životne sredine (Zsigmond et al., 2008).



Slika 16. Ukrštenost (eng. "cross-talk") puteva signalne transdukcije ABA i ROS-a usled abiotičkog stresa (Rock et al., 2000)

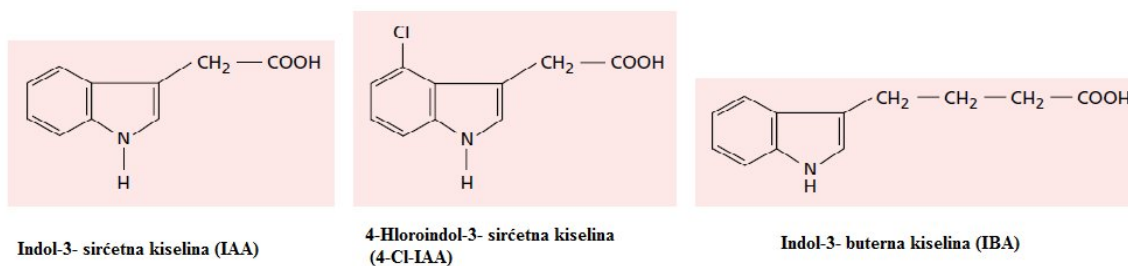
Veliki broj dokaza potvrđuje uključenost reverzibilne proteinske fosforilacije u regulaciji biljnog odgovora na razne stimule iz životne sredine. Takođe, poznato je da ABA uzrokuje antioksidativnu zaštitu putem regulacije ekspresije gena vezanih za antioksidantni odgovor, upravo preko proizvodnje ROS-a (Guan et al., 2000), ali i preko ROS posredovane aktivacije MAPK signalnih kaskada kako je zabeleženo kod kukuruza (Zhang et al., 2006). Kod *Arabidopsis*, oksidativni stres i novonastali H₂O₂ aktivira dve MAP kinaze (AtMPK3 i AtMPK) od kojih prekomerna ekspresija gena *AtMPK6* ujedno povećava i ABA-zavisnu ekspresiju gena *CAT1* koji kodira katalazu (Kovtun et al., 2000, Moon et al., 2003), koja igra važnu ulogu u smanjenju koncentracije H₂O₂ i oksidativnog stresa (Mittler et al., 2004). U ćelijama zatvaračicama *Vicia faba* dokazano je postojanje ABA-aktiviranih protein kinaza (AAPK) (Mori i Muto, 1997). Aktivnost AAPK je potrebna za ABA aktivaciju S-tipa anjonskih kanala, što rezultira zatvaranjem stoma. Periodičnost oscilacija struje Ca²⁺ (tzv. Ca²⁺ potpis) određuje ćeljski odgovor.

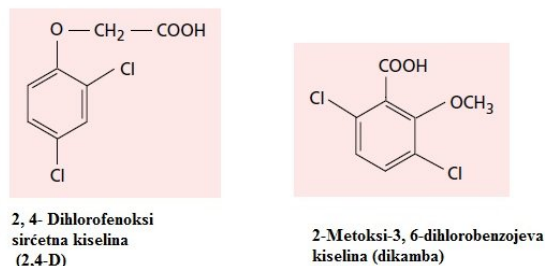
Porast koncentracije citosolnog kalcijuma koji je uzrokovan delovanjem ABA predstavlja ključni momenat u trenutnom modelu ABA indukovanog stomalnog zatvaranja, mada je ABA sposobna da izazove stomalno zatvaranje i kad u ćelijama zatvaračicama ne dodje do porasta citosolnog kalcijuma. Naime, dokazano je da ABA deluje kalcijum nezavisnim putevima, tako što koristi citosolni pH kao signalni intermedijer. ABA uzrokuje alkalizaciju citosola od pH 7.76 do pH 7.94, a povećanje citosolnog pH aktivira K^+ izlazne kanale, što takođe dovodi do zatvaranja stoma (Allan et al., 1994).

Dokazano je da ABA reguliše ekspresiju velikog broja gena tokom sazrevanja semena i tokom stresnih uslova, kao što su toplotni šok, adaptacija na niske temperature i tolerancija na soli i teške metale (Rock, 2000). ABA uzrokovana povećana ekspresija gena doprinosi stvaranju adaptivne tolerancije. Ovi povišeno ekspresovani geni kodiraju proteaze, čaperone, enzime metabolizma šećera i drugih osmolita, jonske kanale i akvaporine, te enzime za detoksifikaciju reaktivnih kiseoničnih vrsta i regulatorne proteine poput transkripcionih faktora (TFs) i proteinskih kinaza. Genska aktivacija od strane ABA je posredovana transkripcionim faktorima, među kojima su identifikovane četiri klase. Neki od TFs posreduju u odgovorima na sušu, hladnoću ili zaslanjenost medijuma, a pretpostavlja se da su TFs uključeni i u sprovođenju bioloških odgovora i kod stresa izazvanog teškim metalima, mada još uvek nisu identifikovani (Pareek et al., 2010).

2.10.2. Auksin-hormon rasta

Auksin je prvootkriveni hormon u biljkama čija je fiziološka uloga i mehanizam delovanja rasvetljen. Kako ovo jedinjenje pospešuje izduživanje koleoptila nazvano je auksin od grčkog *auxein*, što znači povećavati se, rasti. Tehnološki napredak, prvenstveno obeležavanje sa izotopima, omogućilo je otkrivanje metaboličkih puteva biosinteze i razgradnje auksina. U srednjim tridesetim godinama prošlog veka otkriveno je da je dominantni auksin u višim biljkama indol-3-sirćetna kiselina (IAA). Tek kasnije je otkriveno još nekoliko auksina u višim biljkama, ali je IAA daleko najzastupljeniji i fiziološki najznačajniji. Kako je struktura IAA relativno jednostavna, akademske i industrijske laboratorije bile su brzo u mogućnosti da sintetišu širok spektar molekula sa auksinskom funkcijom. Neki od njih se koriste kao herbicidi u hortikulturi i poljoprivredi.





Slika 17. Strukture najznačajnijih sintetskih i prirodnih auksina

Rana definicija auksina je obuhvatala sve prirodne i sintetske hemijske supstance koje stimuliraju elongaciju u koleoptilima. Međutim, dokazano je da auksini pokazuju i druge efekte osim elongacije. Stoga, auksini mogu biti definisani kao jedinjenja sa biološkom funkcijom sličnoj onoj koju ima indol-3-sirćetna kiselina (IAA), uključujući sposobnost da se pospešuje ćelijska elongacija u koleoptilu i izbojačnom delu, deoba ćelija u kalusnoj kulturi u prisustvu citokinina, formiranje adventivnih korenova, i drugih fenomena u razvoju biljke povezanih sa IAA. Mada su hemijski različite, zajednička osobina svih aktivnih auksina je da je molekulska udaljenost između delimično pozitivnog naelektrisanja na aromatičnom prstenu i negativno naelektrisane karboksilne kiseline oko 0.5 nm.

2.10.2.1. Putevi biosinteze indol-3-sirćetne kiseline

Biosinteza IAA je povezana sa brzim deobama u brzo rastućim tkivima, posebno izbojcima. Mada su sva biljna tkiva sposobna za sintezu niskih koncentracija IAA, apikalni izbojci meristema, mladi listovi i voće i semenje u razvoju su primarna mesta sinteze IAA (Ljung et al., 2001).

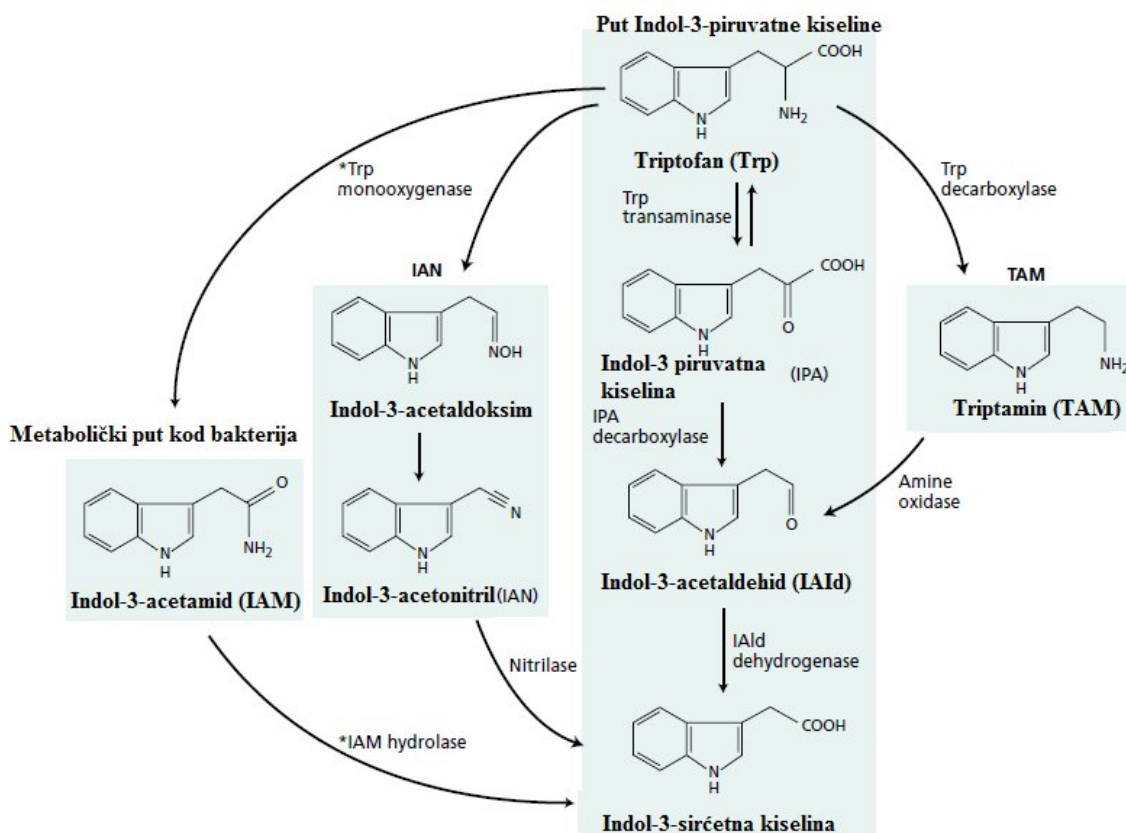
IAA je strukturno slična aminokiselini triptofan, te su prvobitne studije o biosintezi auksina bile usmerene na triptofan kao potencijalni prekursor i praćenje transformacije egzogenog izotopski obeleženog triptofana (npr. ³H-triptofan) u IAA od strane biljnog tkiva. Do danas je poznato više metaboličkih puteva konvezijske triptofana u IAA koji su prikazani na slici 18.

a) IPA put je najčešći put biosinteze IAA od svih triptofan-zavisnih puteva kod biljaka. U ovom putu biosinteze IAA, indol-3-piruvatna kiselina predstavlja prekursor koji prvo podleže reakciji deaminacije kako bi se formirala indol-3-piruvatna kiselina, te reakciji dekarboksilacije kako bi se formirao indol-3-acetaldehid (IAld). Indol-3-acetaldehid se zatim oksiduje do IAA specifičnim dehidrogenazama.

b) TAM put je sličan IPA putu, s tim da je redosled reakcija deaminacije i dekarboksilacije obrnut, te su i različiti enzimi uključeni. One vrste biljaka koje ne koriste IPA put, koriste TAM put. Postoje biljke, poput paradajza kod kojih IAA nastaje u oba puta, i TAM i IPA (Nonhebel et al., 1993).

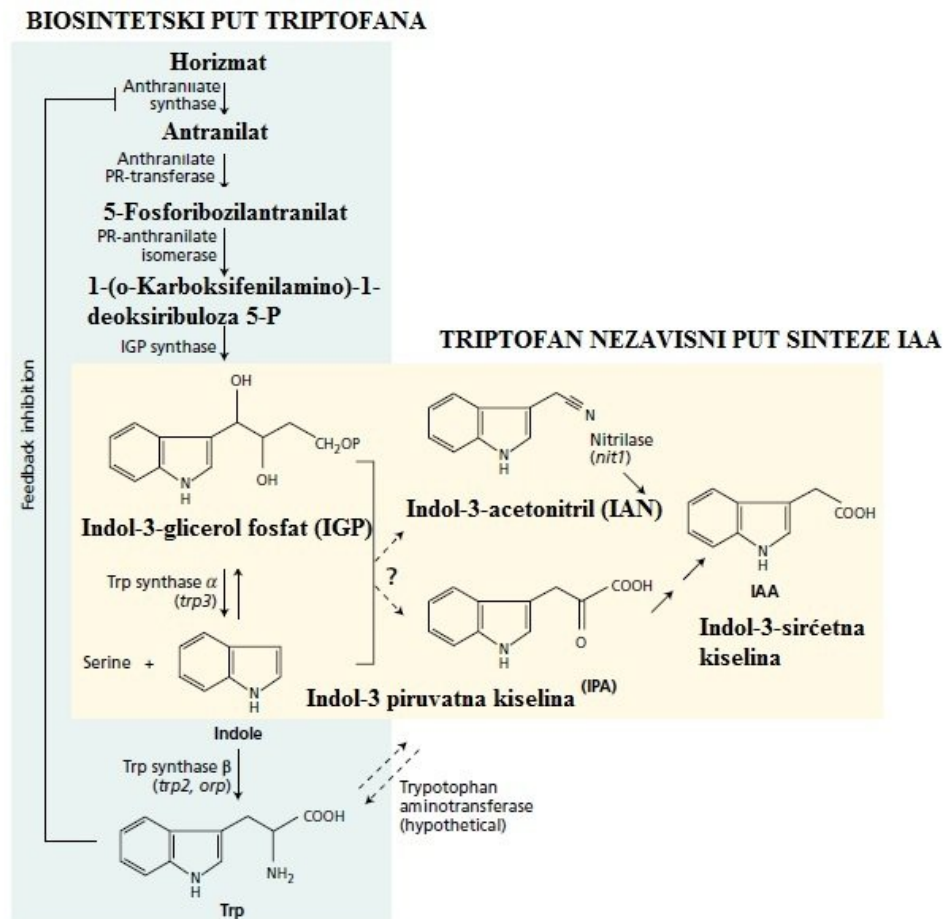
c) IAN put nazvan po indol-3-acetonitrilu (IAN) jer se u ovom putu triptofan prvo konvertuje u indol-3-acetaldoksim, a zatim do indol-3-acetonitrila. Enzim koji prevodi IAN do IAA se zove nitrilaza. Ovaj

put je karakterističan za samo tri familije biljaka *Brassicaceae*, *Poaceae* i *Musaceae* kojima pripada i biljka banane.



Slika 18. Sumarna shema triptofan zavisnih puteva biosinteze IAA (Taitz i Zeiger, 2002)

Zahvaljujući upotrebi genetskih metoda, otkriven je i triptofan-nezavisni put biosinteze IAA koji je prikazan na slici 19. Otkriće triptofan-nezavisnog puta drastično je promenilo viđenje IAA biosinteze, ali odnos triptofan zavisnog i nezavisnog puta je i dalje slabo shvaćen. Kod nekoliko biljnih vrsta je pronađeno da tip biosinteze IAA varira u različitim tkivima i među različitim fazama razvika. Na primer, tokom embriogeneze kod šargarepe, triptofan-zavisna staza je značajna u ranom razvoju gde, nakon što se ose korena i izbojka formiraju, triptofan-nezavisna staza biosinteze IAA preuzima glavnu ulogu. Postojanje višestrukih puteva za biosintezu IAA čini skoro nemogućim da biljka ostane bez auksina, što odražava esencijalnu ulogu ovog hormona u razvoju biljke.



Slika 19. Ukrštenost triptofan-zavisnog i triptofan-nezavisnog puta sinteze IAA (Taitz i Zeiger, 2002)

2.10.2.2. Konjugovane forme IAA

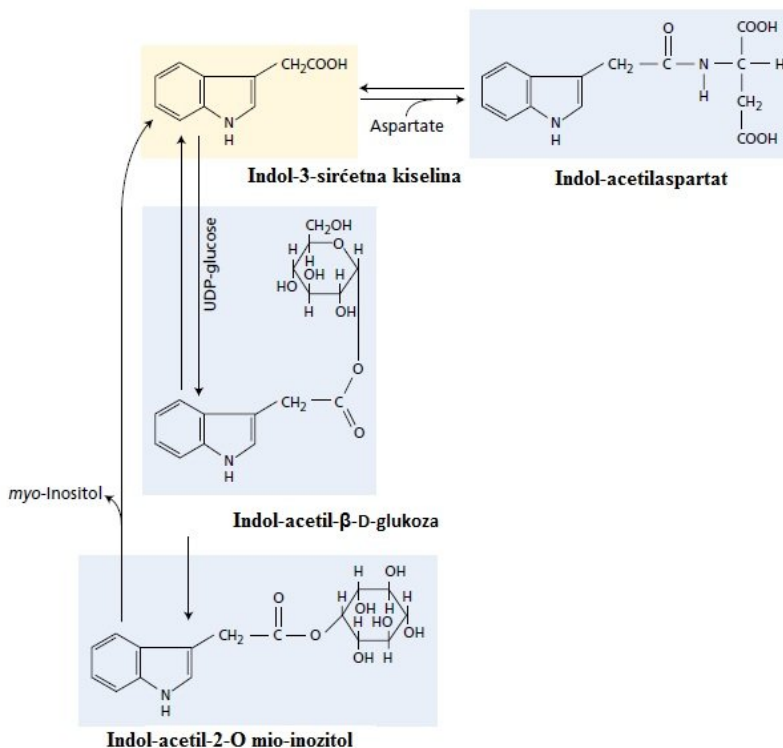
Mada slobodan IAA predstavlja biološki aktivan oblik hormona, većina auksina u biljci je nađena u kovalentno vezanom obliku. Konjugati auksina su identifikovani u svim višim biljkama i smatraju se hormonalno inaktivnim. Postoji podela ovih konjugata na:

- Nisko-molekulske IAA konjugate auksina koji sadrže estre sa glukozom ili mio-inozitolom i amidne konjugate poput indol-N-aspartata,
- Visoko-molekulske IAA konjugate koji obuhvataju IAA-glukane (7-50 jedinica glukoze po jednom molekulu IAA) i IAA-glikoproteine

Jedinjenje sa kojim je IAA konjugovan i način vezivanja zavisi od specifičnih enzima koji vrše konjugaciju. Najbolje proučena reakcija konjugacije je IAA sa glukozom u *Zea mays*. Metabolizam konjugovanih auksina može biti glavni faktor koji doprinosi regulaciji nivoa slobodnog auksina. Npr. tokom germinacije semena *Zea mays*, IAA-mio-inozitol je translociran iz endosperma do koleoptila

putem floema. Smatra se da jedan deo slododnog IAA u vrhovima koleoptila *Zea mays*-a nastaje iz hidrolize IAA-mio-inozitola.

Takođe, stimulisi iz životne sredine kao što su svetlost i gravitacija, utiču na odnos konjugovanih auksina (uklanjanje aktivnog auksina) i slobodnog auksina (koji nastaje hidrolizom konjugovanih auksina). Formiranje konjugovanih auksina može da ima funkciju da skladišti IAA i štiti ga od oksidativnog oštećenja.



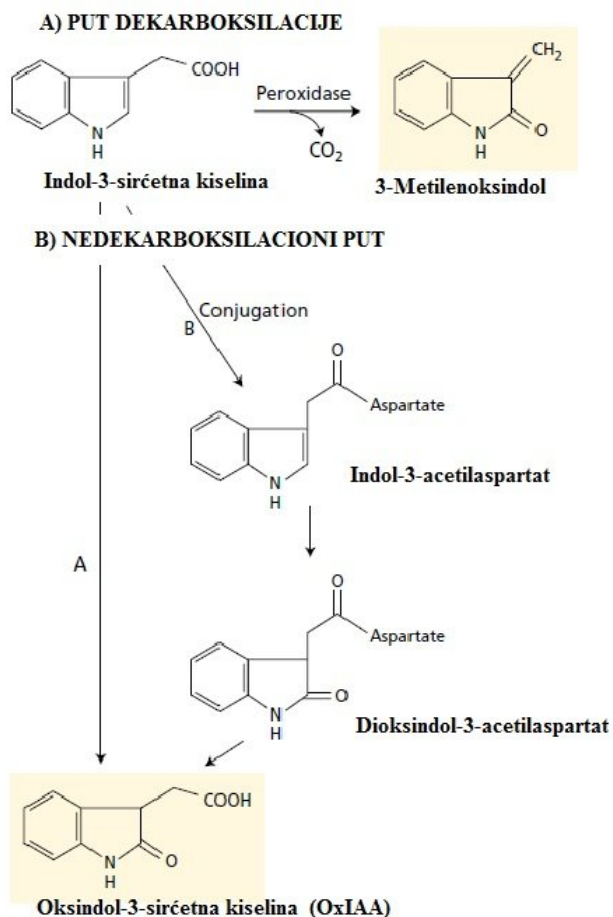
Slika 20. Konjugacija IAA i strukture konjugovanih formi IAA

2.10.2.3. Metabolički putevi degradacije IAA

Poput IAA sinteze i enzimatska razgradnja (oksidacija) IAA uključuje višestruke metaboličke puteve. Neko vreme se mislilo da su enzimi iz grupe peroksidaza zaslužni za oksidaciju IAA, međutim fiziološka uloga peroksidaza u ovom procesu još nije razjašnjena. Promene u nivou IAA kod transgenih biljaka kod kojih je ekspresija peroksidaza desetostruko povećana nisu primećene, niti je došlo do promene u nivou IAA prilikom inhibicije peroksidazne aktivnosti (Normanly et al., 1995).

Na osnovu istraživanja sa izotopski obeleženom IAA i putem detaljne identifikacije metabolita, otkrivena su druga dva oksidativna puta kontrolisanog procesa degradacije. Krajnji produkt ove reakcije je oksindol-3-sirćetna kiselina (oxIAA), jedinjenje koje se prirodno javlja u endospermu i izbojcima *Zea mays*. U prvom metaboličkom putu, IAA je oksidovana bez dekarboksilacije do OxIAA, dok je u drugom

IAA-aspartat konjugat oksidovan prvo do intermedijera dioksindol-3-acetilaspata, a onda do oxIAA. *In vitro*, IAA može biti oksidovana i neenzimski kada je izložena intenzivnom svetlu, pri čemu fotodestrukcija dodatno biva pospešena prisustvom biljnih pigmenata, poput riboflavona.



Slika 21. Shema puteva degradacije IAA

2.10.2.4. Distribucija i transport IAA unutar ćelije

Raspodelu IAA u ćeliji reguliše pH vrednost. Kako disosovan oblik IAA⁻ ne može da prođe membranu, dok protonovan IAAH slobodno difunduje kroz membranu, auksin teži da se akumulira u više baznim kompartmentima ćelije. Raspodela IAA i njegovih metabolita je proučavana u ćelijama duvana, gde je otprilike jedna trećina IAA nađena u hloroplastima, dok je ostatak skladišten u citosolu. IAA u citosolu je metabolizovan ili konjugacijom ili katabolizmom koji isključuje reakcije dekarboksilacije. IAA u hloroplastima je zaštićen od ovih procesa, a njegova koncentracija je regulisana količinom IAA u citosolu sa kojom je u dinamičkoj ravnoteži (Sitbonet et al., 1993).

Ustanovljeno je da se IAA uglavnom kreće bazipetalno (od apikalnog ka baznom kraju) i ova pojava se naziva polarni transport. Auksin je jedini biljni hormon rasta koji se kreće polarno. Kako

apikalni izbojci služe kao primarni izvor auksina za celu biljku, dugo se smatralo da je polarni transport glavni uzrok stvaranja gradijenta auksina idući od vrhova izbojaka ka vrhovima korenova. Ovaj longitudinalni gradijent auksina od izbojaka do korena utiče na razne procese razvića, uključujući elongaciju, apikalnu dominaciju, lisnu senescenciju i zarastanje rana na biljci. Skoro je primećeno da se značajna količina auksina transportuje i pojavljuje u floemu i da je to glavni put kojim se auksin kreće akropetalno (ka vrhu).

Brzina polarnog auksinskog transporta je $5-20 \text{ cm h}^{-1}$, što je brže od difuzije, a sporije od floemske translokacije. Polarni transport je specifičan za aktivni auksin, prirodni i sintetički. S obzirom da se neaktivni auksinski analozi niti metaboliti auksina ne translociraju polarno, postojanje specifičnih proteinskih nosača na plazma membrani koji prepoznaju hormon i njegove aktivne analoge je evidentno (Palme i Galweiler, 1999).

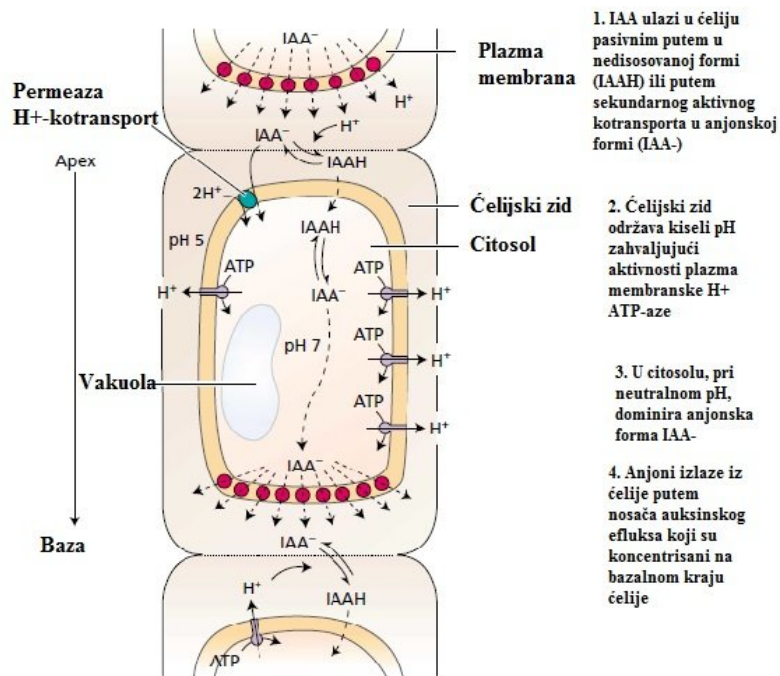
Prema hemiosmotskom modelu polarnog auksinskog transporta unos auksina je vođen silom protonskog gradijenta ($\Delta E + \Delta pH$) kroz plazma membranu, dok je auksinski efluks obezbeđen membranskim potencijalom, ΔE . Prvi korak u polarnom transportu je auksinski influks, koji prema modelu obezbeđuje ulazak auksina u ćeliju preko dva mehanizma:

- pasivnom difuzijom protonovane forme (IAAH) kroz fosfolipidni dvosloj,
- sekundarnim aktivnim transportom, simportom disosovanog oblika (IAA^-) i hidronijum jona 2H^+ .

Dvojni način ulaska auksina proizilazi iz zavisnosti permeabilnosti membrane od apoplastičnog pH. Nedisocirana forma indol-3-sirćetne kiseline, gde je karboksilna grupa protonovana, je lipofilna i prolazi difuzijom kroz lipidni dvosloj, dok disocirana forma negativno naelektrisana, ne može da prođe kroz membranu. Kako membranska H^+ -ATP-aza normalno održava pH vrednost oko 5, oko polovine auksina ($\text{pK}_a=4.5$) u apoplastu će biti u svojoj nedisociranoj formi i proći će pasivnom difuzijom kroz plazma membranu niz koncentracijski gradijent. Eksperimentalno je dokazano da se u uslovima sniženog vanćelijskog pH unos IAA povećava.

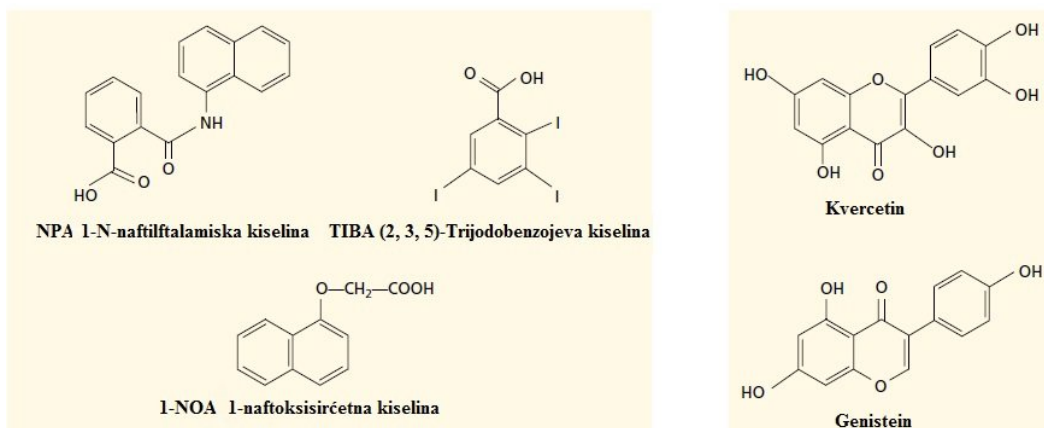
Ekspirimenti potvrđuju i da 2H^+ - IAA^- simporteri vrše kotransport dva hidronijum jona zajedno sa auksinskim anjonom. Ovaj aktivni transport auksina omogućava veću akumulaciju IAA nego prostom difuzijom. U korenovima *Arabidopsis* je identifikovan auksinski nosač tipa permeaze AUX1 (Bennett et al., 1996). Uopšteno, polarnost transporta auksina je zapravo vođena efluksom pre nego influksom (Marchant et al., 1999). Jednom kad IAA uđe u citosol, čiji je pH otprilike 7.2, skoro celokupni auksin će disosovati do anjonske forme. Kako je membrana manje propusna za IAA^- nego za IAAH, IAA^- će težiti da se akumulira u citosolu. Međutim, određena koncentracija auksina koji uđe u ćeliju, izlazi putem auksinskog anjonskog efluks nosača. Prema hemiosmotskom modelu, transport IAA^- van ćelije je vođen negativnim membranskim potencijalom unutrašnje strane. Prema hemiosmotskom modelu polarnog

transporta efluks IAA^- se najčešće dešava na bazalnom delu svake ćelije. Uzastopni unos auksina sa apikalnog kraja ćelije i njegovo otpuštanje na baznom delu svake ćelije, objašnjava totalni polarni transport.



Slika 22. Hemistatski model polarnog transporta auksina kroz ćelije

Do sada je utvrđeno nekoliko sintetičkih jedinjenja koja se ponašaju kao inhibitori auksinskog transporta, uključujući 1-N-naftilftalamičnu kiselinu (NPA) i 2, 3, 5-trijodobenzojevu kiselinu (TIBA). Ovi inhibitori blokiraju polarni transport sprečavajući auksinski efluks. Jedan od simptoma blokiranog unosa auksina inhibitorima, poput 1-naftoksisirćetne kiseline (1-NOA), je agravitropizam, sličan onom koji se pojavljuje kod *aux1* mutanata *Arabidopsis* (Geldner et al., 2001).



Slika 23. Strukture inhibitora auksinskog transporta

Još šezdesetih godina prošlog veka dokazano je da je B-prsten flavonoida uključen u degradaciju indol-sirćetne kiseline, dok su flavonoidi sa dihidroksi B-prstenom inhibirali IAA degradaciju. Sve je više dokaza da flavonoidi mogu da funkcionišu kao endogeni regulatori polarnog transporta auksina, najverovatnije jer se aglikoni flavonoida nadmeću za vezujuća mesta na membranama gde su koncentrisani efluks nosači (Peer et al., 2001). Takođe, potvrđeno je da su mutanti *Arabidopsis* sa deficitom flavonoida manje sposobni da akumuliraju auksin nego divlji tip, kao i da mutanti koji nemaju flavonoide imaju različitu raspodelu auksina (Brown et al., 2001). Kvercetin, apigenin i kamferol mogu nadmašiti auksin u vezivanju za vezujuća mesta na plazma membrani (Jacobs i Rubery, 1988). Rast biljaka na naringeninu dovodi do inhibicije rasta i gravitropizma kao posledica inhibicije auksinskog transporta. Međutim, glikozilacija ometa vezivanje, te su stoga samo aglikoni aktivni inhibitori auksinskog transporta (Bernasconi, 1996).

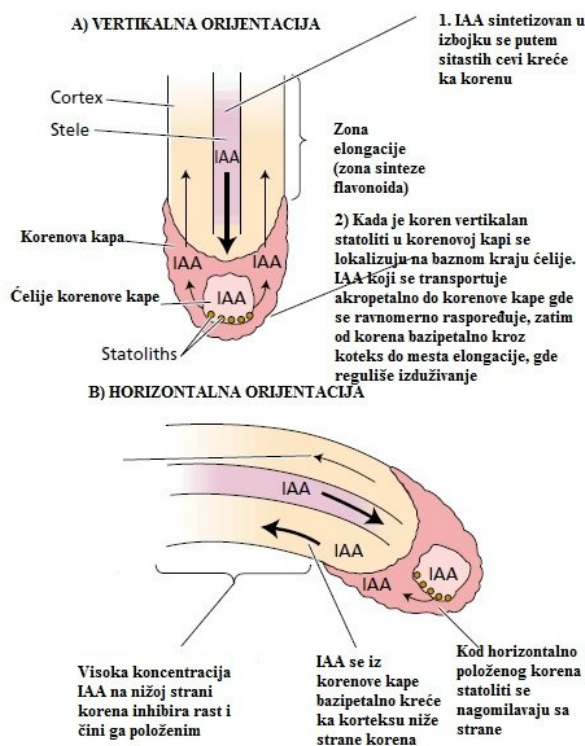
2.10.2.5. Fiziološki efekti auksina

Auksin (indol-3-sirćetna kiselina) je u biljnim ćelijama najzastupljeniji prirodni hormon rasta, koji kod biljaka kontroliše apikalnu dominaciju, tropizme, elongaciju izbojka i inicijaciju korenova. Apikalna dominacija se održava zahvaljujući gradijentu koji se formira polarnim transportom IAA, od vrhova apikalnog meristema izbojaka prema bazi (Vernoux et al., 2010). Meristemsko tkivo je glavni izvor auksina, a ćelijske koncentracije u biljkama su najčešće kontrolisane procesom transporta, degradacije ili konjugacije sa drugim metabolitima (npr. aminokiselinama, ugljenim hidratima i dr.) u njihove neaktivne forme (Normanly et al., 1995). Konjugacija auksina sa aminokiselinama je katalizovana auksin amidosintazama (grupa II GH3 enzimima). Skoro je ustanovljeno da GH3 enzimi predstavljaju vezu između adaptacije biljnog rasta i nepovoljnih uslova životne sredine. U nepovoljnim uslovima GH3 enzimi vrše inaktivaciju gena koji su regulisani auksinom, usmeravajući time procese ka aktivaciji odbrambenih mehanizama umesto ka procesu rasta (Park et al., 2008). Sve je veći broj dokaza koji potvrđuje da auksini igraju značajnu ulogu u sezonskoj adaptaciji drveća na klimatske promene i stres koji posledično te promene izazivaju, kao i nepovoljne uslove životne sredine (Schrader et al., 2003; Popko et al., 2010). U granama topola izloženih stresu zaslanjenosti, došlo je do smanjenja koncentracije slobodnog auksina paralelno sa smanjenjem dijametra sprovodnih sudova i jačanjem ćelijskih zidova, što sve doprinosi adaptaciji na povećan osmotski pritisak (Junghans et al., 2006). Prilagođavanje unutrašnje koncentracije auksina u drvetu, kao odgovora na promene u životnoj sredini, regulisana je GH3 auksin konjugat sintazom, što potvrđuje ulogu ovih enzima u biljnoj adaptaciji na stres (Hagen et al., 1991). Na značajnu protektivnu ulogu IAA u uslovima abiotičkog stresa ukazuje sve veći broj radova, gde IAA povećavaju toleranciju biljaka na zaslanjenost (Iqbal i Ashraf, 2007), sušu, smrzavanje (Posymk et al.,

2009), povišene temperature i stres izazvan teškim metalima (Dimpka et al., 2008; Khan i Chaudhary, 2006).

Auksin se sintetizuje u vršnim izbojcima i bazipetalno transportuje do tkiva ispod. Optimalna koncentracija za elongaciju i rast je tipično od 10^{-6} do 10^{-5} M. Inhibicija rasta, u slučaju viših koncentracija auksina od optimalnih, se povezuje sa auksin indukovanom biosintezom etilena, koji pak inhibira elongaciju stabljike kod mnogih vrsta. Auksinska kontrola elongacije korena je još komplikovanija, možda zato što auksin uzrokuje proizvodnju etilena, inhibitora rasta korena. Međutim, čak i kad je biosinteza etilena specifično blokirana, niska koncentracija (10^{-10} do 10^{-9} M) auksina pospešuje rast korena, dok viša koncentracija od 10^{-6} M inhibira rast korena. Stoga, korenje zahteva minimalnu koncentraciju auksina da bi raslo, a rast korena je inhibiran koncentracijama auksina koje izazivaju elongaciju stabljika i koleoptila.

Pospešivanje rasta stabla i koleoptila i inhibicija rasta korena su najbolje proučena fiziološki efekti delovanja auksina, ali auksini imaju ulogu i u odgovorima biljke na stimulse kakvi su svetlost i gravitacija, koji se nazivaju tropizmi. Auksin se transportuje lateralno do zasenčenih strana tokom fototropizma i do nižih strana tokom gravitropizma. Statoliti (skrobom ispunjeni amiloplasti) u statocitima su zaslužni za opažanje gravitacije od strane biljke (slika 24).



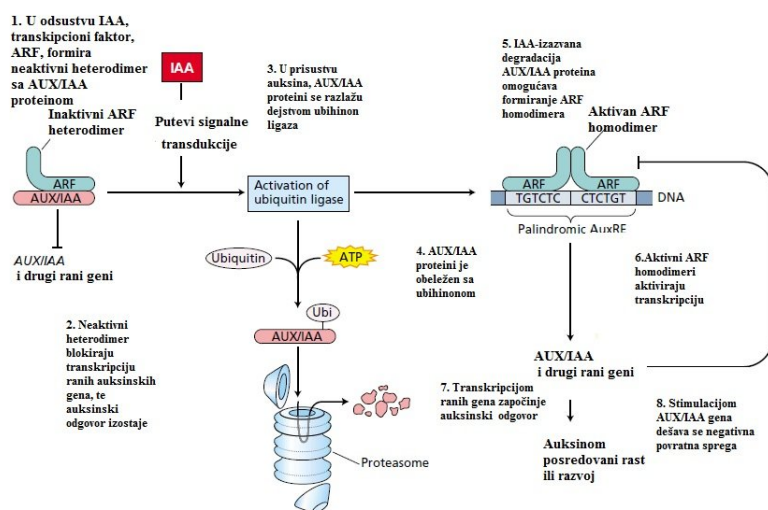
Slika 24. Uloga IAA u gravitropizmu

Pored uloge u rastu i tropizmima, auksin igra centralnu ulogu u apikalnoj dominaciji i inicijaciji rasta lateralnih korena, lisnoj abscisiji, diferencijaciji vaskularnog tkiva, formaciji cvetnih pupoljaka i formiranju ploda. Komercijalna upotreba auksina uključuje jedinjenja koji pospešuju rast adventivnih korena i herbicide među kojima su najpoznatiji 2,4-D (2,4-dihlorofenoksi sirćetna kiselina) i dikamba (2-metoksi-3,6-dihlorobenzojeva kiselina). Sintetički auksini su veoma efikasni jer ih biljka ne metaboliše tako brzo kao IAA.

2.10.2.6. Putevi signalne transdukcije auksina

Mnogi dokazi ukazuju da auksin izaziva povećanje slobodnog kalcijuma koji ima ulogu sekundarnog glasnika u transdukciji signala. Osim jona kalcijuma, transdukcija signala može biti regulisana promenom citosolnog pH, koji pod uticajem auksina opada. Kako se vrednost citosolnog pH kreće oko 7.4, a optimalni pH za rad plazma membranske H^+ -ATP-aze je 6.5, auksinom uzrokovan pad pH aktivira H^+ -ATP-azu na plazma membrani i podstiče oslobađanje IAA iz vezanih formi, što dalje povećava i unutarćelijsku koncentraciju slobodnog Ca.

Takođe, auksin vezivanjem za receptore aktivira i MAPK kinaze koje igraju važnu ulogu u signalnoj transdukciji putem kaskadnog fosforilovanja proteina koji dalje aktiviraju transkripcione faktore. (TFs). Aktivirani transkripcioni faktori ulaze u jedro i pospešuju ekspresiju specifičnih gena koji su nazvani geni primarnog odgovora ili rani geni. Ovi rani geni imaju tri osnovne funkcije: 1) da kodiraju proteine koji regulišu transkripciju gena sekundarnog odgovora ili tzv. kasne gene, 2) da vrše međućelijsku komunikaciju na nivou ćelija- ćelija, 3) da učestvuju u adaptaciji na stres jer uključuju AUX/IAA familiju gena koja kontroliše rast. Geni koji su identifikovani kao odgovor na stres su geni koji kodiraju glutathion-S-transferazu i 1-aminociklopropan-1-karboksilna kiselina (ACC) sintetaza koji je ključni enzim u sintezi etilena.

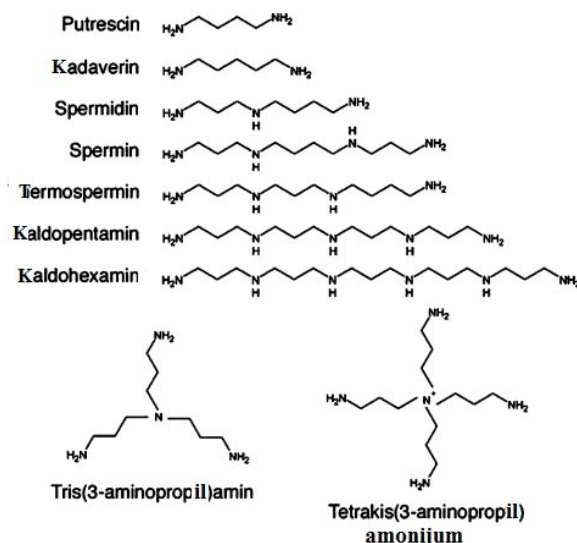


Slika 25. Mehanizam auksinske aktivacije ekspresije grupa ranih gena

2.11. Poliamini: esencijalni faktori rasta i opstanka

Poliamini su niskomolekularni alifatični polikatjonski ugljovodonici nađeni u ćelijama svih živih bića. Poliamini su uključeni u razne procese: regulaciju genske ekspresije, translaciju, ćelijsku proliferaciju, modulaciju ćelijskog signalinga i stabilizaciju membrane (Tabor i Tabor, 1984; Cohen, 1998; Igarashi i Kashiwagi, 2000). Takođe, poliamini regulišu aktivnosti određenih grupa jonskih kanala. Upravo zbog ove multifunkcionalnosti, homeostaza poliamina je od velikog značaja i u ćeliji je regulisana putem biosinteze, katabolizma i transporta poliamina. Dokazano je da su poliamini esencijalni za rast biljaka i da su uključeni u odgovore biljke na stres i bolesti. Zahvaljujući njihovom pozitivnom naelektrisanju, ova jedinjenja se vezuju za razne negativno naelektrisane biomolekule poput DNK i RNK, hromatin i proteine, elektrostatičkim vezama čime uzrokuju stabilizaciju ili destabilizaciju biomolekula. Poliamini regulišu i ćelijsku smrt, naročito apoptozu (Thomas i Thomas, 2001).

Tri osnovna poliamina kod biljaka su putrescin, spermidin i spermin, dok je kadaverin prisutan samo u leguminozama. Jedino termofilne bakterija sadrže poliamine sa dužim alifatičnim lancima, kao što su kaldopentamin i kaldoheksamin i razgranate poliamine kao što su tris-(3-aminopropil)-amin (tzv. mitsubisin) i tetrakis-(3-aminopropil)-amin. (Oshima, 2007). Biljni poliamini su lokalizovani u citosolu, ali i organelama kao što su vakuola, mitohondrije i hloroplasti (Kumar et al., 1997).

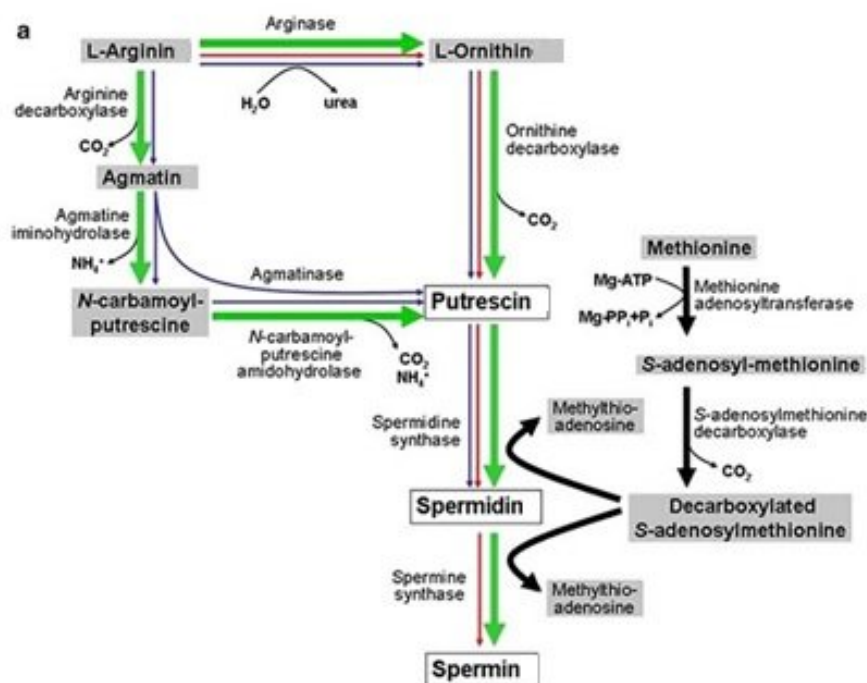


Slika 26. Strukture najvažnijih jedinjenja poliamina (Kusano et al., 2007)

Biljni poliamini igraju važnu ulogu u morfogenezi i embriogenezi, razvoju organa, senescenciji lišća, odgovoru na abiotički i biotički stres i antioksidantnoj zaštiti (Groppa i Benavides, 2007; Kusano et al., 2007). Biljni poliamini imaju i agroekonomski značaj, uključujući kvalitet plodova, vek trajanja vina, sadržaj fitonutrijenata (Matto et al., 2006).

2.11.1. Biosinteza poliamina

Putevi biosinteze poliamina se samo neznatno razlikuju od bakterija do životinja, što ukazuje na njihovu konzervaciju tokom evolucije (Tabor i Tabor, 1984). Sinteza generalno započinje od dva aminokiselinska prekursora, L-arginina i L-metionina (slika 27). Dva alternativna biosintetska puta su potvrđena i geni koji kodiraju enzime uključene u biosintezu poliamina su okarakterisani i klonirani iz raznih biljnih vrsta (Liu et al., 2007). Počevši od arginina, diamin putrescin se preko ornitina sintetise zahvaljujući aktivnosti enzima arginaze (EC 3.5.3.1) i ornitin dekarboksilaze (ODC, EC 4.1.1.17).



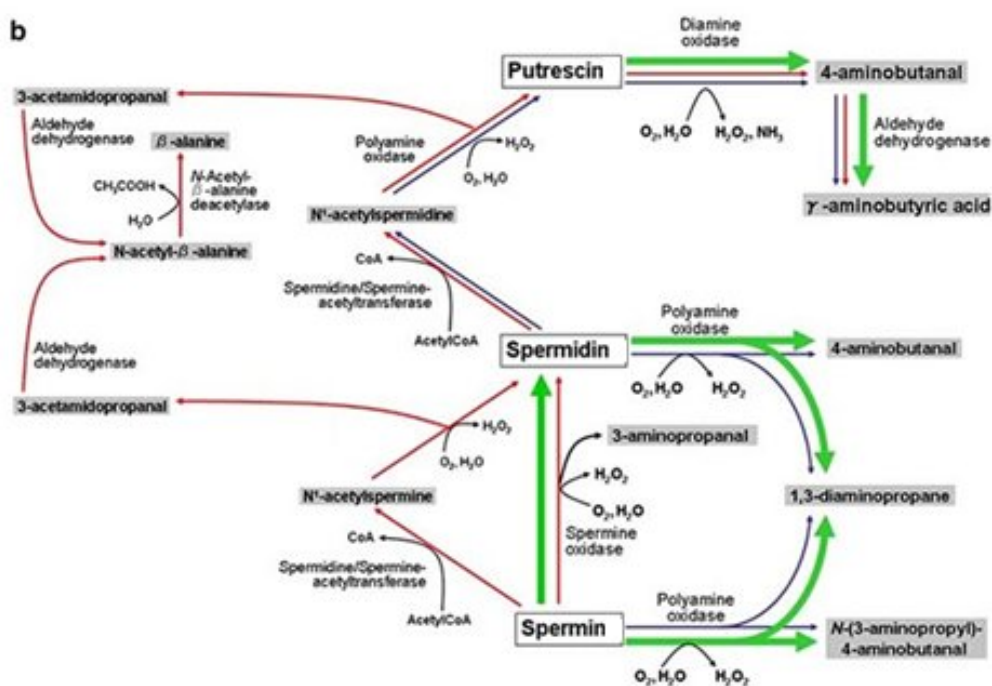
Slika 27. Putevi biosinteze najvažnijih predstavnika poliamina (Kusano et al., 2007)

Takođe, putrescin može biti sintetisan iz agmatina putem tri uzastopne reakcije katalizovane arginin dekarboksilazom (ADC, EC 4.1.1.19), agmatin iminohidrolazom (AIH, EC 3.5.3.12) i N-karbamoil putrescin amidohidrolazom (CPA, EC 3.5.1.53). Putrescin se prevodi u spermidin aktivnošću spermidin sintetaze (SPDS, EC 2.5.1.16), gde se aminopropil grupa prenosi sa dekarboksilovanog S-adenozilmetionina. Dekarboksilovani S-adenozilmetionin se sintetise iz metionina u dve uzastopne reakcije katalizovane aktivnostima metionin-S-adenozil transferaze (EC 2.5.1.6) i S-adenozil-metionin dekarboksilaze (SAMDC, EC 4.1.1.50). Kod leguminoza je prisutan i kadaverin, koji se biosintetiše iz lizina kao prekursora preko reakcija katalisanih lizin-dekarboksilazom (LDC, EC 4.1.1.18). Kod bakterija, pored regularnog puta putrescin može biti sintetizovan direktno iz agmatina zahvaljujući aktivnosti agmataze (EC 3.5.3.11). Spermidin se ne sintetise kod *E. coli* jer njen genom ne sadrži gen za spermin sintazu (SPMS, EC 2.5.1.22) (Wortham et al., 2007). Skorašnja istraživanja o biosintezi

poliamina kod ekstremno termofilne bakterije *Thermus thermophilus* su otkrila novi metabolički put za sintezu spermidina, gde je prekursor ovog poliamina arginin, a ne putrescin (Oshima, 2007).

2.11.2. Katabolizam poliamina

Glavni put degradacije poliamina je prikazan na slici 28. Enzim poliamin oksidaza (PAO, EC 1.5.3.11) koji kao kofaktor sadrži FAD (flavin-adenin-dinukleotid) koristi N-acetil-derivate kao supstrat i vrši prevođenje spermidina i spermina u 4-aminobutanal i N-(3-aminopropil)-4-aminobutanal, zajedno sa proizvodnjom 1,3-diaminopropana i H_2O_2 (Cona et al., 2006). Spermin-oksidaza (SMO), FAD-zavisna aminoksidaza usmerava povratnu transformaciju spermina u spermatidin sa propratnom proizvodnjom 3-aminopropanola i H_2O_2 (Cervelli et al., 2003).



Slika 28. Shema kataboličkih puteva poliamina (Kusano et al., 2007)

Druga grupa enzima koja učestvuje u reakcijama katabolizma poliamina su diamin oksidaze (DAO, EC 1.4.3.6) koje kao kofaktor sadrže bakar i koje kao supstrat koriste diamine (Brazeau et al. 2004). DAO katalizuju i oksidaciju putrescina do 4-aminobutanala uz uporednu proizvodnju amonijaka i vodonik-peroksida, gde se nastali aldehid prevodi dalje do γ -aminobuterne kiseline preko Δ^1 -pirolina (Bagni i Tassoni, 2001). Kao što je pokazano sve poliamin-oksidaze proizvode H_2O_2 , što je važno za dalji kontekst.

Biljni poliamini, takođe, služe kao prekursori sekundarnih metabolita. Tako na primer, putrescin je prekursor nikotina i tropanskih alkaloida, koji su dominantno prisutni u porodici *Solanaceae*. U prvim

koracima biosinteze nikotina, putrescin se metiluje od strane N-metiltransferaze, potom deaminizuje oksidacijom do 4-metilaminobutanala, koji se spontano ciklizuje do N-metil-pirolinijumskog katjona (Kato et al., 2007).

2.11.3. Uloga poliamina u biljnom opstanku

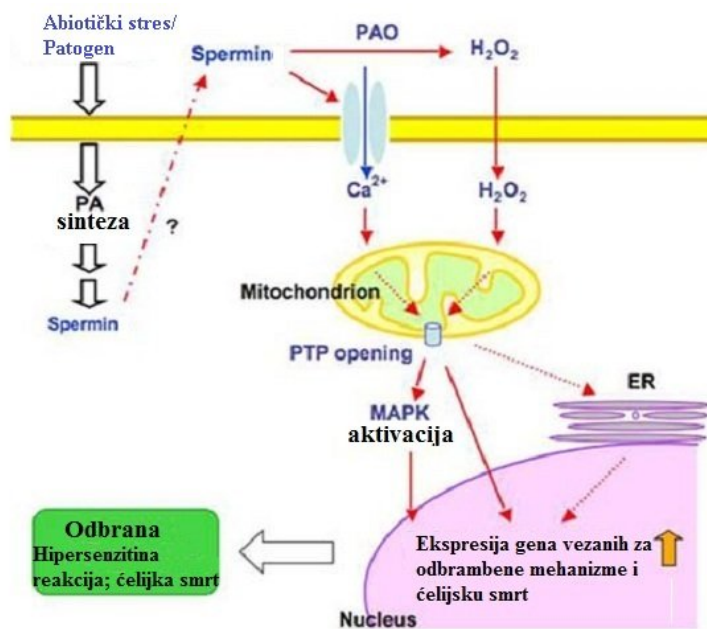
Poliamini se smatraju esencijalnim molekulima, jer inhibicija sinteze poliamina dovodi do inhibicije ćelijskog rasta i letalnosti (Thomas i Thomas, 2001; Hanfrey et al., 2001). Rezultati ukazuju da su putrescin i spermidin esencijalni za embiogenezu i dalji razvoj biljke, dok spermin nije esencijalan za rast i razvoj *Arabidopsis* (Imai et al., 2004). Poliamini imaju i zaštitnu ulogu protiv raznih vrsta stresa, uključujući oksidativni, osmotski, stres izazvan kiselinama, kao i kod napada patogena (Rhee et al., 2007). Biljni poliamini se često akumuliraju kao odgovor na biotički ili abiotički stres (Urano et al., 2003).

Veliki broj radova opisuje promenu nivoa poliamina pri fiziološkim poremećajima i ističe zaštitnu ulogu poliamina kod stresa izazvanog promenom uslova životne sredine (Alcázar et al., 2006; Groppa i Benavides, 2007; Liu et al., 2007). Primećeno je da egzogena primena poliamina štiti biljke od abiotičkog stresa (Chattopadhyay et al., 2002). Takođe, transgene biljake kojima je introdukovan gen SPDS iz *Curcubita ficifolia* koji izaziva povišenu biosintezu poliamina, pokazuju povećanu toleranciju na razne vrste abiotičkog stresa kod *Arabidopsis* i slatkog krompira. Slično je dokazano i kod biljaka pirinča koje su pokazale povećanu toleranciju na sušu, kao rezultat povećane ekspresije ADC gena introdukovanog iz *Datura stramonium* (Capell et al., 2004). Čak i kod drvenastih biljaka, povećanje sinteze poliamina putem primene transgenih tehnologija obezbeđuje toleranciju na razne vrste stresa (Wen et al., 2007). Mutant biljka *Arabidopsis ac15/spms*, koja nije sposobna da proizvodi spermin, je hipersenzitivna na stres zaslanjenosti i sušu u poređenju sa divljim tipom (Yamaguchi et al., 2006; 2007). Pri egzogenom dodatku poliamina, pre svega putrescina, ali i spermina, simptomi osetljivosti na stres nastali usled deficita poliamina se povlače. Poznato je da su promene u koncentraciji slobodnog Ca^{2+} u citoplazmi ćelija zatvaračica uključene u mehanizam zatvaranja stomatnog aparata (Rob et al., 2005). Uzimajući u obzir da odsustvo spermina rezultuje u odsustvu regulacije transporta jona Ca^{2+} , može se zaključiti da je spermin uzrok smanjene adaptacije na visoke koncentracije NaCl i stres izazvan sušom kod *Vicia Faba* (Kusano et al., 2007). Takođe, ovi rezultati ukazuju da poliamini, posebno spermin, inhibiraju stomatno otvaranje putem zatvaranja K^+ ulaznih kanala voltažno-zavisnim mehanizmom kod ćelija otvaračica biljke *Vicia faba* (Liu et al., 2000).

Da bi došlo do ometanja funkcionisanja mitohondrija, potrebno je da dođe do aktivacije influksa Ca^{2+} i produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (Takahashi et al., 2003) (Slika 31.). Uticaj mitohondrija u biotičkom stresu i programiranoj ćelijskoj smrti je objašnjen u detalje (Amirsadeghi et al., 2007).

Apoplastični spermin direktno utiče na katjonske kanale, a može biti katabolisan i od strane poliamin oksidaze. Ove kombinovane reakcije rezultuju u promenama prometa jona K^+/Ca^{2+} , te formiranju H_2O_2 , koji može da bude okidač reakcija sperminskog signalnog puta (Kusano et al., 2007). Poliaminski katabolizam kod biljaka je povezan sa ćelijskim opstankom i rastom kao i lignifikacijom i očvršćavanjem ćelijskog zida (Cona et al., 2006). Yoda i saradnici (2003, 2006) su pokazali da je ćelijska smrt u hipersenzitivnoj reakciji (HR), izazvana mozaičnim virusom duvana (TMV), delimično posredovana H_2O_2 proizvedenim u katabolizmu poliamina. Ovi autori su predložili da je spermidin supstrat za proizvodnju H_2O_2 , pošto se tokom HR javlja povišenje koncentracija spermidina, a ne spermina u apoplastu. Drugi autori tvrde da biljka koristi H_2O_2 proizveden u katabolizmu poliamina kao sredstvo za obranu od biotičkog stresa (Cona et al., 2006; Walters, 2003).

Tun i saradnici (2006) navode da su spermin i spermidin potencijalni uzročnici formiranja azot-(II)-oksida (NO) kod *Arabidopsis*, dok putrescin i njegov biosintetički prekursor arginin nisu. NO je sposoban da inhibira oksidativnu fosforilaciju u biljnim mitohondrijama i ima važnu signalnu ulogu u interakciji biljka-patogen, tako da su dalja istraživanja o ulozi poliamin posredovane proizvodnje NO vrlo opravdana (Yamasaki i Cohen, 2006).



Slika 29. Katabolizam spermina kao okidač signalnih puteva aktivacije HR (Kusano et al., 2007)

2.11.5. Uloga poliamina u a/biotičkom stresu

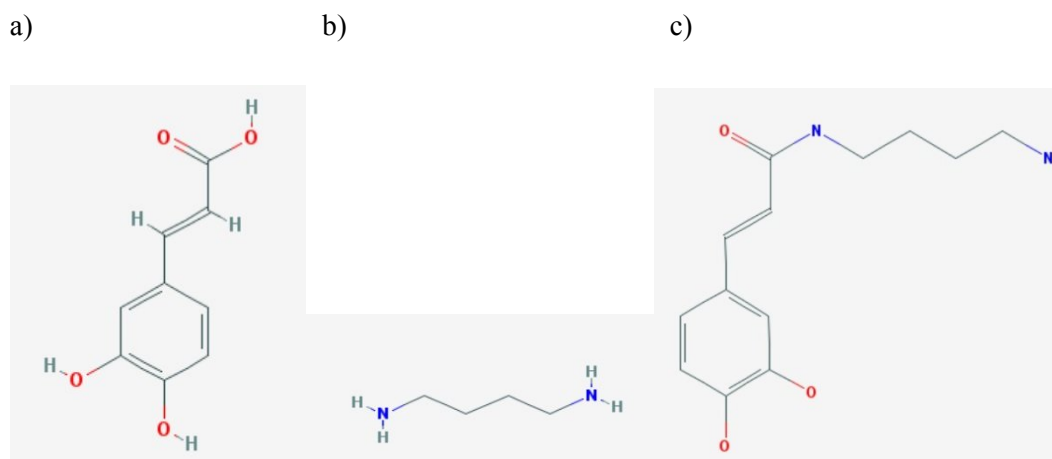
Iako poliamini (PAs), kao esencijalni molekuli za normalan rast i razvoj, imaju bitnu ulogu u regulaciji transkripcije i translacije (Kusano, 2007), njihova fiziološka važnost proističe najpre iz

uključenosti u razne vrste odgovora na abiotički i biotički stres. PAs imaju zaštitnu ulogu u sprečavanju lipidne peroksidacije i oštećenja membrana, i ulogu u gašenju akumuliranih ROS-a (Papadakis, 2005). Stoga je povećanje ćelijskih nivoa PA povezano sa osmotskim stresom, sušom i zaslanjenošću, a svakako i sa stresom izazvanim teškim metalima u toksičnim koncentracijama (Groppa, 2008). Geni koji kodiraju arginin dekarboksilazu (ADC) su identifikovani u mnogim biljnim vrstama, i njihova ekspresija je analizirana pod različitim uslovima stresa. Nije iznenađujuće stoga, da genetski modifikovana industrijska biljka sa povećanom ekspresijom gena koji su odgovorni za biosintezu PAs, pokazuje povećanu toleranciju na raznovrsne stresove iz životne sredine (Wen et al., 2007), uključujući i uticaj teških metala (Franchin, 2007). PAs biosinteza i akumulacija, kao odgovor na povećane koncentracije Zn^{2+} i Cu^{2+} , su istraživane u kulturi tkiva belih topola (*Populus alba L.*), komercijalnom klonu 'Villafranca' (Franchin, 2007). Sa povećanjem koncentracije Zn, u listovima i izbojcima topola došlo je do povećane ekspresije gena *PaADC* i *PaODC*, dok je povećanje koncentracije Cu dovelo do toksičnih efekata na listovima. Biljke duvana koje su bile izložene $CdCl_2$ pokazale su značajnu akumulaciju ukupnih, slobodnih i konjugovanih PAs. Postoje dokazi o pozitivnoj interakciji biljnih PAs sa ektomikorizom koji su dobijeni merenjem sadržaja slobodnih konjugovanih Put, Spd i Spm u biljnom tkivu tokom formiranja mikorize (Niemi, 2007). Do danas još uvek nije potpuno definisan profil poliamina u biljkama inokulisanim arbuskularnim mikoriznim gljivama (AM) pod uticajem teških metala. Postoji veliki broj radova koji prati indukovanu akumulaciju poliamina usled faktora stresa u raznim biljnim vrstama (Bouchereau et al., 1999), jer tokom oksidativne degradacije poliamina dolazi do akumulacije vodonik-peroksida, koji je ujedno jedan od najrasprostranjenijih ROS pri uslovima stresa. Tokom oksidativnog stresa uzrokovanog abiotičkim faktorom, dvostruka uloga PAs je primećena. Najuočljivija je odbrambena funkcija PAs, koja se manifestuje u njihovom "skevindžer efektu" prema oksiradikalima, aktivaciji ekspresije gena za antioksidantne enzime, i generaciji vodonik-peroksida kao signalnog molekula. Sa druge strane, PAs mogu da pokažu i prooksidativne efekte koji su rezultat intenzivne oksidativne PAs degradacije, nakon nekontrolisanog povećanja njihove unutarćelijske koncentracije usled stresa. Ostaje pitanje da li vodonik-peroksid koji nastaje u katabolizmu PAs, doprinosi štetnim efektima abiotičkog stresa u biljnoj ćeliji, ili je vodonik-peroksid uključen u procese adaptacije obavljajući njegove signalne i zaštitne uloge u biljci (Basu et al., 1998). PAs su do sada manje istraživani kao izvori vodonik-peroksida, a više kao efikasni antioksidanti, posebno Spm i Spd koji se smatraju vrlo efikasnim u "gašenju" oksiradikala (Ha et al., 1998). Uključenost PA u procese "gašenja" oksiradikala zasnovana je na kiseonik zavisnoj autoksidaciji i enzimskoj oksidaciji amino grupa katalizovanih od strane DAO i PAO, kao i sposobnosti PAs da se akumuliraju tokom uslova stresa. Ustanovljena je značajna veza između povećanih endogenih koncentracija PAs i sistemske biljne tolerancije na abiotički stresa kakav je onaj uzrokovan parakvatom

(metilviolagenom) (Ye et al., 1997). Povećana enzimaska aktivnost enzima biosinteze PAs je primećena kod biljaka koje pokazuju konstitutivnu toleranciju na stres u odbrani od oksidativnog stresa. Uloga PAs u stvaranju rezistencije na stres kod prirodno tolerantnih ekoloških grupa biljka, kao halofita, kserofita i hiperakumulatora teških metala, je vrlo atraktivna i nedovoljno razjašnjena tema.

2.11.6. Konjugovani poliamini-fenilamidi (PhA)

Konjugovani poliamini, amidi hidroksicimetnih kiselina ili tzv. fenilamidi (PhA), su niskomolekulski proizvodi koji su nastali konjugacijom hidroksicimetnih kiselina sa poliaminima ili aminima aromatičnih aminokiselina. Konjugovani poliamini su važni za kontrolu unutarćelijskih koncentracija poliamina (Bagni i Tassoni, 2001). Fenilamidi (PhA), kao konjugati hidroksicimetnih kiselina i amina, poseduju kombinovana hemijska svojstva obeju komponenata što im obezbeđuje veliki opseg biohemijskog i metaboličkog delovanja. U biljkama, najrasprostranjenije hidroksicimetne kiseline koje ulaze u sastav fenilamida (PhA) su kafena, ferulna i p-kumarna kiselina, dok su od poliamina dominantni alifatični Put, Spd i Spm, ili od arilmonoamina tiramin i triptamin (Martin-Tanguy, 1985).



Slika 30. Hemijske strukture prekursora fenilamida (c), kafena kiselina (a) i spermidin (b)

Ključni korak u biosintezi PhA je aktivacija karboksilne grupe hidroksicimetnih kiselina putem esterifikacije sa CoA, katalizovana dejstvom 4-kumarat-CoA ligaze. Krajnji korak u biosintezi je kondenzacija hidroksicimetnog-CoA tioestra sa poliaminima ili arilaminima, katalizovana putem odgovarajućih transferaza specifičnih za aminski supstrat. Pretpostavlja se da se na sličan način ovi fenilamidi vezuju za komponente ćelijskog zida, gde predstavljaju pogodan supstrat za tamo smeštene peroksidaze.

Alifatični konjugovani poliamini, koji nose dve protonovane amino grupe, pri fiziološkom pH su pozitivno naelektrisani, što je glavna osobina na kojoj se zasniva njihova biološka aktivnost. Martin-Tanguy (2001) tvrde da stvaranje konjugata poliamina sa hidroksicimetnim kiselinama reguliše unutarćelijski "pool" poliamina, te da služe za transport PAs jer im se konjugacijom povećava lipofilnost, te predstavljaju pogodan supstrat za aminooksidaze ili peroksidaze. Neki autori (White i Broadley, 2003) tvrde da konjugacija sa alifatičnim PAs može da ublaži visoku citotoksičnost slobodne hidroksicimetne kiseline. Konjugacija može da ublaži i kompeticiju između poliamina i Ca^{2+} za mesta na membranama, što ometa druge funkcije poliamina, poput regulacije K^+ kanala i stomatalnih pokreta.

Poliamini konjugovani sa fenilpropanoidnim kiselinama imaju značajnu ulogu u biljnoj adaptaciji na uslove stresa, zahvaljujući njihovoj visokoj antioksidantnoj aktivnosti. Antioksidantna svojstva konjugovanih PAs su prvi put uočena od strane Bors i saradnici (1989), koji su pokazali da poliamini konjugovani sa kafenom, cimetnom i ferulnom kiselinom poseduju visoke konstante vezivanja za reaktivne kiseonične vrste. Kuznetsov i saradnici (2006) su izneli zaključak da su slobodni poliamini manje efikasni "hvatači" slobodnih radikala nego njihovi konjugovani oblici. Sposobnost PhA da vrše neutralizaciju hidroksil, superoksid i hidroperoksid radikala je odavno demonstrirana kako *in vitro* (Bors et al., 1989), tako i *in vivo*. Dokazano je da je antiradikalska aktivnost PhA viša i u poređenju sa samom hidroksicimetnom kiselinom, te obrazloženo da se antiradikalska sposobnost hidroksicimetne kiseline povećava prilikom vezivanja za PAs. Takođe, formiranjem kompleksa fosfolipida i Fe^{3+} , PAs smanjuju Fe^{3+} -katalizovanu oksidaciju Fe^{2+} , čime smanjuju oksidativna oštećenja izazvana Fe^{2+} jonima, koji su inicijatori lančane reakcije lipidne peroksidacije (Tadolini, 1989).

Povećano nastajanje konjugata Put i Spd sa kafenom i ferulnom kiselinom je detektovano u stresu izazvanom viškom vode u slučaju plavljenja biljke (Edreva et al., 2007). Takođe, povećana ekspresija rastvornih konjugovanih formi PAs je zabeležena i kod mikropropagiranih biljaka topole, izloženih povišenim koncentracijama Zn i/ili Cu (Franchin et al., 2007; Castiglione et al. 2009). Fenolamidi su često opisani i kao bioaktivna jedinjenja sa antiviralnim, antibakterijskim, antifungalnim, insekticidnim i deterdžentskim terapeutskim aktivnostima (Bassard et al., 2010).

Fenilamide (PhA) možemo klasifikovati u dve grupe:

- a) Osnovni, monosupstituisani alifatični PAs, koje karakteriše prisustvo jedne protonovane slobodne amino grupe, kao što je to kod feruloil-putrescina;
- b) Neutralni, disupstituisani alifatični PAs, poput diferuloilputrescina, koji pripada ovoj grupi i nema slobodne amino grupe. Derivati arilmonoamina, poput p-kumaroiltriptamina i feruloiltiramina u kojima je jedina amino grupa supstituisana, se takođe ponašaju kao neutralna jedinjenja.

Osnovni fenilamidi, zbog svog pozitivnog naelektrisanja, se ponašaju kao organski katjoni koji formiraju jonske veze sa negativno naelektrisanim ostacima nukleinskih kiselina, proteina, ćelijskih membrana i zidova, kao što i to čine i slobodni poliamini (Martin-Tanguy, 1997). Ove jonske interakcije sa fosfatnim grupama nukleinskih kiselina i karboksilnim grupama proteina, te polipeptidima u fazama njihove posttranslacione modifikacije su važne, ne samo zbog zaštite od degradacije, nego i zbog obezbeđivanja najstabilnije konformacije ovim biomolekulima tokom izlaganja uslovima stresa. Prisustvo jedne slobodne amino grupe u osnovnim fenilamidima doprinosi njihovom polarnom karakteru i rastvorljivosti ovih konjugata u vodi. Supstitucija ove grupe sa hidroksicimnom kiselinom kod neutralnih PhA smanjuje polarnost i povećava lipofilna svojstva ovih jedinjenja. Osobine fenola u fenilamidima obezbeđuju interakciju ovih jedinjenja sa jedinjenjima koja poseduju hidroksilne grupe i mono- i polihidroksialifatičnim jedinjenjima (alkoholi i ugljeni hidrati), kao i polimerima poput lignina i suberina, koji sadrže ostatke aromatičnih alkohola. Sposobnost i osnovnih i neutralnih PhA da se vežu za polisaharide, lignin i suberin, može doprineti izgradnji kompleksno ispreplitanе mreže različitih polimera ćelijskog zida (Passardi i Penel, 2004). Ovi događaji dovode do povećanja rigidnosti ćelijskog zida, što smanjuje njegovu rastegljivost i ometa ćelijsku elongaciju, a ujedno i povećavaju otpornost ćelijskog zida na fizička, hemijska i enzimska oštećenja. Stoga, PhA su uključeni u molekulskom mehanizmu regulacije biljnog rasta i odgovora na stres. Povećana akumulacija slobodnih i konjugovanih formi PAs, pre svega kafeoilputrescina i feruloilputrescina, primećena je pri izlaganju abiotičkom stresu povišene temperature kod biljke pasulja (Edreva et al., 2007), ali i u kulturi tkiva duvana, u uslovima gde u podlozi nedostaje sumpor. Takođe, postoji značajan odgovor u povećanoj akumulaciji fenilamida i pri biotičkom stresu izazvanom mozaičnim virusom (TMV) kod duvana, gde se pretpostavlja da PhA imaju bitnu ulogu u interakciji biljka-patogen (Martin-Tanguy et al., 2001).

3. CILJ ISTRAŽIVANJA I RADNE HIPOTEZE

Cilj ovog istraživanja je bio da se ispita uticaj različitih koncentracija nitratnih soli pojedinačnih teških metala (Cd, Cu i Ni) na fiziološke i biohemijske osobine tri klona topole (M1, Pe 19/66 i B229) u zemljišnom medijumu pri polukontrolisanim uslovima. Osim navedenog, rad ima za cilj da uporedi sposobnosti klonova topola da vrše fitoekstrakciju metala iz zemljišta, ali i njihove biološke odgovore na uticaj različitih koncentracija teških metala. Očekuje se da će dobijeni rezultati omogućiti odabiranje klonova topole koji su dobro adaptirani na oksidativni stres izazvan delovanjem jona Cu^{2+} , Cd^{2+} i Ni^{2+} . Da bi se ovi ciljevi postigli, sprovedena su sledeća istraživanja:

- ❖ Praćenje efikasnosti klonova topola da vrše proces fitoekstrakcije teških metala iz zemljišta; akumulacija i distribucija teških metala kroz biljne organe;
- ❖ Praćenje uticaja metala na mineralnu ishranu, distribuciju i metabolizam esencijalnih makroelemenata (Mg, Ca, P, N i C);
- ❖ Praćenje uticaja metala na parametre fotosinteze merenjem razmene gasova na površini listova (ukupna fotosinteza, brzina transpiracije, stomalna provodljivost i efikasnost iskorišćenja vode) kod tretiranih i kontrolnih biljaka klonova topole;
- ❖ Određivanje sposobnosti ekstrakata topola da vrše neutralizaciju reaktivnih kiseoničnih, azotovih i sintetičkih radikalskih vrsta; određivanje intenziteta lipidne peroksidacije i ukupnog antioksidantnog kapaciteta listova i korena biljaka tretiranih teškim metalima i kontrolnih biljaka;
- ❖ Određivanje aktivnosti antioksidantnih enzima poput gvajakol-peroksidaze (GPx) i superoksid-dizmutaze (SOD) i enzima uključenih u metabolizam glutationa kao što su glutation-reduktaza (GR) i glutation-peroksidaza (GSH-Px) pod uticajem različitih koncentracija teških metala u korenovima i listovima ispitivanih klonova topola;
- ❖ Određivanje količine neenzimskih antioksidanata (nastalih u metabolizmu fenolnih jedinjenja i metabolizmu glutationa) i određivanje sadržaja pigmenata hloroplasta u listovima biljaka tretiranih teškim metalima i kontrolnih biljaka;
- ❖ Izolacija i kvantifikacija biljnih hormona (indol-3-sirćetne kiseline-IAA i abscisinske kiseline-ABA) upotrebom GC/MS analize iz korena i lista *Populus deltoides* (klona Pe 19/66) i komparativna analiza rezultata u zavisnosti od vrste i koncentracije tretmana različitim jonima teških metala (Ni^{2+} , Cu^{2+} i Cd^{2+}). Poređenje sadržaja fitohormona (IAA

i ABA) u organima klonova topola (M1, B229 i Pe19/66) koji su bili izloženi delovanju različitih koncentracija bakra;

- ❖ Izolacija i kvantifikacija slobodnih i konjugovanih poliamina (putrescina (Put), spermidina (Spd) i spermina (Spm)) upotrebom HPLC analize iz korena i lista *Populus deltoides* (klona Pe 19/66) i komparativna analiza rezultata u zavisnosti od vrste i koncentracije tretmana jonima teških metala (Ni^{2+} , Cu^{2+} i Cd^{2+}). Poređenje sadržaja slobodnih i konjugovanih poliamina u organima klonova topole (M1, B229 i Pe19/66) koji su bili izloženi delovanju različitih koncentracija bakra;
- ❖ Praćenje promena morfoloških karakteristika biljaka topola (visina biljaka, biomasa nadzemnih i podzemnih delova biljke, dijometri stabla) pod uticajem različitih koncentracija teških metala;
- ❖ Praćenje uticaja različitih koncentracija teških metala na brojnost mikroorganizama, oligotrofnih bakterija, filametoznih gljiva i algi u zemljišnom medijumu;

Navedena istraživanja bi trebalo da potvrde tačnost sledećih hipoteza:

Hipoteza 1. Klonovi topola pokazuju različitu sposobnost akumulacije i translokacije metala u nadzemne delove biljke.

Hipoteza 2. Postoje razlike u fiziološkom i biohemijском odgovoru različitih klonova topola u zavisnosti od vrste i koncentracije teškog metala, kao i organa u kom se promene posmatraju.

Hipoteza 3. U ispitivanim klonovima topola pod uticajem povišenih koncentracija teških metala dolazi do abiotičkog i oksidativnog stresa, koji se manifestuje u smanjenoj sposobnosti neutralizacije reaktivnih kiseoničnih i azotovih vrsta, povećanoj lipidnoj peroksidaciji, promeni aktivnosti enzima antioksidantne zaštite i sadržaja metabolita sa antioksidantnom ulogom.

Hipoteza 4. Teški metali utiču na mineralnu ishranu topola, kao i na proces fotosinteze, izazivajući promene u koncentraciji pigmenata hloroplasta i parametrima fotosinteze.

Hipoteza 5. Klonovi topola pokazuju razlike u sadržaju biljnih hormona (indol-3-sirćetne kiseline-IAA i abscisinske kiseline-ABA).

Hipoteza 6 U listovima i korenovima tretiranih klonova topola pod uticajem povišenih koncentracija teških metala u zemljištu dolazi do promena u sadržaju konjugovanih i slobodnih poliamina u odnosu na kontrolne biljke.

Hipoteza 7. Teški metali uzrokuju promenu broja mikroorganizama u zemljištu.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Biljni materijal

Uzorci biljnog materijala u sklopu ovog rada pripadaju dvema vrstama topola i to: *Populus x euramericana* i *Populus deltoides*.

4.1.1. Vrste *Populus x euramericana* (Dode Guinier)

Euroameričke hibridne topole (*Populus euroamericana* (Dode) Guinier) su dvodome, anemofilne, heliofilne i higrofilne, brzorastuće vrste. Nastale su spontanom ili veštačkim ukrštanjem evropskih i američkih crnih topola, te se zbog poboljšanih tehničkih osobina u odnosu na roditelje uzgajaju širom Evrope. Razmnožavaju se ožiljavanjem reznica. Poznat je veliki broj sorti i klonova euroameričkih topola od kojih su najpoznatije kod nas: serotina, robusta, regenerata, marilandica, I-214, I-154 itd. Ova vrsta topola je lako prilagodljiva velikom dijapazonu ekoloških uslova. Može se naći gotovo u svim delovima sveta: Severnoj Americi, Aziji, Evropi, pa čak i na Sibiru. Njena staništa su aluvijalna, peskovita zemljišta ravničarskih i nižih brdskih područja do oko 300 m nadmorske visine.

4.1.2. Vrste *Populus deltoides* (Marshall)

Vrsta *Populus deltoides* (Marshall) je glavna američka crna topola, koja zauzima vrlo prostran areal u istočnim područjima Severne Amerike. Postoji oko 14 različitih varijeteta koji su prema njihovim arealima, podeljeni u 3 skupine: severni, središnji i južni varijeteti. U svom autohtonom staništu rastu u čistim i mešovitim sastojinama, na plavnim, peskovitim terenima, pored reka Misuri, Misisipi i njihovih pritoka. Postižu visinu do 30 m, sa prečnikom i preko 2 m. Već u 17. veku ove topole su prenošene u Evropu, i to uglavnom severni i južni varijeteti. Njenim unošenjem u Evropu došlo je do ukrštanja sa evropskim crnim topolama i stvaranja novih hibrida sa veoma dobrim osobinama koji su kod nas poznati kao kanadske topole. Ovo je naročito bio slučaj u Italiji i Francuskoj-te je u ovim zemljama bilo moguće izdvojiti izvesne značajne klonove. Američke crne topole se kod nas gaje pretežno u drvoredima i parkovima, a nastoji se da se isprobaju i u šumskim kulturama (Jovanović, 1967).

4.1.3. Izabrani klonovi u eksperimentu

Izbor klonova topole je izvršen po principu taksonomske i genetičke divergentnosti, stoga je izbor sveden na sledeća tri klona, iz ove dve vrste:

Klon M1, *Populus x euramericana* - je klon poreklom iz Mađarske. Nastao je ukrštanjem *P. deltoides* i *P. nigra*. U zbirku klonova Instituta za nizijsko šumarstvo i životnu sredinu iz Novog Sada, dospao je iz

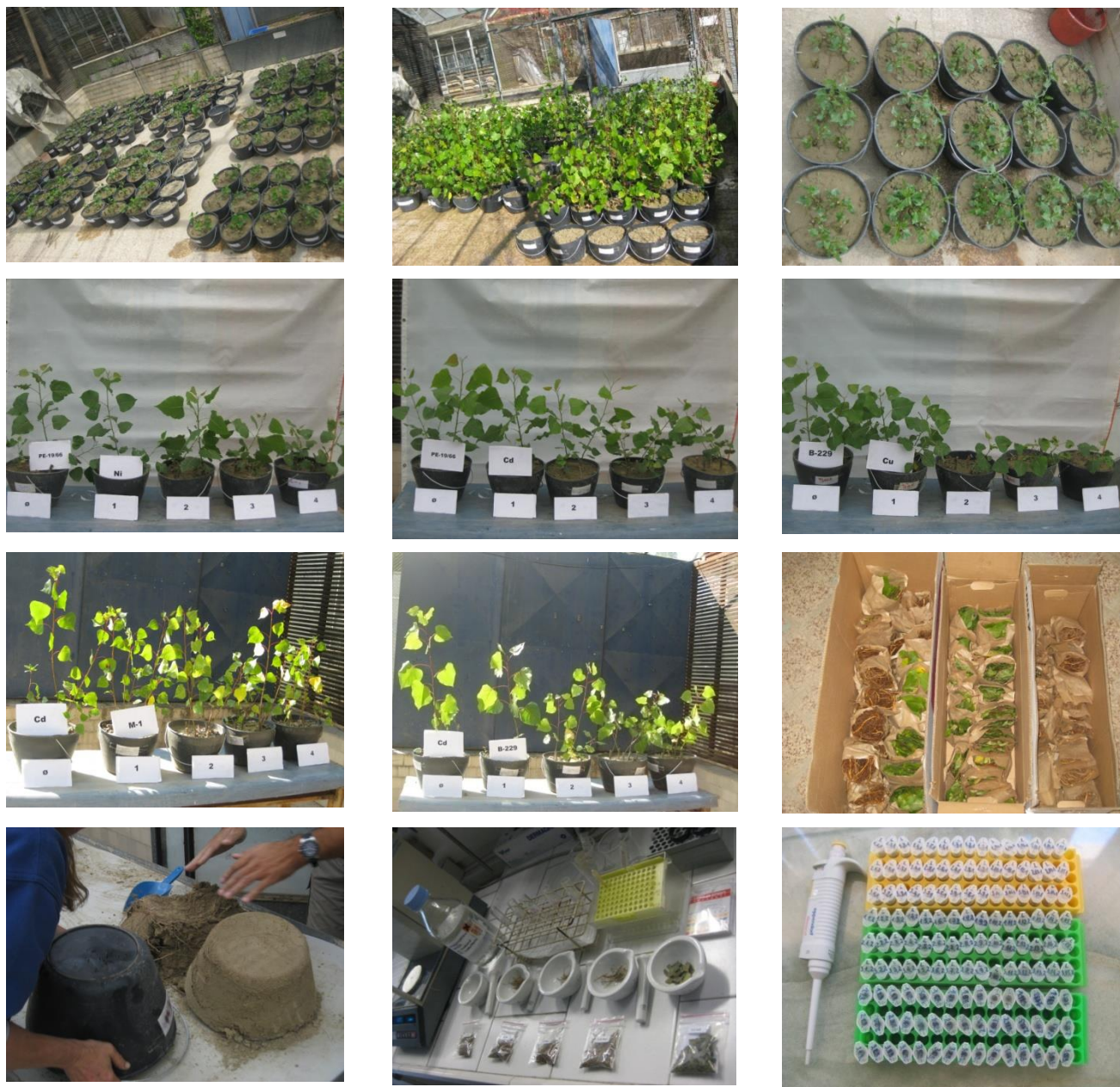
međunarodne razmene 1977. godine. Odlikuje se crvenkastom bojom kore, izbojaka, sadnica i mladih stabala kao i specifičnim habitusom sa tankim granama i kožastim lišćem sjajno zelene boje. Karakteriše ga visok procenat prijema sadnog materijala, odlična sposobnost ožiljavanja reznica i slaba osetljivost na rak kore topola (*Dothichiza populea*). Od 1998. je odobrena njegoa upotreba u R. Srbiji.

Klon B229 i klon PE 19/66, *Populus deltoides* su klonovi nastali selekcijom u Institutu za nizijsko šumarstvo i životnu sredinu, i još uvek su u fazi ispitivanja u cilju potpunog priznavanja kao nove sorte. Klon Pe 19/66 pripada italijanskoj klonskoj selekciji američke crne topole i u zbirku Instituta za nizijsko šumarstvo i životnu sredinu uvršten je u proleće 1986. godine, i njegoa svojstva su uporedo testirana i na italijanskom institutu iz Casale Monserato po jedinstvenoj metodologiji. Karakterišu ih bujan porast, visok prinos drvene mase, dobra sposobnost ožiljavanja i srednja otpornost na patogene (Pilipović, 2005).

4.2. Ogled u polukontrolisanim uslovima

Ogled u polukontrolisanim uslovima je dizajniran tako da omogući praćenje biološkog odgovora tri klona topola (M1, B229 i Pe 19/66) na dejstvo tri različita teška metala u različitim koncentracijama u zemljišnom supstratu. Ogled je postavljen u saksijama staklenika Departmana za biologiju i ekologiju. Ogled je dizajniran tako što su reznice tri klona topola (dužine oko 15 cm, prečnika 1 cm) izložene tretmanu sa različitim koncentracijama bakra, nikla i kadmijuma, pojedinačno. Koncentracije kojima su topole tretirane određivane su prema maksimalnim dozvoljenim koncentracijama (MDK) za date teške metale koje su propisane Pravilnikom o dozvoljenim količinama opasnih i štetnih materija u zemljištu i metodama njihovog ispitivanja, koji je objavljen u Službenom glasniku Republike Srbije br. 23 iz 1994. godine i Pravilniku o metodama organske biljne proizvodnje i sakupljanju šumskih plodova i lekovitog bilja kao proizvoda organske poljoprivrede, (Sl. Glasnik RS, 23/1994; Sl. List SRJ, 51/2002), Službeni list SRJ broj 51. iz 2002. godine, po kojem su date granične vrednosti za sadržaj pojedinih teških metala u zemljištu. Vrednosti za ispitivane metale iznose MDK (Cu)=100 mg/kg, MDK (Cd)=3 mg/kg, MDK (Ni)=50 mg/kg. Zemljište je kontaminirano koncentracijama koje odgovaraju MDK i 3*MDK za određeni metal, što je definisalo sledeće tretmane: 3 i 9 mg/kg za Cd; 100 i 300 mg/kg za Cu; i 50 i 150 mg/kg za Ni) (tabela 4a). Svaki tretman je postavljen u tri ponavljanja. Zemljište je tretirano u februaru 2010. i ostavljeno 3 meseca pre pobadanja reznica topola da odstoji kako bi se metali stabilizovali mikroflorom. Metali su dodavani u obliku nitratnih soli, $M^{2+}(NO_3)_2$, a prethodno su preračunate koncentracije rastvora soli koje je bilo potrebno dodati količini zemljišta od 100 kg zemljišta, kako bi u svakom od tretmana bile postignuti željene koncentracije teških metala. Rastvori soli raspršivani su prskalicama po zemljištu koje je dalje homogenizovano mešanjem i usuto u saksije od po 10 kg. U svaku saksiju pobodeno je po četiri reznice odgovarajućih klonova topola, tako da je jednim tretmanom (jednom koncentracijom jednog

metala) bilo kontaminirano po 12 biljaka od svakog klona topola. Postavljeni su i kontrolni uzorci svih testiranih klonova topola gajenih na nekontaminiranom zemljištu. Ogled je održavan i redovno zalivan u trajanju od maja do oktobra i uzorci lišća i korenova su uzeti u oktobru po skidanju ogleđa (Trudić et al., 2012).

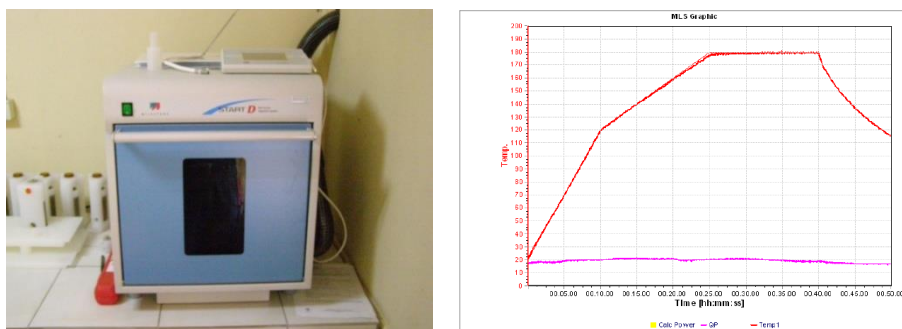


Slika 31. Izgled ogleđa u polukontrolisanim uslovima u raznim fazama razvića topola i uzorkovanje

4.3. Priprema matičnih rastvora mikrotalasnom digestijom (Wu et al., 1997; Wang et al., 2004)

Tačnost kvantitativne multielementarne spektroskopske analize (AAS, AES, ICP ili ICP/MS) zavisi direktno od načina pripreme uzoraka, odnosno od uspešnosti digestije čvrstih uzoraka. Digestija predstavlja mineralizaciju čvrstog matriksa, gde dolazi do degradacije i oksidacije organskih supstanci matriksa, kako bi se postiglo stvaranje homogene tečne faze. Brza i tačna priprema uzoraka uvek je predstavljala analitički izazov i bila je tzv. usko grlo analize, gde su dodatni izazov predstavljali uzorci sa ultra niskim koncentracijama metala i koncentracijama u tragovima, uzorci sa visokim sadržajem organskih materijala i uzorci vrlo male mase. Konvencionalne, već prevaziđene metode digestije su bile zasnovane na destrukciji organskih supstanci pri izlaganju visokim temperaturama u gravimetrijskim pećima (tzv. suvi put-žarenje) ili pri izlaganju jakim kiselinama sa ili bez dodatka oksidacionog sredstva (tzv. mokra digestija). Uvođenje mokrog puta digestije u zatvorenim sudovima pod pritiskom je dovelo do smanjenja gubitka isparljivih analita i smanjenja kontaminacije.

Digestija potpomognuta mikrotalasima (eng. microwave assisted digestion) ima prednost kod određivanja Hg, As i Cd, jer sprečava gubitak volatilnih jedinjenja koje ovi metali daju sa hlorom (MCl_4), smanjuje potrošnju kiseline, vreme digestije kao i kontaminaciju uzoraka iz okoline, ali i uzajamnu kontaminaciju od drugih uzoraka koji se simultano procesuiraju. Najvažnija prednost digestije potpomognute mikrotalasima je što omogućavaju razvijanje temperature digestije daleko veće nego što su tačke ključanja datih kiselina što dodatno ubrzava digestiju. Ove metode su reproduktivne i dostupne u velikom broju naučnih radova, te su stoga i sertifikovane. Magnetron proizvođača Milestone D series omogućava proizvodnju mikrotalasa energije do 1200 W, koja može biti dobro kontrolisana mikroprocesorom.



Slika 32. Instrument za digestiju potpomognutu mikrotalasima (levo) i temperaturni program analize

Koristeći smešu HNO_3 i H_2O_2 većina bioloških uzoraka se u potpunosti digeruje, osim ako ne sadrže visoke količine silikata. Međutim, mikrotalasna digestija uz HNO_3 i H_2O_2 ne obezbeđuje uvek potpuni prinos elemenata kao što su Fe, Al i Se, te je upotreba sertifikovanih referentnih materijala sa sličnim matriksom obavezna za svaki postupak digestije.

Postupak:

Matični rastvori za AAS su pripremljeni tako što se u kivete odmerilo po 0.3 g sprasenog i osušenog biljnog materijala, odnosno po 1 g vazdušno-suvog zemljišta, te je trbušastom pipetom dodato po 10 ml cHNO_3 i 2 ml cH_2O_2 . Kivete su zatvarane odgovarajućim poklopcem, stavljane u omotače, te zaptivane prstenom i zaključavane imbus torzionim zavrtnjem momenta sile 10 Nm, kako bi se u svakoj kiveti uspostavio isti pritisak. Kivete zaštićene segmentima su postavljane u rotor unutar peći za mikrotalasnu digestiju koja je podešena na temperaturni program prikazan u tabeli ispod. Rotor, segmenti i sami sudovi kao i poklopci za uzorke unutar mikrotalasne pećnice su napravljeni od PTFE (politetrafluoroetilen, TEFLON™).

t [min]	T [$^{\circ}\text{C}$]	E [W]
10	180	900
10	180	900
15	Ventilation	

Referentna temperaturna sonda je postavljena u najreaktivniji uzorak. Svi uzorci su bili iste vrste i zapremine, kako bi protok mikrotalasa bio ravnomeran kroz sve sudove. Primenjena energije mikrotalasa se može modifikovati u zavisnosti od broja uzoraka koji se istovremeno digeruju. Digerovani materijal iz ohlađenih kiveta je kvantitativno prenesen i profiltriran kroz plavu hartiju u normalni sud od 50 ml i dopunjen destilovanom vodom do crte.

4.4. Atomska apsorpciona spektrofotometrijska (AAS) analiza

Sadržaj metala u različitim organima klonova topola određen je na atomskom apsorpcionom spektrofotometru proizvođača Varian, konfiguracije FSAAS240/GTA120/VGA77. Svi metali su određeni plamenom tehnikom u režimu apsorpcije, u modu integracije, u 3 ponavljanja sa vremenom čitanja od 10s po ponavljanju, i vremenu odlaganja čitanja (eng. read delay time) od 10s sa brzinom aspiriranja uzorka u raspršivač (eng. nebulizer) između 5-10 ml/min. Metali Ni, Cu, Cd i Mg su atomizirani u oksidujućem svetlo-plavom plamenu smeše komprimovanog vazduha (13,5 l/min) i acetilena (2 l/min) kao goriva, dok je sadržaj Ca određen u plamenu nastalom gorenjem smeše acetilena i azot-suboksida (N_2O_2). Ostali analitički uslovi za pojedine metale su prikazani u tabeli 3.

Tabela 3. Analitički uslovi za ispitivane metale

Metal	Cu	Cd	Ni	Mg	Ca
Tip plamen(ik)a	Acetilen/ vazduh	Acetilen/ vazduh	Acetilen/ vazduh	Acetilen/ vazduh	Acetilen/N ₂ O ₂
Talasna dužina (nm)	324,8	228,8	232,0	285,2	422,7
Otvor mohromatora (slit) (nm)	0,5	0,5	0,2	0,5	0,5
Struja lampe (mA)	4	4	4	10	10
Napon lampe (EHT)(V)	255	283	389	205	225
Odziv (gain) (%)	35	57	55	23	25

Za izračunavanje rezultata je korišćena formula:

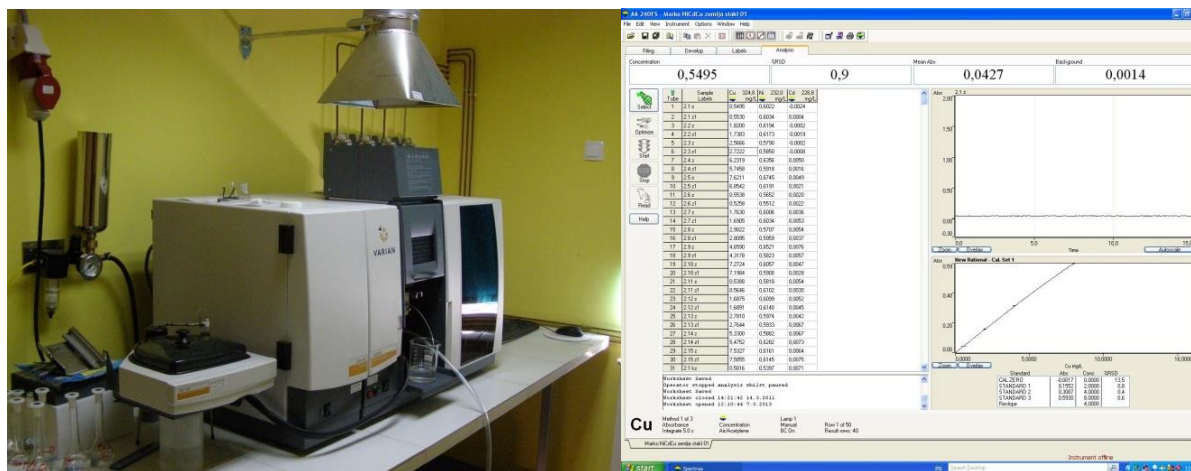
$$C_m = \frac{C_u - C_{sp}}{100} \cdot \frac{1000}{m_u}$$

Gde su: C_m koncentracija metala u uzorku (mg/kg)

C_u očitana koncentracija metala u uzorku (mg/l)

C_{sp} očitana koncentracija metala u slepoj probi (mg/l)

m_u odvaga uzorka (g)



Slika 33. Atomski apsorpcioni spektrofotometar i kalibraciona kriva

4.5. Određivanje sadržaja indol-3 sirćetne kiseline (IAA) i abscisinske kiseline (ABA) metodom gasne hromatografije kuplovane sa masenom spektrometrijom (GC/MS) (Rapparini et al., 2002)

Poslednjih godina, znatan napor je uložen u razvoj metoda za prečišćavanje i kvantitativno određivanje sadržaja biljnih hormona u ekstraktima biljnog tkiva (Chen et al., 1988.; Cohen et al., 1986; 1987; Dunlap i Guinn 1989.; Funada et al., 1987.; Vine et al., 1987; Rapparini et al., 2002). Male količine prisutnih hormona, njihova nestabilnost, kao i komplikovan proces prečišćavanja od smetajućih jedinjenja, predstavljaju najveću prepreku u stvaranju pouzdane metode određivanja.

U većini slučajeva, biljno tkivo za istraživanje sadržaja hormona je najčešće vrlo bogato pigmentima, a količina hormona je vrlo niska u poređenju sa jedinjenjima sličnih hemijskih osobina koja se jednako ponašaju pri procesima prečišćavanja. U velikom broju radova se za proces prečišćavanja koristi preparativna tečna hromatografija visokih performansi (HPLC) (Xianyue et al., 1992). Dok neki radovi koriste zasebne metode prečišćavanja ova dva hormona (Gocal et al, 1991), u ovom radu odabran je metod za simultano određivanje oba hormona putem prečišćavanja u dva stupnja upotrebom različitih kertridža za ekstrakciju na čvrstoj fazi (eng. solid phase extraction-SPE).

4.5.1. Ekstrakcija fitohormona

Biljni materijal je odmah nakon uzorkovanja potapan u tečni azot i skladišten na -70° C u zamrzivač sa dubokim zamrzavanjem. Zamrznuti uzorci su liofilizovani na -80° C, kako bi se otklonio višak vlage. Na dan ekstrakcije oko 100 mg liofilizovanog biljnog materijala je dodavano u avan za homogenizaciju koji je sadržao oko 50 ml tečnog azota, da bi se tučkom, nadalje uzorak homegenizovao sa 10 ml ekstrakcionog pufera (35% imidazol pufera 0.02 M pH-7 i 65% izopropanola). Izopropanol je izabran kao ekstrakciono sredstvo, jer poput ostalih polarnih organskih rastvarača npr. metanola, obezbeđuje dobru ekstrakciju hormona, a istovremeno vrši inhibiciju enzima sprečavajući pritom stvaranje estara konjugovanih oblika IAA.

Ekstraktima je dodato po 100 μ l internog standarda koji sadrži 100 ng izotopski obeleženog $^{13}\text{C}_6$ -IAA rastvorenog u izopropanolu, i 100 μ l rastvora internog standarda koji sadrži 100 ng deuterisanog $^2\text{H}_4$ -ABA. Ekstrakti su inkubirani 24h u mraku na $+4^{\circ}$ C, da bi se sledeći dan nakon centrifugiranja od 10 minuta na 10000 rpm pažljivo odvojio supernatant, dok se talog dodatno tri put ispirao istim ekstrakcionim sredstvom.

4.5.2. Prečišćavanje uzoraka upotrebom ekstrakcije na čvrstoj fazi (SPE) (Chen et al., 1988)

Prečišćavanje je izvedeno na principu jonoizmenjivačke hromatografije koristeći SAX Vac QMA analitičke SPE kolonice od 3ml sa 500 mg amino adsorbensa/stacionarne faze. Ove kolone su zapravo slab anjonski izmenjivač sa tercijarnim amino grupama vezanim za silica fazu. S obzirom na $pK_a=9.8$, ovih tercijarnih amino grupa, pri pH nižem od 9.8, one bivaju pozitivno naelektrisane, te stoga privlače negativno naelektrisane analite poput slabih organskih kiselina, kakve su IAA^- i ABA^- . IAA je pri $pH > 4.5$ prisutan u disosovanom negativno naelektrisanom anjonskom obliku. Da bi se zadovoljila oba uslova, kolona zadržala u pozitivnom anjon izmenjivačkom obliku, a analiti zadržali negativno naelektrisani, SPE kolona se kondicionira sa MeOH (7-8 ml), vodom i imidazolnim puferom od $pH=7$. Uzorci se nanese na kondicionirane SPE kolonice Pasterovom pipetom, a kolone ispiraju nepolarnim rastvaračima sa rastućim gradijentom polarnosti (3 ml heksana, 3 ml etilacetata, pa 3 ml acetona), kako bi se sprale neželjene komponente, kao što su nepolarni pigmenti i manje polarni šećeri, polifenoli i njihovi glikozidi. Nakon prečišćavanja, zadržani analiti IAA i ABA na amino silica SPE jonoizmenjivačkim kolonama, eluirani su sa 10% rastvorom sirćetne kiseline u metanolu, i sakupljeni u balon prethodno napunjen sa 5-6 ml fosfatnog pufera 0.02 M, $pH=2.5$. Pri tom pH, analiti IAA i ABA se prevedeni u protonizovan, nenaelektrisan oblik. Koristeći vakuum rotacioni uparivač, uzorci su uparavani do vodene, fosfatno-puferske faze, kako bi uklonili metanol i izopropanol.



Slika 34. Manifold za SPE kertridže sa rastvaračima za eluiranje analita

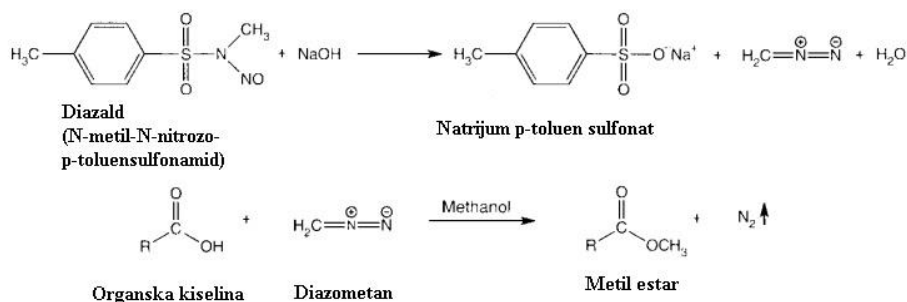
Dalje prečišćavanje je rađeno na C_{18} SPE kolonama (Varian bond elute C_{18} 500 mg/2.8 ml) koje su prethodno kondicionirane nizom polarnih rastvarača, 20% acetonom u izopropanolu, vodom i fosfatnim puferom 0.02 M, $pH=2.5$. Ovaj korak predstavlja postupak hromatografije na obrnutoj fazi, gde stacionarnu fazu predstavljaju nepolarne oktadecilske grupe vezane za silica gel, te se nepolarne jedinjenja sa aromatičnim prstenovima i alkil ostacima, kakvi su IAA i ABA pri $pH 2,5$ u svojoj nenaelektrisanom formi, vezuju hidrofobnim vezama. Polarna jedinjenja poput šećera i organskih soli su

uklonjena ispiranjem slabo polarnim rastvaračima (5-6 ml 10% acetone i 3 ml 90% heksana sa 10% hloroforma). Posle toga, analiti su spirani sa kolone koristeći 5-6 ml 100% acetonitrila. Uzorci su dalje upareni na vakuum uparivaču do suva, a suvi ostatak resuspendovan u 200 μ L metanola.

4.5.3. Priprema diazometana i derivatizacija analita (Barkawi i Cohen, 2010)

Resuspendovanom metanolnom ekstraktu je dodat sveže pripremljen diazometan u odnosu 1:10, i smeša se ostavlja oko 30 minuta, kako bi se indol-3-sirćetna i abscisinska kiselina, derivatizovale metilacijom sa diazometanom i prevele u metil estre. Višak diazometana uklonjen je u struji tečnog azota, uparivanjem uzoraka do suva. Suvi ostatak je resuspendovan u 20 μ L etilacetata, i potom injektovan u GC/MS.

Diazometan je sintetisan u aparaturi načinjenoj od borosilikatnog stakla prikazanoj na slici 36., gde se u prvu kivetu dodalo 25 ml dietiletra, a u drugu 10 ml 2-(2-etoksietoksi)-etanola, 10 ml dietiletra i 15 ml 7M NaOH i 1g N-metil-N-nitrozo-p-toluen-sulfonamida (komercijalni proizvod "Diazald", Aldrich, No D2,8000). Reakcija sinteze diazometana je prikazana na slici 35. Aparatura je spojena šlifovanim delovima tako da zaptiva, a potom se u kivete sa dietiletrom uvodi azot sa protokom od oko 5-10 ml/min. PTFE izlazni deo cevi se postavi u vial sa oko 1.5-2 ml dietil-etra i držao nekoliko minuta u etru do razvijanja svetlo-žuto karakterističnog obojenja diazometana u etru.



Slika 35. Mehanizam sinteze diazometana kao sredstva za derivatizaciju i reakcije derivatizacije organskih kiselina (IAA i ABA) u odgovarajuće metil-estre (Barkawi i Cohen, 2010)

Proces sakupljanja novosintetisanog diazometana se nastavlja dokle god se etar iz viala boji karakterističnom bojom. Kako je diazometan toksičan i eksplozivan, sve operacije sa diazometanom se moraju raditi u digestoru, sa zaštitnom opremom. Obavezno izbegavati korišćenje napukle staklarije sa oštrim površinama, jer može doći do eksplozije. Diazometan skladištiti u frižideru na 4 °C i držati podalje od alkalnih metala, kalcijum sulfata, kalcijum hlorida, ili bakra.

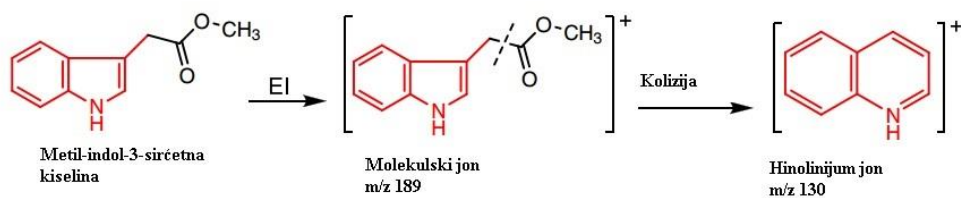


Slika 36. Aparatura za sintezu diazometana (levo) i uparavanje uzoraka sa diazometanom u struji azota nakon derivatizacije

4.5.4. Gasno-hromatografska analiza biljnih hormona (Rapparini et al., 2002)

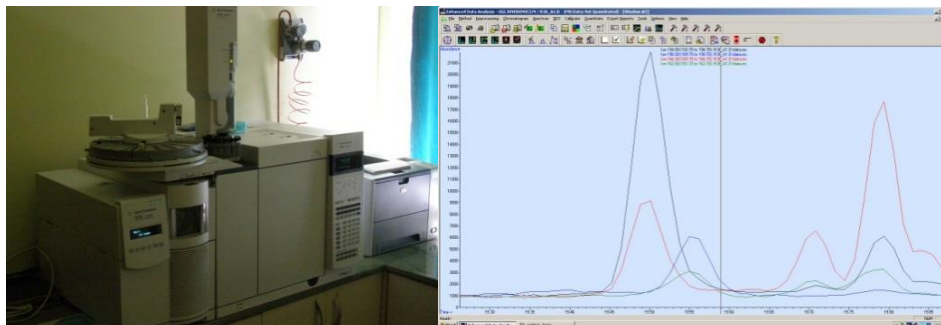
Kvantitativna analiza metilovanih estara IAA i ABA je rađena bikapilarnom-gasnom hromatografijom kuplovanom sa masenom spektrometrijom u SIM (selective ion monitoring) modu koristeći GC/5970 MS Model 5890 (Agilent Technologies, PaloAlto, CA) opremljen HP-1MS fuzionisanom-silica kapilarnom kolonom (dužine 60 m x 0.25 mm unutrašnjeg dijametara; obložena sa 0.25 mm filma polimetilsiloksana; HP1; Hewlett Packard). Temperatura GC-injektora je bila podešena na 270 °C, dok je temperatura peći unutar GC, bila podešena na temperaturnu rampu od 90°C do 280°C sa brzinom rasta temperature od 20°C min⁻¹ do 220°C i brzinom 5°C min⁻¹ do 280°C. Temperatura jonskog izvora je bila 280°C, a brzina protoka He kao mobilne faze bila je 1 ml min⁻¹.

Kvadripol masenog spektrometra je radio u elektron impakt modu “EI-mode” sa elektronskom emisijom od 70 eV. Za određivanje količine metil estara IAA i [¹³C₆]-IAA internog standarda, praćeni su joni m/z 130, 136, 189 i 195, sa vremenom naseljavanja od 50 ms po jonu. Joni m/z 130 i 136 odgovaraju masama baznih pikova (hinolinijumskih jona) metil-IAA i metil-[¹³C₆]-IAA, dok mase m/z 189 i 195 odgovaraju molekulskim jonima ova dva jedinjenja.



Slika 37. Mehanizam jonizacije i kolizije metil-estra IAA do hinolinijum jona u kvadripolu masenog detektora GC/MS sistema

Za određivanje metil estara ABA i [$^2\text{H}_6$]-ABA internog standarda, praćeni su joni masa m/z 190, 194, 162, i 166, sa vremenom zadržavanja od 50 ms po jonu. Joni masa m/z 190 i 194 odgovaraju masama pikova baza (hinolinijumskim jonima) metil-ABA i metil- $[\text{}^2\text{H}_6]$ -ABA, dok mase m/z 162 i 166 predstavljaju molekulske jone ovih jedinjenja. Odnosi manualno integrisanih površina jona 130:136 i 190:194 su korišćeni za računanje koncentracija endogenih IAA i ABA.



Slika 38. Gasni hromatograf sa masenim detektorom (levo) i SIM hromatogram jonova koji potiču od izotopski obeleženog standarda i endogene ABA

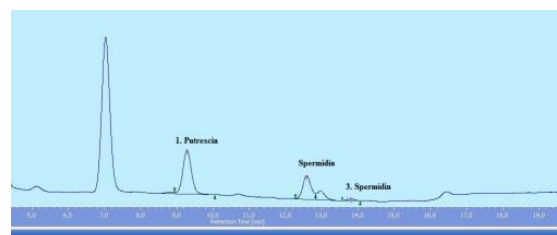
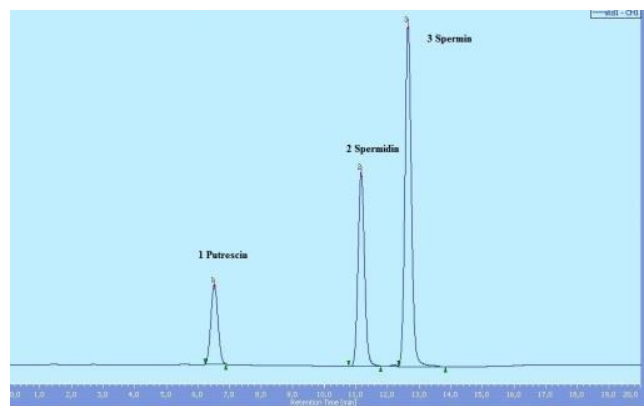
4.6. Određivanje sadržaja slobodnih i konjugovanih poliamina primenom HPLC analize (Scaramagli et al., 1999)

4.6.1. Ekstrakcija i derivatizacija poliamina

Za određivanje sadržaja slobodnih poliamina odmeravano je po 20 mg liofilizovanog biljnog materiala (korena ili lista) i homogenizovano sa 4% perhlornom kiselinom (PCA), te nakon inkubacije od 1h na 4°C , centrifugirano na 15000 obrtaja 30 minuta. Alikvoti supernatanta i standardnih 1 mM rastvora putrescina, spermidina i spermina (Put, Spd i Spm) su derivatizovani sa danzil-hloridom (5 mg/ml acetona) kao što je opisano od strane Bregoli i saradnika (2002). Derivatizacija je vršena tako što je u ependorf kivetice dodato 200 μl supernatanta uzorka ili 200 μl standarda (pripremljenog rastvaranjem 20 μl rastvora 1 mM odgovarajućeg poliamina (Put, Spm, Spd) u 140 μl 4% PCA), te dodavanjem 200 μl danzilhlorida i 200 μl rastvora zasićenog 1.5 M Na_2CO_3 . Nakon snažnog mešanja na “vorteks” mešalici, reakciona smeša je inkubirana sat vremena na vodenom kupatilu na 60°C . Nakon inkubacije reakcionoj smeši dodato je 100 μl prolina (koncentracije 5 mg/ml), a smeša je ponovo inkubirana na sobnoj temperaturi u mraku još 30 minuta. Nakon toga, u kivete je dodato 600 μl toluena, a reakciona smeša je snažno mešana na “vorteks” mešalici i ostavljena par minuta da se faze odvoje. Iz gornje touluenske faze u nove ependorf kivete otpipetirani su alikvoti od 400 μl , te su denzilovani derivati upareni do suva u Speed Vac rotacionom vakuum uparivaču-koncentratoru, potom odloženi na -20°C . Neposredno pre HPLC analize, upareni ostatak je resuspendovan sa 200 μl acetonitrila i razblažen 50 puta prenesen u

viale. Poliamini su razdvojeni i kvantifikovani na HPLC (PU-980 Jasco, Tokyo, Japan) koristeći reverznu fazu C₁₈ kolonu (Spherisorb ODS2, 5-mm particle diameter, 4.6 x250 mm, Waters, Wexford, Ireland) i programirani acetonitril:voda gradijent kao što su opisali Scaramagli i saradnici (1999).

Radi kvantifikacije konjugovanih poliamina alikvoti supernatanta uzorka u perhlornoj kiselini su bili izloženi kiseloj hidrolizi sa 6 N HCl (preko noći, na 110⁰ C) u cilju da se poliamini otpuste iz njihovih rastvornih i nerastvornih konjugata, te su derivatizovani i analizirani na isti način kako je opisano za slobodne poliamine (Scaramagli et al., 1999). Sadržaj konjugovanih poliamina računat je iz razlike ukupnih i slobodnih poliamina, čije su koncentracije određene nakon integracije pikova u odnosu na pikove standard poznate koncentracije.



Slika 39. Tečni hromatograf visokih performansi (HPLC) (levo) i hromatogrami sa razdvojenim pikovima poliamina (Put, Spd, Spm) iz standarda (gore) i endogenih iz uzorka (dole).

4.7. CHN elementarna analiza (Yasuhara i Nokihara, 2001)

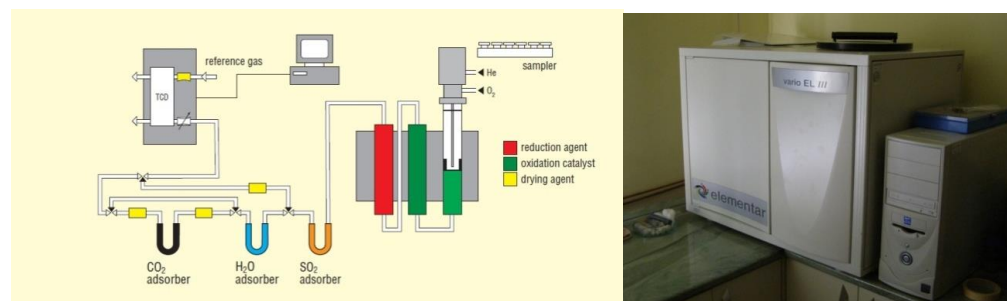
Uzorci vazdušno suvog zemljišta i biljnog materijala (korena, lista i stabla klonova topola) su najpre homogenizovani u laboratorijskom mlinu, te su se odvage od po 30 mg fino spraćenog uzorka odmerenih na analitičkoj vagi Danver tačnosti 0.00001g pakovale u specijalne kalajne folije dimenzija 6 x 6 x 6 mm. Nakon manualnog paletiranja kako bi se istisnuo vazduh i smanjila grešku pri određivanju azota, uzorci su postavljeni u autosempler elementarnog analizatora CHN Elementar Vario EL III. Veličina odvage određena je prema osetljivosti i sledećem radnom dinamičkom opsegu CHN analizatora:

C: 0.03-20 mg H: 0.03-3 mg N: 0.03-2 mg

Primenjeni parametri na instrumentu tokom CHN analize su tabelarno prikazani.

Temperatura peći 1: 900 °C	Vreme dovoda O ₂ : 10 s
Temperatura peći 2: 600 °C	Protok He: 200 ml/min
Temperatura CO ₂ kolone: 100 °C	Radni pritisak: 1.24 bara
Temperatura H ₂ O kolone: 150 °C	Index 1
Temperatura peći 1: 900 °C	Vreme ispiranja uzorka: 5s

Autosempler automatski unosi uzorke u oksidacionu kolonu aparata koja se nalazi unutar peći 1 gde se na temperaturi od 900 °C uz dovod ultračistog kiseonika vrši oksidacija i karbonizacija uzorka i prevođenje C, H i N iz uzorka u odgovarajuće okside, CO₂ i H₂O i N_xO. Struja gasa He nastale okside sprovodi dalje kroz redukcionu kolonu punjenu opiljcima bakra u kojoj se smeša azot-oksida redukuje do elementarnog N₂. Struja gasa nosača nosi smešu gasova na kolone na kojima se vrši razdvajanje nastalih oksida. Sa kolona se prvo desorbuje H₂O pa preostali CO₂, dok N₂ ide direktno na termokonduktometrijski detektor (eng. thermal conductivity detector-TCD). TCD poseduje dve merne komore kroz koje gas protiče konstantno. Jedna od komora je referentna i ona propušta samo gas nosač (He), dok kroz drugu komoru prolazi gas sa desorbovanim frakcijama He-N₂, He-CO₂ i He-H₂O. Između dve komore se uspostavlja električni disbalans koji se očitava kao razlika potencijala referentnog gasa i smeše nastalih gasova koja je izražena u mV. Voltažu u mV u funkciji vremena detektor automatski integriše i zahvaljujući kalibraciji za svaki element integral se u poređenju sa vrednostima za standard prevodi na apsolutni sadržaj elementa. Kao standard za kalibraciju instrumenta korišćen je acetanilid (C 71.09%; N 10.36%; H 6.71%) koji je odmeravan i pakovan u odvagama od po 5 mg. Procenat elementa u nepoznatom uzorku se računa automatski, relativno u odnosu na masu odvage uzorka i sadržaja elementa iz standarda.



Slika 40. Shema CHN analizatora (levo) i slika uređaja

4.8. Biohemijske metode merenja antioksidantne aktivnosti

Uprkos velikom broju postojećih metoda za praćenje ukupne antioksidantne aktivnosti, pouzdana, validirana i univerzalna metoda za merenje antioksidantne aktivnosti hrane i bioloških uzoraka još uvek nije otkrivena. Postojeće metode koje određuju totalni antioksidantni kapacitet *in vitro*, najčešće prate samo jednu reakciju, što ih čini nedovoljno pouzdanim i jednodimenzionim za merenje aktivnosti multifunkcionalnih bioloških antioksidanata. Autori Frankel i Meyer (2000), predlažu da bi univerzalni protokol za testiranje antioksidantne aktivnosti trebao da poseduje sledeće osobine:

- a) Da koristi biološki relevantan supstrat
- b) Da testira različite oksidacione uslove
- c) Da meri početne kao i sekundarne proizvode oksidacije
- d) Da poredi antioksidante u istim molarnim koncentracijama aktivnih komponenata
- e) Da vrši kvantifikaciju na osnovu vremena indukcije, procenta inhibicije, brzine formiranja ili neutralizacije radikala ili pak IC_{50} vrednosti (koncentracije antioksidanta koja postiže 50% inhibicije).

Prema zastupljenosti u naučnim radovima ističu se testovi poput testa antioksidantnog kapaciteta izraženog troloks ekvivalentima (eng. trolox equivalent antioksidant capacity-TEAC) (Rice-Evans et al., 1999), DPPH (Sanchez-Moreno, 2002), ORAC (eng. oxygen radical absorbance capacity) (Prior, 2000) i TRAP testa (eng. total radical-trapping antioksidant parameter) (Ghiselli et al., 2000). Mada su ovi biohemijski testovi u širokoj upotrebi kako u nauci tako i industriji, međusobno se razlikuju po supstratu, reakcionim uslovima, mehanizmu kvantifikacije, te je stoga vrlo komplikovano porediti rezultate dobijene različitim testovima (Frankel i Meyer, 2000). Zbog nedostatka standardizovanih testova, poređenje rezultata dobijenih od različitih istraživačkih grupa u nauci i kontrola kvaliteta antioksidantnih proizvoda i dalje predstavlja problem. Otvorena diskusija o prednostima i manama raznih dostupnih testova je potrebna kako bi došlo do usklađivanja mišljenja različitih istraživačkih grupa i razvijanja standardizovanih metoda. Metode za merenje antioksidantne aktivnosti prema mehanizmu reakcija na kojima se zasnivaju mogu biti podeljene u dve grupe:

- Metode zasnovane na prenosu jednog elektrona (eng. single electron transfer; SET)
- Metode zasnovane na prenosu atoma vodonika (eng. hydrogen atom transfer; HAT)

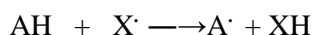
Krajnji rezultat oba mehanizma je isti, međutim kinetika i mogućnost nastajanja nusproizvoda su različiti kod ova dva mehanizma. Metode zasnovane na SET mehanizmu detektuju sposobnost

potencijalnog antioksidanta da vrši prenos jednog elektrona i redukciju drugog jedinjenja, bilo metala, karbonilnog jedinjenja ili nekog stabilnog radikala. Ovi testovi obuhvataju najpopularnije i najčešće primenjivane biohemijske testove, poput testa za određivanje ukupnih fenola sa Folin-Ciocalteu reagensom (FCR), antioksidatni kapacitet meren troloks ekvivalentima (eng. trolox equivalent antioxidant capacity-TEAC), sposobnost redukcije feri jona (eng. ferric reducing antioxidant power-FRAP)(Benzie i Strain, 1999) kao i DMPD (N,N-dimetil-p-fenilendiimin) i DPPH (2,2'-difetil-pikril-hidrazil radikal) test. Kod svih ovih testova reakciona smeša uključuju dve komponente, antioksidant i oksidant, gde usled jednoelektronskog transfera dolazi do redukcije oksidanta (Huang et al., 2005).

Proba (oksidant) + e⁻ (poreklom od antioksidanta) → redukovana proba + oksidovani antioksidant

Stepen promene boje oksidanta koji se redukuje je proporcionalan koncentraciji antioksidanta. Krajnja tačka reakcije je dostignuta kada promena boje prestane. Promena absorbance (ΔA) probe je u linearnoj zavisnosti sa koncentracijom antioksidanta. Nagib prave ove linearne zavisnosti odražava redukcionu kapacitet antioksidanta, koji se može izraziti troloks ekvivalentima (eng. trolox equivalents-TE) ili ekvivalentima galne kiseline (eng. gallic acid equivalents-GAE). Ovi testovi u mnogo čemu podsećaju na klasične hemijske redoks titracije, ali zbog toga što ne prate kompetitivne reakcije u sistemu ostaje pitanje koliko se rezultati testa mogu pripisati isključivo antioksidantnom kapacitetu uzorka. Kako bi se napravila korelacija, uvedena je aproksimacija da je antioksidantni kapacitet jednak njegovom redukcionom kapacitetu (Benzie i Strain, 1999). Tako, zaključno svi SET zasnovani testovi mere redukcionu kapacitet antioksidanta, koji direktno zavisi od pH vrednosti medijuma. Pri niskim pH vrednostima, redukcionu kapacitet može biti supresovan zbog velike verovatnoće protonacije antioksidantnih jedinjenja, dok je pri baznim uslovima favorizovana disocijacija protona kod npr. fenolnih jedinjenja, čime se dodatno povećava redukcionu kapacitet uzorka. Činjenica da se pomenuti testovi izvode u različitim pH sredinama posebno doprinosi neuporedivnosti rezultata dobijenih primenom različitim testova. Tako se FRAP test odvija pri kiselim, TEAC pri neutralnim, dok se određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja (eng. total phenolic content-TPC) odvija pri baznim uslovima. Takođe, pH medijuma u mnogim *in vitro* testovima ne odgovara fiziološkom pH *in vivo*. Zanimljivo je da veliki broj radova navodi odličnu linearnu korelaciju između sadržaja ukupnih fenola (TPC) i SET-zasnovanih testova (FRAP, DPPH; TEAC i dr.), što nije začuđavajuće uzimajući u obzir da su ovi testovi zasnovani na istovetnom mehanizmu i sličnim hemijskim reakcijama. Naime, uprkos nazivu testa da određuje sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (TPC), ovaj test zapravo meri redukcionu kapacitet antioksidanata da redukuju Mo(VI) do Mo(V) unutar smeše soli molibdena i volframata koju predstavlja Folin-Ciocalteu reagens (Huang et al., 2005).

S druge strane, HAT-zasnovane metode mere klasičnu sposobnost nekog oksidanta da neutrališe slobodne radikale donacijom atoma vodonika. HAT reakcije su nezavisne od rastvarača i pH i obično su vrlo brze te se završavaju u nekoliko sekundi do minuta. Prisustvo redukujućih agenasa, uključujući i prisustvo metala dovodi do komplikacija i drastičnog povećanja reaktivnosti (Prior et al., 2005). Većina HAT-zasnovanih metoda prati kinetiku kompetitivnih reakcija, a do kvantifikacije se dolazi analizom kinetičkih krivih. HAT-zasnovane metode se sastoje iz sintetičkog slobodnog radikala, ili sistema koji generiše radikal, molekulske probe koja podleže oksidaciji, i antioksidanta. Antioksidant HAT zasnovanih testova je sposoban da “gasi” radikal donacijom atoma vodonika prema reakciji.



Ovoj grupi testova pripadaju testovi: ORAC (eng. oxygen radical absorbance capacity), TRAP (eng. total radical-trapping antioxidant parameter), TOSCA (eng. total oxyradical scavenging capacity assay), test inhibicije indukovane LDL oksidacije, test izbleđivanja krocina i hemiluminescentni testovi (Huang et al., 2005).

4.8.1. Priprema ekstrakata

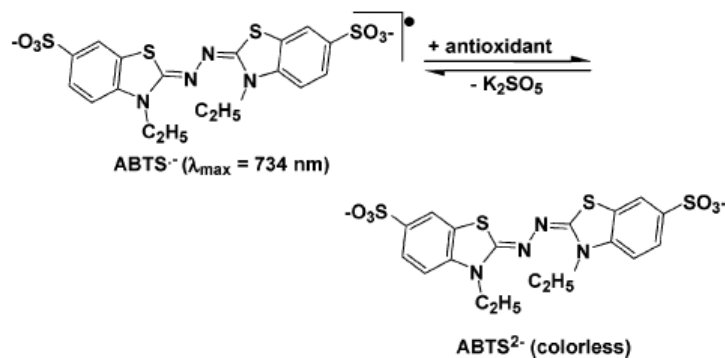
Puferski ekstrakti biljnog materijala, iz kojih je određivana aktivnost antioksidantnih enzima, ukupna sposobnost redukcije ekstrakata određene FRAP metodom, rastvorljivi proteini kao i lipidne peroksidacije, pravljene su homogenizacijom 1 g biljnog materijala (korena i lista klonova topole) sa 10 cm³ fosfatnog pufera (0,1 M, pH=7, pH podešavan sa KOH) (Quy Hai et al., 1975). Homogenat je nadalje centrifugiran 10 minuta na 11000 obrta/min i za ispitivanja je korišćen superinatant prema protokolima za pojedine analize. Za određivanje sposobnosti ekstrakata da vrše neutralizaciju radikala (ABTS⁺, DPPH, OH i NO[•] radikala) kao i ukupnih fenola i flavonoida u listu i korenu različitih klonova topola pripremani su ekstrakti dobijeni maceracijom vazdušno suvog biljnog materijala sa 70% etanolom u odnosu 1:10 u vremenu od 24 h.

4.8.2. Sposobnost neutralizacije radikala (RSC-radical scavenger capacity)

4.8.2.1. Određivanje sposobnosti neutralizacije ABTS⁺ radikala (Arnao et al., 2001)

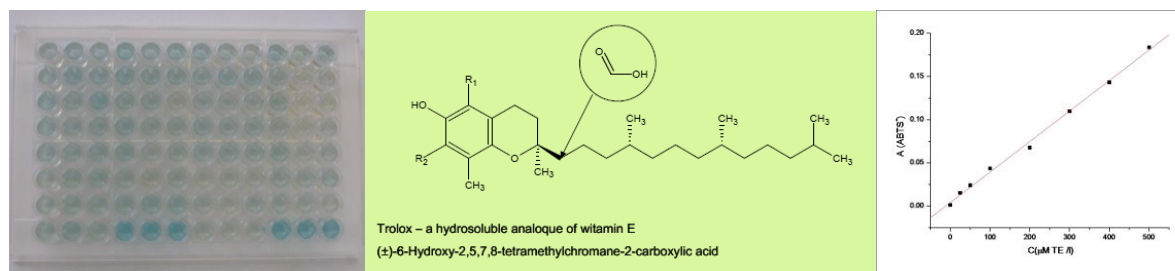
Test za merenje antioksidantnog kapaciteta izraženog troloks ekvivalentima prvi put je objavljen od strane Miller i Rice-Evansa (1997), te kasnije unapređen (Arnao et al., 2001). U unapređenoj verziji, oksidant ABTS⁺ se generiše u reakciji oksidacije 2,2'-azinonbis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS²⁻) amonijum persulfatom (slika 41).

Reagens: Osnovni rastvor se priprema tako što se 7 mmol ABTS (38.4 mg u 10 ml H₂O) pomeša sa 2.45 mmol kalijum persulfata (K₂S₂O₇), te se smeša ostavi na sobnoj temperaturi do 16h da se razvije tamno plavo obojenje. Na dan korišćenja, osnovni rastvor se razblažuje sa 95% EtOH (600μl ABTS u 40 ml EtOH), kako bi se postigla apsorbanca osnovnog rastvora između 0.8-0.9 na 734 nm.



Slika 41. Neutralizacija katjionskog sintetičkog ABTS radikala do bezbojne redukovane forme

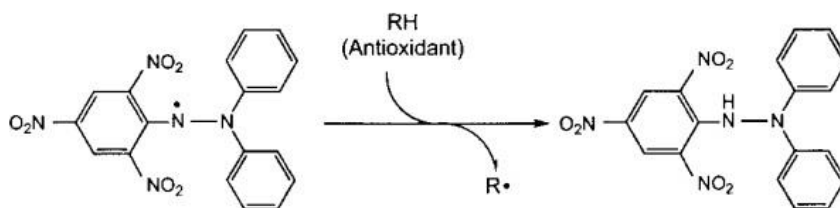
ABTS test se zasniva na spektrofotometrijskom praćenju transformacije plavo-zeleno obojenog katjionskog radikala $\text{ABTS}^{\bullet+}$ u svoju neutralnu bezbojnu formu na 734 nm. $\text{ABTS}^{\bullet+}$ reaguje jednako sa antioksidantima hidrofилne i hidrofobne prirode i ne pokazuje osetljivost na jonsku jačinu. Reakciona smeša se dobija mešanjem 300 μl sveže napravljenog rastvora $\text{ABTS}^{\bullet+}$ i 10 μL ekstrakata lista, izbojka i korena topole. Apsorbance radnih proba su čitane na 734 nm na čitaču mikroploča (Multiplate reader MultiScan GO, Thermo Scientific, Nemačka). nakon inkubacije od 5 min na 30⁰C. Mikroploča sa razvijenom bojom prikazana je na slici 42. Etanol (95%) se koristio kao slepa proba. Standardna kalibraciona kriva je konstruisana kao funkcija apsorbanca $\text{ABTS}^{\bullet+}$ u zavisnosti od serije različitih koncentracija troloksa (od 0 do 500 μM) (slika 42). Sposobnost ekstrakata topola da vrše neutralizaciju katjionskog radikala $\text{ABTS}^{\bullet+}$ se izražava brojem troloks ekvivalenata (TEAC- trolox equivalent antioxidant capacity) po g suvog biljnog materijala (TEAC/g DW), dobijenih ekstrapolacijom sa standardne kalibracione krive. Troloks ekvivalent (TEAC) je ona koncentracija antioksidanta koja daje jednaku procentnu promenu apsorbanca $\text{ABTS}^{\bullet+}$ koju izaziva 1 mM troloksa. Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8,-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina) je hidrofилni analog vitamina E čija je struktura prikazana na slici 44.



Slika 42. Izgled mikrotitar ploče nakon razvijanja boje (levo), struktura troloksa (sredina) i kalibraciona kriva za TEAC test (desno)

4.8.2.2. Određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala (Soler-Rivas et al., 2000)

Za određivanje sposobnosti ekstrakata topola da vrše neutralizaciju slobodnih radikala, primenjen je tzv. DPPH-test (Soler-Rivas et al., 2000). Metoda se zasniva na spektrofotometrijskom praćenju transformacije ljubičasto obojenog, stabilnog, azot centriranog DPPH[•] radikala (2,2'-difetil-1-pikrilhidrazila) u redukovanu, žuto obojenu formu DPPH-H. Naime, DPPH[•] radikal je relativno stabilan radikal čiji je rastvor u metanolu ljubičaste boje sa maksimumom apsorpcije na $\lambda_{\max}=515\text{nm}$. U prisustvu potencijalnih donora elektrona dolazi do neutralizacije radikala i prelaska u neutralni oblik, što je praćeno promenom apsorbanca i iščezavanjem ljubičaste boje rastvora.



2,2-Difenil-pikril hidrazil radikal (DPPH[•])
ljubičasto

2,2-Difenil-pikril hidrazil (DPPH-H)
bledo-žuto obojenje

Slika 43. Neutralizacija DPPH radikala

Reagens: Osnovni rastvor DPPH reagensa (0.4 M) napravljen je odmeravanjem 0.0157g čvrste supstance u normalni sud od 100 ml koji je dopunjen do crte 96% EtOH. Na dan merenja, pravljen je radni rastvor koji se dobija mešanjem 22,5 ml osnovnog rastvora sa MeOH u sudu od 100 ml, i čija apsorbanca treba da iznosi približno oko 0.9 na 515 nm.

Radne probe su pravljenje mešanjem 190 μl DPPH radikala sa 100 μl metanola (MeOH) i 10 μl ekstrakata topola. Za svaki ekstrakt je merena korekcija ($A_{\text{korekcija}}$), koja predstavlja apsorbanca samog uzorka (10 μl) rastvorenog u 290 μl rastvarača (MeOH). Svi uzorci su posle snažnog mešanja u trajanju od 10 s, ostavljeni da se inkubiraju 30 min na sobnoj temperaturi, nakon čega su apsorbanca očitane na

515 nm na čitaču mikroploča MultiScan GO, proizvođača ThermoScientific. Procenat inhibicije DPPH radikala (radical scavenger capacity-RSC) etanolnih ekstrakata topola je određen po formuli:

$$\% \text{RSC} = 100 - \frac{(A_{\text{radne probe}} - A_{\text{korekcije}})}{A_{\text{kontrolne}}} \times 100$$

Gde $A_{\text{kontrolne}}$ predstavljaju slepe probe, koje sadrže samo DPPH (200 μl) i rastvarač (100 μl MeOH).



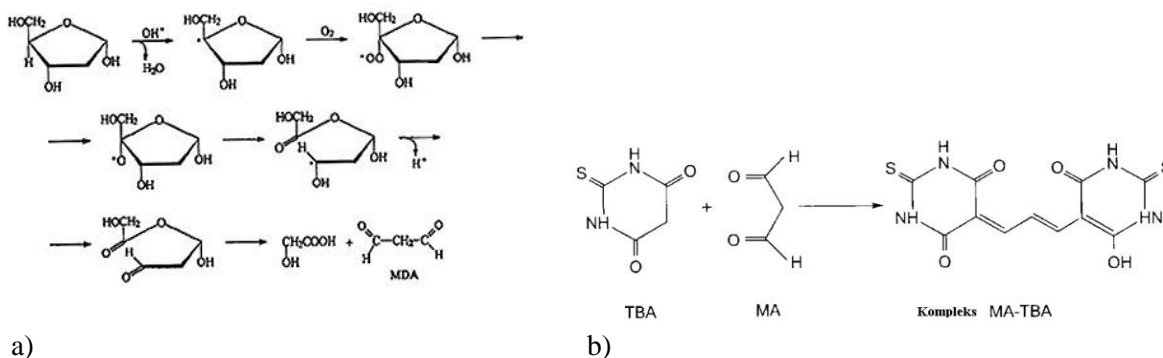
Slika 44. Izgled mikroploče posle inkubacije DPPH testa

4.8.2.3. Određivanje sposobnosti neutralizacije OH^\bullet radikala (Verma et al., 2010)

Kapacitet antioksidanata iz ekstrakata topole da vrše neutralizaciju hidroksilnog radikala određuje se praćenjem reakcije degradacije 2-dezoksi-D-riboze u prisustvu slobodnih OH^\bullet radikala generisanih u sistemu $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$.



U reakciji jona Fe^{2+} sa H_2O_2 (Fenton-ova reakcija) nastaje OH^\bullet radikal, koji dalje oduzima H atom 2-dezoksi-D-ribozi i pokreće razgradnju ovog molekula do krajnjih produkata. Jedan od krajnjih produkata ove reakcije je malonildialdehid (MDA) koji se određuje spektrofotometrijski uz pomoć tiobarbiturnog testa (TBA test) na 532 nm.



Slika 45. a) Degradacija 2-dezoksi-D-riboze u prisustvu slobodnih OH^\bullet radikala i b) kvantifikacija MDA u tiobarbiturnom testu

Reagensi:

- 0,015% rastvor H₂O₂: 42μl 35% H₂O₂ u 100ml vode
- 10,0 mM rastvor FeSO₄: 0.1390g FeSO₄·7 H₂O u 50ml vode
- 0,05 M rastvor 2-deoksi-D-riboze: (0.1677g 2-dezoksi-D-riboze u 25,0 ml fosfatnog pufera pH=7.4)
- TBA reagens: 5.2 ml HClO₄, 1.5 g tiobarbiturne kiseline i 60g trihlorsirćetne kiseline rastvoreno u 400ml vode
- 0.1 M EDTA: 1.86g u 50,0 ml vode
- fosfatni pufer pH=7.4, (c=0.067M): 1,7506g KH₂PO₄ i 7.6851g Na₂HPO₄ u 1 L vode

Za ispitivanje antioksidantne aktivnosti u sistemu Fe²⁺/H₂O₂ pripreme se sledeće probe:

Radne probe:

- 100 μl 2-dezoksi-D-riboza
- 10 μl ekstrakta
- 100 μl H₂O₂
- 100 μl FeSO₄

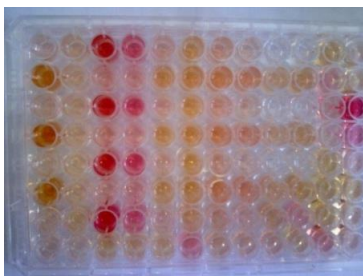
Kontrola:

- 100 μl 2-dezoksi-D-riboza
- 10 μl rastvarača
- 100 μl H₂O₂
- 100 μl FeSO₄

Radne probe su dalje inkubirane 60 minuta na 37°C . Nakon inkubacije, u epruvete je dodato po 0.2 ml EDTA i 2 ml TBA-reagensa, a karakteristična ružičasta boja kompleksa (TBA-MDA) se razvijala nakon 10 min kuvanja na 100°C. Nakon hlađenja, apsorbanca je merena na λ=532 nm. Sve reakcije su rađene u tri ponavljanja. Intenzitet neutralizacije OH• radikala izračunat je prema formuli:

$$\% \text{ RSC} = (A_0 - \bar{A}) / A_0 \times 100$$

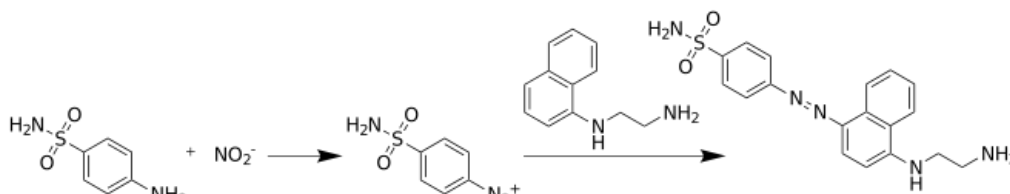
gde A₀ predstavlja apsorbanca kontrola, a \bar{A} apsorbanca radnih proba u prisustvu uzoraka



Slika 46. Izgled mikrotitar ploče nakon razvijanja boje kompleksa TBA-MDA

4.8.2.4. Određivanje sposobnosti neutralizacije NO radikala (Tsai et al., 2007)

Određivanje kapaciteta etanolnih ekstrakata lišća, korena i izbojaka topola da neutrališu NO[•] radikal, zasniva se na spektrofotometrijskom merenju koncentracije generisanih nitritnih jona. U ovu svrhu korišćen je vodeni rastvor natrijum-nitroprusida (eng. sodium-nitroprusite, SNP) koji predstavlja izvor NO[•] radikala pri fiziološkom pH. Nastali NO[•] reaguje sa kiseonikom dajući nitritne jone, čija koncentracija se određuje na bazi Griess-Illosvory-jeve reakcije.



Slika 47. Reakcija nastajanja diazo kompleksa (Griess-Illosvory-jeva reakcija)

Princip spektrofotometrijskog određivanja koncentracije nitritnih jona se zasniva na praćenju nastajanja purpurno-ružičastog diazo kompleksa koji je produkt reakcije NO₂⁻ i Griess-ovog reagensa na sobnoj temperaturi.

Reagensi:

- 5 mM rastvor natrijum -nitroprusida (SNP) se priprema se rastvaranjem 1.49 g SNP u 100 ml 0.1M fosfatnog pufera (pH=4).
- Griess-ov reagens nastaje mešanjem 0.77 mM N-(1-naftil)-etilendiamina dihidroklorida (NEDA) rastvorenog u destilovanoj vodi sa 1% sulfanilamidom (SA) rastvorenog u 5% fosfatnoj kiselini. Pojedinačni rastvori su stabilni 4 meseca na 4⁰ C, dok je smeša stabilna 12h na istoj temperaturi.

Radne probe:

- 10 µl odgovarajućeg ekstrakta
- 60 µl 5 mM SNP
- 50 µl 0.1 M fosfornog pufera pH=4.

Tako postavljene radne probe se inkubiraju na sobnoj temperaturi 100 min na svetlosti, zatim im se posle mešanja od 10s doda:

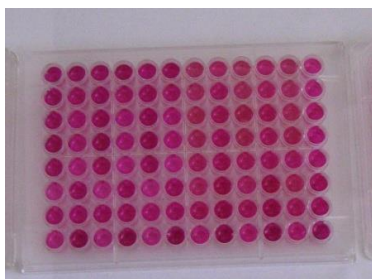
- 120 µl Griessovog reagensa

Apsorbance formirane hromofore se čitaju na 577 nm na spektrofotometrijskom čitaču mikroploča.

Procenat inhibicije azot(II)-oksida (RSC_{NO[•]}) ispitanih ekstrakta računat je na osnovu sledeće jednačine:

$$\text{RSC}_{\text{NO}^{\bullet}} (\%) = (1 - A/A_{\text{kon}}) \times 100\%,$$

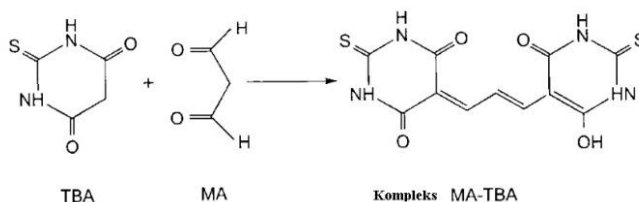
gde je A_{kon} apsorbanca kontrolne probe koja za razliku od radnih proba nema dodat ekstrakt.



Slika 48. Izgled mikrotitar ploče nakon razvijanja boje hromofore

4.8.3. Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije (Devasagayam et al., 2003)

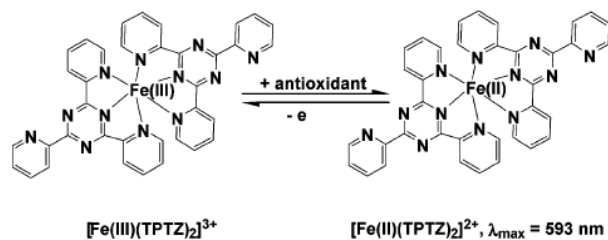
Intenzitet lipidne peroksidacije (LP) određen je na osnovu sadržaja malondialdehida (MDA), jednog od krajnjih proizvoda razgradnje membranskih lipida u ćelijama, ekstrahovanog iz svežeg biljnog materijala pomoću smeše tiobarbiturine kiseline (TBA) i 20% trihlorsirćetne kiseline (TCA) u odnosu 1:3 (Devasagayam et al., 2003). Reakcioni medijum radne probe se sastojao je 0.5 ml ekstrakta biljnog materijala i 4.5 ml rastvora za ekstrakciju MDA (20% TCA i 0.5 % TBA), dok je slepu probu predstavljao sam reagens za lipidnu peroksidaciju. Reakcione smeše su zagrevane 30 min na 95 °C na vodenom kupatilu, ohlađene i centrifugirane 10 minuta na 1500 rpm. Sadržaj MDA u dobijenom supernatantu očitao je spektrofotometrijski na $\lambda=532$ nm. Intenzitet LP izražen je brojem nmol MDA ekvivalenata po mg proteina (nmol MDA ekvivalenata/mg proteina).



Slika 49. Stvaranje TBA-MDA kompleksa u procesu LP

4.8.4. Određivanje redukcionne sposobnosti ekstrakta FRAP testom (ferric reducing antioxidant power) (Benzie i Strain, 1999)

FRAP test je zasnovan na nespecifičnoj reakciji po kojoj svaki sistem koji ima manje pozitivan redoks potencijal od sistema Fe^{3+} -TPTZ/ Fe^{2+} -TPTZ dovodi do redukcije Fe^{3+} -TPTZ. Prilikom redukcije koordinaciono jedinjenje Fe (II) daje tamno plavo intenzivno obojenje sa apsorpcionim maksimumom na 593 nm.



Slika 50. Redukcija TPTZ-Fe³⁺ sistema pomoću antioksidanata iz ekstrakata

Reagensi:

- FRAP reagens: Acetatni pufer: TPTZ: FeCl₃ x H₂O=10 :1 :1
- Acetatni pufer, pH=3.6, 0.31g CH₃COONa i 1.6 ml cc CH₃COOH rastvoreno je u 100 ml destilovane vode
- FeCl₃ x 6H₂O, 20 mM dobijen rastvaranjem 0.0541g FeCl₃ x 6H₂O u 10 ml destilovane vode
- TPTZ rastvor, 10 mM u 40mM HCl dobijen rastvaranjem 0.0312g TPTZ u 10 ml 40mM HCl
- HCl, 40 mM dobijena razblaživanjem 0.086 ml ccHCl u 25 ml destilovane vode
- 100 μM FeSO₄ · 7H₂O, dobija se rastvaranjem 0.2879 g u 100 ml destilovane vode

Za svaki uzorak pripremljene su radne i slepe probe prema navedenom redosledu (u tri ponavljanja).

Radne probe:

- 1500 μl FRAP reagensa
- 50 μl ekstrakta biljnog materijala

Slepa proba:

- 1500 μl FRAP reagensa
- 50 μl odgovarajućeg rastvarača

Standard:

- 1500 μl FRAP reagensa
- 50 μl 100 μM FeSO₄ · 7H₂O

Nakon 6 minuta inkubacije, izmerene su apsorbance na $\lambda = 593 \text{ nm}$. Rezultati su izraženi u FRAP jedinicama, gde jedna FRAP jedinica odgovara onom redukcionom kapacitetu ekstrakta koji je sposoban da redukuje 100 μM Fe³⁺.

$$n \text{ (FRAP unit)} = A_{\text{radne probe}} / A_{\text{standarda}} \times R; \quad A_{\text{standarda}} \text{ (100 } \mu\text{M FeSO}_4 \text{ x 7H}_2\text{O)}; \quad R\text{-faktor razblaženja}$$

4.8.5. Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja (TPC- total phenolic content) (Singleton et al., 1999)

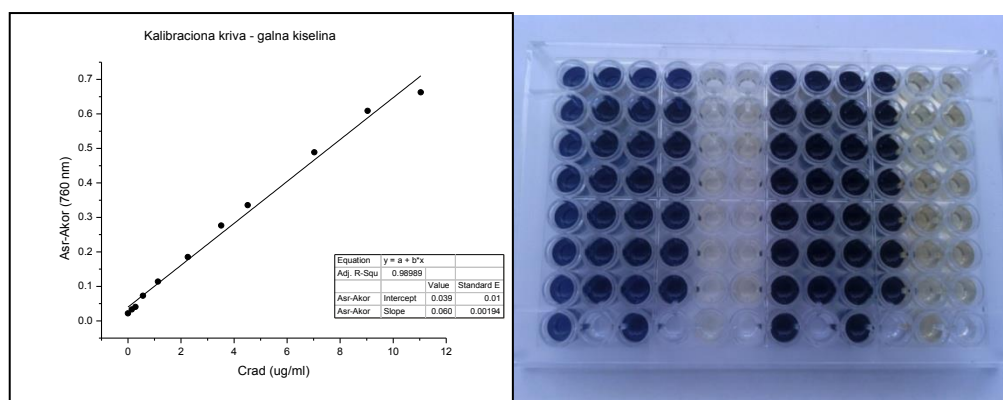
Metod je zasnovan na oksidaciji molekula koji sadrže fenolne funkcionalne grupe. Tanini, flavonoidi i druge klase fenolnih jedinjenja koji sadrže fenolne grupe i poseduju sposobnost da redukuju alkalni rastvor fosfovolframolibdenske kiseline iz Folin-Ciocalteu reagensa učestvuju u ovoj reakciji.

Reagensi:

1. 0.1 mol/L **Folin-Ciocalteu reagens** (FC reagens): 2.5 ml 2M FC reagensu u 50 ml vode
2. Rastvor Na_2CO_3 : 75 g Na_2CO_3 u 1 l destilovane vode = 7.5 %
3. 1 mg/mL galna kiselina: 0.0276 g galne kiseline · H_2O rastvoreno u destilovanoj vodi

Postupak: U radne probe koje se sastoje od 25 μl ispitivanog ekstrakta ili standarda (galna kiselina u rasponu koncentracija od 50 do 500 mg/ml) doda se 125 μl razblaženog Folin-Ciocalteu reagensu i reakciona smeša se inkubira na sobnoj temperaturi 3 min. Zatim se doda 25 μl zasićenog rastvora Na_2CO_3 , reakciona smeša inkubira 2h na sobnoj temperaturi, a potom apsorbancija očitava na 760 nm. Na osnovu izmerenih apsorbanci, sadržaj ukupnih fenola izražava se u broju mg ekvivalenata galne kiseline (gallic acid equivalents) po gramu suve mase biljnog materijala (mg GAE /g).

Radna proba	Korekcija	Slepa proba
25 μl ekstrakta	25 μl ekstrakta	25 μl destilovane vode
125 μl FC reagensu	225 μl destilovane vode	125 μl FC reagensu
100 μl rastvora Na_2CO_3		100 μl rastvora Na_2CO_3



Slika 51. Izgled kalibracione krive standardnog rastvora galne kiseline (levo) i izgled mikrotitar ploče nakon razvijanja boje

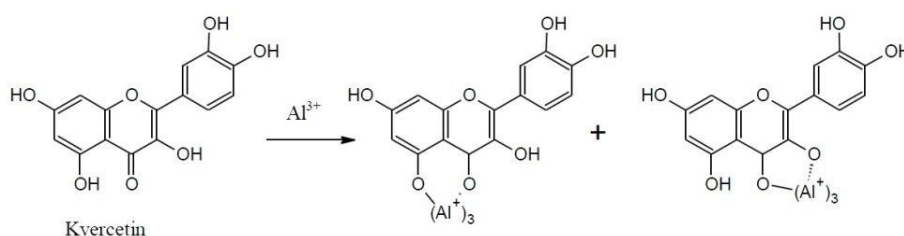
Apsorbance (A) za svaki ispitivani ekstrakt su računane iz razlike apsorbance radne probe (A_{sr}) i korekcije (A_{kor}):

$$A = A_{sr} - A_{kor}.$$

Sadržaj fenola je izračunat na osnovu kalibracione krive dobijene merenjem apsorbanci serije različitih koncentracija standardnog rastvora galne kiseline i preračunat na suhu masu biljnog materijala.

4.8.6. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida (Chang et al., 2002),

Metoda se zasniva na osobinama flavonoida i glikozida flavonoida da sa jonima metala daju odgovarajuće metalo-komplekse. Naročito je značajan Al^{3+} -kompleks, čiji se apsorpcioni maksimum nalazi na 415 nm.



Slika 52. Reakcija helatizacije Al^{3+} sa kvercetinom

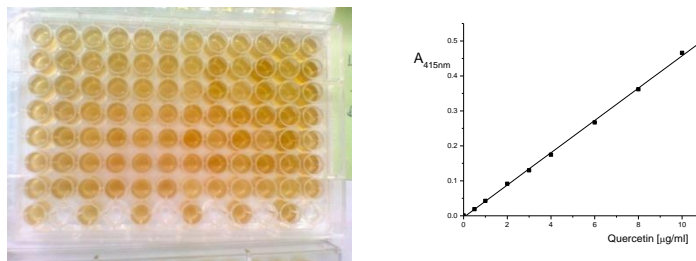
Reagensi:

- 1.0 M $NaCH_3COO$ (4.1 g $NaCH_3COO \cdot 3H_2O$ rastvoreno u 50 ml destilovane vode)
- 0.75 M $AlCl_3$ (5.0025 g $AlCl_3 \cdot 3H_2O$ rastvoreno u 50 ml vode)

Radne, slepe probe i korekcije su otpipetirane u mikroploče u zapreminama rastvora prikazanim u tabeli:

Radna proba	Korekcija	Slepa proba
30 μ l ekstrakta	30 μ l ekstrakta	0 μ l ekstrakta
90 μ l MeOH	90 μ l MeOH	90 μ l MeOH
6 μ l $NaCH_3COO$	6 μ l $NaCH_3COO$	6 μ l $NaCH_3COO$
6 μ l $AlCl_3$	0 μ l $AlCl_3$	6 μ l $AlCl_3$
150 μ l dest. vode	156 μ l destilovane vode	180 μ l destilovane vode

Nakon 30 minuta inkubacije, izmerene su apsorbancije na 415 nm. Sve probe su rađene u tri ponavljanja. Standardna kriva je konstruisana kao zavisnost apsorbance i serije koncentracija rastvora kvercetina. Iz kalibracione krive izračunat je sadržaj flavonoida u ispitivanim ekstraktima i izražen u mg ekvivalenata kvercetina (QE) po gramu suvog biljnog materijala.



Slika 53. Izgled mikroploče posle razvijanja boje (levo) i kalibraciona kriva standardnog rastvora kvercetina

4.8.7. Određivanje sadržaja rastvorljivih proteina (Bradford, 1974; Stoscheck, 1990)

Sadržaj rastvorljivih proteina određen je modifikovanom metodom po Bradfordu (Bradford, 1974), koja se zasniva na vezivanju boje Coomassie blue G-250 za bazne i aromatične aminokiselinske ostatke proteina (Stoscheck, 1990). Boja Coomassie blue postoji u tri oblika: katjonskom (crvena), neutralom (zeleno) i anjonskom (plava). U kiselj sredini dominira protonovana katjonska forma sa maksimumom apsorpcije na $\lambda=465$ nm. Kada se boja veže za protein prelazi u stabilan neprotonovani oblik plave boje sa maksimumom apsorpcije na $\lambda=595$ nm. Reagens interferira sa nekim neproteinskim supstancama koje stabilišu neutralnu formu (zeleno), bilo direktnim vezivanjem ili promenom pH, zbog čega se kao proteinski referentni standard koristi albumin goveđeg seruma (eng. bovine serum albumin-BSA).

Bradford-ov reagens: U normalnom sudu od 1 l u 50 ml 95% etanola i 100 ml 85% (w/v) fosforne kiseline rastvoreno je 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250. Nakon potpunog rastvaranja, rastvor je dopunjen do crte i profiltriran kroz Whatmanov papir pre upotrebe.

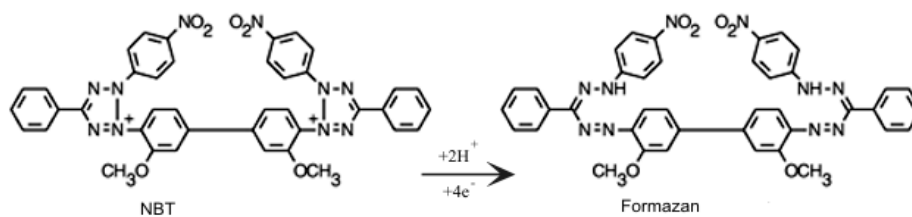
Radne probe:

- 1 ml Bradford-ovog reagensa
- 25 μl uzorka (ili 50 μl ekstrakta duplo razblaženog)
- 1 ml destilovane vode

Nakon 5-30 minuta inkubacije očitava se apsorbanca uzorka i različitih koncentracija standarda (eng. bovine serum albumin, BSA) na $\lambda=595$ nm. Koncentracija proteina u uzorku određena je iz krive zavisnosti apsorbanca od koncentracije standarda. Koncentracija proteina u uzorku izražena je kao mg proteina po gramu svežeg biljnog materijala ($\text{mg proteina g}^{-1}$ sv.m.).

4.8.8. Određivanje aktivnosti superoksid-dizmutaze (SOD: EC 1.15.1.1) (Fredovich, 1995)

Ukupna aktivnost superoksid-dizmutaze (SOD) određena je na osnovu inhibicije fotohemijske redukcije nitroblutetrazolijuma (NBT) u kojoj nastaje formazan, plavi proizvod redukcije NBT sa $\text{O}_2^{\cdot-}$.



Slika 54. Reakcija redukcije nitroblutetrazolijuma (NBT) do formazana

Radna proba:

- Enzimski ekstrakt (15 μ l ekstrakta izbojka, 45 μ l ekstrakta korena i 7.5 μ l ekstrakta lista)
- 2 ml reakcionog medijuma;

Reakcioni medijum je dobijen mešanjem:

- ✓ 2,6 cm³ 50 mmol/dm³ fosfatnog pufera (pH=7,8);
- ✓ 100 μ l 13 mmol/dm³ metionina;
- ✓ 100 μ l 75 μ mol/dm³ NBT;
- ✓ 100 μ l 0,1 mmol/dm³ EDTA i
- ✓ 50 μ l 2 μ mol/dm³ riboflavina.

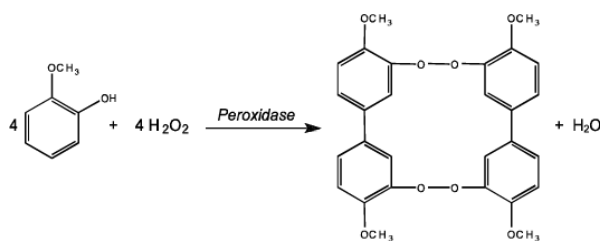
Slepa proba:

- 2 ml reakcionog medijuma
- 20 μ l fosfatnog pufera (pH=7,8)

Rastvor u epruvetama se dobro promeša i epruvete postave ispred svetlosnog izvora da odstoje 10 minuta (Auclair i Voisin, 1985). Očitavanje apsorbance je vršeno na Janway UV/VIS 6505 spektrofotometru, na 560 nm. Jedinica aktivnosti SOD je ona količina enzima koja inhibira redukciju NBT-a za 50% na 25⁰C i na 560 nm (Štajner, 1990).

4.8.9. Određivanje aktivnosti gvajakol-peroksidaze (GPx) (Simon et al., 1974; Morkunas i Gmerek, 2007)

Metoda je zasnovana na transformaciji gvajakola u bifenhoninon i praćenju promene apsorbance u roku od 1 minuta.



Slika 55. Reakcija transformacije gvajakola u bifenhoninon pod dejstvom gvajakol-peroksidaze

Reagensi:

- Gvajakol: 250 μ l se rastvori u 100 ml destilovane vode (energično mućkati kako bi se emulgovao)
- Vodoni-peroksid (12.3 mM); 140 μ l 30% H_2O_2 rastvoriti u 100 ml destilovane vode (pravi se neposredno pre početka rada)
- Fosfatni pufer (0.1M) pH=7: 13,6 g KH_2PO_4 rastvoriti u 1L destilovane vode, pH podesiti sa KOH

Radne probe:

- 3 ml fosfatnog pufera
- 50 μ l rastvora gvajakola
- 30 μ l H_2O_2 (svežeg)
- 100 μ l puferskog ekstrakta

Slepa proba sadrži isti reakcioni medijum kao i radna, izuzev ekstrakta. Reakcija je pozitivna ukoliko dođe do promene boje rastvora u bordo-braon (boja konjaka). Aktivnost GPx se prati kao promena apsorbance u minuti na 436 nm. Jedinica aktivnosti GPx je ona količina enzima koja izaziva transformaciju 1 μ M gvajakola u 1 minutu na 25⁰C (Štajner, 1990). Ekstincioni koeficijent za GPx je 25.6 $mM^{-1} cm^{-3}$.

4.8.10. Određivanje aktivnosti glutation reduktaze (GR: EC 1.6.4.2) (Smith et al., 1988)

Glutation reduktaza (GR: EC 1.6.4.2) je flavoprotein koji katalizuje NADPH-zavisnu redukciju oksidovanog glutationa (GSSG) do redukovane forme (GSH). Ovaj enzim je esencijalan za GSH redoks ciklus koji održava nivoe redukovanog ćelijskog GSH, jer je visok odnos GSH/GSSG ključan u zaštiti protiv oksidativnog stresa. Određivanje GR aktivnosti je zasnovano na reakciji oksidacije NADPH.



Oksidacija NADPH do $NADP^+$ je praćena padom apsorbance merene na 340 nm i direktno je proporcionalna GR aktivnosti uzorka. Ekstincioni koeficijent NADPH 6.22 $mM^{-1} cm^{-3}$, a jedna jedinica GR izaziva oksidaciju 1 μ M NADPH na 25 °C.

Reagensi:

- 0.05 M TRIS/HCl pufer pH=8 (6.057g TRIS, 2.5ml cHCl i 0.6g EDTA se rastvori u 1 l destilovane vode, te sa HCl podesi pH)

- 0.5 mM GSSG (0.00765 g se rastvori i dopuni do crte normalnog suda od 25 ml)
- 2.1 mM NADPH (15.6 mg NADPH se rastvori u 10 ml destilovane vode)

Radne i slepe probe su pripremljene kako je prikazano u tabeli:

Radna proba	Slepa proba
2.7 ml TRIS/HCL pufera	2.8 ml TRIS/HCL pufera
0.1 ml puferskog ekstrakta	0.1 ml puferskog ekstrakta
0.1 ml GSSG	-

Na ovako pripremljene radne i slepe probe posle inkubacije od 10 minuta na temperature od 37⁰ C se dodaje 0.1 ml rastvora NADPH i odmah potom započinje merenje promene apsorbancije na 340 nm po minuti u toku 5 minuta. Aktivnost GR se računa po formuli ispod:

$$\text{GR aktivnost} = \Delta A_{340} / \text{min} \times V_{\text{tot}} / 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-3} / V_{\text{eks}} \quad [\text{nmol/min/ml ili U/ml}]$$

V_{tot} = ukupna zapremina medijuma (3 ml)

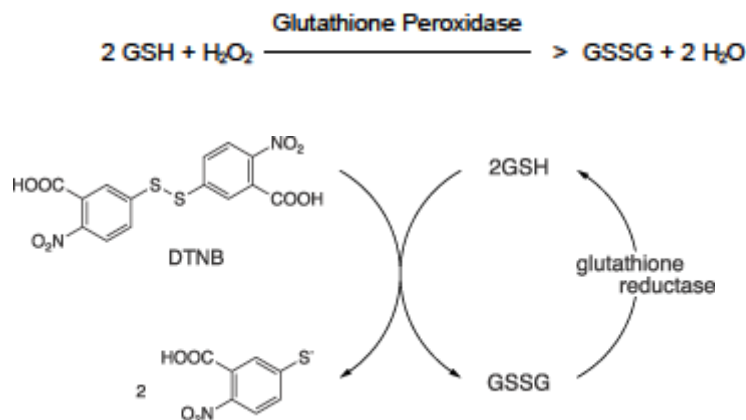
V_{eks} = ukupna zapremina dodatog ekstrakta (0,1 ml)

$\Delta A_{340} / \text{min}$ - srednja promena apsorbance u minuti na 340 nm

6.22 mM⁻¹cm⁻³ - ekstincioni koeficijent za NADPH na 340 nm u kiveti širine 1cm

4.8.11. Određivanje aktivnosti glutathion peroksidaze (GSH-Px: EC 1.11.1.9) (Edwards, 1996)

Metoda se zasniva na reakciji oksidacije redukovanog GSH do oksidovane GSSG forme posredstvom glutathion peroksidaze, gde se potom prati smanjenje redukovanog GSH, koji se kvantifikuje sa DTNS po poznatom metodu (Imam, 2006).



Slika 56. Oksidacija glutathiona glutathion-peroksidazom i reakcija kvantifikacije GSH sa DTNB

Reagensi:

- **Pufer I: TRIS-HCl:** rastvoriti 3.0285 g i 0.1860 g EDTA u 500 ml destilovane vode i podesiti pH vrednost na 7.6
- **Pufer II:** TRIS: rastvoriti 24.23g TRIS u 500 ml destilovane vode i podesiti pH vrednot na 8.9
- **Glutation redukovani GSH:** 6 mg GSH rastvoriti u 10 ml pufera I
- **DTNB:** rastvoriti 0.0198 g 5,5-ditio-bis (2-nitrobenzojeve kiseline) DTNB u 5 ml MeOH
- **Kumen hidroperoksid:** 5 μ l rastvoriti u 10 ml pufera I

Postupak:

Radne i slepe probe su pripremljene kao u tabeli:

Radna proba	Slepa proba
100 μ l uzorka	100 μ l uzorka
700 μ l pufera I	700 μ l pufera I
100 μ l GSH	100 μ l GSH
100 μ l kumen hidroperoksida	-

Radne i slepe probe su potom inkubirane 10 minuta na 37⁰ C na vodenom kupatilu. Reakcija je zaustavljena dodatko 1 ml 20% trihlorsirćetne kiseline (TCA), potom su probe centrifugirane 10 min na 5000 obrtaja min⁻¹. U odvojene supernatante posle centrifugiranja dodato je još po 2 ml pufera II i 100 μ l DTNB. Probe su snažno promešane na vorteks mešalici i nakon deset minuta očitavana je apsorbancna na 412 nm.

4.9. Pedološke analize zemljišta

U zemljištu su pored spomenutih parametara koji su određeni upotrebom AAS, kao što su sadržaj Mg, Ca, K i teških metala koji su dodati kao kontaminanti (Cd, Ni i Cu), određene i ostale fizičko-hemijske osobine zemljišta. Fizičke-osobine predstavljaju granulometrijski sastav, (distribucija veličine čestica (%)) po međunarodnoj B-pipet metodi pripreme uzoraka u natrijum-pirofosfatu) (Bošnjak et al., 1997) koji ukazuje na teksturu i tip zemljišta, dok su od hemijskih parametara određivani pH u KCl, pH u H₂O, vlaga zemljišta, sadržaj humusa, sadržaj karbonata (volumetrijski pomoću Scheibler-ovog kalcimetra), sadržaj N, P i C. (Hadžić et al., 2004).

4.9.1. Određivanje pH vrednosti zemljišta

Uz pomoć pH-metra (pH/Ion/Cond 750, WTW, Germany) određena je pH vrednost zemljišta pripremljenog rastvaranjem u destilovanoj vodi (dH₂O). Suspenzija zemljišta je pravljena dodavanjem 10

g zemljišta u 25 ml dH₂O. Tokom merenja pH vrednosti, suspenzija zemljišta je mešana na magnetnoj mešalici do postizanja konstantne vrednosti pH.

4.10. Mikrobiološke analize zemljišta

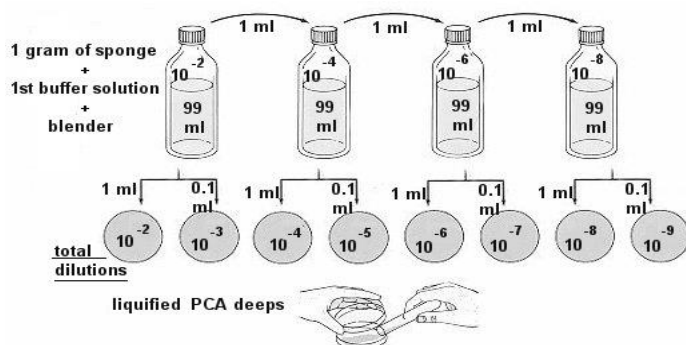
Ukupan broj mikroorganizama opisuje opštu biogenost zemljišta i predstavlja ukupan broj bakterija koje izrastu na zemljišnom agaru ili na nekoj drugoj nediferencijalnoj podlozi, dok se razređenje bira prema svojstvima zemljišta (Govedarica i Jarak, 1993).

Određivanje ukupnog broja mikroorganizama u zemljištu vršeno je indirektnom metodom za određivanje brojnosti mikroorganizama na čvrstim hranljivim podlogama metodom agarnih ploča. Pri tome se vodilo računa o izboru pravilnog razređenja uzorka zemljišta shodno činjenici da različiti tipovi zemljišta svojim fizičko-hemijskim karakteristikama uslovljavaju i različit kvantitativni i kvalitativni sastav mikroorganizama, pa se tako veća razređenja (10^{-6} , 10^{-7}) koriste ukoliko su ona bogata organskom materijom, dok se za peskovita ili kisela zemljišta koriste manja razređenja (10^{-3} , 10^{-4}). Zasejavanje je vršeno u 3-5 ponavljan

4.10.1. Određivanje ukupne brojnosti oligotrofnih bakterija

Za određivanje ukupne brojnosti bakterija korišćena je odgajivačka metoda na čvrstim podlogama. Serije razređenja su pripremljene tako što se odgovarajuća količina zemljišta rastvori u rastvoru za razređenje (0,1% rastvor Na-pirofosfata- NaPP u destilovanoj vodi). Odmerenih 5 g zemljišta se rastvori mešanjem u 47,5 ml NaPP i po 1 ml početne suspenzije se prenese u 9 ml rastvora za rezređenje u epruvetama kako bi se napravile serije rezređenja koncentracija od 10^{-2} do 10^{-6} (slika 57).

Iz pripremljenih serija razređenja zasejavano je po 0,1 ml inokuluma na hranljive podloge meso-peptonkog agara (MPA) u 3-5 ponavljanja. Zasejavanje uzorka je vršeno u 2 ponavljanja u 5 različitih razređenja. Inkubacija traje 5-7 dana na 26°C. Za određivanje ukupne brojnosti bakterija korištena je nespecifična podloga MPA (Torlak, Srbija).



Slika 57. Postupak pravljenja serije razređenja

Nakon završene inkubacije u obzir su se uzimala samo ona razređenja na kojima se broj bakterijskih kolonija kretao između 30 i 300 kolonija po petri ploči. Dobijeni rezultati su izraženi po 1 g suvog zemljišta.

Na osnovu izračunate mase suvog zemljišta u 5 g vlažnog zemljišta, u 1 ml različitih razređenja izračunat je broj bakterijskih kolonija u 1 g suvog zemljišta pomoću formule:

Broj kolonija/masa suvog zemljišta (g) iz datog razređenja=broj bakterijskih kolonija/1 g suvog zemljišta

4.10.2. Određivanje brojnosti filametoznih gljiva

Isolacija i određivanje broja filametoznih gljiva vrši se pomoću odgajivačke metode na agaroznoj podlozi. Serije razređenja se prave kao i pri određivanju brojnosti bakterija u zemljištu, i u obzir se uzima ono razređenje pri kojem je broj kolonija između 30 i 300 u jednoj petri ploči. Inokulacija uzoraka je rađena na 3-5 petri ploča. Inkubacija zasejanih uzoraka traje 5-7 dana na temperaturi od 26°C. Za određivanje ukupne brojnosti filametoznih gljiva u zemljištu korišćena je roze bengal-streptomicin agarna podloga koja ima sledeći sastav:

Roze bengal-streptomicin agar:

Glukoza	10g
Pepton	5g
KH ₂ PO ₄	1g
MgSO ₄ x7H ₂ O	0,5
roze Bengal	0,033g
Agar	15g
rastvor streptomicina	1ml
dH ₂ O	1000ml

Sadržaj vlage u zemljištu i masa suvog zemljišta u 5 g vlažnog zemljišta u 1 ml različitih razređenja određena je na isti način kao što je navedeno kod bakterija. Broj gljiva u 1 g zemljišta je računat prema formuli:

Broj kolonija gljiva/1g suvog zemljišta=broj kolonija gljiva/masa suvog zemljišta (g) za dato razređenje

4.10.3. Određivanje ukupne brojnosti algi

Za određivanje ukupne brojnosti algi korišćena je odgajivačka metoda na tečnoj podlozi, odnosno tehnika najverovatnijeg broja (eng. the most probable number method-MPN). MPN procedura je statistički zasnovan metod za gajenje algi u različitim razređenjima koji ima za cilj procenu rasta algi pri različitim razređenjima. Promeni boje podloge ili formiranje gasa služi kao indikator prisustva algi u

podlozi. Rastvor zemljišta u seriji razređenja je pripremljen na isti način kao kod određivanja broja bakterija i filamentoznih gljiva. Inkubacija zasejanih uzoraka zemljišta je trajala 3-4 nedelje na sobnoj temperaturi (oko 25°C) u prisustvu izvora svetlosti.

Podloga korišćena za određivanje broja algi je gotova **broth** podloga (Fluka, Switzerland). Nakon inkubacije, mikroskopiranjem uzoraka očitani su brojevi algi na osnovu promene boje podloge. Brojnost algi je izračunata prema tablicama McCradya. Prema broju pozitivnih epruveta, formira se karakterističan broj. Prva cifra karakterističnog broja je broj pozitivnih epruveta u razređenju koje je dalo najveći broj pozitivnih odgovora u toj seriji razređenja prema ponavljanjima. Sledeće dve cifre karakterističnog broja grade brojevi pozitivnih epruveta iz sledeća dva razređenja ili njihov zbir. Karakterističan broj odgovara najverovatnijem broju mikroorganizama u razređenju koje je dalo najveći broj pozitivnih epruveta.

4.11. Fiziološke analize listova

4.11.1. Neto fotosinteza, transpiracija i stomatalna provodljivost (Pajević et al., 2009)

Neto fotosinteza, transpiracija i stomatalna provodljivost su mereni pokretnim aparatom koji prati razmenu gasova zasnovanom na infracrvenoj detekciji, proizvođača "ADC Bioscientific Ltd. LCPro+". Parametri su mereni na 3 biljke po tretmanu, u 3 ponavljanja po svakoj biljci, u periodu između 09:00 i 11:00 časova ujutro, po sunčanom i vedrom vremenu. List biljke se postavljao u komoru aparata, a vlažnost vazduha, temperatura vazduha i koncentracija CO₂ u mernoj komori aparata odgovarali su spoljašnjim (ambijentalnim) uslovima sredine, dok je fotosintetička aktivna radijacija (eng. photosynthetic active radiation - PAR) bila podešena na 1000 μmol m⁻² s⁻¹ (Pajević et al., 2009).

A – neto fotosinteza (μmol CO₂ m⁻² s⁻¹),

E – transpiracija (mmol H₂O⁻² s⁻¹),

gs – stomatalna provodljivost (mol H₂O m⁻² s⁻¹),

WUE – efikasnost korišćenja vode (μmol CO₂ mmol⁻¹H₂O).



Slika 58. Instrument za merenje razmene gasove i parametara fotosinteze (Lpro+)

4.11.2. Određivanje sadržaja pigmentata hloroplasta (Sairam et al., 2004)

Sadržaj karotenoida, hlorofila a i b određen je po metodi Sairam i saradnika (2004), koja predstavlja modifikovanu verziju dobro poznatog metoda određivanja pigmentata hloroplasta koju su prvi opisali Lichtenthaler i Wellburn, (1983). Sadržaj pigmentata hloroplasta određen je u listovima klonova topola uzorkovanim nakon završetka oglada na biljkama gajenim u polukontrolisanim uslovima. Od prosečnog uzorka svežeg biljnog materijala odmereno je tri puta po 0.1 g i homogenizovano tučkom u avanu sa 2 ml acetona. Sadržaj je 5 min centrifugiran na 3075 rpm, a zatim je supernatant dekantovan u drugu epruvetu. Talogu je dodato još 2 ml 80% acetona i postupak centrifugiranja i odlivanja supernatanta je ponavljan do obezbojavanja taloga. Supernatant je dopunjen do 10 ml, 80% acetonom. Apsorbanca je očitavana na $\lambda=440, 644$ i 662 nm. Sadržaj pigmentata izražen je kao mg/ g svežeg biljnog materijala (mg/g sv.m).

4.12. Statistička obrada podataka

Svi dobijeni podaci su statistički obrađeni uz pomoć softverskog paketa Statistica 12. Srednje vrednosti između tretmana i klonova testirane su dvofaktorijskom analizom varijanse (ANOVA), a razlike u srednjim vrednostima između analiziranih faktora su upoređene Duncanovim testom za nivo značajnosti ($p<0.05$). Srednje vrednosti u tabelama i na grafikonima označene istim slovom se ne razlikuju značajno, dok se vrednosti obeležene različitim slovom razlikuju za najmanju značajnu razliku koja je utvrđena softverski (eng. the least significant difference-LSD). Vrednosti opadaju prateći alfabetski red.

Tabela 4: Shematski prikaz oglada u (polu)kontrolisanim uslovima A) i pregled korišćenih metoda u radu B)

A) Dizajn oglada u (polu)kontrolisanim uslovima						
Nezavisno promenljive						
Vrsta metala	Koncentracija metala (n * MDK)				Klon topole	Biljni organ
$M^{2+} (NO_3)_2$	MDK (mg/kg)	Kontrole	n=1	n=3		
Ni^{2+}	50	0	50	150	M1	
Cd^{2+}	3	0	3	9	B229	List
Cu^{2+}	100	0	100	300	Pe 19/66	Koren

B) Određivani parametri:	Referenca:
Morfološki parametri: <ul style="list-style-type: none"> • visina, • prečnik, • biomasa organa 	
Fiziološki parametri vezani za razmenu gasova <ul style="list-style-type: none"> • ukupna fotosinteza, • brzina transpiracije, • stomalna provodljivost, • stepen iskorišćenja vode-WUE 	Pajević et al., 2009
Parametri fitoekstrakcije <ul style="list-style-type: none"> • Akumulacija Ni, Cd i Cu • Biokoncentracijski faktor (BCF) • Translokacijski factor 	Standardna AAS analiza i priprema MW digestija Wu et al., 1997; Wang et al., 2004
Mineralna ishrana i sadržaj (ne)metala: <ul style="list-style-type: none"> • Mg • Ca • P • N • C 	Standardna AAS analiza i priprema MW digestija Standardna CHN analiza
Kvantifikacija metabolita: <ul style="list-style-type: none"> • Indol-3-sirćetna kiselina • Abscisinska kiselina • Slobodni i konjugovani poliamini (Put, Spm, Spd) • Redukovani glutation • Pigmenti hloroplasta (Chl a, Chl b, karotenoidi) • Ukupni fenoli • Ukupni flavonoidi • Rastvorni proteini • Malonildialdehid (MDA) (lipidna peroksidacija) 	Rapparini et al., 2002; Chen et al. 1988 Barkawi i Cohen, 2010 (GC/MS; SPE) Scaramagli et al., 1999 (HPLC/DAD) Imam et al., 2006 Sairam et al., 2004 Singleton et al., 1999 Chang et al., 2002 Bradford, 1973 Janero, 1990
Antioksidantne i “skevindžer” sposobnosti ekstrakata: <ul style="list-style-type: none"> • Sposobnost “hvatanja” OH radikala • Sposobnost “hvatanja” NO radikala • Sposobnost neutralizacije DPPH radikala (DPPH test) • Sposobnost neutrizacije ABTS⁺ radikala (TEAC test) • Sposobnost redukcije Fe³⁺ jona (FRAP test) 	Verma et al., 2010 Tsai et al., 2007 Soler Rivas et al, 2000 Miller i Rice-Evans, 1997 Benzie i Strain, 1999
Enzimske aktivnosti: <ul style="list-style-type: none"> • Gvajakol-peroksidaza (POD) • Superoksid-dizmutaza (SOD) • Glutation peroksidaza (GPx) • Glutation reduktaza (GR) 	Simon et al., 1974 Fredovich et al., 1983 Edwards et al., 1996 Smith et al., 1988

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1. Fizičko-hemijska svojstva zemljišta

Fizičko-hemijske karakteristike zemljišta određene su standardnim metodama koje se koriste u laboratoriji Instituta za nizijsko šumarstvo i životnu sredinu u Novom Sadu. Izabrano zemljište je tipa fluvisol, a po teksturnom sastavu je peskovita ilovača. U proseku sadržaj ukupnog peska je bio 58,3 %, dok je sadržaj ukupne gline bio 41,7 %. Prosečni sadržaj humusa je bio 2,28 %, a kretao se u granicama od 2,19 do 2,37 %. Odabrano zemljište sadrži visok procenat karbonata, dok je pH zemljišta slabo alkalno, obezbeđeno dovoljnim količinama osnovnih hranljivih elemenata azota, fosfora i kalijuma. Opisane karakteristike (tabela 5.) ukazuju na povoljan vodno-vazdušni režim zemljišta i omogućavaju nesmetano kruženje vode sa mineralnim materijama.

Tabela 5. Pregled fizičko-hemijskih karakteristika zemljišta izabranog za ogled u kontrolisanim uslovima

Krupan pesak	Sitan pesak	Prah	Koloidna glina	Ukupan pesak	Ukupna glina	Teksturna klasa
0.9	57.4	23.8	18.0	58.3	41.7	Peskovita ilovača

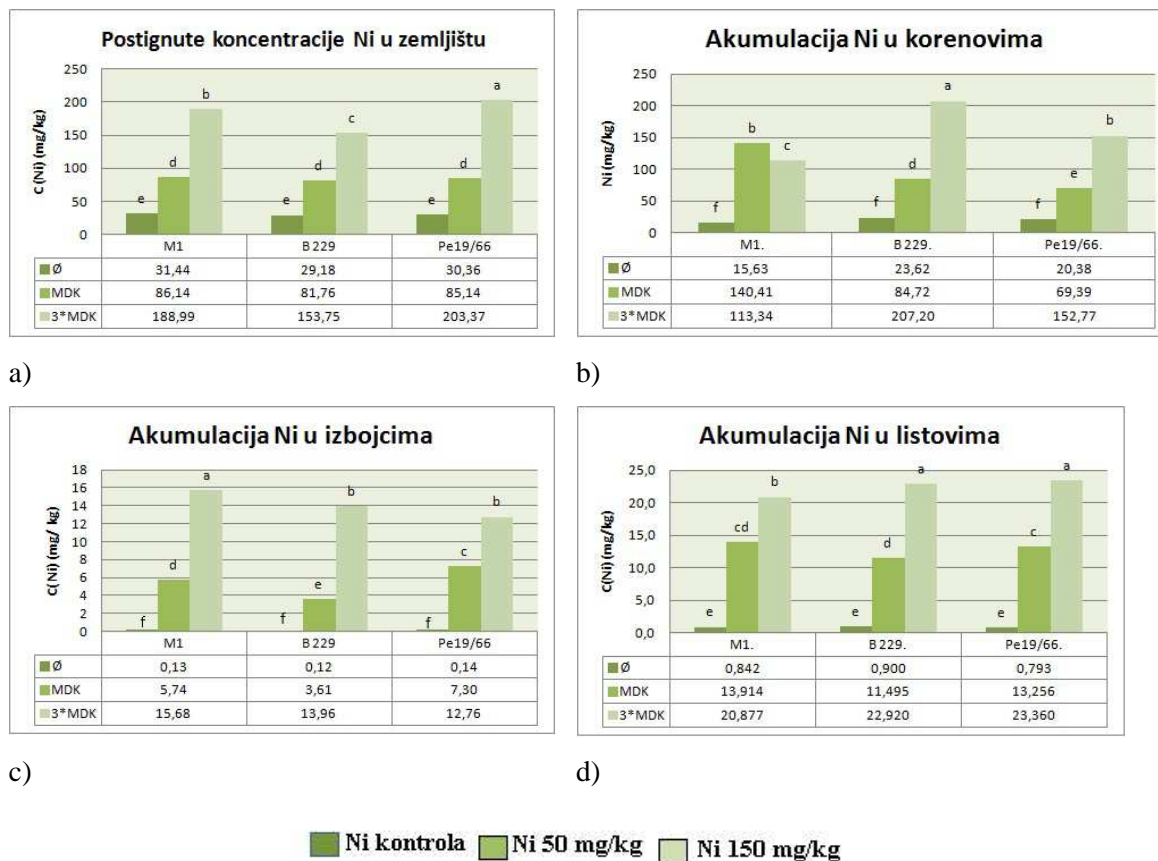
pH		P ₂ O ₅	K ₂ O	humusa	N	CaCO ₃	Mg	Ca
KCl	H ₂ O	mg/kg	mg/kg	%	%	%	mg/g	mg/g
7.5	8,0	9,4	7,5	2,19	0,129	15,45	10, 52	12, 87

Računski determinisane koncentracije nitritnih soli teških metala (Cu, Ni i Cd) u zemljištu su nakon dva meseca stabilizacije mikroflorom i eksperimentalno potvrđene primenom AAS. Koncentracije teških metala u zemljištu su odgovarale maksimalnim dozvoljenim koncentracijama za dati metal (MDK (Ni)=50 mg/kg; MDK (Cu)=100 mg/kg; MDK (Cd)=3 mg/kg), i trostruko višim vrednostima od maksimalno dozvoljenih za odabrane metale, što za Ni, Cu i Cd iznosi 150, 300 i 9 mg/kg.

5.2. Akumulacija nikla po organima i procena potencijala za fitoekstrakciju klonova topola

Dosada objavljeni literaturni podaci o koncentracijama akumuliranih teških metala i njihovoj distribuciji su veoma raznovrsni, a često i kontradiktorni, zbog toga što su primenjivani različiti eksperimentalni uslovi. Tako, različiti metali ili oblik u kom je metal dodat, različite koncentracije i kombinacije metala, vreme izloženosti, kao i supstrat na kojem se prati proces fitoekstrakcije utiču i modifikuju biodostupnost metala za različite biljne vrste ili različite klonove iste vrste biljaka (Zacchini et al., 2009). Na koncentracije akumuliranih metala u biljkama, posebno utiče i tip eksperimenta, odnosno da li je ogled praćen u kulturi tkiva, hidroponim ili zemljišnim kulturama ili u polju u prirodnim uslovima. Na sposobnost biljaka da vrše fitoekstrakciju metala iz zemljišnog

medijuma, značajno utiču karakteristike zemljišta, kao što su pH, katjon-izmenjivački kapacitet zemljišta, sadržaj organskih materija, gline, vlaga zemljišta, granulometrijski sastav, kao i koncentracije drugih mikro- i makroelementa (Singel i Singel, 1986; Kukier et al., 2004).



Slika 59. Akumulacija Ni²⁺ u zemljištu i distribucija usvojenog Ni²⁺ kroz organe različitih klonova topola

Nakon ispitivanja veštački kontaminiranog zemljišta utvrđeno je da je zemljište i pre dodavanja nitratnih soli nikla u sebi sadržalo oko 30 mg/kg nikla, te da je po dodatku 50 mg/kg Ni, koliko je maksimalna dozvoljena koncentracija za Ni (MDK(Ni)), koncentracija prvog tretmana iznosila oko 80 mg/kg, dok je po dodatku trostruko veće koncentracije od maksimalne dozvoljene za nikel u zemljištu iznosila oko 180 mg/kg (slika 59a). Nakon određivanja sadržaja akumuliranih metala u različitim organima ispitivanih klonova topola, vidi se da su najveće koncentracije Ni usvojene od strane korena, a da je redosled organa po koncentraciji usvojenog nikla: koren > list > izbojak za sve ispitivane klonove topola. Sa grafikona 59b, se može zapaziti da su se pri tretmanu niže koncentracije Ni (50 mg/kg), korenovi klona M1 pokazali najefikasnijim u procesu fitoekstrakcije, akumulirajući čak 140,41 mg/kg nikla, dok su klonovi B229 i Pe 19/66 pokazali statistički značajno manji fitoekstrakcijski potencijal akumulirajući u korenovima 84,72 i 69,39 mg/kg nikla. Pri tretmanu niklom koncentracije od 150 mg/kg u zemljištu (3*MDK (Ni)), najviša akumulacija nikla dokazana je

u korenovima klona B229, čak 200,7 mg/kg nikla, dok klon M1 koji se pokazao najefikasnijim pri tretmanu nižom koncentracijom je pri višoj koncentraciji nikla akumulirao svega 113,34 mg/kg Ni u korenovima, što je čak manje nego pri tretmanu nižom koncentracijom nikla. Klon Pe 19/66 koji je pri tretmanu nižom koncentracijom bio najmanje efikasan u usvajanju nikla, pri tretmanu višom koncentracijom je pokazao najveću sposobnost akumulacije nikla u listovima, koja iznosi 23,36 mg/kg pri tretmanu od 150 mg/kg nikla u zemljištu.

Radi lakšeg praćenja rezultata uvedeni su pojmovi biokoncentracijski faktor (BCF) i faktor translokacije (TF). Zayed et al., (1998), razlikuju biokoncentracijske faktore u korenovima i u nadzemnim delovima (izbojci +listovi) i računaju ih po formulama:

BCF=Koncentracija metala u korenu (ili nadzemnim delovima biljke (korenu i izbojku) (mg/kg)/ koncentracija metala u medijumu (mg/kg)

TF= koncentracija metala u nadzemnim delovima biljke (mg/kg) x 100/ koncentracija metala u korenovima (mg/kg)

Ovi parametri su korisni za razlikovanje potencijala fitoekstrakcije među različitim biljnim vrstama ili klonovima iste vrste, koji su izloženi istim uslovima životne sredine. Međutim, kako ovi faktori ne uzimaju u obzir biomasu, vreme izloženosti zagađivaču, kao ni uticaj medijuma u kom se fitoekstrakcija prati, ovi parametri nisu uporedivi sa onima dobijenim u drugim eksperimentalnim uslovima kao npr. iz kulture tkiva ili hidroponima, jer dodatni faktori unutar zemljišta definišu biodostupnost metala za biljke. Pregled BCF za koren i nadzemne delove, kao i TF za ispitivane klonove topola dat je u tabeli 6.

Tabela 6. Pregled biokoncentracijskih i translokacijskih faktora nikla u klonovima topola

Klon topole	Klon M1		Klon B229		Klon Pe 19/66	
	MDK	3* MDK	MDK	3* MDK	MDK	3* MDK
Tretman (Ni)						
BCF korena	1,63	0,60	1,04	1,35	0,81	0,75
BCF nadzemnih organa	0,23	0,19	0,19	0,24	0,24	0,18
TF	14,06	32,27	17,89	17,91	29,69	24,62

Rezultati pokazuju da postoje značajne razlike u sposobnosti fitoekstrakcije Ni među ispitivanim klonovima topola. BCF i TF vrednosti pokazuju varijacije u zavisnosti od koncentracije metala u medijumu. Tako, pri nižoj koncentraciji nikla (50 mg/kg) korenovi klona M1 su se pokazali kao najefikasniji u akumulaciji Ni, dok su pri višoj koncentraciji nikla (150 mg/kg) korenovi klona B229 akumulirali najvišu koncentraciju Ni i u nadzemnim organima i korenu. BCF korenova klona M1 je pri povećanju koncentracije tretmana nikla u zemljištu opao oko 2.5 puta, te uprkos najvećem faktoru translokacije (TF=32,27), koncentracije akumulirane u nadzemnim delovima su tek osrednje. Klon topola Pe19/66 je pokazao najmanju akumulaciju jona nikla u korenu pri obe koncentracije nikla (nizak BCF za koren), ali zahvaljujući visokim vrednostima translokacionog faktora, pokazao se

najefikasnijim za remedijaciju zemljišta umereno opterećenim niklom, dok pri višim koncentracijama nikla u zemljištu, njegov BCF za nadzemne delove opada. Svi navedeni rezultati ukazuju na značajnu sposobnost akumulacije nikla u korenovima klonova topola, gde je BCF faktor kod klonova M1 i B229, čak viši od 1, što bi ih po podeli po Brooks i saradnicima (1998), čak svrstalo u hiperakumulatore. Međutim, zbog veoma niske sposobnost translokacije metala iz korena u nadzemne delove ukupan proces fitoekstrakcije se značajno niži nego kod nekih zeljastih hiperakumulatorskih biljaka iz familija *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Buxaceae*, *Euphorbiaceae*, *Flacourtiaceae*, *Rubiaceae* i *Violaceae* od kojih neke imaju sposobnost akumulacije nikla u nadzemne delove i preko 1000 mg/kg (Dalton et al., 1985). Ipak, prednost topola u odnosu na zeljaste hiperakumulatorske biljke je drastično veća biomasa topola i to što su topole višegodišnje biljke koje ne ulaze u lanac ishrane. Da se više od 50% apsorbiranog Ni zadržava u korenu potvrdili su i Cataldo i saradnici (1978) što je objašnjeno nagomilavanjem nikla u katjonskim jonoizmenjivačkim mestima zidova ksilema parenhimskih ćelija i imobilizacijom u vakuolama korena (Seregin i Kozhevnikova 2006). Najveći pregled Ni hiperakumulatorskih biljaka dali su Raskin i Ensley (2000), a spisak vrsta kao i akumulirane vrednosti nikla su prikazane u tabeli 7.

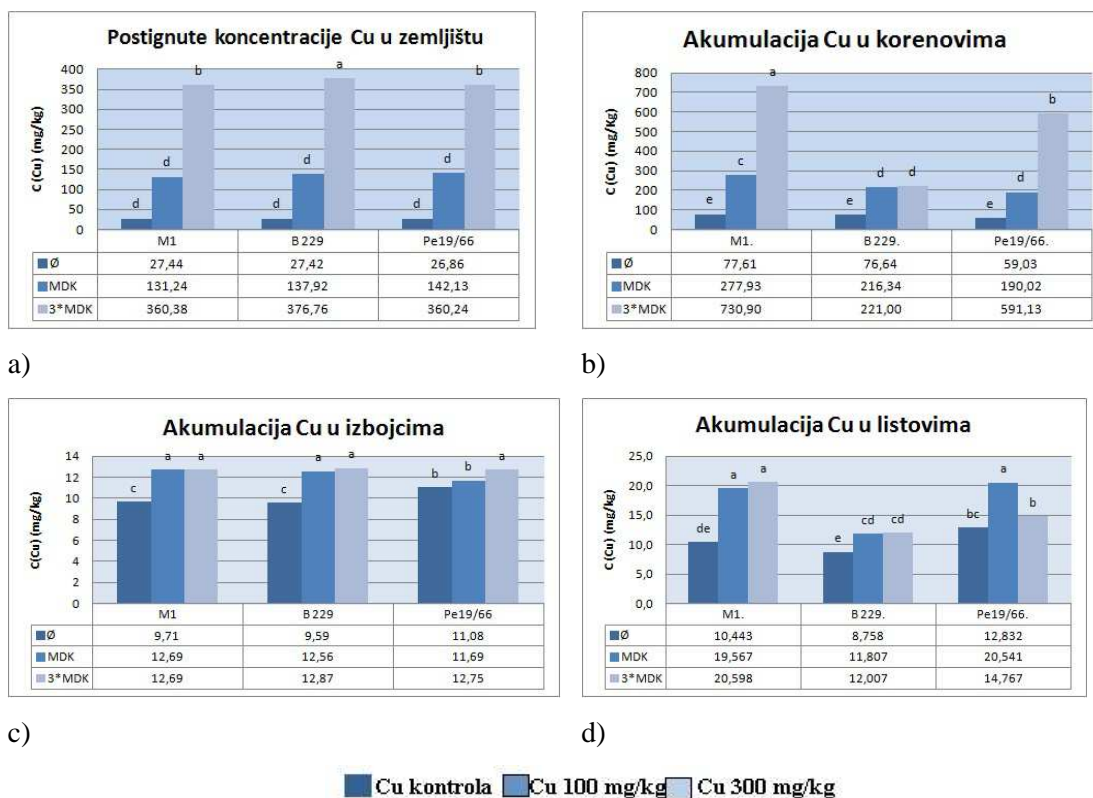
Tabela 7. Pregled hiperakumulatorskih zeljastih vrsta i akumuliranih koncentracija Ni (Seregin i Kozhevnikova, 2006)

Familija, vrsta	Maksimalna akumulirana koncentracija Ni (mg/kg)	Familija, vrsta	Maksimalna akumulirana koncentracija Ni (mg/kg)
Acantaceae		Meliaceae	
<i>Blepharis acuminata</i>	2000	<i>Walsura monophylla</i>	7090
<i>Justicia lanstykii</i>	2690	Myristiaceae	
<i>Lophostachys villosa</i>	1890	<i>Myristica laurifolia</i>	1100
<i>Phidiasia lindavii</i>	1850	Myrtaceae	
<i>Ruellia geminiflora</i>	3330	<i>Mosiera araneosa</i>	5030
Anacardiaceae		Ochnaceae	
<i>Rhus wildii</i>	1600	<i>Ouratea nitida</i>	1700
Asteraceae		<i>Ouratea striata</i>	8190
<i>Berkheya coddii</i>	11 660	Oncothecaceae	
<i>Dichoma niccolifera</i>	1500	<i>Oncotheca balansae</i>	2500
<i>Gochnatia crassifolia</i>	1120	Poaceae	
<i>Koanophyllon grandiceps</i>	6240	<i>Trisetum</i>	
<i>Leucanthemopsis alpina</i>	3200	<i>distichophyllum</i>	1710
<i>Senecio pauperculus</i>	1900	Ranunculaceae	
<i>Shafera platyphylla</i>	1890	<i>Ranunculus glacialis</i>	1260
<i>Solidago hispida</i>	1020	Rubiaceae	
Brassicaceae		<i>Phyllomelia coronata</i>	25 540
<i>Allysum</i> (48 species)	1280–29 400	<i>Psychotria clementis</i>	19 090
<i>Cardamine resedifolia</i>	3270	<i>P. constivenia</i>	38 530
<i>Cochlearia aucheri</i>	17 600	<i>P. douarrei</i>	19 900
<i>Peltaria emarginata</i>	34 400	<i>P. glomerata</i>	10 250
<i>Streptanthus polygaloides</i>	14 800	<i>P. vanhermanii</i>	35 720
<i>Thlaspi</i> (23 species)	2000–31 000	Sapotaceae	
Caryophyllaceae		<i>Planchonella oxyedra</i>	19 600
<i>Minuartia laricifolia</i>	2710	<i>Sebertia acuminata</i>	11 700
<i>Minuartia verna</i>	1390	Saxifragaceae	
Clusiaceae		<i>Saxifraga</i> (3 species)	2970–3840
<i>Garcinia bakeriana</i>	7440	Scrophulariaceae	

Dokazano je da se apsorpcija Ni^{2+} kod *Datura innox* povećala usled primene EDTA (etilendiaminotetrasirćetne kieline) u zemljištu (Jean et al., 2008), ali i da dužina godišnjih doba, geohemijske osobine zemljišta i metode sadenja takođe utiču na unos Ni u biljke (Antoniadis et al., 2008; McGrath et al., 2006; Yanai et al., 2006). Prema Molasu, (2001) fitotoksičnost i akumulacija u kupusu opada u sledećem nizu posle tretmana različitim hemijskim oblicima jona Ni^{2+} : $\text{Ni(II)Glu} > \text{NiSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O} > \text{Ni(II) citrat} > \text{Ni(II)-EDTA}$. Sumarno, unos Ni^{2+} u biljku zavisi od koncentracije (Cataldo et al., 1978), biljnog metabolizma, kiselosti zemljišta ili hranjivog rastvora (Kukie et al., 2004; Antoniadis et al., 2008) prisustva drugih metala (Luo i Rimmer 1995; Podar et al., 2004) i kompozicije organskih jedinjenja u zemljištu (Burke et al., 2000; Jean et al., 2008).

5.3. Akumulacija bakra po organima i procena potencijala za fitoekstrakciju klonova topola

Zbog postojanja metala bakra i u netretiranom zemljištu, nakon prskanja zemljišta rastvorom bakar-nitrata heksahidrata koncentracijom koja je dodata radi postizanja tretmana od MDK (Cu), 100 mg/kg i 3* MDK (Cu), 300 mg/kg, realne koncentracije u zemljištu su i prevazišle željene vrednosti, za vrednost bakra koja je inicijalno postojala u zemljištu. Koncentracije tretmana bakrom u zemljištu prikazane su na slici 60a. Dobijene koncentracije bakra u kontrolnom zemljištu iznosile su 27 mg/kg, u tretmanima nižom koncentracijom bakra oko 130 mg/kg, dok za one sa višom koncentracijom oko 360 mg/kg, što je u proseku za oko 20 % više nego što je predviđeno. Joni bakra su pokazali najveću akumulaciju u korenu, zatim listovima, dok su najmanje koncentracije akumulirane u izbojcima klonova topola. Klon M1, dosegao je najveću akumulaciju bakra u korenovima pri oba tretmana, te je akumulirao 277,93 i 730,3 mg/kg bakra, pri tretmanima nižom i višom koncentracijom. Koncentracije bakra u korenovima kontrolnih biljaka su se kretale oko 70 mg/kg, dok su u listovima i izbojcima netretiranih biljaka, koncentracije bakra iznosile oko 10 mg/kg suve materije (slika 60b). U korenovima tretiranih biljaka koncentracije bakra su se kretale u rasponu od 190-730 mg/kg, a u listovima od 11-21 mg/kg bakra. Ove vrednosti ukazuju da je pri tretmanima drastično veći deo bakra skoncentrisan u korenu, nego u nadzemnim delovima biljke, što opet ukazuje na problem translokacije metala kroz biljku u uslovima koji su bili zadati u ogledu. Klonovi M1 i Pe 19/66 su pokazali doznju zavisnost u pogledu akumulacije bakra u korenovima, te je trostruko povećanje koncentracije bakra u zemljištu izazvalo direktno povećanje u koncentraciji akumuliranog bakra u korenu, dok kod klona B229 to nije slučaj, te nema statistički značajne razlike u sadržaju bakra u korenovima između tretmana nižom i višom koncentracijom bakra. Takođe, različite koncentracije bakra u zemljištu nisu izazvale statistički značajne promene u akumulaciji bakra ni kod listova (slika 60b) ni izbojaka (slika 60c) klonova topola M1 i B229, dok se sadržaj bakra u listovima klona Pe 19/66 pri tretmanu višom koncentracijom bakra, smanjio u poređenju sa tretmanom niže koncentracije bakra.



Slika 60. Akumulacija Cu^{2+} u zemljištu i distribucija usvojenog Cu^{2+} kroz organe različitih klonova topola

Prema BCF bakra u korenu, koji je iznosio oko 2, klon topole M1 se pokazao kao najefikasniji u fitoekstrakciji bakra. Pri povećanju koncentracije bakra u zemljišnom medijumu, u ovom klonu nije došlo do statistički značajne promene u BCF. Međutim, povećanje koncentracije bakra u zemljištu je kod klona B229 izazvalo drastičan pad vrednosti BCF za koren, dok se kod klona Pe 19/66, BCF korena pod uticajem 300 mg/kg Cu povećao u odnosu na BCF faktor pri 100 mg/kg bakra (tabela 8). Klon Pe 19/66 se pokazao kao klon sa najvišim translokacijskim faktorom, te iako je akumulacija bakra u korenovima znatno niža nego kod klona M1, zahvaljujući visokoj vrednosti TF (16,77), efikasnost klona Pe19/66 u fitoekstrakciji bakra, sudeći prema BCF u nadzemnim delovima, je skoro ista kao i kod klona M1, koji se pokazao kao najefikasniji. Biokoncentracijski i translokacijski faktori u klonovima topola za bakar prikazani su u tabeli 8.

Bakar je vrlo važan mikronutrient, koji u koncentracijama od 1-5 mg/kg izaziva simptome deficijencije, dok su odgovarajuće koncentracije od 6-12 mg/kg, a toksične iznad 20-30 mg/kg jona bakra po suvoj masi (Marschner, 1995). Međutim, postoje vrlo izražene razlike u pogledu sposobnosti usvajanja Cu^{2+} u zavisnosti od biljne vrste. Određene metalofite mogu da akumuliraju čak i do 1000 mg Cu/kg u listovima (Morrison et al., 1981). Kako su slobodni metali potencijalno opasni, njihov unos i ćelijska koncentracija moraju biti striktno regulisani. Joni Cu^{2+} ima visok afinitet prema peptidima i sulfhidrilnim, karboksilnim, i fenolnim grupama pa je Cu^{2+} u živim ćelijama obično

prisutan samo u vezanoj formi. Prema nekim proračunima, koncentracija slobodnog Cu^{2+} u kvascu je pri tretmanu sa $70 \mu\text{M}$ Cu manja nego jedan jon po ćeliji, što drugim rečima znači da nevezani Cu^{2+} u ćeliji praktično i ne postoji (Rea et al., 1999).

Tabela 8. Pregled biokoncentracijskih i translokacijskih faktora bakra u klonovima topola

Klon topole	Klon M1		Klon B229		Klon Pe 19/66	
	MDK	3* MDK	MDK	3* MDK	MDK	3* MDK
BCF korena	2,12	2,03	1,57	0,59	1,34	1,64
BCF nadzemnih organa	0,25	0,09	0,18	0,07	0,23	0,08
TF	11,62	4,56	11,27	11,52	16,99	4,67

Kao posledica industrijskog zagađenja, bakar je često prisutan u povišenim koncentracijama u zemljištu, stoga veliki broj radova prati toksičan uticaj bakra na biljke u poljskim ogledima na zemljištima koja su već opterećena visokim koncentracijama bakra, često u okolini rudnika i topionica, pre nego u kontrolisanim uslovima. Tako su u radu Lukaszewski et al., (1993) ispitivali efekte industrijskog zagađenja bakrom, olovom, cinkom i kadmijumom kod otpornih (*Populus marilandica*) i osetljivih (*P. balsamifera*) topola, gde je primećena značajno viša akumulacija metala kod *Populus marilandica* u poređenju sa *P. balsamifera* i okarakterisan radijalni patern raspodele bakra oko ksilemskih prstenova.

Castiglione i saradnici (2009) su objavili rad u kojem su pratili korelaciju akumuliranih metala sa sadržajem konjugovanih i slobodnih poliamina, kao i klonalne razlike u kapacitetu preživljavanja 168 klonova topola vrsta *Populus alba* i *P. nigra* na zemljištima teško zagađenim bakrom i cinkom na severu Italije. U šest izdvojenih klonova topola zapažene su značajne razlike u koncentracijama akumuliranog bakra u izbojcima i korenovima, među kojima se klon topole (AL35) isticao drastično višom akumulacijom oba metala u korenovima. U radu je dokazana visoka korelacija sadržaja poliamina u listovima sa koncentracijom metala i visoka varijabilnost u akumulaciji metala koja zavisi od klona, biljnog organa i vrste metala.

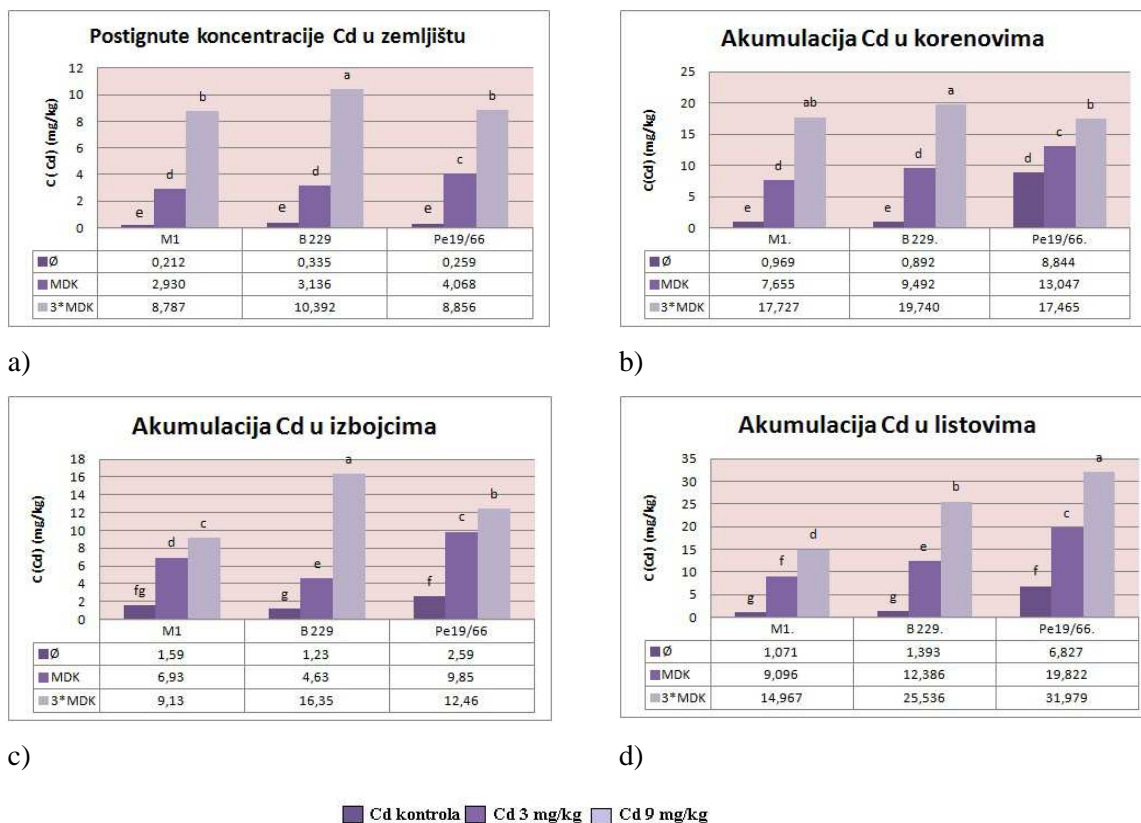
U svom radu, Wang i Yia, (2010) su veštački kontaminirali zemljište kombinacijom metala (Cd, Cu i Zn) u koncentracijama od 1.5, 100, and 200 mg/kg, te zabeležili akumulaciju Cu od 4.11 and 14.55 mg/kg u listovima i korenovima topola vrste *Populus canadensis* Moench, što je značajno viša vrednost u poređenju sa netretiranim kontrolama. Koncentracija metala akumulirana iz zemljišta u nadzemne delove opadala je se po sledećem redosledu $\text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$. Topole *Populus canadensis* Moench su pokazale više koncentracije bakra u nadzemnim tkivima, što nije bio slučaj u našem istraživanju gde je viša koncentracija akumuliranog bakra zabeležena u korenovima nego u listovima. Prema proceni iz ovog istraživanja, da bi se vrednosti ovih metala dovele u granice dozvoljenih koncentracija u zemljištu, proces fitoremedijacije Cd^{2+} i Cu^{2+} iz ovog zemljišta trebalo bi

da traje 56 i 245 godina, dok je procenjeno vreme fitoekstrakcije arišom kao vrstom koja nije tako efikasna u procesu akumulacije metala, za date metale iznosilo 211 i 438 godina (Wang i Yia, 2010).

Suprotno rezultatima dobijenim u našem istraživanju, gde su biokoncentracijski faktori (BCF) kod korenova obe vrste topole i *P. deltoides* i *P. euramericana* viši od BCF nadzemnih delova, Borghi i saradnici (2008) su pratili biološke odgovore dve vrste topole *Populus x canadensis* i *P. albe*, pod uticajem visokih koncentracija bakra i zaključili da su topole imale viši BCF i TF u nadzemnim delovima, nego u korenovima u oba varijeteta topola.

5.4. Akumulacija kadmijuma po organima i procena potencijala za fitoekstrakciju klonova topola

Odabrano zemljište sadržalo je niske koncentracije Cd, te su spoljnom aplikacijom rastvora kadmijum-nitrata postignute željene koncentracije metala sa velikom tačnošću, što je i prikazano na grafikonu 61a. Akumulacija kadmijuma po organima različitih klonova topola pokazuje doznu zavisnost, gde sa povećanjem koncentracije metala u zemljištu dolazi do gradijentnog povećanja koncentracije metala u svim biljnim organima. Pri tretmanu od 3 mg/kg kadmijuma u zemljištu, akumulirane vrednosti kadmijuma u korenovima su se kretale u opsegu od 7,6 do 13,04 mg/kg, dok su se koncentracije kadmijuma u listovima kretale u rasponu od 9,09 do 19,82 mg/ kg suve materije (slika 61b).



Slika 61. Akumulacija Cd²⁺ u zemljištu i distribucija usvojenog Cd²⁺ kroz organe različitih klonova topola

Pri tretmanu sa 9 mg/kg kadmijuma vrednosti kadmijuma u korenovima su se kretale u opsegu od 17,4 do 19,7 mg/kg, odnosno u opsegu od 14,96 do 31,97 mg/kg u listovima testiranih klonova topola (slika 61d). Pri tretmanu nižom koncentracijom kadmijuma (3 mg/kg), u korenovima klona Pe 19/66 došlo je do najveće akumulacije metala među klonovima, dok su pri tretmanu višom koncentracijom kadmijuma (9 mg/kg) korenovi klona B229 usvojili najveću koncentraciju ovog metala (19,74 mg/kg). Sa aspekta fitoekstrakcije, do veće klonalne varijabilnosti u akumulaciji kadmijuma došlo je u listovima, nego u korenovima klonova topola. Tako je klon Pe 19/66, koji se pokazao kao najefikasniji klon topola za fitoekstrakciju kadmijuma, akumulirao više nego duplo veće koncentracije ovog metala u listovima i korenovima, u poređenju sa klonom M1. Može se primetiti da biokoncentracijski faktori kod svih ispitanih klonova opadaju sa porastom koncentracije kadmijuma u zemljišnom medijumu (tabela 9.). Za razliku od prethodna dva ispitana metala, Cd²⁺ pokazuje drastično veću mogućnost translokacije, što je preduslov za efikasnu fitoekstrakciju i nagomilavanje metala u nadzemne delove. To potvrđuju i BCF za nadzemne delove, koji su kod svih ispitanih klonova viši nego BCF kod korenova, što nije bio slučaj kod druga dva ispitana metala. Uzimajući u obzir sve ispitivane parametre, može se zaključiti da je klon topole Pe 19/66 najefikasniji u procesu fitoekstrakcije kadmijuma u poređenju sa klonovima B229 i M1 (tabela 9).

Tabela 9. Pregled biokoncentracijskih i translokacijskih faktora kadmijuma u klonovima topola

Klon topole	Klon M1		Klon B229		Klon Pe 19/66	
	MDK	3* MDK	MDK	3* MDK	MDK	3* MDK
BCF korena	2,61	2,02	3,03	1,90	3,21	1,97
BCF nadzemnih organa	5,47	2,74	5,43	4,04	7,30	5,02
TF	210,1	136,3	179,2	212,5	227,3	261,8

U literaturi se može naći veliki broj radova koji prati uticaj zagađenja kadmijumom upravo na topolama koje su zbog svojih osobina pogodne za primenu u fitoremedijaciji. Tako su, Zacchini i saradnici (2009), u svom radu ispitali akumulaciju i translokaciju kadmijuma kod deset klonova topola i šest klonova vrba pri tretiranju klonova koncentracijom od 50 µM Cd u hidroponim kulturama u periodu od tri nedelje. Oni su zabeležili da je značajna količina kadmijuma usvojena od strane ispitivanih klonova, ali su primetili i veliku klonalnu varijabilnost u akumulaciji kadmijuma u korenovima topola. Takođe su objavili da je 95% od ukupnog akumuliranog kadmijuma, skladišteno u korenovima biljke. Klonovi *Populus nigra*, 58-861 i Poli su u njihovom istraživanju pokazali najveću sposobnost akumulacije kadmijuma u korenovima, dok su klon 6K3 (*Populus deltoides* Bartr.) i klon Lux (*Populus alba* L.) pokazali najniže sposobnosti akumulacije ovog metala. Akumulacija kadmijuma u nadzemnim delovima biljke sudeći po nadzemnim BCF je ukazala da se klonovi Poli i Lux ističu najvećom sposobnošću da akumuliraju kadmijum u listove i izbojke topola, usled čega su TF ovih klonova pokazali najviše vrednosti. Autori ističu da u poređenju sa vrbama, topole imaju

veću klonalnu varijabilnost u akumulaciji kadmijuma i pokazuju duplo bolju akumulaciju kadmijuma od vrba, dok je sposobnost translokacije kadmijuma u nadzemne delove mnogo veća kod klonova vrba, a varijabilnost među klonovima više homogena (Zacchini et al., 2009).

Drugi autori, Dai et al. (2013) su ispitivali toleranciju, akumulaciju i translokaciju sive topole *Populus canescens* (hibrida *Populus tremule* L. x *Populus alba* L.) u hidroponom eksperimentu, gde su topole bile izložene opsegu koncentracija od 0, 10, 30, 50 i 70 μM kadmijuma u trajanju od 28 dana i praćena je akumulacija metala i faktori BCF i TF. Autori su ustanovili da se akumulacija kadmijuma razlikuje po organima i kreće po sledećem redosledu: korenovi > drvo > kora > listovi, gde je akumulacija Cd^{2+} u korenovima ponegde veća i do 20 puta nego u kontrolnim biljkama, a akumulacija u listovima viša 11 puta nego u netretiranim kontrolama. Topole sa malim translokacijskim faktorom i velikom sposobnošću da akumuliraju metale u podzemnim organima su značajne za procese rizostabilizacije i rizofiltracije, čime sprečavaju jone Cd^{2+} da napusti zemljište i vrše dalju kontaminaciju životne sredine, podzemnih voda i dr. (Luković et al., 2012).

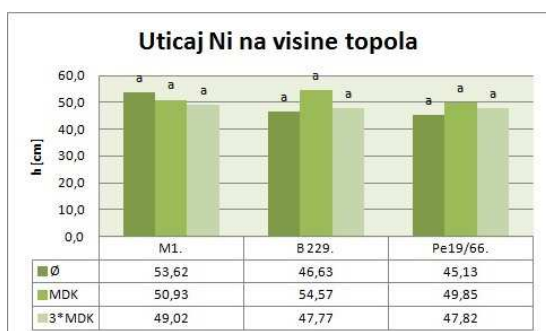
Značajan doprinos u ovoj oblasti dali su He et al., (2013), koji su poredili toleranciju šest različitih vrsta topola na jone Cd^{2+} u koncentraciji od 200 μM na peskovitom zemljištu u trajanju od 20 dana. U svom istraživanju, pored biokoncentracijskih i translokacijskih faktora za kadmijum, pratili su i mehanizme tolerancije, analizirajući lipidnu peroksidaciju, oksidativni stres i aktivnost enzima uključenih u antioksidantni odgovor, kao i uticaj jona Cd^{2+} na parametre fotosinteze. U korenovima, drvetu, kori i listovima topola izloženih 200 μM kadmijuma, došlo je do povećanja usvojenih koncentracije kadmijuma za 43, 9, 23 i 25 puta u odnosu na netretirane kontrole. Vrsta *P. cathayana* se istakla najvećom akumulacijom Cd^{2+} , dostižući koncentracije kadmijuma od 101,6 i 135,0 $\mu\text{g/g}$ suve mase u kori i listovima, što prevazilazi prag definisan za hiperakumulatore za jone Cd^{2+} (100 $\mu\text{g/g}$) (Broadley et al., 2001). Primećene su razlike u akumulaciji Cd^{2+} u zavisnosti od vrste topole, pa tako BCF nadzemnih delova pokazuju gradijentno opadanje po sledećem redosledu: *P. cathayana* > *P. alba* > *P. glandulosa* > *P. polularis* > *P. deltoides* > *P. nigra* > *P. euramericana*. S obzirom da je klon PE 19/66 koji pripada vrsti *Populus deltoides*, pokazao najviše vrednosti BCF za nadzemne delove i najviše TF, dok je klon M1 koji pripada vrsti *P. euramericana* pokazao manju efikasnost u fitoekstrakciji kadmijuma, može se zaključiti da naši rezultati za BFC nadzemnih delova prate redosled koji su ustanovili He i saradnici (2013).

U našoj zemlji, uticaj jona Cd^{2+} istraživao je u hidroponim kulturama u dve koncentracije Cd (10^{-4} i 10^{-5}) na hibridnom klonu topola 9111/93 (*Populus nigra* x *maximowitzi* x *P. nigra* var. *Italica*) (Nikolić et al., 2008). Autori su ustanovili da je akumulacija kadmijuma u organima opadala po sledećem redosledu: korenovi > izbojci > listovi. Biljke ovog klona topole u prisustvu 10^{-4} M Cd^{2+} , akumulirale su 214,0 $\mu\text{g/g}$ u listovima, 371,3 $\mu\text{g/g}$ u izbojcima i 6778,3 $\mu\text{g/g}$ u korenovima. U biljkama koje su rasle pod nižom koncentracijom kadmijuma, 10^{-5} M, 95,3 % od ukupnog akumuliranog Cd^{2+} se nalazilo u korenovima, dok se preostalih 2,6 i 2,1 %, nalazilo u izbojcima i listovima.

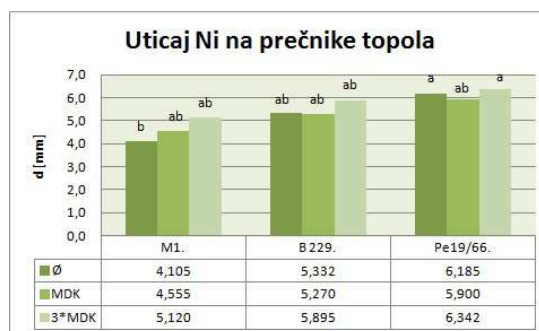
U poređenju sa rezultatima dobijenim u ovom istraživanju, više koncentracije Cd^{2+} u korenovima pronađene su i kod *Nerium oleander* (Kadukuva et al., 2006), *Triticum aestivum* i *T. durum* (Kovačević et al., 1999; Oztur et al., 2003), *Pinus sylvestris* (Kim et al., 2003), *Cannabis sativa* (Linger et al., 2005), kupusu (Panday i Sharma, 2002), kukuruзу (Ekmekci et al., 2008), ali i vrbama i topolama (Lunačkova et al., 2003).

5.5. Uticaj teških metala na morfološke karakteristike klonova topola

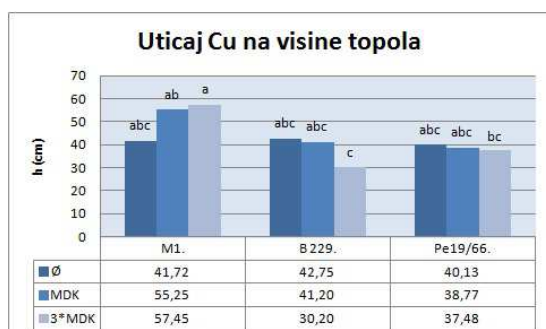
Veliki broj studija dokazao je da teški metali u toksičnim koncentracijama doprinose promenama morfoloških karakteristika biljnih vrsta, te dovode do usporenog rasta, redukcije visine i prečnika biljaka i smanjenja biomase organa koji su izloženi toksičnim agensima u odnosu na kontrolne. Pri visokim koncentracijama teških metala može doći čak i do dugotrajnog onesposobljavanja zemljišta za gajenje useva, voća i povrća (Molas, 2002; Duarte et al., 2007; Gajewska et al., 2006; Madhava Rao i Sresty 2000; Piey i Sharma 2002).



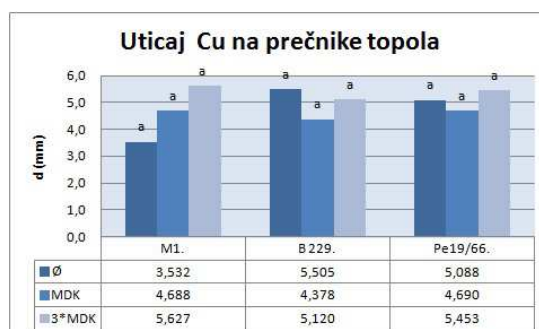
a)



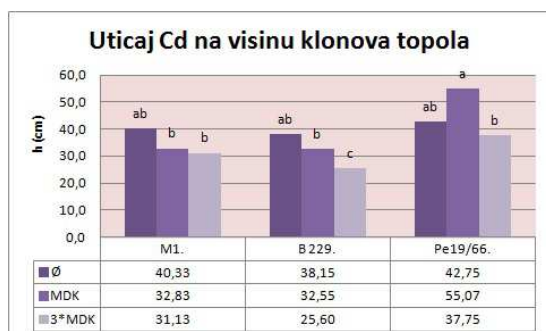
b)



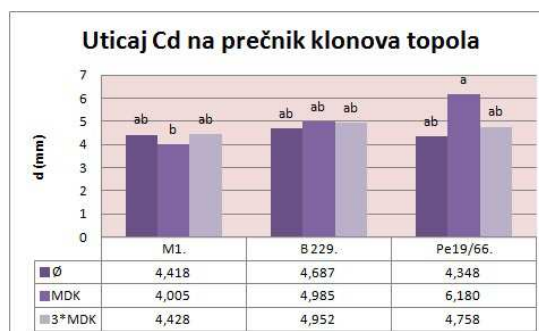
c)



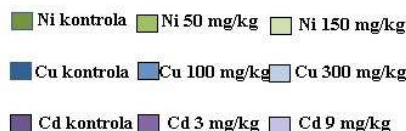
d)



e)



f)



Slika 62. Uticaj jona teških metala (Ni^{2+} , Cu^{2+} i Cd^{2+}) na morfološke karakteristike (visine i prečnike) klonova topola

U uslovima neopterećenosti zemljišta teškim metalima, klon M1 se istakao kao najviši klon u poređenju sa Pe 19/66 i B229, dok se klon B229 u uslovima bez tretmana teškim metalima, pokazao kao najniži. Pod uticajem jona Ni^{2+} u koncentracijama koje odgovaraju maksimalno dozvoljenim koncentracijama u zemljištu (MDK=50 mg/kg) i trostruko većim od maksimalno dozvoljenih ($3 \times \text{MDK}(\text{Ni})=150 \text{ mg/kg}$), nije došlo do statistički značajnih promena visina biljaka ni kod jednog od ispitivanih klonova topola (M1, P19/66 i B229). Tretmani bakrom u koncentraciji od 300 mg/kg, doveli su do statistički značajnog smanjenja visine klonova B229 i Pe 19/66 (slika 62b). Teški metali su dodavani u obliku nitratnih soli, te je sa povećanjem koncentracije metala, dolazilo i do povećanja sadržaja nitrata, koji je kao izvor azota za biljku poznat po stimulativnom efektu na rast topola (Pilipović et al., 2005), čime su toksični efekti samih metala na rast topola posledično ublaženi.

Pri koncentraciji bakra koja odgovara trostruko većoj vrednosti od maksimalne dozvoljene (300mg/kg) u zemljištu, sva tri klona su pokazala statistički značajno smanjenje u visini biljaka u poređenju sa kontrolom. Slične rezultate dobili su i Marschner (1995), Prasad i Strzalka, (1999) koji su dokazali da joni Cu^{2+} i Cd^{2+} pokazuju inhibitorni efekat na rast, te da dovode i do ometanja drugih važnih ćelijskih procesa kao što su fotosinteza i respiracija. Nasuprot tome, pod uticajem maksimalno dozvoljene koncentracije Cd od 3 mg/kg, kod klonova M1 i Pe 19/66 došlo je do neznatne stimulacije rasta.

Od morfoloških karakteristika, u ovom eksperimentu praćen je i prečnik biljaka. Klonovi B229 i Pe19/66 nisu pokazali statistički značajne promene prečnika pri tretmanima Ni^{2+} u odnosu na kontrolu, dok su pod uticajem trostruko veće koncentracije Ni^{2+} od dozvoljene, prečnici klona M1 blago povećani (slika 62 b) Slično tome, ni tretmani sa povećanim koncentracijama bakra u zemljištu nisu uticali na promene dijametra klona Pe19/66, dok su na klon B229 delovale inhibirajuće, a na klon M1 blago stimulišuće (slika 62d). Izloženost ispitivanih klonova tretmanima kadmijumom nije dovela do statistički značajnih promena u dijametrima poprečnog preseka kod sva tri ispitivana klona, osim što je klon Pe19/66 pod uticajem 3 mg/kg Cd^{2+} pokazao blago stimulišući efekat, koji je pri povećanju koncentracije na 9 mg/kg Cd^{2+} neutralizovan (slika 62f).

Izostanak inhibicije rasta kod ovih tretmana može biti objašnjen time što su teški metali dodavani u obliku nitrata, za koje je poznato da služe i kao veštačka đubriva, te vrše stimulaciju rasta. Sumarno, nepromenjena visina i prečnik reznica klonova topola može biti rezultat dva suprotna efekta, stimulišućeg efekta nitratnih anjona i inhibišućeg uticaja katjona teškog metala.

Nasuprot dobijenim rezultatima, Burton i saradnici (1984) su zabeležili da je povećanje koncentracija Cd^{2+} dovelo do redukcije nadzemnih i podzemnih delova *Picea sitchensis* ((Bong.) Carr.), dok su Menon i saradnici (2007) zapazili da teški metali redukuju biomase nadzemnih organa kod *Populus tremula* i rast najsitnijih korenčića prečnika ispod 2 mm kod *Picea abies* ((L.) H. Karst.), *Populus tremula* (L.) i *Betula pendula* (Roth). Ovi fini korenčići predstavljaju bitna mesta uspostavljanja simbioze sa ektomikoriznim gljivama koje doprinose boljem usvajanju metala i njihovoj detoksifikaciji. Jedno od objašnjenja promena rasta korenova i rasta kompletne biljke leži u uticaju mikoriznih zajednica na remedijaciju zemljišta od stane biljaka. Naime, zemljišni mikroorganizmi kao što su ektomikoriza i arbuskularne mikorizne gljive takođe imaju važnu ulogu u fitoremedijaciji, jer mogu da modifikuju biodostupnost metala i/ili poboljšaju rast biljaka na taj način što doprinose usvajanju nutrijenata, sintetišući supstance koje su stimulatori rasta i/ili omogućavajući biljkama povećanu toleranciju na stres (Cicatelli et al., 2010). Mikorizne gljive mogu da stabilizuju zemljište mrežom hifa i poboljšaju strukturu zemljišta, kao i da akumuliraju ili heliraju teške metale jedinjenjima vankorenskog micelijuma (Turnau et al., 2006). Pored zaštitne uloge, ove gljive povećavaju kapacitet za usvajanje vode (Landhäusser et al., 2002; Marjanović et al., 2005) i nutrijenata (Todeschini et al., 2007) rezultujući u većoj produkciji biomase što je uslov za uspešnu remedijaciju (Khan et al., 2000). Drugo objašnjenje je da redukcija rasta može biti rezultat uticaja teških metala na fotosintezu i respiraciju.

Dokazano da joni kadmijuma, supresuju ćelijski rast i ograničavaju širinu prečnika, tako što u inhibiraju proton pumpe koje su odgovorne za održavanje turgora (Aidid i Okamaoto, 1992). Gubitak turgora koji je neophodan za izduživanje ćelija izaziva zaustavljanje rasta, ali ne i sposobnost ćelija da se razvijaju dalje. Ksilemske strukture se diferenciraju u korenske dlačice, ali su vitalne funkcije istih izgubljene. Korenovi koji su izloženi jonima Cd^{2+} pokazuju povećanu produkciju etilena, hormona koji inhibira ćelijski rast (Johnson i Ecker, 1998). Joni Cd^{2+} takođe dovode do akumulacije H_2O_2 koji uzrokuje ukrućivanje ćelijskog zida aktiviranjem sinteze lignina, čime se sprečava istegljivost zidova (Barcelo, 1990). Dakle, inhibicija rasta je zapravo pleotropski efekat izazvan direktnom inhibicijom važnih enzimskih sistema kao i ometanjem ćelijskog signalinga od strane teških metala.

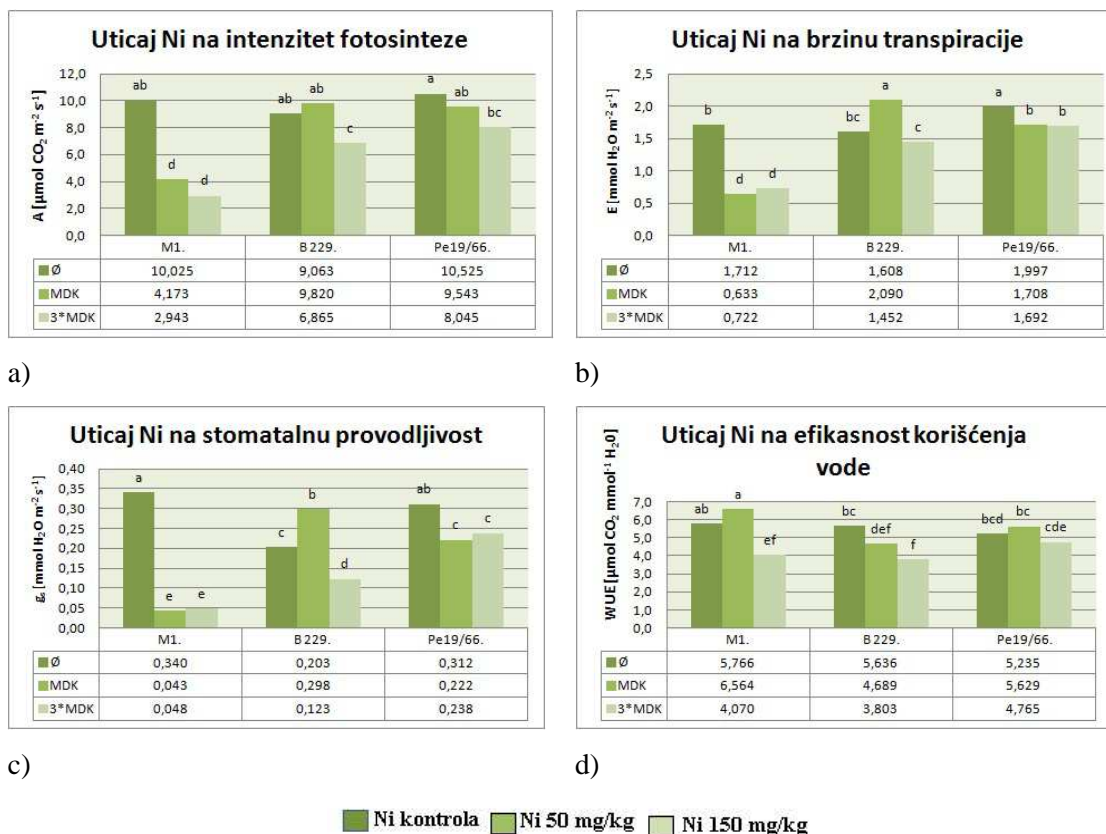
5.6. Uticaj teških metala na parametre fotosinteze kod ispitivanih klonova topola

Prema dobijenim rezultatima nesumnjivo je da sadržaj teških metala ima drastičan efekat na parametre fotosinteze. Shodno tome, trostruko veće koncentracije Ni^{2+} od dozvoljenih u zemljištu izazvale su smanjenje intenziteta fotosinteze sa $10,02 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ u kontrolnim netretiranim biljkama na $2,94 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ kod biljaka tretiranih jonima Ni^{2+} . Mada ne tako drastično, smanjenje intenziteta fotosinteze pokazao je i klon Pe19/66, gde se vrednost intenziteta fotosinteze sa $10,52 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ kod netretiranih biljaka smanjila na $8,04 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ pod uticajem jona nikla koncentracije 150 mg/kg. Klon B229 reagovao je drugačije na izloženost jonima Ni^{2+} u zemljištu, i to tako što je pri nižoj koncentraciji Ni^{2+} intenzivirao fotosintezu, da bi pri trostrukoj

maksimalnoj koncentraciji nikla u zemljištu intenzitet fotosinteze smanjio vrednost na $6,88 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ u odnosu na $9,06 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ kod netretiranih biljaka (slika 63a).

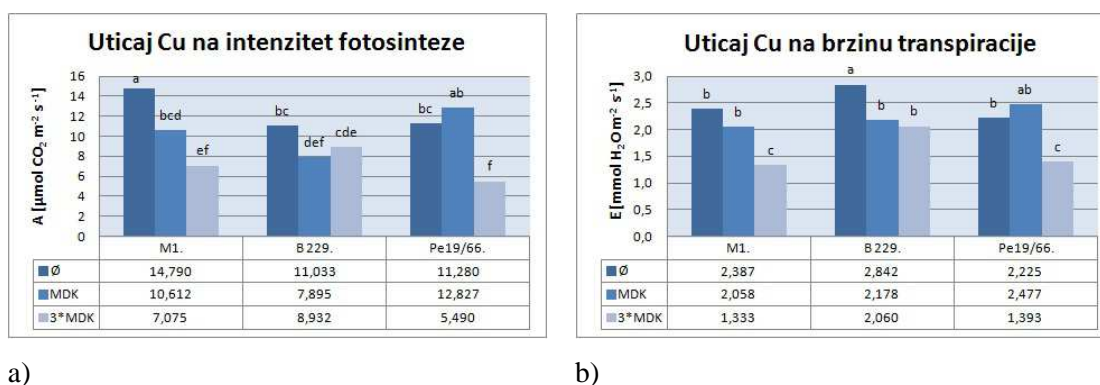
Klon M1 je pokazao drastičnu redukciju brzine transpiracije pod uticajem maksimalne dozvoljene koncentracije Ni^{2+} u zemljištu, koja je sa vrednosti $1,71 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ pala na $0,72 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$, dok su klonovi B229 i Pe19/66 takođe pokazali smanjenje brzine transpiracije, ali u manjoj meri u odnosu na klon M1 (slika 63b). Brzina transpiracije ima veliki uticaj na intenzitet fitoekstrakcije metala kod biljaka, s obzirom da je unos teških metala kao i njihova translokacija iz korenske zone do izbojaka i listova vođena silom transpiracije. Razlike u vodnom potencijalu kod različitih tkiva su od velikog značaja za procese usvajanja nutrijenata, ali i fotosintezu i organsku proizvodnju (Marchiol et al., 2004).

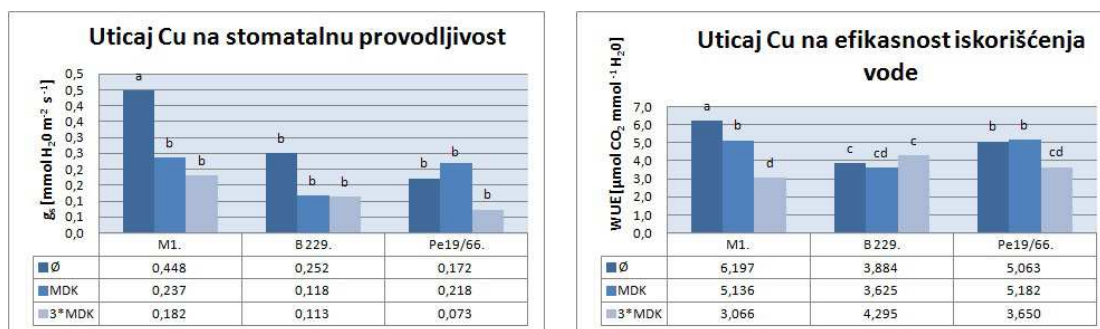
U literaturi se može naći veliki broj radova u kojima su autori primetili da joni Ni^{2+} utiču na smanjenje brzine transpiracije biljaka i sadržaj vode u listovima (Sheoran et al., 1990; Kevrešan et al., 1998; Schickler i Caspi, 1999; Molas, 2002). Bishnoi i saradnici (1993) su četiri dana pratili rast *Triticum aestivum* u peščanoj kulturi sa dodatih 10 mM Ni i zaključili da se lisni vodni potencijal, stomalna provodljivost, brzina transpiracije i ukupan sadržaj vlage smanjio, pogotovo u najvišim listovima, gde je akumulacija Ni^{2+} najviše izražena. Smanjenje brzine transpiracije je objašnjeno kao posledica nekoliko metal-indukovanih promena koje mogu biti izazvane i pod uticajem drugih teških metala. Joni Ni^{2+} izazivaju inhibiciju biljnog rasta i dovode na smanjenja lisne površine, koja je najveća površina za transpiraciju kod biljaka. Smanjenje lisne površine od 40% zabeleženo je kod biljaka *Cajanus cajaa* koje su rasle na pesku sa dodatkom 1 mM NiCl_2 (Sheoran et al., 1990). Slično tome, kod biljke *Brassica oleracea* lisna površina je bila značajno smanjena u prisustvu $5\text{-}20 \text{ g/m}^3 \text{ NiSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ u agru na kojem je biljka rasla (Molas, 2002). Brzina transpiracije opada i zbog smanjenog broja stoma po jedinici površine (Molas, 2002), mada u nekim slučajevima, gustina stoma može čak i da raste pri smanjenju lisne površine i smanjenju veličine epidermalnih ćelija (Breckle, 1991). Prisustvo jona Ni^{2+} u listovima *Phaseolus vulgaris* je izazvalo povećanje nivoa abscisinske kiseline (ABA), koja izaziva zatvaranje stoma (Bishnoi et al., 1993). Izazivanje stomalnog zatvaranja je jedan od osnovnih efekata uticaja teških metala (Seregin i Ivanov, 2001; Molas, 2002), što posledično smanjuje i brzinu transpiracije. Oštećene i trajno zatvorene stome su pronađene u biljkama *B. oleracea* koje su prethodno bile tretirane toksičnim koncentracijama nikla (Molas, 2002). Smanjenje sadržaja vlage i stomalne provodljivosti kod biljaka je još jedan od efekata toksičnosti nikla.



Slika 63. Uticaj jona Ni²⁺ na parametre fotosinteze: a) intenzitet fotosinteze, b) brzina transpiracije, c) stomatalna provodljivost i d) efikasnost korišćenja vode-WUE kod klonova topola

Slično uticaju nikla, i tretmani biljaka jonima bakra su izazvali smanjenje intenziteta fotosinteze, i to najdrastičnije kod klona M1. Intenzitet fotosinteze se pri tretmanu bakrom od 300 mg/kg u zemljištu dvostruko smanjio na vrednosti od 7,07 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ u odnosu na kontrolne biljke, kod kojih je intenzitet fotosinteze iznosio 14,79 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Drastični pad intenziteta fotosinteze pokazao je i klon Pe19/66, kod koga se intenzitet fotosinteze pri maksimalnom tretmanu bakra smanjio na 5,49 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ u poređenju sa 11,28 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ koliko je iznosio u netretiranim biljkama tog klona. Statistički značajna, ali ipak umerenija redukcija intenziteta fotosinteze izazvana jonima bakra primećena je i kod klona B229 i to sa vrednosti 11,03 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ na 8,99 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (slika 64a).





c)

d)

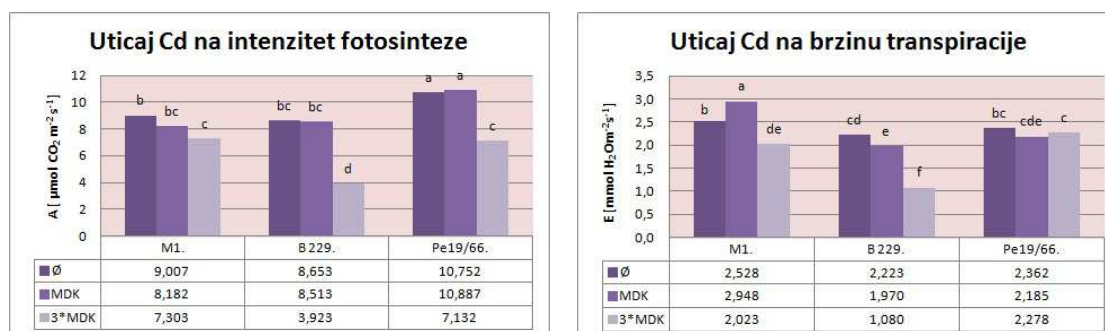
■ Cu kontrola ■ Cu 100 mg/kg ■ Cu 300 mg/kg

Slika 64. Utjecaj jona Cu^{2+} na parametre fotosinteze: a) intenzitet fotosinteze b) brzina transpiracije c) stomatalna provodljivost i d) efikasnost korišćenja vode-WUE kod klonova topola

Klon M1 je pokazao najveću osjetljivost u brzini transpiracije na tretmane sa jonima bakra. Pod uticajem trostruko veće koncentracije od maksimalne dozvoljene koncentracije za bakar u zemljištu, klon M1 je pokazao vrednost brzine transpiracije od $1,33 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ dok je kod netretiranih biljaka iznosila $2,38 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (slika 64 b).

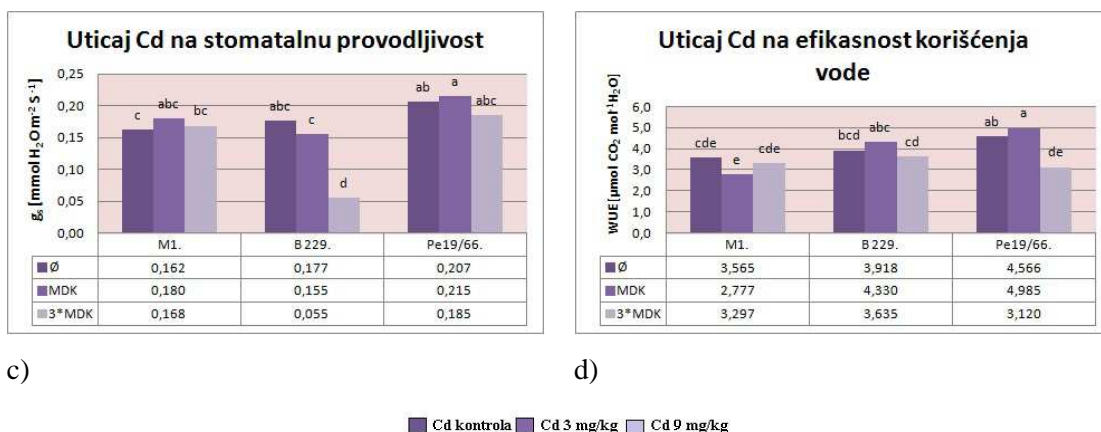
Maksimalna dozvoljena koncentracija kadmijuma (3 mg/kg) u zemljištu ni kod jednog klona nije dovela do promena intenziteta fotosinteze, te je do redukcije intenziteta fotosinteze došlo tek pri trostruko većim vrednostima od maksimalno dozvoljenih za kadmijum u zemljištu (9 mg/kg), gde je pri tom tretmanu klon B229 pokazao najveću redukciju intenziteta fotosinteze, za oko 120 %, sa $8,65 \text{ µmol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ na $3,92 \text{ µmol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (slika 65a).

Tretman sa 9 mg/kg kadmijuma izazvao je najveće promene u brzini transpiracije kod klona B299, kod koga se vrednost ovog parametra smanjila sa $2,23 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ kod kontrolnih biljka, na duplo niže vrednosti ($1,08 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) kod tretiranih biljaka. Klon Pe 19/66 nije pokazao značajne oscilacije u brzini transpiracije pod uticajem tretmana kadmijumom i niklom (slika 65 b).



a).

b)



Slika 65. Uticaj jona Cd^{2+} na parametre fotosinteze: a) intenzitet fotosinteze b) brzina transpiracije c) stomatalna provodljivost i d) efikasnost korišćenja vode-WUE kod klonova topola

Slični rezultati smanjenja brzine transpiracije usled delovanja teških metala su dobijeni kod topola (Pajević et al., 2009) i drvetu breskve (Centritto et al., 2002). Smanjenje transpiracije kod biljaka pod uticajem teških metala u svojim istraživanjima navode Hattab i saradnici, (2009), kao i Shi i Cai, (2009). Burzynski i Klobus (2004), u istraživanjima uticaja jona Cu^{2+} , Cd^{2+} i Pb^{2+} na proces fotosinteze kod krastavca, ukazuju na smanjenje brzine transpiracije pod uticajem jona navedenih teških metala. Negativan uticaj teških metala na brzinu transpiracije potvrdili su Hermle i saradnici (2006, 2007), Di Baccio i saradnici (2003; 2009) kod vrsta *Populus tremula* i *Salix viminalis*. Di Baccio i sar (2003; 2009) su izneli zapažanja o negativnom uticaju jona Zn^{2+} na parametre fotosinteze poput stomalne provodljivost i brzine transpiracije kod klona topole I-214 (*Populus x euramericana*).

Redukcija intenziteta fotosinteze i inhibicija asimilacije CO_2 pod uticajem jona teških metala zabeležena je ne samo u zemljišnom medijumu već i u vodenoj kulturi i kulturi tkiva od strane velikog broja autora (Molas, 2002; Gajewska et al., 2006; Gajewska i Sklodowska 2007; Szalontai et al., 1999; Kozlow, 2005). Pajević i saradnici (2009) su dokazali redukciju intenziteta fotosinteze i genetsku varijabilnost ovog parametra kod različitih klonova topola i vrba usled delovanja pojedinačnih metala (Cd^{2+} , Pb^{2+} i Ni^{2+}), ali i njihovih kombinacija u zemljišnom medijumu. Ista grupa autora izmerila je vrednosti intenziteta fotosinteze kod topola u poljskim uslovima koje se kreću u opsegu od 10,77 do 8,22 $\text{CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, što odgovara vrednostima dobijenim u ovom istraživanju. Pajević i saradnici (2009) navode zavisnost intenziteta fotosinteze od genotipa topole i vremena izloženosti uticaju metala. Najmanje promene intenziteta fotosinteze izazvane su tretiranjem zemljišta kadmijumom, što u potpunosti odgovara rezultatima dobijenim u našem istraživanju. Klon topole B229 je pokazao najveće oscilacije u parametrima fotosinteze pod uticajem jona Cd^{2+} , Ni^{2+} i Pb^{2+} , te je okarakterisan kao najosetljiviji na uticaj ovih metala (Pajević et al., 2009). Određivanje fotosintetičke sposobnosti asimilacije CO_2 kod različitih drvenastih biljnih vrsta ili kod različitih

genotipova iste vrste je od velikog značaja za odabiranje najpogodnijih genotipova koji bi se koristili za pošumljavanje staništa zagađenih teškim metalima.

Detaljne ekofiziološke studije su pokazale da uticaj povišenih koncentracija jona Cd^{2+} ili Cu^{2+} u izbojcima zavise od faze rasta i fiziološkog stadijuma tj. starosti listova (Skorzynska-Polli i Beszynski, 1997; Krupa i Moniak 1998; Vinit-Dunand et al., 2002). Tako su kod mladih listova *Cucumis sativa*, stomalna provodljivost, aktivnost ukupne fotosinteze kao i maksimalni fotohemijski prinos ostali nepromenjeni, dok je rast bio inhibiran tretmanom jonima Cu^{2+} (Vinit-Dunand et al., 2002). Zreli listovi, koji su akumulirali manje koncentracije Cu^{2+} , pokazali su značajno smanjenje stomalne provodljivosti i smanjenje u intenzitetu fotosinteze kao i povećanu akumulaciju skroba u odnosu na mlade listove (Vinit-Dunand et al., 2002). Slično, pod uticajem jona Cd^{2+} dolazi do smanjenja veličine ćelija, smanjenja lisne površine, nagomilavanja skroba u hloroplastima i smanjene stomalne provodljivosti, bez primetnog efekta na osobine fotosintetičkog elektron-transportnog niza (Moya et al., 1995; Haag-Kerver et al., 1999, Baryla et al., 2001). Nagomilavanje skroba i saharoze dovodi do inhibicije fotosinteze putem povratnog (feed-back) mehanizma (Paul i Pellny, 2003).

Brzina transpiracije u stomama direktno zavisi od stomalne provodljivosti. Dokazano je da vodni deficit dovodi do smanjena stomalne provodljivost kod pšenice, suncokreta, grožđa i eukaliptusa, kukuruza. Stomalna provodljivost je u korelaciji sa stomalnim pokretima, koji su uslovljeni delovanjem ABA i vodnim deficitom.

U ovom eksperimentu, stomalna provodljivost je kod klona topole M1 pokazala veliku osetljivost na prisustvo jona Ni^{2+} i Cu^{2+} , gde se u slučaju tretmana jonima Ni^{2+} stomalna provodljivost smanjila više od 6 puta, sa vrednosti $0,34 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ na $0,048 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (slika 63c). Značajan pad stomalne provodljivosti zabeležen je kod klona M1 usled izloženosti tretmanu bakrom koncentracije 300 mg/kg , gde se vrednost stomalne provodljivosti smanjila sa $0,45$ na $0,182 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (slika 64c). Nasuprot tome, zagađenost zemljišta kadmijumom kod klona M1 nije izazvala drastične promene u vrednostima ovog parametra. Klona B229 je pod uticajem jona kadmijuma koncentracije od 9 mg/kg , pokazao drastičan pad stomalne provodljivosti sa $0,177$ na $0,055 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (slika 65c). Isti klon, B229, je pokazao značajnu promenu u stomalnoj provodljivosti i pri zagađenju bakrom, dok se klon Pe 19/66 sudeći po ovom parametru pokazao manje osetljiv na zagađenje izazvano jonima Cd^{2+} , Cu^{2+} i Ni^{2+} u datim koncentracijama.

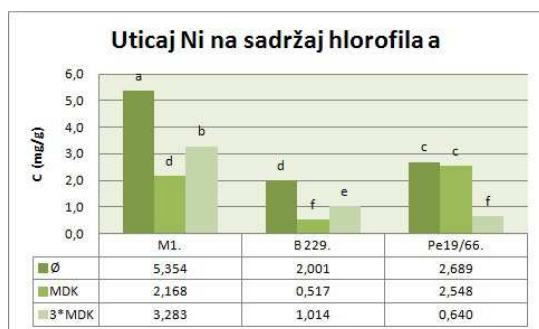
Sheoran i saradnici (1990) su zabeležili redukciju stomalne provodljivosti usled zagađenosti teškim metalima u biljkama *Cajanus cajan*. Bethkey i Drew (1992) su slične efekte smanjenja stomalne provodljivosti, opisali kod vrste *Capsium annum* tokom progresivne izloženosti solima NaCl. Klonozi topola M1, Pe 19/66 i B229 su već ispitani u vodenoj kulturi na delovanje 3 i $30 \mu\text{M}$ bakra i cinka, te je dokazano drastično veće smanjenje stomalne provodljivosti pri tretmanima jona bakra u odnosu na tretmane cinkom, a klonozi B229 i M1 su sudeći po ovom parametru pokazali značajnu osetljivosti na jone bakra (Galle et al., 2013; Wodala et al., 2013).

U skorijoj literaturi pominje se još jedan parametar koji ukazuje na osmotski stres izazvan abiotičkim faktorima koji se naziva efikasnost iskorišćenja vode (eng. water use efficiency-WUE). Parametar WUE se računa kao odnos intenziteta fotosinteze i brzine transpiracije i izražen je u $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1} / \text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. WUE ukazuje na bioprodukciju i asimilaciju CO_2 , po jedinici potrošnje vode. Stabilna vrednost WUE u nepovoljnim uslovima životne sredine je znak visoke organske produkcije, te ukazuje i na dobar potencijal datih genotipova da vrše remedijaciju zemljišta.

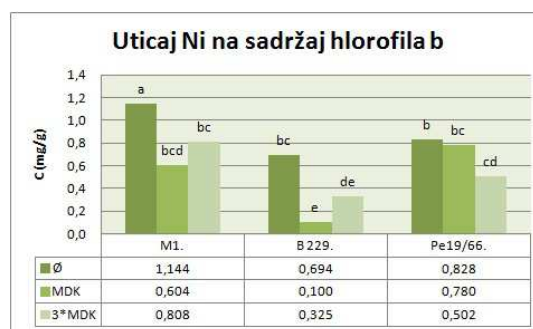
U ovom istraživanju, pri povećanju koncentracije bakra u zemljištu klon M1 je pokazao gradijentno opadanje WUE, što ukazuje na osetljivost ovog klona prema jonima bakra i na smanjenu efikasnost iskorišćenja vode usled poremećaja u osmotskoj ravnoteži usled procesa fitoekstrakcije jona bakra (slika 64d). Sa porastom koncentracije nikla u zemljištu, došlo je do opadanja vrednosti WUE kod klona B229 koji je pokazao najveću osetljivost na ovaj metal (slika 63d). Maksimalna dozvoljena koncentracija Cd^{2+} , nije izazvala drastične promene u stepenu iskorišćenja vode ni kod jednog od klonova topola, dok je trostruko veća koncentracija od maksimalne dozvoljene (9 mg/kg) izazvala najveću redukciju vrednosti WUE kod klona Pe 19/66. Tom prilikom, vrednost ovog parametra kod klona Pe 19/66 smanjila se sa 4,56 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1} / \text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ koliko je iznosila u kontrolnim biljkama, na 3,12 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1} / \text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ kod biljaka tretiranih najvišim koncentracijama kadmijuma, što ukazuje na najveću osetljivost ovog klona prema jonima kadmijuma (slika 65 d).

5.7. Uticaj teških metala na sadržaj hlorofila a, b, ukupnih hlorofila i karotenoida kod klonova topola

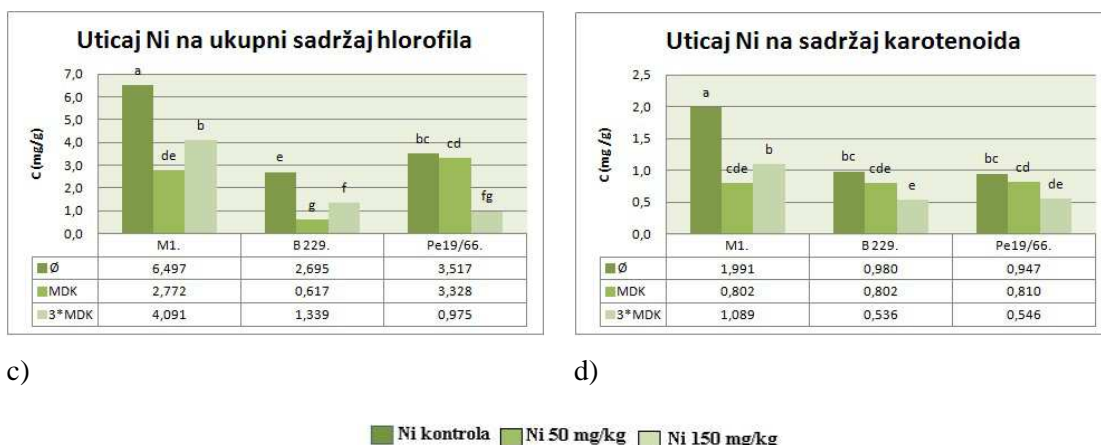
Parametri fotosinteze su u neraskidivoj vezi sa sadržajem pigmenata hloroplasta, pre svega hlorofila a, b i karotenoida. Već je navedeno da teški metali ometaju fotosintezu pre svega, tako što utiču inhibitorno na biosintezu hlorofila, dovode do poremećaja strukture tilakoidnih membrane, ali često i do zamene centralnog jona Mg^{2+} unutar hema hlorofila jonom teškog metala, usled čega hlorofil postaje neaktivan u prenosu elektrona u toku svetle faze fotosinteze (Patsikka et al., 1998; Quarticci et al., 2000).



a)



b)

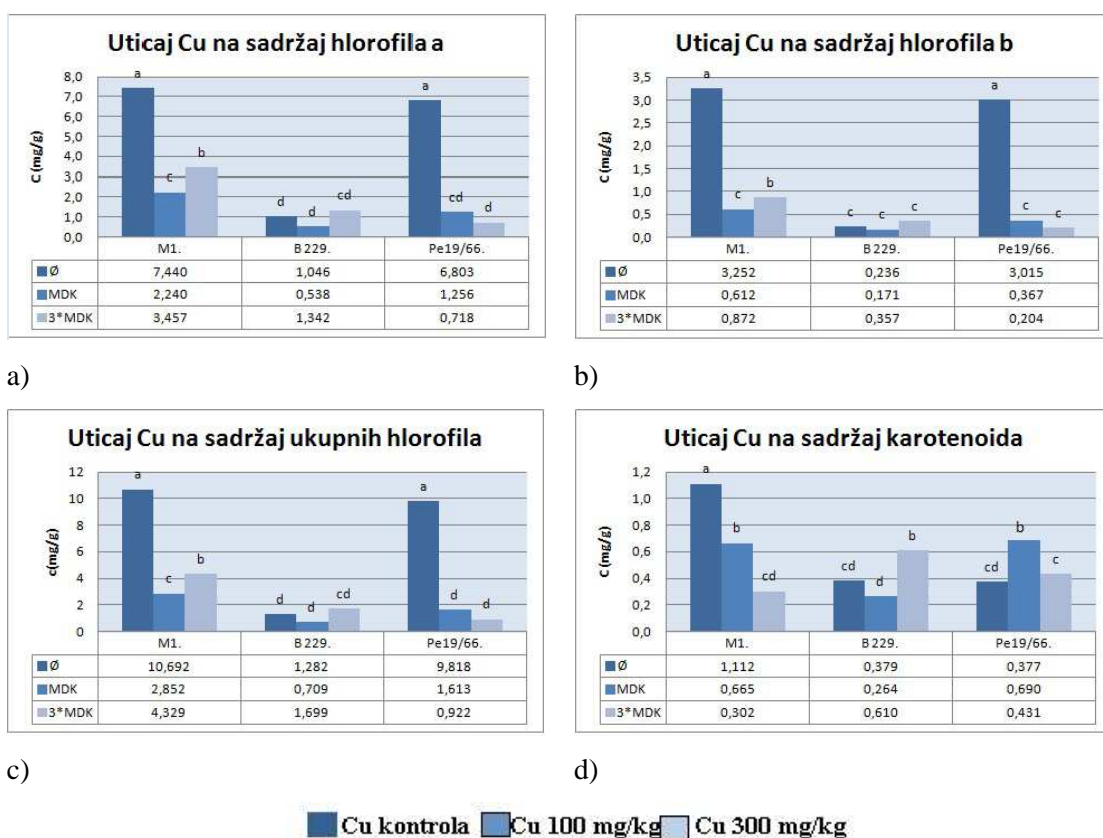


Slika 66. Uticaj jona Ni^{2+} na sadržaj a) hlorofila a, b) hlorofila b, c) ukupnih hlorofila i d) karotenoida u klonovima topola

Istraživanja osetljivosti klonova topola (M1, Pe 19/66, B229) na jone nikla u pogledu sadržaja hlorofila u ovom radu pokazala su da izlaganje maksimalno dozvoljenoj koncentraciji Ni^{2+} izaziva drastičan pad hlorofila a i b i karotenoida u klonu M1, gde su se koncentracije hlorofila a (5,35 mg/g sv. mase) i b (1,14 mg/g sv. mase) i karotenoida (1,99 mg/g sveže mase) pri datom tretmanu jonima Ni^{2+} smanjile na vrednosti 3,28, 0,81, 1,09 mg/g sveže mase (slika 66 a b d). Klon M1 je pokazao najveće smanjenje koncentracije sadržaja ukupnog hlorofila u prisustvu jona Ni^{2+} (slika 66 c). Klon B229 je pri maksimalno dozvoljenoj koncentraciji Ni^{2+} pokazao smanjenje koncentracije obe grupe pigmentata, dok klon Pe 19/66 nije pokazao promene u sadržaju hlorofila i karotenoida pri maksimalno dozvoljenoj koncentraciji Ni^{2+} , već je redukcija sadržaja ovih pigmentata primećena tek pri trostruko većim koncentracijama metala od maksimalno dozvoljenih vrednosti. Ovo ističe da je klon Pe 19/66 najotporniji na tretmane jonima Ni^{2+} .

Slično, smanjenje veličine, broja hloroplasta i dezorganizacija ultrastrukture hloroplasta, uključujući smanjen broj grana i tilakoida, njihovu deformaciju, i formiranje plastoglobula i promena u sastavu membranskih lipida, su primećene u biljci *Brassica oleracea*, koja je rasla na agru u prisustvu $\text{NiSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (10–20 g/m³). Takve promene su posledica peroksidacije membranskih lipida usled oksidativnog stresa (Molas, 2002). Nekoliko autora je dokazalo smanjen sadržaj hlorofila u listovima biljaka tretiranih jonima Ni^{2+} i pojavu hloroze, koja je rezultat deficita jona Fe^{2+} i Mg^{2+} i inhibicije sinteze hlorofila (Ewais, 1997; Sheoran et al., 1990; Piccini i Malavolta, 1992). Smetnje u elektron-transportnom nizu predstavljaju drugi mehanizam koji dovodi do smanjenja efikasnosti fotosintetske produkcije. Veliki broj eksperimenata je ukazao da joni Ni^{2+} prvenstveno utiču na PSII (Seregin i Ivanov, 2001; Krupa i Baszynski, 1995; Maksymiec, 1997), jer je akumulacija Ni najviše izražena u regionima lamela koji sadrže PSII (Veeranjaneyulu i Das, 1982). Joni teških metala kao što su joni Cd^{2+} i Zn^{2+} , redukuju fotosintetičku aktivnost, transpiraciju i povećavaju brzinu tamne faze fotosinteze (Hermle et al., 2007).

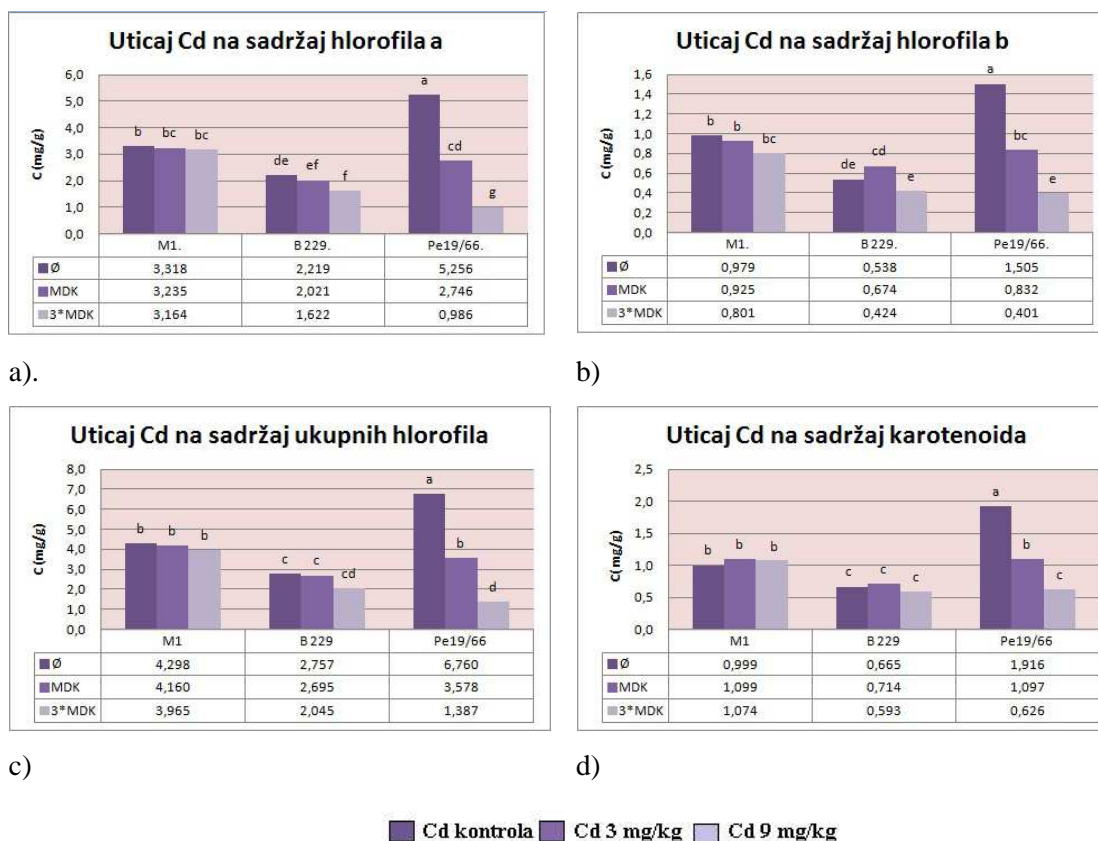
Toksične koncentracije bakra u zemljištu su izazvale redukciju sadržaja pigmenta hloroplasta kod klona M1 i Pe 19/66, dok klon B229 nije pokazao statistički značajne promene u sadržaju hlorofila a, b i karotenoida. Kod klona M1 pri koncentraciji od 100 mg/kg Cu vrednosti sadržaja hlorofila a su se smanjile sa 7,44 na 3,45 mg/g, hlorofila b sa 5.25 na 0.87 mg/g, a sadržaj karotenoida je opao sa 1,12 na 0,30 mg /g (slika 67 a b d). Slično, kod klona Pe 19/66 je došlo do smanjenja hlorofila a sa 6,80 na 0,72 mg/g, sadržaja hlorofila b sa 3,02 na 0,20 mg/g, dok je kod klona M1, maksimalna dozvoljena koncentracija bakra aktivirala biosintezu karotenoida i povećala sadržaj sa 0,37 na 0,69 mg/g (slika 67 a b d). Ovo povećanje u sadržaju karotenoida se može objasniti time što su karotenoidi značajni prekursori abscisinske kiseline, čija je biosinteza značajno povećana u uslovima osmotskog stresa izazvanog abiotičkim faktorima (Lahr i Raschke, 1988; Bianco-Trinchant i Page-Degivry, 1998).



Slika 67. Uticaj jona Cu^{2+} na sadržaj a) hlorofila a, b) hlorofila b, c) ukupnih hlorofila i d) karotenoida u klonovima topola

U korist navedenih rezultata idu i navodi iz literature da joni Cu^{2+} ometaju biosintezu fotosintetičkog aparata modifikujući same pigmente kao i gradivne proteine unutar fotosintetičkih membrana (Lidon i Henriques, 1991; Maksymiec et al., 1994). Mehanizam toksičnog uticaja jona Cu^{2+} na fotosintetički elektron-transportni lanac je intenzivno istraživano *in vitro*, te je dokazano da je fotosistem II (PSII) osetljiviji na prisustvo Cu^{2+} nego PSI (Droppa i Horvath, 1990; Baron et al., 1995; Ouzounidou et al., 1997). Najprimetniji efekat toksičnosti jona Cu^{2+} je inhibicija fotosistema II (PSII)

tokom stvaranja O₂ koja je praćena ispuštanjem određene fluorescencije (Hsu i Lee, 1988; Samson et al., 1988; Mohanty et al., 1989). Kako akceptorska, tako i donorska strana PSII su mete toksičnog napada jona Cu²⁺. Redukujuća strana PSII, Q_B vezujuće mesto (Mohanty et al., 1989) i Pheo-Fe-Q_A domen (Yruela et al., 1991; 1993; 1996a) predstavljaju mesta koja su izrazito osetljiva na delovanje jona Cu²⁺. Drugi autori (Schroder et al., 1994; Arellano et al., 1995), su uočili da je tok elektrona od Tyr_z do P₆₈₀⁺ blokiran toksičnim dozama jona Cu²⁺. Dokazano je da joni Cu²⁺ reaguju sa tirozinskim ostacima iz D2 proteina (Kralova et al., 1994; Sersen et al., 1997). Joni Cu²⁺ utiču i na proteine klastera-Mn koji ima ulogu u stvaranju kiseonika, a reaguju i sa nehemskim Fe²⁺i citohromom (cyt) b₅₅₉ (Yruela et al., 2000; Burda et al., 2003; Bernal et al., 2004). Yruela et al. (1996b) nalaze da Cu²⁺ smanjuje nivo fotoredukovanog Cyt b₅₅₉ što usporava brzinu fotoredukcije. Kako joni Cu²⁺ imaju visok afinitet prema ostacima histidina, logično je pretpostaviti da joni Cu²⁺ reaguju sa histidinskim ostacima, koordinaciono se vezujući za hem grupe Cyt b₅₅₉ (Roncel et al., 2001), te dovodeći do promena u redoks potencijalu Cyt b₅₅₉. S druge strane, Burda i saradnici (2003) tvrde da pri visokim koncentracijama jona Cu²⁺, osim inhibicije u stvaranju kiseonika, dolazi i do oksidacije Cyt b₅₅₉, što ubrzava formiranje Chl_z⁺ radikala, koji je odgovoran za floescenciju u PSII.



Slika 68. Uticaj jona Cd²⁺ na sadržaj a) hlorofila a, b) hlorofila b, c) ukupnih hlorofila i d) karotenoida u klonovima topola

Prilikom tretmana maksimalnim i trostruko većim od maksimalnih koncentracija kadmijuma u zemljištu, klon Pe 19/66 se po sadržaju hlorofila a i b, kao i karotenoida izdvojio kao naosetljiviji

klon, jer je sa porastom koncentracije Cd^{2+} u zemljištu došlo do značajnog smanjenja sadržaja svih ispitivanih pigmenata. Vrednosti hlorofila a (5,27 mg/g), hlorofila b (1,50 mg/g) i karotenoida (1,9 mg/kg) u kontrolnim biljkama klona Pe 19/66 su pri tretmanu od 9 mg/kg Cd^{2+} u zemljištu smanjene na vrednosti 0,98, 0,41, 0,63 mg/g, Klonovi B229 i M1, nisu pokazali statistički značajne promene u sadržaju pigmeneta hlorofila pod tretiranim koncentracijama kadmijuma, što ukazuje da su verovatno koncentracije metala iz tretmana bile niske da bi izazvale poremećaje u biosintezi hlorofila.

Utvrđeno je da joni Cd^{2+} uzrokuju oksidativni stres, smanjuju stomalnu provodljivost kroz direktan uticaj na ćelije zatvaračice, smanjuju sadržaj pigmenata i gustinu hloroplasta u ćeliji (Barila et al., 2001; Perfus-Barbeoch et al., 2002; Milone et al., 2003). Joni Cd^{2+} direktno zaustavljaju proces fotosinteze uništavanjem tilakoidnih membrana u listovima, čime narušavaju enzimsku aktivnost (Pietrini et al., 2005). Smanjenje sadržaja pigmenata je direktno vezano za inhibiciju sinteze hlorofila i karotenoida. Vezivanjem za SH grupe u ATP-azi, joni Cd^{2+} narušavaju njenu funkciju. Wallace i saradnici (1992) navode da joni Cd^{2+} utiču na smanjenje sadržaja Fe^{2+} , čime posredno dolazi do hloroze listova i opadanja intenziteta fotosinteze. Dinakar i saradnici (2008) navode dva moguća uzroka opadanja sadržaja hlorofila pod uticajem Cd: 1) direktna inhibicija protohlorofilid reduktaze i 2) inhibicija aktivnosti enzima koji razlaže vodu u fotosistemu II.

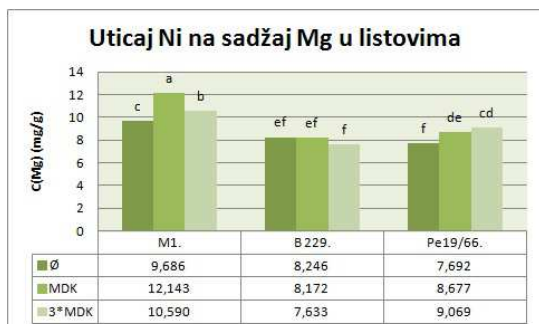
Ispitujući uticaj dve koncentracije jona Cd^{2+} u vodenoj kulturi na sadržaj pigmenata hloroplasta kod hibridne topole (*P. nigra* x *P. maximowitzi*), Nikolić i saradnici (2008), su otkrili drastično povećanje sadržaja hlorofila pri višoj koncentraciji jona Cd^{2+} , dok su pri nižoj koncentraciji Cd^{2+} zabeležili povećanje hlorofila b za 49% u tretiranim biljkama i povećanje sadržaja karotenoida od 10 % u poređenju sa kontrolnim biljkama.

Druga istraživanja, potvrdila su da povišene koncentracije jona Cd^{2+} izazivaju redukciju količine hlorofila i kod listova *Brassica juncea*, te u listovima biljaka paradajza, duvana, bibira, pasulja i *Alternanthera philoxeroides* što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u ovom radu (Deng et al., 2007).

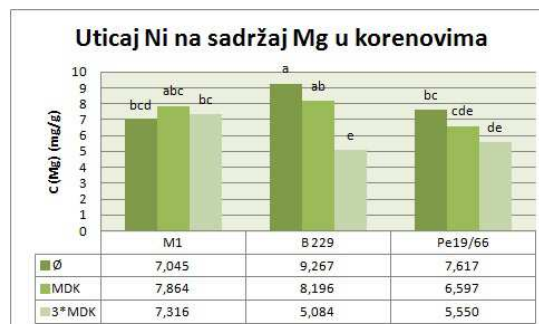
5.8. Uticaj teških metala na sadržaj makronutrijenata u klonovima topola

U ovom radu, praćeni su i poređeni uticaji različitih koncentracija teških metala u zemljištu na sadržaj makroelementa u listovima i korenovima ispitivanih klonova topola. Dobijeni rezultati ispitivanja uticaja jona Ni^{2+} na sadržaj esencijalnog magnezijuma u listovima ispitivanih klonova topola pokazuju da pri maksimalnoj dozvoljenoj koncentraciji (50 mg/kg) u zemljištu u listovima klonova M1 i Pe 19/66 dolazi do blagog povećanja koncentracije Mg^{2+} u poređenju sa odgovarajućim kontrolama (25 i 13%), dok u listovima klona B229 nije došlo do statistički značajnih promena u sadržaju jona Mg^{2+} . Pod uticajem trostruko većih koncentracija Ni^{2+} od dozvoljenih (150 mg/kg) klon B229, pokazao je blago smanjenje koncentracije Mg^{2+} u listovima (slika 69 a). Sa druge strane, u korenovima klonova B229 i Pe 19/66, došlo je do značajnog pada sadržaja Mg^{2+} i pri tretmanima od 50 mg/kg i 150 mg /kg Ni^{2+} u zemljištu. Korenovi klona M1 nisu pokazali značajne promene u sadržaju Mg^{2+} pri tretmanima sa jonima Ni^{2+} (slika 69 b).

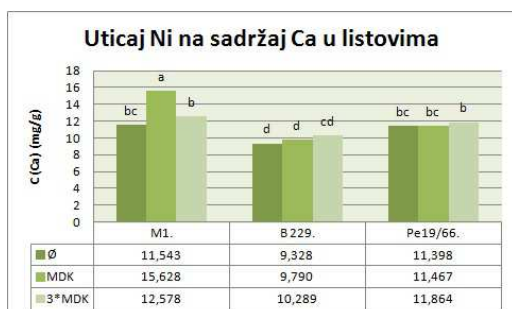
Rezultati dobijeni praćenjem uticaja jona Ni^{2+} na sadržaj Ca^{2+} u listovima i korenovima ispitivanih klonova ukazuju da su joni Ni^{2+} pri koncentraciji od 50 mg/kg delovali stimulatивно na sadržaj Ca^{2+} u listovima klonova M1 i B229, dok kod listova klona Pe19/66 nisu doveli do promena u sadržaju Ca^{2+} u poređenju sa kontrolnim biljkama. Tretman jonima Ni^{2+} koncentracije od 150 mg/kg doveo je do redukcije sadržaja Ca^{2+} u listovima klona M1 za 23 % u poređenju sa sadržajem Ca^{2+} u listovima biljaka tretiranih sa 50 mg/kg (slika 69c).



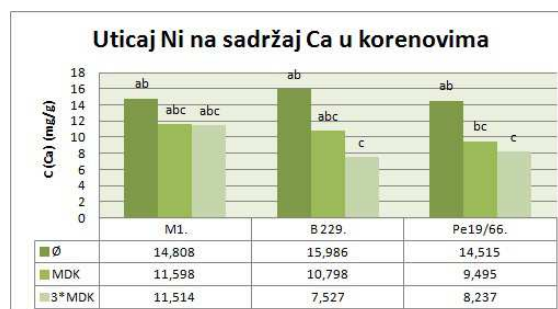
a)



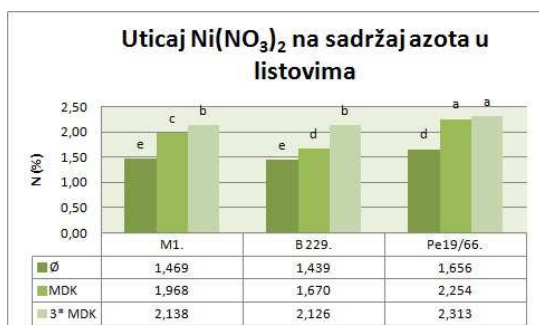
b)



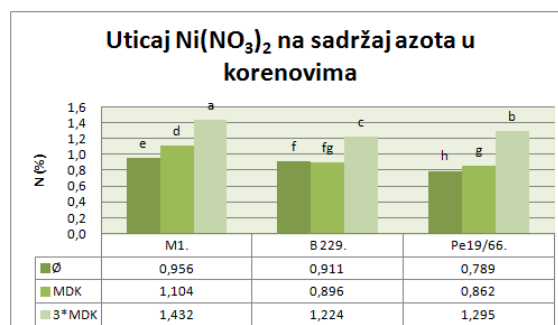
c)



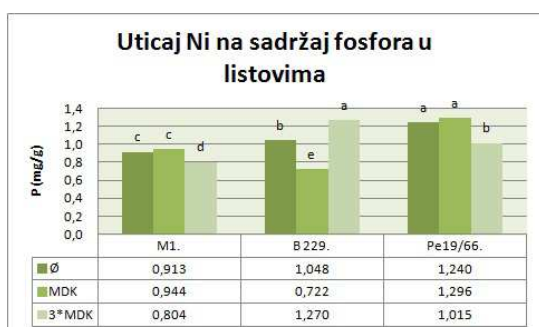
d)



e)



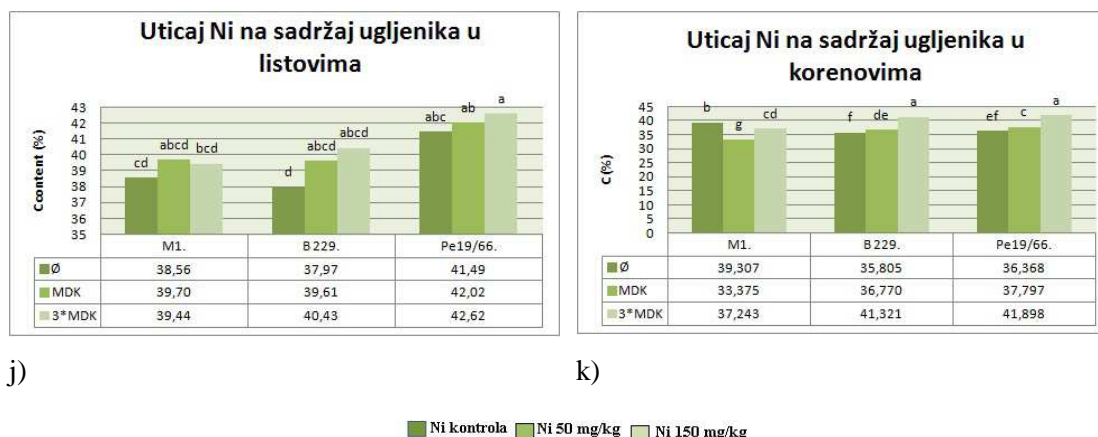
f)



g)



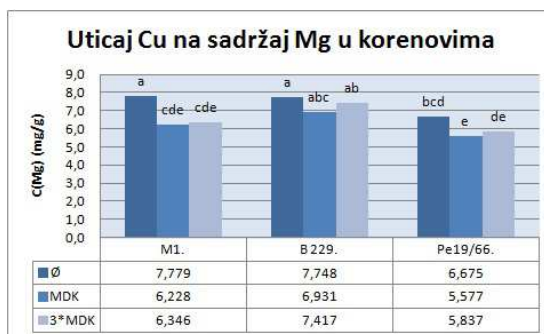
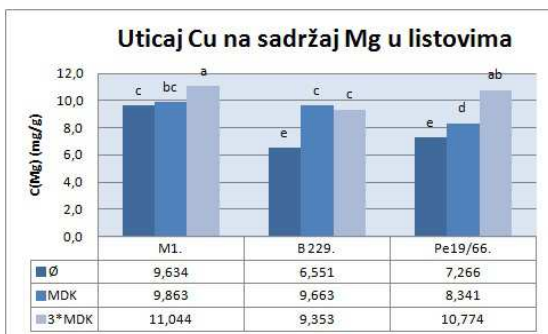
h)



Slika 69. Uticaj jona Ni^{2+} na sadržaj makronutrijenata (metala (Mg i Ca) i nemetala (N, P i C)) u korenovima i listovima klonova topola

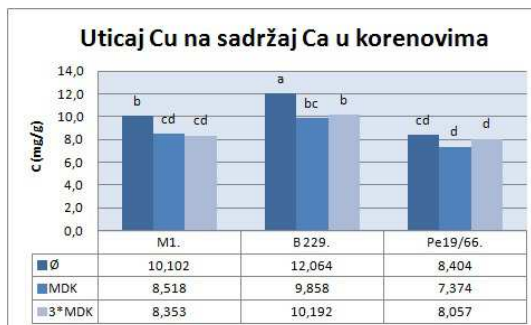
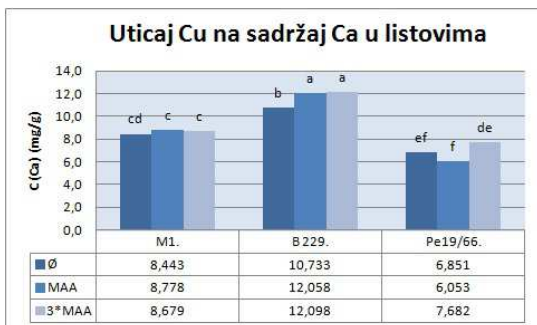
Sadržaj Ca^{2+} u korenovima je značajno smanjen kod sva tri ispitana klona pri zagađenju zemljišta jonima Ni^{2+} u obe koncentracije u odnosu na kontrolu. Najdrastičnije smanjenje sadržaja Ca^{2+} primećeno je u klonu B229, gde je pod uticajem 150 mg/kg Ni^{2+} , vrednost Ca^{2+} u korenovima opala više nego duplo i iznosila 7,52 mg/kg u poređenju sa kontrolnim biljkama kod kojih je koncentracija Ca^{2+} iznosila 15,98 mg/kg (slika 69 d).

Kako su nitratne soli ispitivanih teških metala sudeći po proizvodima rastvorljivosti najrastvorljivije, teški metali su zbog blagog stimulišućeg efekta nitrata dodati upravo u ovom neorganskom obliku. U ogledu je praćen i sadržaj azota u korenovima i listovima biljke, da bi se utvrdilo da li dodatak nitratnih soli teških metala povećava sadržaj dostupnog azota u zemljištu. Tako, pri dodatku 150 mg/kg $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ u zemljište, sadržaj azota u listovima klona M1 se povećao za 0,5 % u poređenju sa kontrolnim biljkama kod kojeg je sadržaj azota iznosio 1,46%. Trend povećanja sadržaja azota u listovima sa dodatkom nitratnih soli u zemljište pokazuju i druga dva klona (slika 69e). Koncentracija od 50 mg/kg $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ nije dovela do statistički značajnih promena u sadržaju azota u korenovima klonova B229 i Pe19/66, dok je pri 150 mg/kg nitratne soli nikla došlo do statistički značajnog porasta u sadržaju azota u korenovima sva tri klona topola (slika 69 f). Sadržaj fosfora je usled izlaganja Ni ostao nepromenjen u korenovima klona B229 i listovima klona Pe 19/66 i M1, dok se u ostalim slučajevima pri izlaganju nižoj koncentraciji Ni sadržaj fosfora smanjio (slika 69 g h).



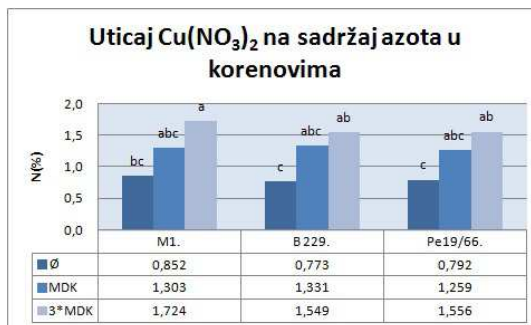
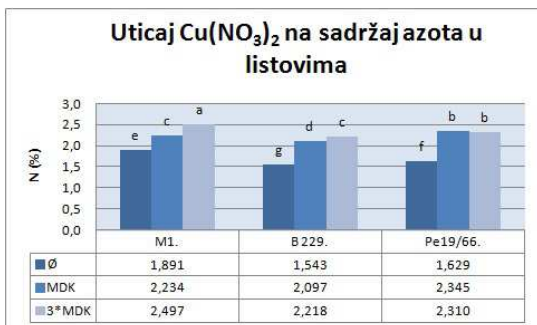
a)

b)



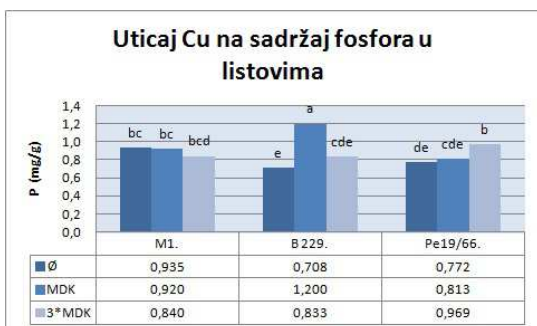
c)

d)



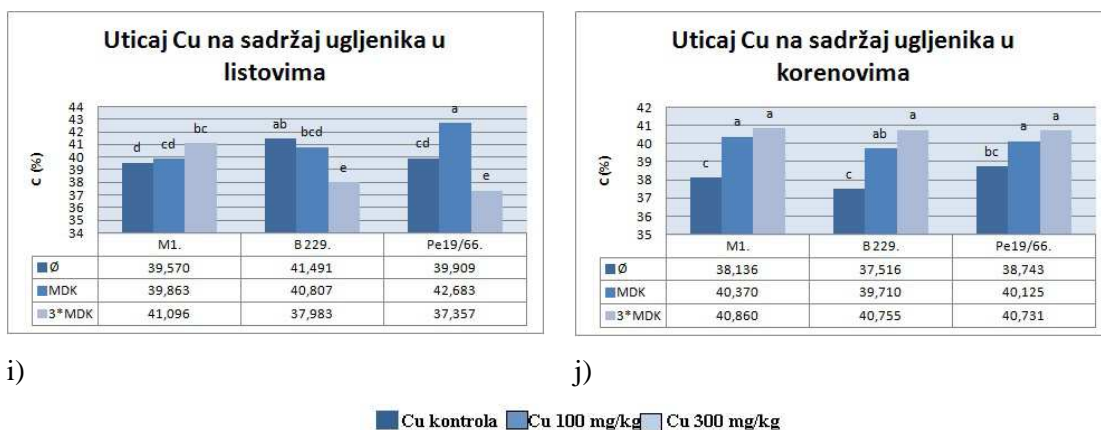
e)

f)



g)

h)



Slika 70. Uticaj jona Cu^{2+} na sadržaj makronutrijenata (metala (Mg i Ca) i nemetala (N, P i C)) u korenovima i listovima klonova topola

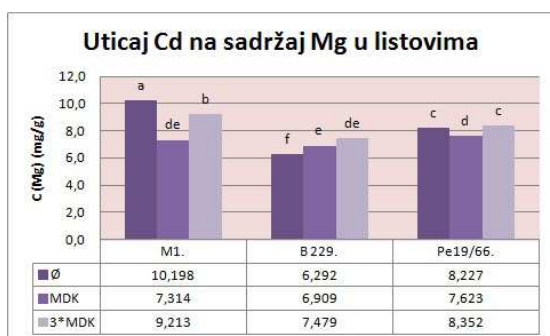
U listovima svih klonova topole pri tretmanu sa maksimalnom dozvoljenom koncentracijom bakra (100 mg/kg) u zemljištu, došlo je do povećanja sadržaja Mg^{2+} u poređenju sa kontrolnim biljkama. Pri povećanju koncentracije bakra na 300 mg/kg, došlo je do povećanja sadržaja Mg^{2+} u listovima kod klonova M1 i Pe 19/66, dok u klonu B229 nije bilo statistički značajnih promena u sadržaju Mg^{2+} (slika 70 a). Bakar je u obe koncentracije (100 i 300 mg/kg) u korenovima svih klonova izazvao smanjenje sadržaja Mg^{2+} (slika 70 b).

Praćenjem uticaja bakra na sadržaj Ca^{2+} je dokazano da u listovima klonova B229 i Pe 19/66 dolazi do blagog povećanja sadržaja Ca^{2+} , dok kod listova klona M1 ne dolazi do promena izazvanih povećanim koncentracijama bakra u poređenju sa netretiranim biljkama (slika 70 c). Takođe, u korenovima svih klonova dolazi do statistički značajnog smanjenja u sadržaju jona Ca^{2+} pri obe koncentracije bakra u poređenju sa kontrolama. U korenovima sva tri ispitana klona nema statistički značajnih razlika u sadržaju Ca^{2+} između tretmana sa 100 i 300 mg/kg bakra (slika 70 d).

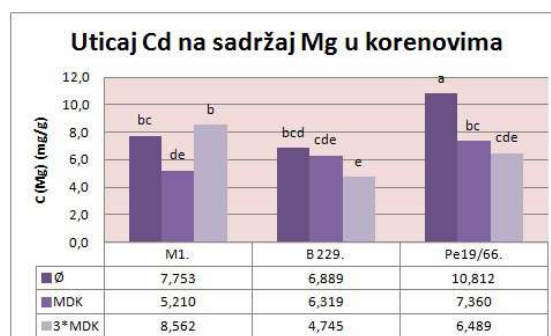
Dotakom, nitratnih soli bakra, povećan je sadržaj izvora azota, te i sadržaj azota u korenovima i listovima svih ispitanih klonova (slika 70 e f). Ovo povećanje sadržaja azota kao značajnog makronutrijenta u biljci je posledica tretiranja nitratnim solima teških metala i kompenzuje toksične efekte samih metala.

U ovom istraživanju ispitan je uticaj bakra na sadržaj fosfora koji je drugi nemetal po značajnosti sa velikim brojem fizioloških funkcija u biljkama. Iz dobijenih rezultata (slika 70 g) se vidi da klon M1 nije pokazao promene u sadržaju fosfora u listovima pri tretmanu sa obe koncentracije bakra (100 i 300 mg/kg), dok klon B229 pri nižoj koncentraciji bakra od 100 mg/kg pokazuje povećanje sadržaja fosfora u listovima, da bi pri tretmanu sa 300 mg/kg došlo do smanjenja sadržaja fosfora u listovima. Kod klona Pe19/66, tretman sa 100 mg/kg bakra u zemljištu nije izazvao značajne promene u sadržaju fosfora u listovima, dok je tretman sa 300 mg/kg bakra izazvao blago povećanje (19%) sadržaja fosfora u listovima. U korenovima sva tri

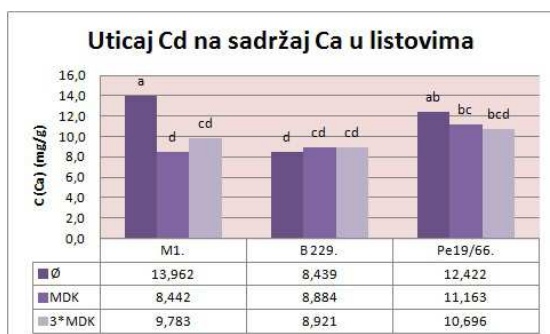
ispitana klon, maksimalana dozvoljena koncentracija bakra u zemljištu je izazvala porast sadržaja fosfora, dok je trostruko veća koncentracija od maksimalne dozvoljene za bakar dovela do smanjenja sadržaja fosfora u korenovima klonova M1 i B229 ili je koncentracija fosfora ostala nepromenjena kao kod klon Pe 19/66 (slika 70 h). U ovom ogledu, primenom CHN analize korenova i listova, pratio se i uticaj bakra na sadržaj ugljenika u listovima i korenovima klonova topola, te se u tom pogledu može primetiti da se sadržaj ugljenika blago povećao kod svih tretiranih klonova topola u odnosu na kontrolu, dok se u listovima kod klonova B229 i Pe 19/66 pri izloženosti trostruko većoj koncentraciji bakra od MDK sadržaj ugljenika blago smanjio (slika 70 i j).



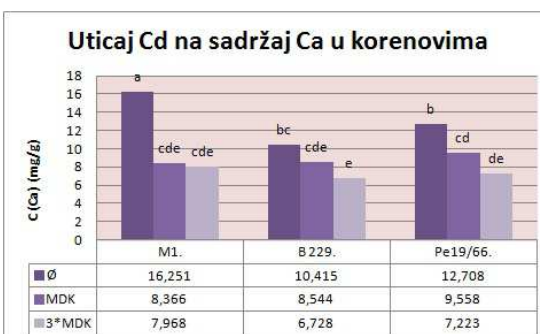
a)



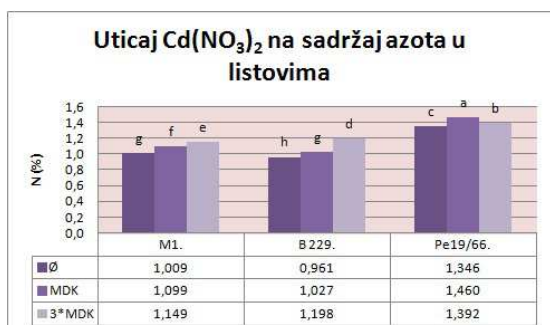
b)



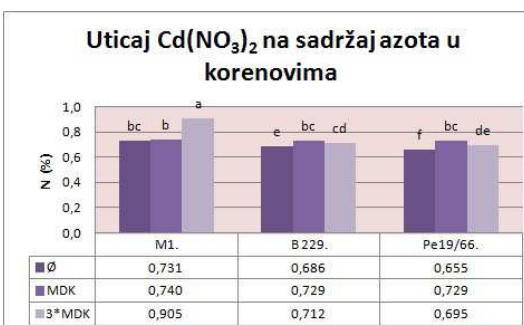
c)



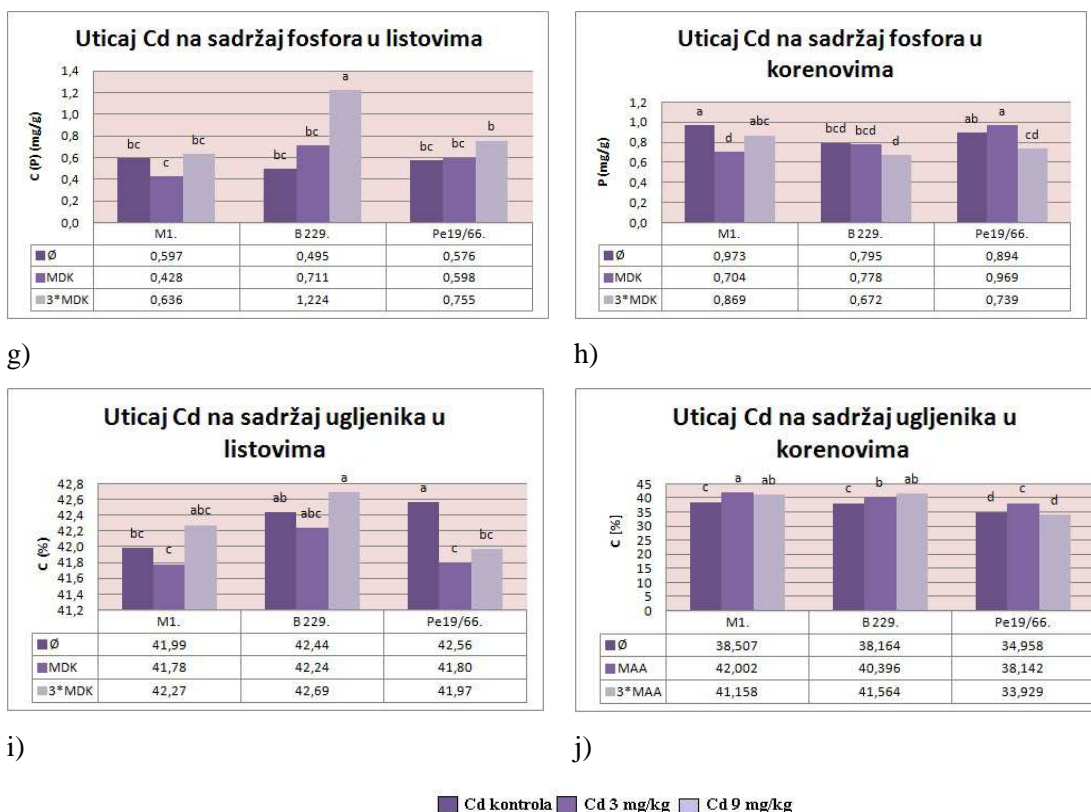
d)



e)



f)



Slika 71. Uticaj jona Cd^{2+} na sadržaj makronutrijenata (metala (Mg i Ca) i nemetala (N, P i C)) u korenovima i listovima klonova topola

Sadržaj Mg^{2+} u listovima klonova M1 i Pe 19/66 je opadao pri izlaganju koncentraciji od 3 mg/kg Cd^{2+} , dok je sadržaj Mg^{2+} u listovima klona B229 pri istom tretmanu pokazao neznatni rast (slika 71 a). U svim ispitanim klonovima, sadržaj Mg^{2+} u korenovima opadao je sa povećanjem koncentracije kadmijuma u zemljišnom supstratu (slika 71 b). Klon M1 je pokazao izuzetnu osetljivost u pogledu sadržaja Ca^{2+} u listovima i korenovima pod uticajem jona Cd^{2+} , te je izlaganje maksimalnoj dozvoljenoj koncentraciji kadmijuma, izazvalo drastično smanjenje sadržaja Ca^{2+} i u korenovima i listovima (slika 71 c d). Do smanjenja sadržaja Ca^{2+} u listovima usled tretiranja kadmijumom je došlo i u klonu Pe19/66, dok se sadržaj Ca^{2+} nije statistički značajno promenio u klonu B229. Nasuprot tome, toksične koncentracije kadmijuma su u korenovima svih ispitanih klonova dovele do redukcije sadržaja Ca^{2+} (slika 71 d).

Usled dodatka nitratnih soli kadmijuma došlo je do povećanja sadržaja azota u listovima sva tri klona. Usled dodatka trostruko veće koncentracije $Cd(NO_3)_2$ od maksimalno dozvoljene u zemljištu jedino kod korenova klona M1 je došlo do povećanja sadržaja azota, dok su vrednosti azota u korenovima kod preostala dva klona ostale nepromenjene u odnosu na kontrolu (slika 71e f). Sadržaj fosfora u listovima klona M1 se blago smanjio pri MDK (Cd), dok je pri trostrukoj vrednosti MDK ostao nepromenjen u odnosu na kontrolu. Ni kod klona Pe19/66 nije došlo do promena u sadržaju fosfora u korenovima (slika 71 g). Nasuprot tome, trostruko veća koncentracija Cd od MDK je izazvala drastično povećanje koncentracije fosfora u listovima klona B229. Joni kadmijuma u

koncentraciji od 3 mg/kg nisu doveli do promena u sadržaju fosfora u korenovima klona B229, dok su kod druga dva klona doveli do smanjenja sadržaja fosfora u korenovima (slika 71 h). Kadmijum je takođe pri maksimalno dozvoljenoj koncentraciji (3 mg/kg) u listovima sva tri klona doveo do smanjenja u sadržaju ugljenika, u odnosu na kontrolu, dok su tretmani sa trostruko većim koncentracijama Cd od MDK doveli do povećanja sadržaja ugljenika u listovima, u poređenju sa kontrolnim (slika 71 i). Joni Cd^{2+} uticali su na blagi porast u sadržaju ugljenika pri maksimalnoj dozvoljenoj koncentraciji, dok su pri trostruko većoj vrednosti izazvali pad sadržaja ugljenika u korenovima sva tri klona (slika 71 j).

Veliki broj studija potvrđuje da jedan od uzroka toksičnosti teških metala leži upravo u sposobnosti jona teških metala da zamene neki od jona esencijalnih metala, te da dovodu do izostanka metaboličke funkcije esencijalnih metala i do simptoma njihovog deficita i poremećaja u mineralnoj ishrani biljaka. Ovakav uticaj se najčešće zasniva na antagonizmu, kao što je na primer između jona kadmijuma i gvožđa, ili sinergizmu što je uočeno između jona Cd^{2+} i Mn^{2+} i Cu^{2+} . Unos teških metala zahteva proteinske nosače koji su namenjeni za neki od esencijalnih metala kao što su Ca^{2+} ili Mg^{2+} . Joni teških metala i joni esencijalnih metala pokazuju veliku sličnost u radijusu i naelektrisanju. Odnos naelektrisanja i veličine jona, dodatno doprinosi lakoj zameni esencijalnih jona, jonom teškog metala u strukturi proteina, bilo metaloproteina koji poseduju enzimsku funkciju, bilo proteinskih transportera. Tako na primer, rastvorna jedinjenja Ni^{2+} mogu biti apsorbovana putem transportnog sistema za jone Mg^{2+} , zahvaljujući sličnom odnosu naelektrisanja/veličine ova dva metala (Oller et al., 1997). Jedan od mogućih mehanizama koji objašnjava smanjeni unos mikro- i makroelemenata leži u kompeticiji za uobičajena mesta vezivanja na proteinskim transporterima, zahvaljujući uporedivim veličinama jonskog radijusa Ni^{2+} i drugih katjona. Ovaj mehanizam je potvrđen smanjenim unosom jona Mg^{2+} (78 pm), Fe^{2+} (82 pm) i Zn^{2+} (83 pm) u prisustvu jona Ni^{2+} (78 pm) (Barsukova i Gamzikova, 1999; jonski radijusi iz zagrada su uzeti iz rada Emsley et al., 1991). Neki autori ističu da je zapravo jedan od uzroka hloroze zapravo smanjen unos jona Mg^{2+} i Fe^{2+} kao posledica povećanih koncentracija jona Ni^{2+} u životnoj sredini (Piccini i Malavolta, 1992). Međutim drugi autori, (Cataldo et al., 1978; Kurner et al., 1987) tvrde da joni Mg^{2+} nemaju inhibitorni efekat prema apsorpciji jona Ni^{2+} . Sekundarni transport helatizovanih jona Ni^{2+} je omogućen putem odgovarajućih specifičnih proteina koji se vežu za jone Ni^{2+} tzv. HoxN proteina (eng. high-affinity nickel transport proteins), permeaza (Eitinger i Miri-Berthelot 2000), metalotioneina i metaločaperona (Hausinger 1997; Olson et al., 1997; Watt i Ludden, 1998). Teški metali poput jona Cd^{2+} , imaju toliko slične hemijske osobine sa jonima Mg^{2+} , koji je sastavni deo hema hlorofila, da može doći i do zamene ovog metala sa teškim metalom (Kupper et al., 1998).

Na primer, kod *Lathurus sativus* unos jona Ni^{2+} se povećava sa porastom pH vrednosti iznad 5.0 i ponovo smanjuje sa porastom pH iznad 8.0 (Pia et al., 2007). Unos jona Ni^{2+} kod *Berkheya coddii* je inhibiran jonima Ca^{2+} i Mg^{2+} (Robinson et al., 1999). Međutim, dokazano je da su joni Ca^{2+} i Mg^{2+} nekompitivni inhibitori ulaska jona Ni^{2+} u korenove raži (Kurner et al., 1987), dok su se joni Zn^{2+} ,

Cu^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} i Pb^{2+} pokazali kao kompetitivni joni inhibitori za unos jona Ni^{2+} . Među ovim jonima najveći kompetitivni efekat pokazali su joni Zn^{2+} i Cu^{2+} , dok su joni Co^{2+} , Cd^{2+} i Pb^{2+} bili veoma slabo kompetitivni sa jonima Ni^{2+} (Kurner et al., 1987).

Veći broj autora je utvrdio da teški metali utiču na usvajanje i metabolizam neophodnih elemenata. Tako na primer, olovo, nikal, a naročito kadmijum inhibiraju ne samo usvajanje kalcijuma, magnezijuma, gvožđa, cinka, mangana i bakra, već i njihov transport iz korena u nadzemne organe i time utiču na raspodelu elemenata u biljkama (Aller et al., 1990; Tang i Miiler, 1991).

Smanjenje intenziteta usvajanja i transporta neophodnih mineralnih elemenata zavisi, pored ostalog, i od koncentracije neesencijalnih metala u supstratu, vrste neophodnog mineralnog elementa, biljne vrste, genotipa i dr. (Yang et al., 1996). Od simptoma deficita ovih esencijalnih metala pojavljuju se hloroze i nekroze listova (Gussarsson et al., 1995).

Pri izraženom višku jona nikla i kadmijuma u hranljivoj podlozi kod brojnih biljnih vrsta se potpuno inhibira metabolizam magnezijuma, gvožđa, mangana i cinka, a kao posledica toga uočava se njihov nedostatak u mladim, novoformiranim nadzemnim organima. Ispitivani teški metali su imali najviše uticaja na koncentraciju alkalnih i zemnoalkalnih metala, posebno magnezijuma (Kastori i Vapa, 1994). Suprotno pomenutim autorima, Yang i saradnici (1996) su u većem broju biljnih vrsta utvrdili da kadmijum povoljno utiče na usvajanje i transport fosfora, i posebno sumpora.

U biljkama kukuruza povećane koncentracije bakra različito su uticale na sadržaj i distribuciju drugih elemenata. U korenu, joni bakra progresivno smanjuju koncentraciju kalcijuma i gvožđa, a u manjoj meri deluje na usvajanje kalijuma (Ouzounidou et al., 1995). Lanaras i saradnici (1993) su na osnovu sadržaja ukupnog, rastvorljivog i proteinskog azota utvrdili da bakar pri većim koncentracijama u hranljivom supstratu u biljkama pšenice inhibira usvajanje azota. U nekim biljnim vrstama bakar putem sinergizma podstiče nakupljanje kalijuma, magnezijuma ili olova (Clijsters i Van Assche, 1985).

Neophodni mineralni elementi u zemljišnom rastvoru u svom višku mogu uticati na usvajanje i transport teških metala i time ublažiti i/ili povećati njihov nepovoljan uticaj na biljke. Tako na primer, suvišak fosfatnih jona u zemljišnom rastvoru kod salate podstiče usvajanje bakra i cinka, a istovremeno inhibira njihov transport u nadzemne organe (Del Lorio et al., 1996). Višak jona Fe^{2+} , Mn^{2+} i Cu^{2+} u zemljištu smanjuje kod biljaka soje usvajanje i transport kadmijuma (Cataldo et al., 1984), a joni K^+ smanjuju usvajanje nikla. Nasuprot tome, amonijum joni (NH_4^+) u biljkama ovasa i pšenice podstiču nakupljanje mangana, cinka i kadmijuma (Wu et al., 1990; Balik et al., 1996).

Teški metali inhibiraju aktivnost ne samo nitrat-reduktaze, već i drugih enzima metabolizma azota, glutamat dehidrogenaze, glutamin sintetaze (Popović et al., 1996) i time podstiču u ćelijama korena i/ili nadzemnog dela nakupljanje nitrata (Kastori et al., 1993; Popović et al., 1996). Nakupljanje nitrata u biljkama u prisustvu teških metala ne zavisi samo od aktivnosti enzima asimilacije azota već i od drugih činilaca. U prisustvu teških metala membrane ćelija, posebno korena, gube selektivnost. Posledica toga može da bude i veoma intenzivno usvajanje i nakupljanje nitratnih

jona u "rezervni pol" u vakuoli ćelije (Champbell, 1988; Oaks et al., 1989). Pri nižim koncentracijama teških metala u supstratu, njihov uticaj na asimilaciju azota najčešće je indirektan (Kastori et al., 1995).

Teški metali, posebno srebro, bakar i živa utiču na strukturu i funkciju plazmaleme ćelija korena kada u procesu usvajanja dođu sa njom u neposredni kontakt. Selektivnost plazmaleme se gubi veoma brzo, već nekoliko minuta nakon izlaganja biljaka teškim metalima (Pandolfini et al., 1992). U tim uslovima dolazi i do depolarizacije plazmaleme (Costa i Morel, 1994), a prenosioci jona gube svoju funkciju (De Vos et al., 1991). Pomenute promene u plazmalemi je veći broj autora potvrdio merenjem fluksa jona K^+ (Meharg, 1993) i aktivnosti lipidne peroksidaze (De Vos et al., 1993).

Teški metali kobalt, cink, nikal i arsen prilikom transporta kroz plazmalemu nepovoljno utiču na njenu funkciju. Međutim, intenzitet njihovog usvajanja i nakupljanja u ćelijama korena, a time i njihova toksičnost za biljke, zavise naročito od prisustva drugih jona u hranljivom supstratu. Tako na primer, toksičnost arsena prvenstveno zavisi od koncentracije fosfata u zemljišnom rastvoru (Clarkson i Luettge, 1989).

Veći broja autora uočio je da povišene koncentracije nikla u supstratu kod biljaka izazivaju hlorozu, koja podseća na hlorozu izazvanom nedostatkom gvožđa. Smatra se da nikal u tim uslovima nepovoljno utiče ne samo na pokretljivost, već i na usvajanje gvožđa (Mishra i Kar, 1974). Suvišak nikla u hranljivoj podlozi inhibira i usvajanje kobalta i njegovo ugrađivanje u vitamin B_{12} . Nikal u biljkama ovasa i paradajza podstiče, a u biljkama graška smanjuje usvajanje kalcijuma (Kastori et al., 1995). Takođe, kod šećerne repe kadmijum utiče na sadržaj i distribuciju kalcijuma. Pretpostavlja se da kadmijum deluje na selektivnost membrana ćelija korena i aktivnost enzima pristunih u membranama, na primer, Ca-ATP-aze. U biljkama salate kadmijum utiče na usvajanje i transport mangana i gvožđa (Thus et al., 1991).

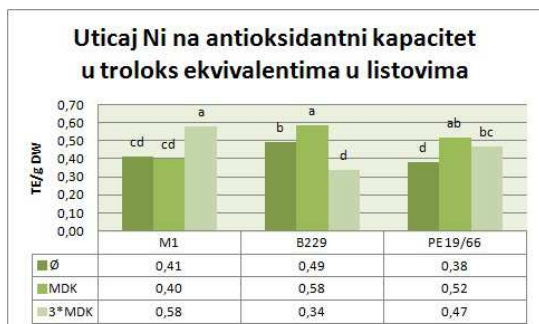
Kastori i saradnici, (1991) su u mladim biljkama soje utvrdili da olovo nepovoljno utiče na usvajanje kalijuma, fosfora, kalcijuma, magnezijuma, gvožđa, bakra, cinka i mangana, često i pri niskim koncentracijama u hranljivom rastvoru, 10^{-8} M. Uticaj visokih koncentracija, 10^{-3} M olova, kadmijuma i cinka u hranljivom rastvoru na nakupljanje neophodnih makro- i mikroelemenata u mladim biljkama pšenice bio je specifičan i zavisio je od genotipa, organa, elemenata.

Visoke koncentracije mangana u hranljivoj podlozi kod paradajza smanjuju koncentraciju kalijuma, mangana, gvožđa i molibdena, kako u korenu tako i u nadzemnim organima (Le Bot et al., 1996). Njihov nedostatak često može da prikrije simptome povećanih koncentracija mangana. Višegodišnja upotreba većih količina magnezijuma, može da ublaži nakupljanje toksičnih koncentracija mangana u biljkama. S toga se u novije vreme odnos sadržaja Mg:Mn u listovima koristi kao pokazatelj toksičnosti mangana za biljke (Le Bot et al., 1990).

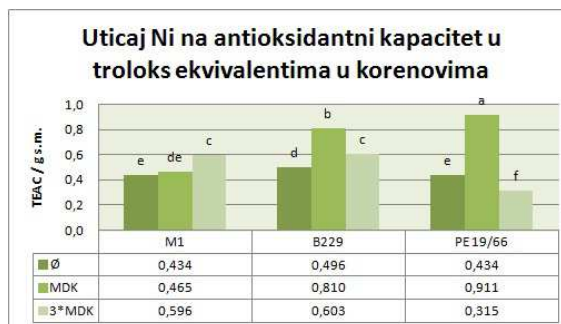
5.9. Uticaj teških metala na sposobnost ekstrakata klonova topola da vrše neutralizaciju slobodno-radikalnih vrsta

U radu je primenjena serija biohemijskih testova koji imaju za cilj merenje sposobnosti ekstrakata da vrše neutralizaciju slobodno-radikalnih vrsta *in vitro*. U ovom ogledu ispitivani su etanolni ekstrakti različitih klonova listova i korenova topola i određivana je sposobnost ekstrakata da vrše neutralizaciju kako stabilnih organskih komercijalnih radikalnih vrsta (ABTS⁺ ili DPPH radikal), tako i azotovih ili kiseoničnih radikalnih vrsta generisanih *in vitro*. Ova sposobnost ekstrakata da neutrališe reaktivne vrste može da se pripiše antioksidantnoj aktivnosti sekundarnih metabolita koji postoje u ekstraktima klonovima topole.

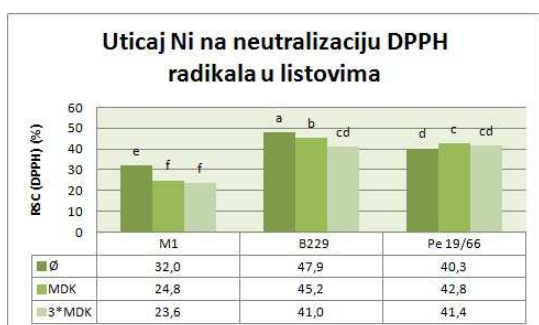
Rezultati prikazani na slici 72a. ukazuju da ukupni antioksidantni kapacitet, izražen troloks ekvivalentima, u listovima klonova B229 i Pe19/66 raste pod uticajem jona nikla u koncentraciji koja odgovara MDK za jone Ni²⁺ (50 mg/kg). Sa povećanjem koncentracije jona Ni²⁺ u zemljištu na trostruko veće vrednosti od MDK, kod istih klonova dolazi do pada antioksidantnog kapaciteta u poređenju sa tretmanima u koncentraciji od MDK. Koncentracija Ni od 50 mg/kg nije dovela do promena u antioksidantnom kapacitetu listova klona M1 na ABTS radikal, dok je trostruko veća koncentracija jona Ni²⁺ (150 mg/kg) dovela do povećanja sposobnosti neutralizacije ovog katjonskog radikala za 41 % (slika 72 a). Antioksidantni kapacitet korenova klona topole M1 je pod uticajem tretmana od 150 mg/kg Ni, porastao za 37 % u poređenju sa kontrolom. Pod uticajem tretmana sa 50 mg/kg Ni, vrednosti TEAC kod klonova B229 i Pe 19/66 su skoro udvostručene, da bi pod uticajem trostruko veće koncentracije nikla (150 mg/kg) došlo do pada antioksidantne sposobnosti korenova ovih klonova na vrednosti koje su pokazali ekstrakti kontrolnih biljaka (slika 72b).



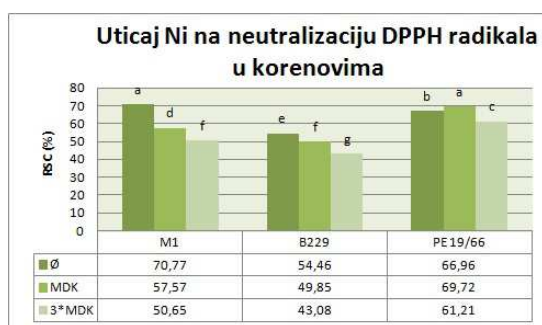
a)



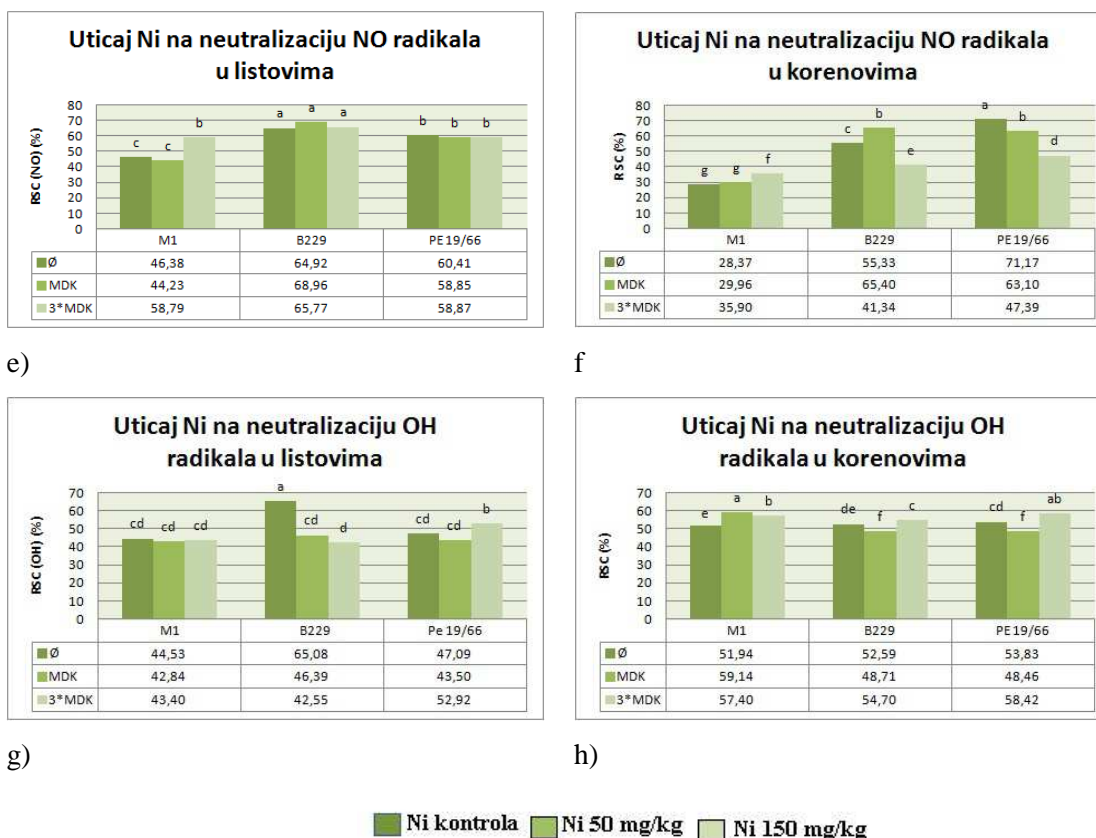
b)



c)



d)



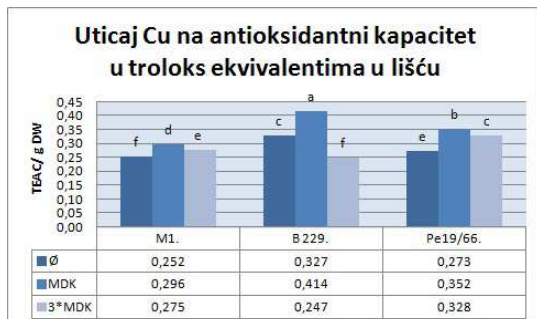
Slika 72. Uticaj jona Ni^{2+} na sposobnost etanolnih ekstrakata topola da vrše neutralizaciju slobodno-radikalnih vrsta (ABTS^+ , DPPH , $\text{NO} \cdot$ i $\text{OH} \cdot$)

Jedan od najčešće primjenjivanih rutinskih testova za merenje antioksidantne aktivnosti je i DPPH test koji je zasnovan na sposobnosti ekstrakta da neutrališe stabilni azot-centrirani DPPH radikal. Na histogramima sa slike 72. je predstavljen procenat inhibicije DPPH radikala, odnosno sposobnost neutralizacije radikala (eng. radical scavenger capacity-RSC). Prema rezultatima ovog testa (slika 72c), procenat neutralizacije DPPH radikala kod listova klonova M1 i B229 tretiranih jonima Ni^{2+} je veći u poređenju sa netretiranim listovima, što ukazuje da u uslovima stresa izazvanog jonima Ni^{2+} , dolazi do blage redukcije sposobnosti neutralizacije DPPH radikala. Nasuprot tome, kod listova klona Pe 19/66 pod uticajem jona Ni^{2+} koncentracije 150 mg/kg došlo je do povećanja sposobnost neutralizacije DPPH radikala, verovatno zahvaljujući aktivaciji antioksidantne odbrane manifestovane povećanom biosintezom sekundarnih metabolita u uslovima stresa izazvanog jonima Ni^{2+} . Ekstrakti korenova klonova M1 i B229, pokazali su smanjenje kapaciteta neutralizacije DPPH sa porastom koncentracije jona Ni^{2+} u zemljištu, dok su ekstrakti korena klona Pe 19/66 pri tretmanu od 50 mg/kg Ni, pokazali blago povećanje procenta neutralizacije DPPH radikala u poređenju sa kontrolom. Pri tretmanu sa trostruko većom koncentracijom od maksimalne dozvoljene koncentracije za Ni (150 mg/kg) kod korenova svih klonova topole došlo je do opadanja sposobnosti neutralizacije

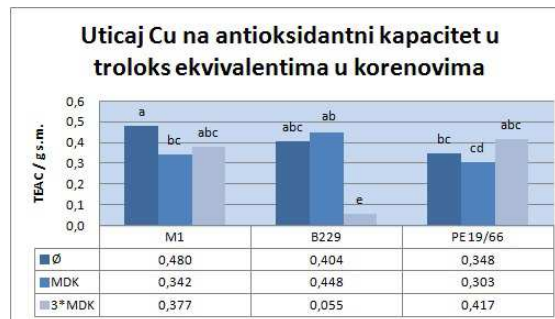
DPPH (slika 72d). Pod uticajem te koncentracije jona Ni^{2+} (150 mg/kg), sposobnost neutralizacije DPPH radikala se najviše smanjila kod korenova klona M1 i to za oko 40% u odnosu na kontrole.

Tretman jonima Ni^{2+} koncentracije od 150 mg/kg izazvao je značajno povećanje sposobnosti neutralizacije NO^{\cdot} radikala kod listova klona M1 u odnosu na kontrolne netretirane listove (slika 72e). Listovi klona Pe19/66 nisu pokazali promene u sposobnosti neutralizacije NO^{\cdot} u zavisnosti od tretmana različitim koncentracijama jona Ni^{2+} (slika 72e). Korenovi klona Pe19/66 pokazali su smanjenje sposobnosti hvatanja NO^{\cdot} radikala za 51% pri povećanju koncentracije jona Ni^{2+} u zemljištu na 150 mg/kg, dok kod korenova klona M1 nije došlo do značajne promene u sposobnosti neutralizacije NO^{\cdot} radikala. Korenovi klona B229, pod uticajem koncentracije jona Ni^{2+} od 50 mg/kg su pokazali neznatno povećanje sposobnosti neutralizacije NO^{\cdot} radikala, dok su pri koncentraciji Ni^{2+} od 150 mg/kg smanjili sposobnosti neutralizacije NO^{\cdot} radikala za 34% u poređenju sa korenovima kontrolnih biljaka (slika 72f).

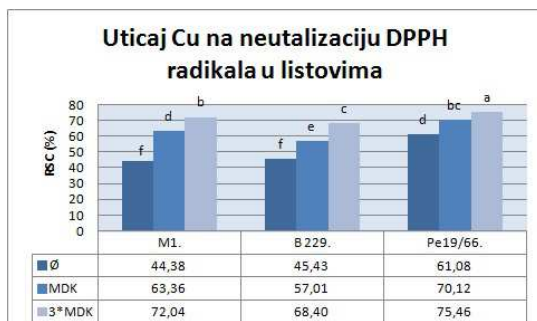
Praćenjem inhibicije hidroksilnog radikala, dokazano je da sa povećanjem koncentracije Ni^{2+} u zemljištu na 150 mg/kg, kod listova klona B229 dolazi do opadanja sposobnosti neutralizacije $\cdot\text{OH}$ radikala, dok kod listova klonova M1 i Pe 19/66 promene u neutralizaciji ovog kiseoničnog radikala u poređenju sa kontrolama nisu detektovane (slika 72g). Tretman jonima nikla koncentracije 150 mg/kg izazvao je blago povećanje (do 10%) sposobnosti neutralizacije hidroksil-radikala kod korenova svih ispitivanih klonova topola u poređenju sa korenovima kontrolnih biljaka (slika 72h).



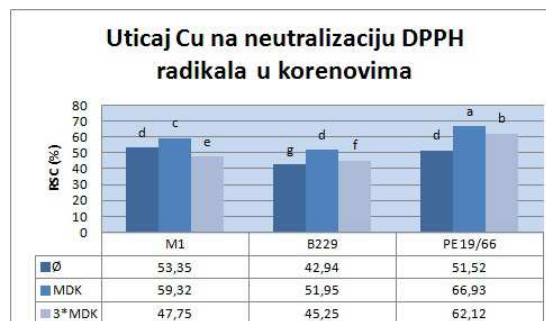
a)



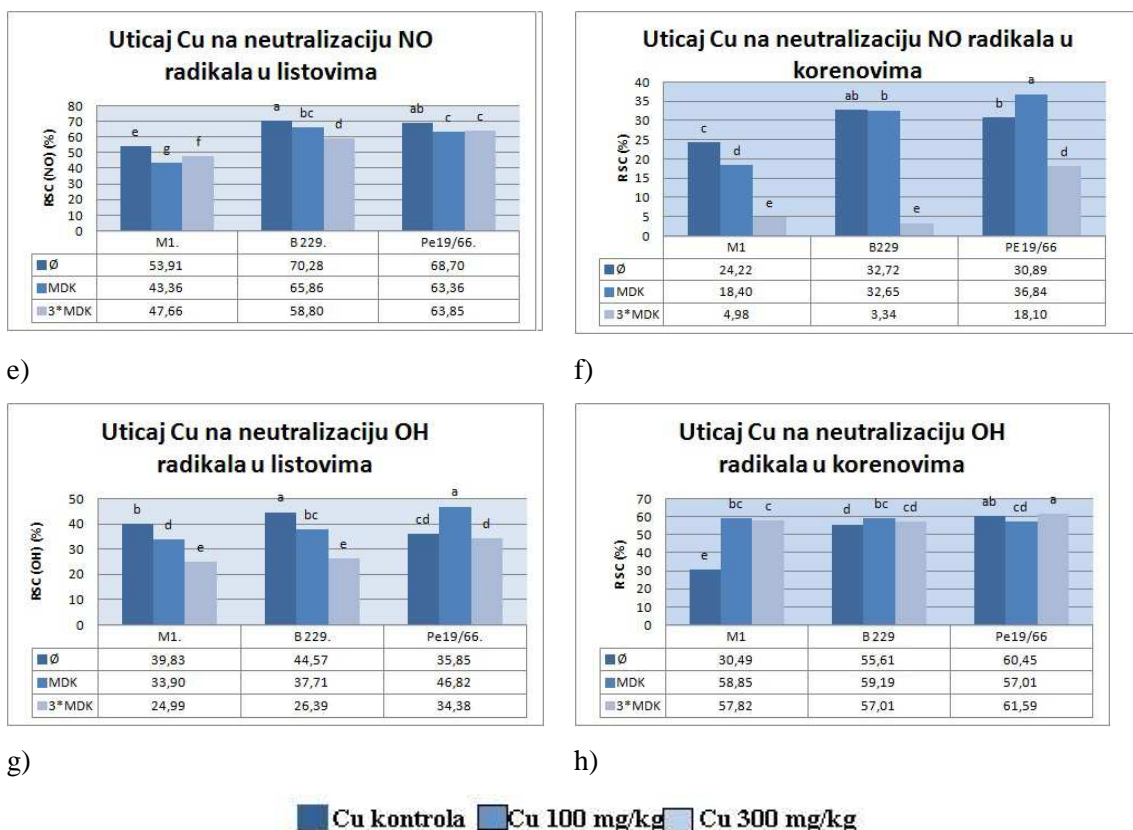
b)



c)



d)



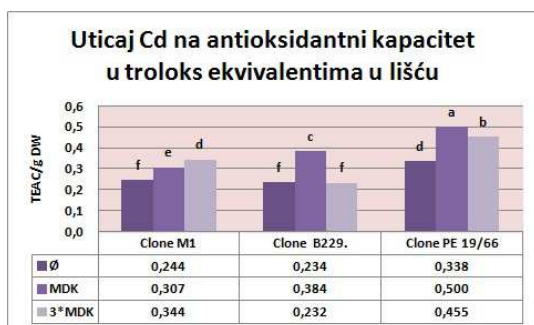
Slika 73. Uticaj jona Cu^{2+} na sposobnost etanolnih ekstrakata topola da vrše neutralizaciju slobodno-radikalnih vrsta ($\text{ABTS}^{\cdot+}$, DPPH^{\cdot} , NO^{\cdot} i OH^{\cdot})

Izlaganje klonova topola tretmanima jonima bakra dovelo je do promena u antioksidantnom kapacitetu i sposobnosti topola da vrše neutralizaciju radikalnih vrsta, što ukazuje na pojavu oksidativnog stresa izazvanog tretmanima bakrom. Ukupni antioksidantni kapacitet, izražen troloks ekvivalentima je povećan u listovima kod svih klonova topola pri izlaganju maksimalnim dozvoljenim količinama bakra u zemljištu (100 mg/kg) u poređenju sa kontrolnim listovima. Izlaganje topola trostruko većim koncentracijama bakra u zemljištu od maksimalnih dozvoljenih (300 mg/kg), dovelo je do smanjenja sposobnosti neutralizacije $\text{ABTS}^{\cdot+}$ radikala i nižeg antioksidantnog kapaciteta listova topola u poređenju sa antioksidantnim kapacitetom pri koncentraciji bakra od 100 mg/kg (slika 73a). Ovo ukazuje da manje koncentracije jona Cu^{2+} dovode do stimulacije antioksidantnog odgovora u listovima topole, dok veće koncentracije jona Cu^{2+} smanjuju antioksidantni odgovor i inhibiraju sposobnost neutralizacije radikalnih vrsta. Sa druge strane, u korenovima ispitivanih topola, došlo je do smanjenja antioksidantnog kapaciteta u klonovima M1 i Pe 19/66 pod uticajem 100 mg/kg bakra, dok je sa povećanjem koncentracije metala antioksidantni kapacitet pokazao trend rasta u poređenju sa nižom koncentracijom bakra (slika 73b). Najosetljivijim na uticaj bakra pokazali su se koreni topola klona B229, kod kojih se ukupna vrednost antioksidantnog kapaciteta smanjila osam puta pri izloženosti od 300 mg/kg bakra u poređenju sa korenovima kontrolnih biljaka.

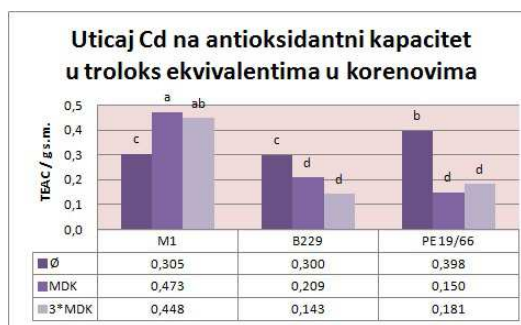
DPPH test je pokazao da pod uticajem jona bakra sposobnost ekstrakata da neutrališu DPPH radikal kod listova svih ispitanih klonova topola raste gradijentno sa porastom koncentracije bakra u zemljištu, u poređenju sa listovima kontrolnih topola (slika 73c). Takođe, korenovi svih ispitanih klonova topola su pokazali povećanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala pri koncentraciji bakra od 100 mg/kg, ali i blago smanjenje inhibicije DPPH radikala pri koncentraciji od 300 mg/kg bakra u zemljištu u poređenju sa tretmanom niže koncentracije bakra (slika 73d). Povećanje sposobnosti inhibicije DPPH radikala u klonovima topola i povećanje ukupnog antioksidantnog potencijala biljke pod uticajem jona bakra predstavlja jedan od odbrambenih mehanizama topola prema ovom abiotičkom stresu.

U listovima svih klonova dolazi do smanjanjenja neutralizacije NO[•] radikala *in vitro*, prilikom izlaganja koncentracijama od 100 i 300 mg/kg bakra u zemljištu. Ekstrakti netretiranih listova klona B229 pokazali su visoku sposobnost inhibicije NO[•] radikala, čak 70 % (slika 73e). Verovatno je da procenat inhibicije NO[•] radikala usled tretmana jonima bakra u listova opada jer joni bakra vrše inhibiciju nekih od enzima zaduženih za sintezu sekundarnih metabolita koji imaju sposobnost neutralizacije NO[•] radikala. Mada je sposobnost "gašenja" NO[•] radikala u korenovima netretiranih klonova topola dvostruko niža nego kod listova, trend smanjenja ove antioksidantne sposobnosti se primećuje prilikom tretmana sa 300 mg/kg bakra, gde se procenat inhibicije drastično smanjuje (slika 73f). Uloga NO[•] radikala u uslovima abiotičkog stresa je manje povezana sa prooksidativnim procesima unutar ćelije. S druge strane, NO[•] ima bitnu signalnu funkciju u aktiviranju molekulskih kaskada koje vrše signalnu transdukciju u cilju aktivacije bioloških odgovora na translatorskom nivou i bioloških odgovora vezanih za apoptozu. Pretpostavlja se da bi potpunom neutralizacijom NO[•] radikala došlo do poremećaja u signalnoj transdukciji, a time i izostanka odgovora nastalog biosintezom proteina ili transkripcionih faktora koji imaju za cilj ublažavanje stresa, te je sposobnost neutralizacije ovog signalnog molekula u uslovima intoksikacije bakrom verovatno otuda supresovana od strane biljaka (Lui et al., 2001).

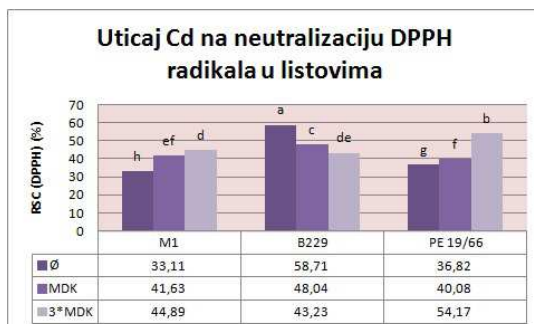
Uočeno je smanjenje inhibicije hidroksilnog radikala usled tretmana bakrom kod listova klonova M1 i B229 pri obe primenjene koncentracije bakra (100 i 300 mg/kg) u poređenju sa netretiranim uzorcima (slika 73g). Ovaj rezultat ukazuje da je nastajanje hidroksilnih radikala u uslovima oksidativnog stresa izazvanog bakrom kao učesnikom Fentonove reakcije, daleko brži proces od procesa neutralizacije ovog radikala od strane antioksidanata i sekundarnih biomolekula sa antioksidantnom funkcijom (Halliwell i Gutteridge, 1984). Međutim, listovi klona Pe 19/66 su pri tretmanu bakrom od 100 mg/kg pokazali blagi porast sposobnosti inhibicije [•]OH radikala, da bi pri većem tretmanu od 300 mg/kg bakra došlo do smanjenja ove sposobnosti. Ovakvo ponašanje može biti posledica ubrzane proizvodnje hidroksilnog radikala, usled oksidativnog stresa izazvanog redoks aktivnim bakrom. Povećanje sposobnosti topola tretiranih jonima bakra da neutrališu [•]OH radikale u odnosu na kontrolne netretirane biljke, primećeno je kod korenova klona M1 (slika 73h), dok kod druga dva klona nije došlo do značajne promene u inhibiciji hidroksilnog radikala *in vitro*.



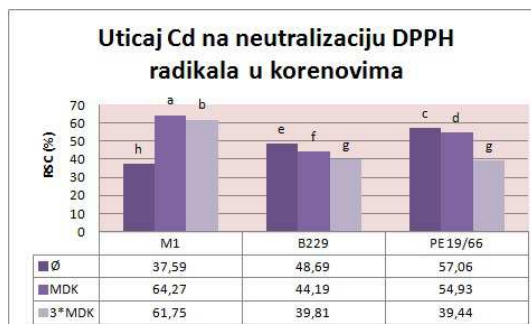
a)



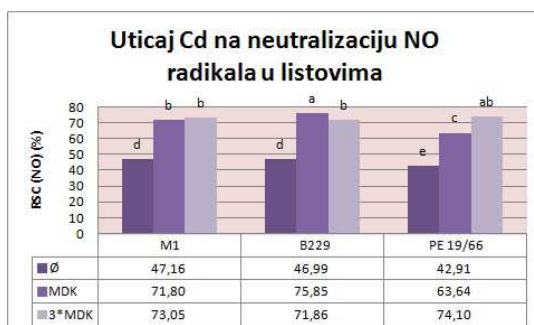
b)



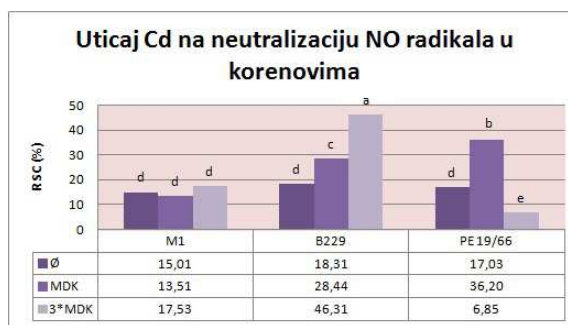
c)



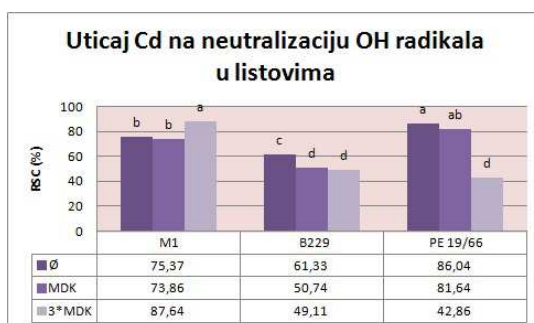
d)



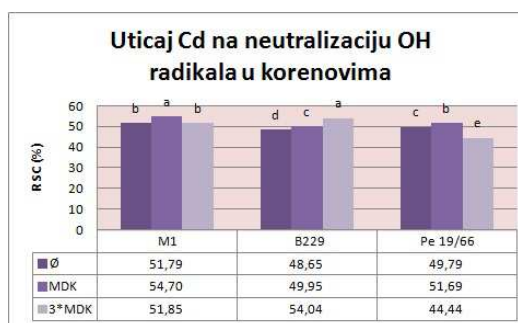
e)



f)



g)



h)

■ Cd kontrola ■ Cd 3 mg/kg ■ Cd 9 mg/kg

Slika 74. Utjecaj jona Cd²⁺ na sposobnost etanolnih ekstrakata topola da vrše neutralizaciju slobodno-radikalnih vrsta (ABTS^{•+}, DPPH, NO i •OH)

Iako kadmijum predstavlja redoks neaktivni element, koji nije sposoban da pokrene

Fentonovu reakciju, kadmijum svojim indirektnim delovanjem može da bude okidač oksidativnog stresa kod biljaka. Prema rezultatima dobijenim ABTS testom, korenovi svih klonova topola pri koncentraciji jona Cd^{2+} od 3 mg/kg pokazale su povećanje vrednosti troloks ekvivalenata i viši antioksidantni kapacitet od netretiranih klonova topola. Pri tretmanu sa 9 mg/kg kadmijuma u zemljištu, kod korenova klonova B229 i Pe 19/66 došlo je do smanjenja antioksidantnog kapaciteta u odnosu na iste klonove tretirane sa 3 mg/kg kadmijuma, što ukazuje da veće koncentracije kadmijuma dovode do smanjenja antioksidantne aktivnosti ekstrakata (slika 74a). Jedino klon topole M1, pokazuje trend rasta antioksidantnog kapaciteta pri obe koncentracije kadmijuma u lišću, što povećava stepen preživljavanja biljke u uslovima abiotičkog stresa, zahvaljujući angažovanju molekula sa jakim antioksidantnim kapacitetom koji imaju odbrambenu funkciju. Kod istog klona M1, trend povećanja ukupne antioksidantne aktivnosti pod uticajem jona kadmijuma se primećuje i u korenovima, dok u korenovima ostalih ispitanih klonova pod uticajem jona kadmijuma dolazi do smanjenja ukupnog antioksidantnog kapaciteta u poređenju sa korenovima netretiranih biljaka (slika 74b).

Prema rezultatima DPPH testa u listovima klonova M1 i Pe 19/66 došlo je po povećanja inhibicije DPPH radikala u topolama tretiranim kadmijumom u odnosu na kontrolne, što govori o povećanju antioksidantnog kapaciteta u situacijama oksidativnog stresa izazvanog jonima kadmijuma kod ovih klonova topola. Nasuprot tome, u listovima klona B229 tretiranog kadmijumom, došlo je do smanjenja sposobnosti inhibicije DPPH radikala, u poređenju sa listovima netretiranih biljaka (slika 74c). Rezultati antioksidantne aktivnosti dobijeni DPPH testom se u slučaju ispitivanja uticaja kadmijuma umnogome poklapaju sa onim dobijenim ABTS testom, te pokazuju smanjenje inhibicije DPPH radikala kod korenova klonova B229 i Pe 19/66 kod tretiranih topola, u poređenju sa netretiranim. Korenovi klona M1 su pokazali blago povećanje inhibicije ovih komercijalnih radikala, te i ukupne antioksidantne aktivnosti kod biljaka tretiranih kadmijumom u poređenju sa kontrolnim (slika 74 d b).

Pod uticajem jona kadmijuma sposobnost inhibicije azot-oksida radikala je u listovima svih ispitanih klonova veća kod biljaka tretiranih kadmijumom od listova kontrolnih biljaka *in vitro*. Ovo povećanje sposobnosti neutralizacije NO radikala prilikom izlaganja jonima kadmijuma zapaženo je i u korenovima klonova B229 i Pe 19/66, s tim da u ta sposobnost u korenovima klona Pe 19/66 drastično opada ($RSC(NO)=6,65\%$) prilikom izlaganja koncentraciji kadmijuma od 9 mg/kg u zemljištu (slika 74e). Klona M1, nije pokazao statistički značajne promene u procentu inhibicije azot-oksida izazvane dvema koncentracijama kadmijuma u odnosu na netretirane topole tog klona.

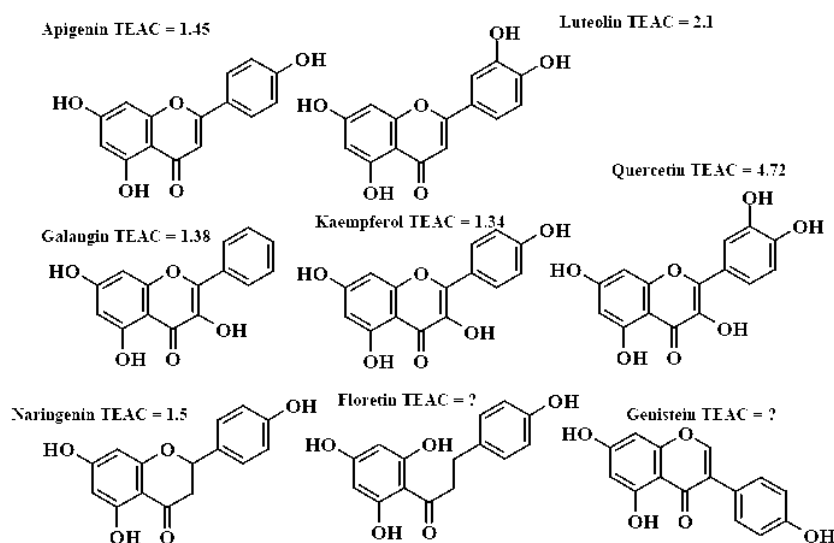
Ispitivani klonovi su pokazali različite trendove inhibicije hidroksilnog radikala pod uticajem jona kadmijuma. Tako, u listovima klona Pe 19/66 je pod uticajem jona kadmijuma koncentracije od 9 mg/kg, došlo je do dvostrukog smanjenja inhibicije hidroksilnog radikala.

Listovi klona M1 nisu pokazali značajne promene u sposobnosti inhibicije hidroksilnog radikala pri izloženosti koncentraciji od 3 mg/kg, dok je pri trostruko većem tretmanu došlo do povećanja sposobnosti neutralizacije OH radikala u odnosu na kontrolu za 16% (slika 74g). Korenovi ispitanih klonova topola nisu pokazali statistički značajne promene u inhibiciji hidroksilnog radikala usled zagađenja zemljišta kadmijumom (slika 74h).

Kebert i saradnici (2011) su ispitivali oksidativni stres u listovima klonova topola Pe 19/66, B229 (*Populus deltoides*) i Panonnia (*Populus x euramericana*) nakon izlaganja biljaka tretmanima smeše teških metala (Ni, Cd i Pb), herbicida, dizel goriva, i kombinovanog tretmana dizelom i teškim metalima u poljskim uslovima. Autori su ukazali da listovi topola tretiranih biljaka pokazuju veći antioksidantni kapacitet u odnosu na kontrolne i izdvojili klon B229 kao najviše tolerantan na primenjene tretmane.

Takođe, Štajner i saradnici (2011) su istraživali i poredili antioksidantnu aktivnost listova šest različitih drvenastih vrsta (*Populus alba*, *Robinia pseudoacacia*, *Sophora japonica*, *Euodia hupehensis*, *Tilia sp.*, *Fraxinus sp.*) iz Srbije kako bi procenili njihovu toleranciju na sušu primenom antioksidantnih skrining testova. Eksperiment je sproveden tokom sušnih meseci juna, jula i avgusta. Najveću antioksidantnu aktivnost tokom nepovoljnih uslova suše u Julu su pokazale vrste *Populus alba* i *Fraxinus spp.*, gde se topola vrste *P. alba* posebno istakla sa visokom sposobnošću neutralizacije DPPH radikala i to 86,4% tokom juna, 93,3% u julu i 89,3 % u avgustu. Zhu i saradnici (2009) su takođe primetili povećanje procenta RSC (DPPH) kod *Bupleurum spp.* usled osmotskog stresa izazvaneog sušom.

Jedan od najprimenljivijih testova za ispitivanje antioksidantne aktivnosti ekstrakata raznih biljnih vrsta, izolovanih jedinjenja i uzoraka hrane je ABTS ili troloks ekvivalent test (TEAC) (Rice Evans i Miller, 1996). Na slici 75. prikazane su TEAC vrednost raznih jedinjenja izolovanih iz biljnih uzoraka i uzoraka hrane. TEAC jedinica predstavlja onu koncentraciju antioksidanta, koja dovodi do promene apsorbance ABTS radikala istovetnoj onoj koju izaziva 1 mM troloksa-hidrofilnog analoga vitamina E. TEAC vrednosti askorbinske kiseline (1,05), α -tokoferola (0,97), glutaciona (1,28) i mokraćne kiseline (1,01) su skoro isti, iako glutacion donira samo jedan, dok ostala jedinjenja po dva elektrona. Radi poređenja, najaktivniji etanolni ekstrakti listova topola u ovom istraživanju pokazivali su vrednosti od oko 0,5 TEAC jedinica. TEAC testom testirana su i najbitnija fenolna jedinjenja poput ferulne (1,9) i p-kumarne (2,0) kiseline koje imaju slične TEAC vrednosti, dok kafena kiselina slična po strukturi ferulnoj ima TEAC vrednost svega 1,0. Iznenadujuće su i razlike između kvercetina (3,0) i kamferola (1,0) s obzirom na vrlo sličnu strukturu (Rice-Evans et al., 1996).

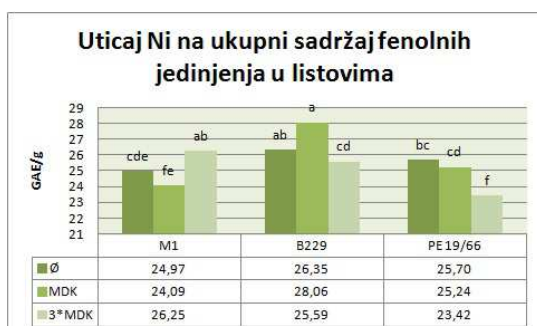


Rice-Evans i inini. 1996

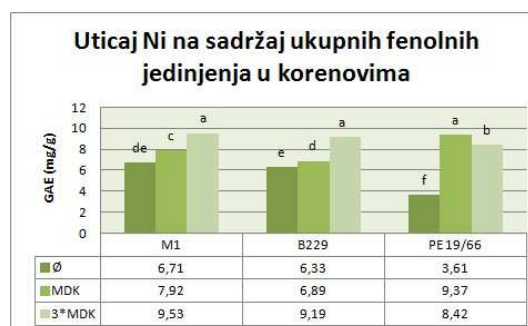
Slika 75. TEAC vrednosti poznatih antioksidantnih fenolnih jedinjenja (Rice Evans et al., 1996)

5.10. Uticaj teških metala (Ni, Cu i Cd) na sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u klonovima topola

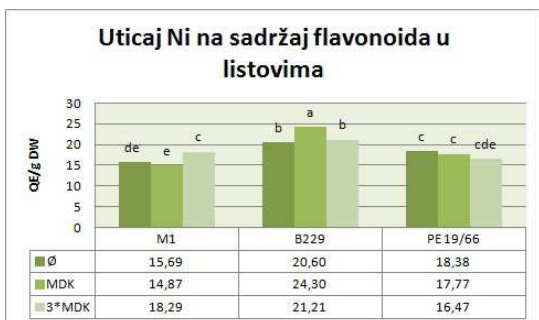
Fenolna jedinjenja, od kojih je najvažnija klasa flavonoida, zbog svojih hemijskih osobina predstavljaju glavne nosioce antioksidantne aktivnosti biljnih ekstrakata. S obzirom da je u ispitivanim klonovima topola dokazana velika varijabilnost u antioksidantnoj aktivnosti pod uticajem teških metala pretpostavka je da je razlog tome upravo različit sadržaj fenolnih jedinjenja i flavonoida.



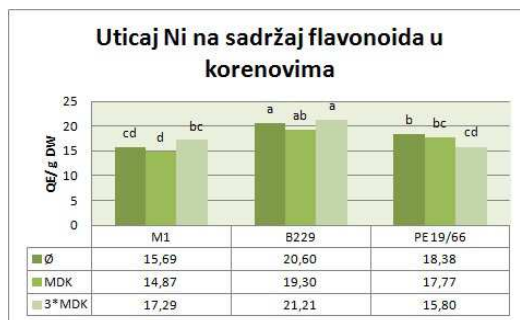
a)



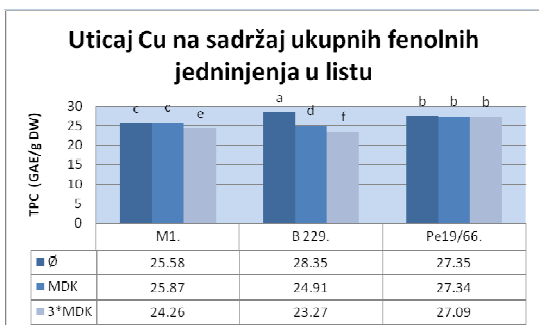
b).



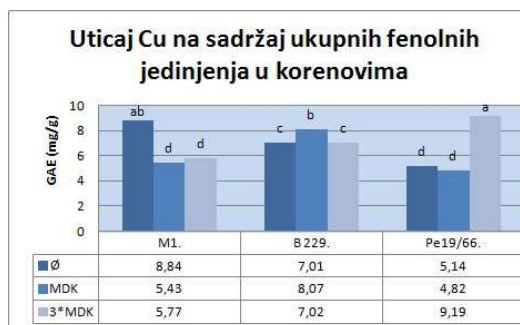
c)



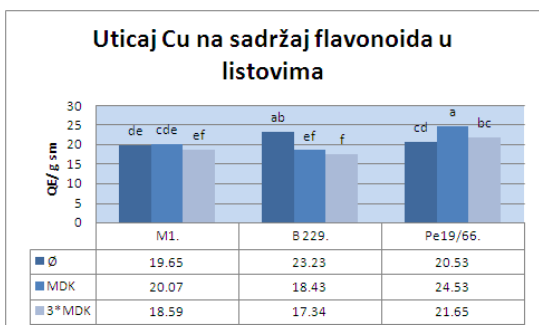
d)



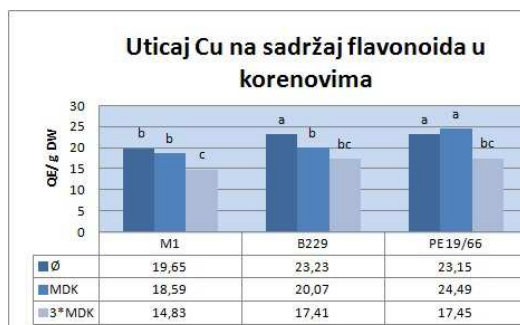
e)



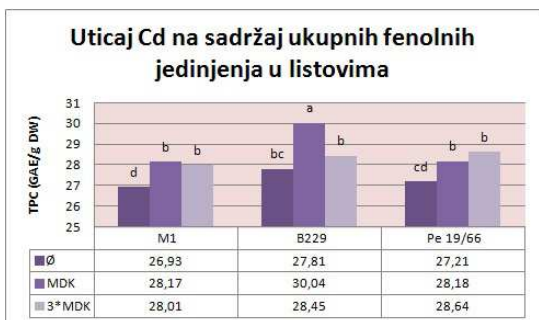
f)



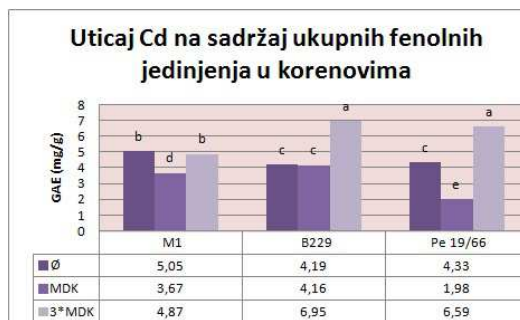
g)



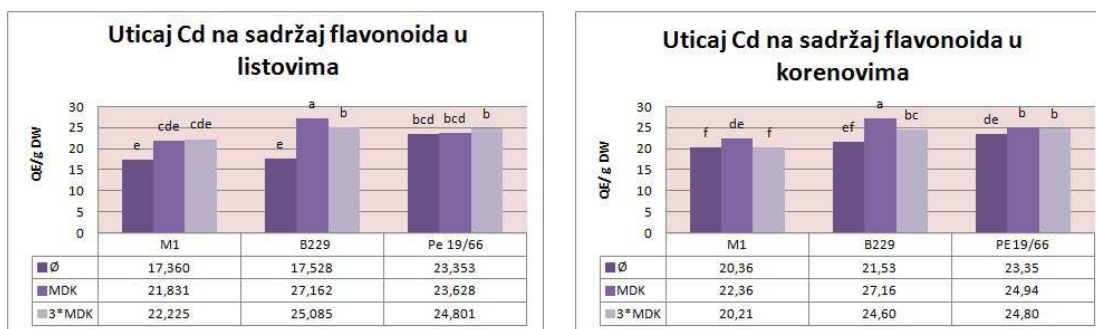
h)



i)

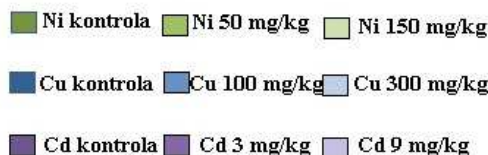


j).



k)

l)



Slika 76. Uticaj teških metala (Ni, Cu i Cd) na sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u klonovima topola

Sadržaj fenolnih jedinjenja u listovima klonova topola kretao se u opsegu od 20-30 GAE/ g suve materije, dok su se u korenovima topola vrednosti ukupnih fenolnih jedinjenja kretala u opsegu od 3-10 GAE/g suve materije. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u listovima je tri do četiri puta veći nego u korenovima. U korenovima svih ispitanih klonova topola se može primetiti porast sadržaja ukupnih fenola pod uticajem jona nikla koncentracije od 50 i 100 mg/kg u zemljištu u odnosu na netretirane biljke (slika 76b). Joni Ni^{2+} izazvali su različito ponašanje u listovima različitih klonova topole, tako je u listovima klonova M1 i Pe 19/66 pod uticajem jona nikla došlo do smanjenja sadržaja fenola, dok u listovima klona B229 dolazi do povećanja koncentracije ukupnih fenola usled tretmana od 50 mg/kg nikla. Pri izlaganju višim koncentracijama nikla od 150 mg/kg i u listovima klona B229 došlo je do smanjenja koncentracije ukupnih fenola (slika 76a). Kod klona B229, došlo je i do povećanja sadržaja flavonoida u listovima pri umerenim koncentracijama jona Ni^{2+} (50 mg/kg), dok se pri višoj koncentraciji Ni^{2+} (150 mg/kg) i sadržaj flavonoida smanjio u listovima klona B229. Listovi klona Pe 19/66 i M1 nisu pokazali statistički značajnu razliku u sadržaju flavonoida pri tretmanima niklom (slika 76c).

Sa druge strane, bakar kao redoks aktivni element koji je izazvao promene antioksidantnog kapaciteta klonova topola nije doveo do promene u sadržaju ukupnih fenolnih jedinjenja u listovima klonova Pe19/66 i M1, a izazvao je tek blago sniženje sadržaja ukupnih fenola u listovima klona B229, pri oba tretmana bakrom (100 i 300 mg/kg) u zemljištu (slika 76 e). U korenovima klona M1 pod uticajem obe koncentracije bakra došlo je do smanjenja sadržaja ukupnih fenola. Koncentracija od 300 mg/kg bakra u zemljištu je kod korenova klona Pe 19/66 izazvala drastično povećanje sadržaja ukupnih fenola (za 79%), dok isti tretman nije doveo do promena u sadržaju ukupnih fenola kod klona B229 (slika 76f).

Sadržaj flavonoida u listovima klona M1 se nije menjao pod uticajem bakra, dok su u listovima klona B229 obe koncentracije (100 i 300 mg/kg) bakra indukovale smanjenje sadržaja flavonoida. Niža koncentracija bakra (100 mg/kg) je kod listova klona Pe 19/66 delovala stimulatивно na biosintezu flavonoida, dok je viša koncentracija bakra (300 mg/kg) dovela do smanjenja sadržaja flavonoida u listovima istog klona (slika 76g).

Joni Cd^{2+} u koncentraciji od 9 mg/kg u zemljištu indukovali su povećanje ukupnog sadržaja fenola u listovima sva tri ispitana klona topola (slika 76 i). U korenovima klonova B229 i Pe 19/66 je pod uticajem koncentracije jona Cd^{2+} od 9 mg/kg došlo je do značajnog porasta (65 i 52 %) u sadržaju ukupnih fenolnih jedinjenja, dok klon M1 nije pokazao statistički značajne promene u sadržaju fenola pod uticajem jona kadmijuma (slika 76 j).

Joni Cd^{2+} su u listovima klonova M1 i B229 doprineli porastu koncentracije flavonoida u poređenju sa kontrolnim netretiranim biljkama (slika 76k). U korenovima svih ispitanih klonova topola primećen je blagi porast sadržaja flavonoida pri kontaminaciji zemljišta sa maksimalno dozvoljenom koncentracijom kadmijuma (3 mg/kg), dok su tretmani trostruko višim koncentracijama izazivali pad sadržaja flavonoida kod klonova M1 i B229, ili nisu uticali (klon Pe 19/66) (slika 76 l).

Dokazano je da fenolna jedinjenja osim važne uloge u alelopatskim odnosima i odbrani od herbivora imaju ulogu u povećavanju tolerancije biljke na razne abiotičke faktore stresa poput: temperaturnih kolebanja (Nozzolillo et al., 2002; Solecka i Kacperska, 2003), prisustva teških metala (Hale et al., 2002; 2001; Krupa et al., 1996; Marrs i Walbot, 1997; Suvarnalatha et al., 1994) i vodnog deficita (Farrant, 2000; 2003). Biotički i abiotički uzročnici stresa-uključujući biljojede, patogene, viruse, mehanička oštećenja biljke, temperaturne ekstreme, visoka osvetljenost, UV zračenje, disbalans u mineralnoj ishrani, zagađenja teškim metalima i herbicidima, suša, salinitet, anoksija i izloženost ozonu izazivaju povišenje nivoa fenolnih jedinjenja u vegetativnim izbojcima i korenovima (Chalker-Scott, 1999; 2002; Close i Beadle, 2003). Odbrambena uloga fenolnih jedinjenja pripisuje se fotoprotektivnim, osmoregulatorskim i ponajviše antioksidantnim svojstvima ovih jedinjenja (Gould et al., 2002). Zahvaljujući njihovoj specifičnoj hemijskoj strukturi, velikom broju elektron-donorskih hidroksilnih grupa i sposobnosti rezonancije elektrona u fenolnom jezgru Bors et al., 1990; Rice-Evans et al., 1996), ova jedinjenja su sposobna da vrše redukciju skoro svih reaktivnih kiseoničnih i azotovih vrsta i do četiri puta efikasnije od askorbinske kiseline ili α -tokoferola (Buckley et al., 1996; Heinloth et al., 2002; Pratico et al., 2001). Fenolna jedinjenja značajno smanjuju oštećenja DNK, lipidnu peroksidaciju i oksidaciju lipoproteina niske gustine (LDL) (Hu et al., 2003; Ramirez-Tortosa et al., 2001). Takođe, fenolna jedinjenja pokazuju sposobnost da vrše helaciju gvožđa i bakra, te stoga smanjuju njihovo učestvovanje u proizvodnji hidroksil-radikala u Haber–Weiss reakciji (Brown et al., 1998;), a mogu delovati i preventivno sprečavanjem formiranja hipervalentnih metalnih formi koje su uključene u procese inicijacije lipidne peroksidacije (Arora et al., 2000).

Veliki broj dokaza ukazuje na povećanu akumulaciju flavonoida u stvaranju rezistencije na teške metale u zemljištu. Korenovi biljke kukuruza (*Zea mays*) koji su bili izloženi jonima

aluminijuma su pokazali visoke nivoe fenolnih jedinjenja (Kidd et al., 2001; Cocker et al., 1998). Ostaje pitanje da li flavonoidi u kiseloj sredini mogu da se vezuju za jone metala s obzirom na kompeticiju između hidronijum jona i jona metala. Kidd i saradnici (2001) su dokazali da određeni flavonoidi poput katehina formiraju stabilne aluminijum komplekse. Iz tog razloga, zeleni čaj koji sadrži visok sadržaj katehina je sposoban da akumulira visoke koncentracije jona Al^{3+} i pokazuje visoku tolerantnost na ove jone.

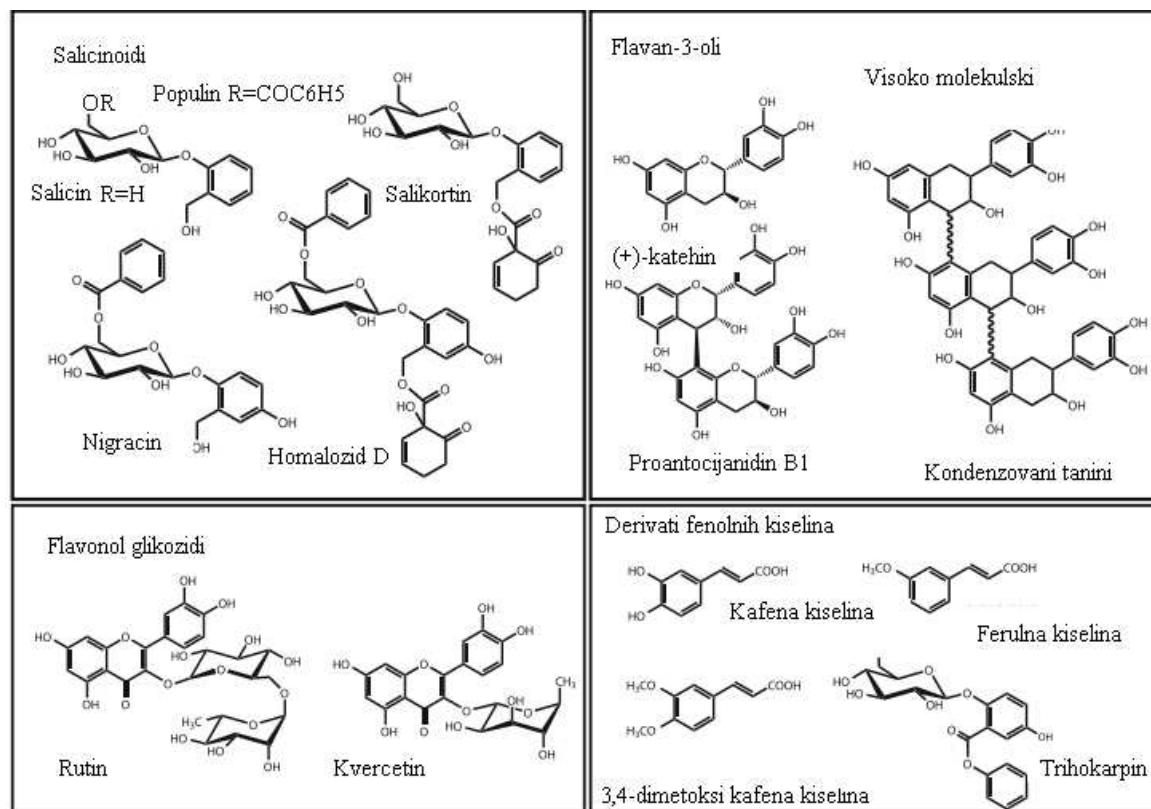
Povišena biosinteza fenolnih jedinjenja je primećena u pšenici pod uticajem jona nikla (Diaz et al., 2001). *Phaseolus vulgaris* izložen jonima Cd^{2+} je pokazao povišenu akumulaciju rastvornih i nerastvornih fenola u korenovima i listovima, a nakon izlaganja bakar-sulfatu listovi *Phyllanthus tenellus* su sadržali značajno više koncentracije fenola nego kontrolne biljke. Povećana biosinteza fenola je u korelaciji sa povećanom aktivnošću enzima uključenih u metabolizam fenolnih jedinjenja, što ukazuje na *de novo* sintezu fenola pod uticajem stresa izazvanog teškim metalima. Nasuprot tome, neki autori tvrde da su povećane koncentracije flavonoida rezultat hidrolize njihovih konjugata, te da nisu posledica *de novo* sinteze (Diaz et al., 2001).

Biljke bogate taninima i polifenolima su više tolerantne na jone Cr^{3+} , Pb^{2+} , Mn^{2+} i Hg^{2+} što se objašnjava direktnom helatizacijom jona metala koja je zabeležena kod ekstrakta rizoma *Nymphaea* (Lavid et al., 2001). Sposobnost helatizacije fenolnih jedinjenja je povezana sa visokim nukleofilnim karakterom aromatičnog prstena pre nego za specifične helirirajuće grupe unutar samog molekula (Moganu et al., 1997). Takođe, glikozilovani flavonoidi imaju nižu antioksidantnu aktivnost u poređenju sa svojim aglikonima (Yamasaki et al., 1997; Rice-Evans et al., 1996).

Povećanje koncentracije fenolnih jedinjenja usled izlaganja biljaka jonima Cd^{2+} je zabeleženo i kod topola, gde je koncentracija od 200 μM izazvala povećanje fenolnih jedinjenja u korenovima *P. deltoides* za 47%, u kori *P. euramericana*, *P. nigra* i *P. popularis* za od 38-168 %, dok je u listovima *P. nigra* koncentracija fenola je bila viša za 67% u poređenju sa kontrolnim biljaka (He et al., 2013), što je u skladu sa rezultatima dobijenim u našem ogledu.

Utvrđeno je da se rod *Populus*, koji pripada familiji *Salicaceae*, sastoji od 30 vrsta i obiluje velikom raznovrsnošću flavonoida u mladim listovima, kori, pupoljcima i smoli pupoljaka (Cervera et al., 2005). Sastav ovih jedinjenja karakterističan je za svaku vrstu (Greenaway et al., 1992). Hemijskom karakterizacijom listova i pupoljaka topole identifikovani su aglikoni flavonoida, iz grupe flavanona poput pinokembrina i pinostrobina, flavonola i njihovih glikozida poput galangina, rutina, kvercetina, ramnetina, kamferola i miricetina, flavona poput hrizina i apigenina i estara fenolnih kiselina poput kafene, ferulne ferulic, 3,4-dimetoksi kafene i drugih derivata poput trihokarpina. (Boeckler et al., 2013; Boeckler et al., 2013; Greenaway et al., 1987, 1992; Isaeva et al., 2010). Vrste roda topole su posebno bogate u dve grupe fenolnih jedinjenja: salicinoidima, 1-O- β -glikozidima salicil ili gentizil alkohola, i oligomerima flavan-3-ol, koji se drugačije nazivaju kondenzovanim taninima ili proantocianidinima. Salicinoidi su prisutni i u lišću i kori topole u koncentracijama od 10–150 mg/g s.m., dok su flavan-3-oli i flavonol glikozidi pronađeni u nižim koncentracijama od 2-10

mg/g s.m. i prisutni samo u lišću (Dudonne et al., 2011; Boeckler et al., 2013). Veliki broj fenolnih jedinjenja pronađen je i u propolisu topole, pčelinjem produktu nastalom iz pupoljaka, koji je u medicini poznat po lekovitosti zahvaljujući antimikrobnim, antiinflamatornim i antioksidantnim svojstvima (Vardar-Unlu et al., 2008; Castaldo et al., 2002; Banskota et al., 2001). Zbog visokog sadržaja flavonoida i dobre antioksidante aktivnosti ekstrakata pupoljaka topola, Dudonne i saradnici (2011) su ispitivali uticaj ovih ekstrakata na procese starenja kože kod ljudi i zaključili da bi upotreba topolinskih pupoljaka u kozmetičke svrhe bila moguća i opravdana.

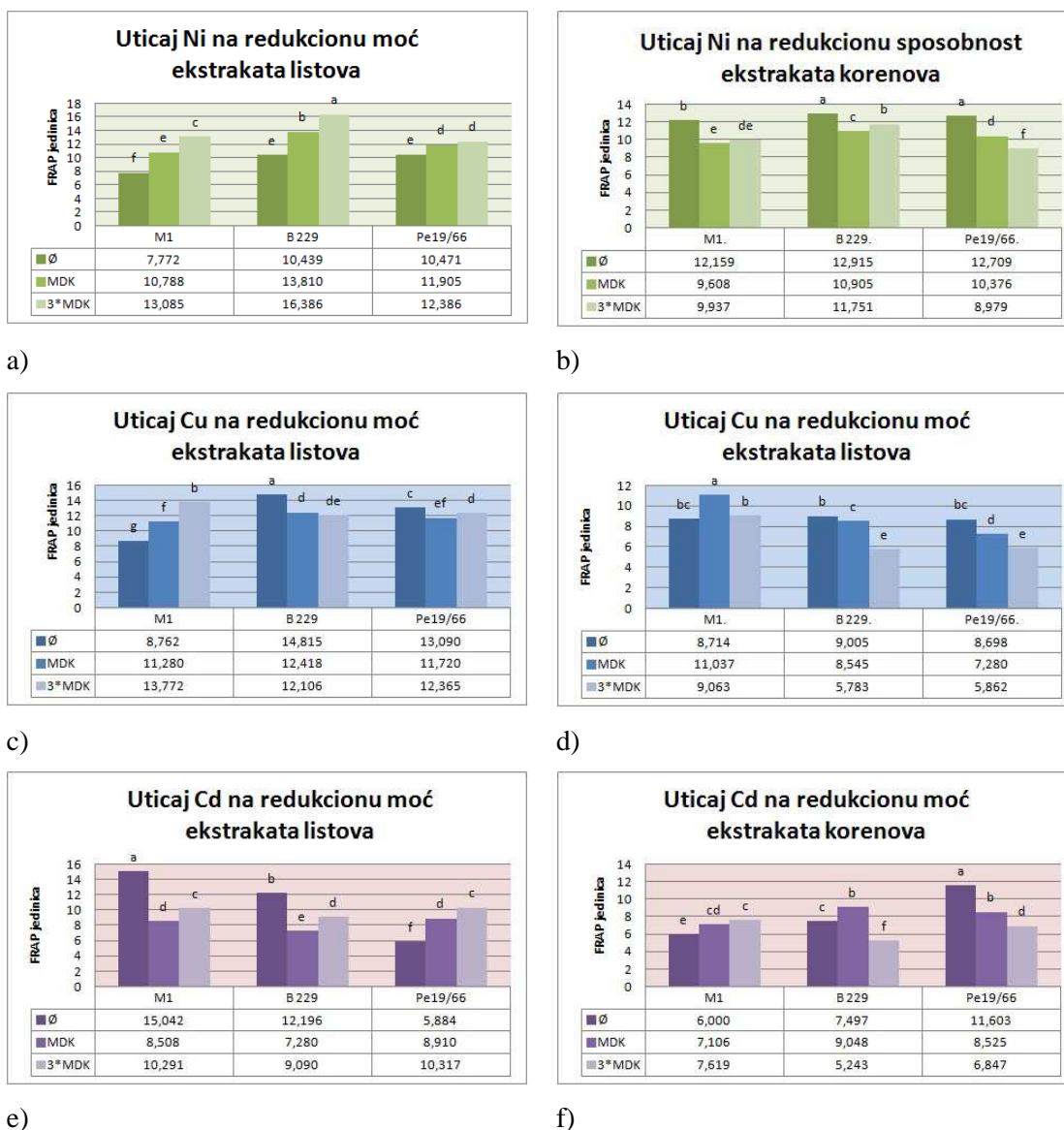


Slika 76. Najzastupljenija fenolna jedinjenja roda *Populus* (Boeckler et al., 2013)

Složeniji salicinoidi su estri salicina i organskih kiselina (npr. benzojeve kiseline), specifični su za vrstu (Julkunen-Tiitto, 1985) i pojavljuju se u koncentraciji do oko 1% suve mase (Thieme and Benecke, 1971). Salicinoidi: salicin, populin, salikortin, nigracin i homalozid D su prvi put identifikovani iz crne topole (*P. nigra*), za koju su i najkarakterističniji, mada se javljaju i u vrstama *P. alba*, *P. tremuloides*, *P. euphratica*, *P. × canadensis*, *P. × canescens*, *P. davidiana*, *P. balsamifera* (English et al., 1991; Zhang et al., 2006). Tremulacin, salikortin, homalozid D sadrže 1-hidroksi-6-oksocikloheks-2-en-1-karboksilnu estarsku grupu koja je karakteristična za salicinoide i koja ispoljava repelentni efekat prema insektima herbivorama (Lindroth i Peterson, 1988). Kondenzovani tanini su C-C oligomeri flavan-3-ola i najzastupljeniji su od fenolnih jedinjenja u *Salicaceae* familiji, gde u listovima mogu doseći i koncentraciju od 30 % suve mase (Donaldson et al. 2006).

5.11. Uticaj teških metala (Ni, Cu i Cd) na redukcionu kapacitet listova i korenova klonova topola

Sposobnost ekstrakta da *in vitro* redukuje kompleksno vezano Fe^{3+} do Fe^{2+} predstavlja redukcionu kapacitet ekstrakata. Do ovog elektron transfera u *in vivo* uslovima može da dođe jedino ukoliko je redoks potencijal electron-donorskih jedinjenja iz ekstrakata niži od redoks potencijala slobodnih radikala u ovim oksidoredukcionim parovima. Benzie i Strain (1999) su uveli aproksimaciju da je redukcionu kapacitet jednak antioksidantnom kapacitetu ekstrakta. Redukcionu kapacitet u ovom radu je izražen brojem FRAP jedinica, gde jedna FRAP jedinica predstavlja onu koncentraciju ekstrakta koja je dovoljna za redukciju $100 \mu M Fe^{3+}$.



■ Ni kontrola ■ Ni 50 mg/kg ■ Ni 150 mg/kg
 ■ Cu kontrola ■ Cu 100 mg/kg ■ Cu 300 mg/kg
 ■ Cd kontrola ■ Cd 3 mg/kg ■ Cd 9 mg/kg

Slika 77. Uticaj teških metala (Ni, Cu i Cd) na redukcionu kapacitet ekstrakata listova i korenova klonova topola

Prilikom izlaganja klonova topola dvema koncentracijama nikla, dolazi do povećanja redukcione moći ekstrakata listova kod sva tri ispitivana klona. Najveći redukcionni kapacitet postigao je ekstrakt listova klona B229 (16,58 FRAP jedinice), pri tretmanu niklom koncentracije 150 mg/kg (slika 77a). Nasuprot tome, kod ekstrakata korenova sva tri ispitana klona došlo je do slabljenja redukcione sposobnosti usled izlaganja biljaka jonima nikla u maksimalno dozvoljenim koncentracijama nikla i trostruko većim koncentracijama od tih (slika 77b).

Joni bakra su pokazali dvostruki efekat na redukcionni kapacitet klonova topola. Porast koncentracije bakra u zemljištu doveo je do porasta redukcione sposobnosti u listovima i korenovima klona M1, dok je u listovima i korenovima preostala dva klona izazvao neznatno smanjenje redukcione sposobnosti. Redukciona sposobnost korenova klona B229 tretiranih sa 300 mg/kg je opala za 36%, a korenova klona Pe 19/66 za 32% u poređenju sa korenovima odgovarajućih netretiranih biljaka (slika 77c d).

Listovi klonova M1 i B229, kao i korenovi klona Pe 19/66 su pod uticajem jona kadmijuma u zemljištu pokazali smanjenje redukcione sposobnosti za oko 40 % u odnosu na kontrole, dok su listovi klona Pe19/66 i korenovi klonova M1 i B229, na prisutvo kadmijuma u obe koncentracije reagovali povišenjem redukcionog kapaciteta ekstrakata topola (slika 77 e f).

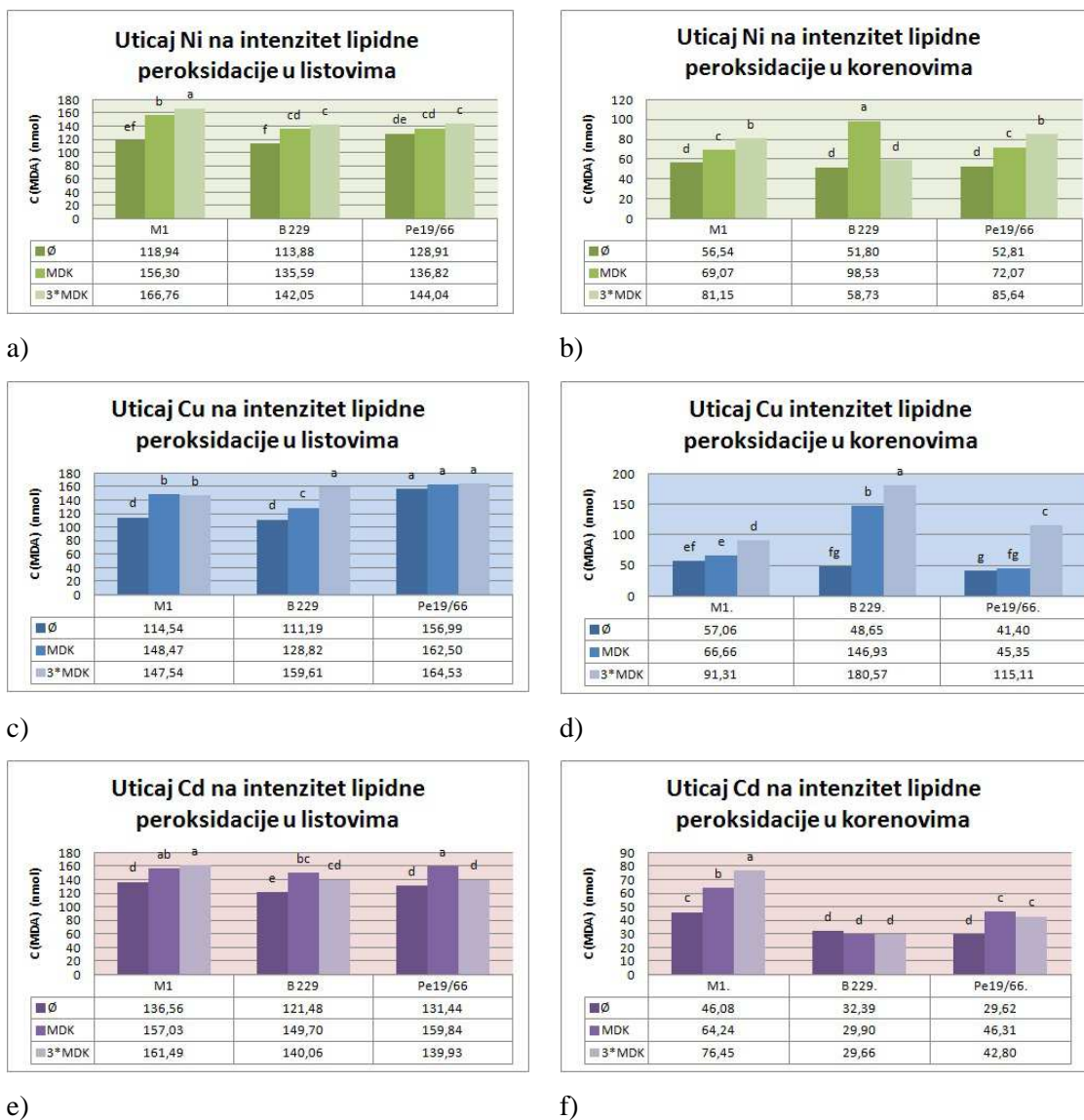
Štajner i saradnici (2013) procenjujući adaptacioni potencijal 20 provinijencija bukve izloženih različitim sušnim stanišnim uslovima u dva planinska lokaliteta, su na osnovu visokih FRAP vrednosti, kao i povećanog sadržaja slobodnog prolina i rastvornih proteina, okarakterisali provinijenciju bukve Avala kao bukvu sa najvećim adaptacionim potencijalom na Fruškoj gori, a austrijsku provenijenciju bukve Scharnstein Mitterndorf kao najtolerantniju na sušne uslove drugog ispitivanog lokaliteta.

Takođe, Kebert i saradnici (2011) su dokazali da u listovima topola dolazi do povećanja redukcionog kapaciteta usled izlaganja biljaka stresu izazvanom uticajem teških metala, pesticida i/ili dizela u zemljištu. Autori su, na osnovu visokog redukcionog potencijala u listovima, okarakterisali klon topole B229 (*Populus deltoides*) kao najtolerantniji na stres izazvan smešom teških metala u odnosu na ostale ispitane klonove topola u poljskim uslovima. FRAP vrednosti u listovima tretiranih biljaka su se kretale u opsegu od 33,9-46,5 FRAP jedinica, što su skoro trostruko više vrednosti od onih dobijenih u kontrolisanim uslovima u ogledu u ovom radu.

5.12. Uticaj teških metala na intenzitet lipidne peroksidacije u listovima i korenovima klonova topola

Teški metali su inicijatori lipidne peroksidacije, lančane reakcije u kojoj dolazi do oksidacije membranskih lipida i njihove dekompozicije pri čemu se stvara veliki broj visoko reaktivnih intermedijera kao što su alkil-radikal, konjugovani dieni, peroksi- i alkoksi-radikali i lipidni hidroperoksidi (Panda et al., 2003; Cho i Seo, 2004). Jedan od krajnjih proizvoda lipidne peroksidacije je malondialdehid (MDA) koji daje kompleks sa tiobarbiturnom kiselinom, te zbog

jednostavne detekcije, ovaj molekul služi za merenje intenziteta lipidne peroksidacije (Janero, 1990).



■ Ni kontrola ■ Ni 50 mg/kg ■ Ni 150 mg/kg
■ Cu kontrola ■ Cu 100 mg/kg ■ Cu 300 mg/kg
■ Cd kontrola ■ Cd 3 mg/kg ■ Cd 9 mg/kg

Slika 78. Akumulacija malonildialdehida (MDA) kao krajnjeg produkta lipidne peroksidacije u korenovima i listovima klonova topola pod uticajem teških metala

Koncentracija izmerenog malonildialdehida (MDA) u listovima svih ispitivanih klonova topola se povećava sa porastom koncentracije jona Ni^{2+} u zemljištu. Trend rasta je najizraženiji u listovima klona M1, kod kojeg je pod uticajem koncentracije jona Ni^{2+} od 150 mg/kg u zemljištu količina MDA porasla za oko 40% u odnosu na netretirane biljke, dok je u listovima klona Pe 19/66 koncentracija MDA usled kontaminacije zemljišta niklom porasla svega 11 % (slika 78a).

Veća akumulacija MDA zabeležena je u korenovima, nego u listovima kod svih ispitanih klonova topole, jer je tamo viša i akumulacija nikla. Pod uticajem trostruko veće koncentracije jona Ni^{2+} od maksimalno dozvoljene, došlo je do povećanja količine MDA u korenovima klonovima M1 i Pe 19/66, i to za 43% i 62 % u odnosu na kontrolne biljke odgovarajućih klonova. Koncentracija MDA u korenovima klona B229 pri koncentraciji nikla od 50 mg/kg u zemljištu povećala se za čak 90 %, dok je tretman trostruko većim koncentracijama jona Ni^{2+} (150 mg/kg) izazvao povećanje od svega 13% u odnosu na kontrolne biljke (slika 78b).

Izlaganje jonima bakra u koncentraciji od 300 mg/kg dovela je do porasta akumulacije MDA u listovima klonova M1 i B229 za 28% i 43 % u poređenju sa kontrolama odgovarajućih klonova, dok ovaj tretman bakrom nije doveo do statistički značajnih promena u akumulaciji MDA u listovima klona Pe 19/66 (slika 78c). U korenovima klona B229 došlo je do najdrastičnijeg porasta koncentracije MDA, gde se pri tretmanu bakrom od 300 mg/kg koncentracija MDA u tretiranim korenovima povećala skoro 4 puta u odnosu na netretirane. Pri istom tretmanu došlo je do povećanja akumulacije MDA i u korenovima preostala dva klona i to kod klona Pe 19/66 za 177 %, a kod klona M1 za 60% u odnosu na odgovarajuće kontrole (slika 78d).

Na osnovu poređenja sa kontrolnim biljkama, može se zaključiti da su joni kadmijuma indukovali lipidnu peroksidaciju u listovima svih ispitanih klonova, s tim da je kod klonova B229 i Pe 19/66 veća koncentracija MDA akumulirana pri tretmanu sa 3 mg/kg, nego pri tretmanu sa 9 mg/kg kadmijuma (slika 78e). Kod korenova klona M1 pri koncentraciji kadmijuma od 9 mg/kg, došlo je do povećanja koncentracije MDA za 65% u odnosu na kontrole. Klona Pe 19/66 je pri tretmanu najveće koncentracije kadmijuma pokazao povećanje količine MDA za 44 % u odnosu na kontrole, dok u korenovima klona B229 nije došlo do ikakvih statistički značajnih promena koncentracije MDA pod uticajem jona kadmijuma (slika 78f).

Veliki broj dokaza u naučnoj literaturi potvrđuje da u uslovima oksidativnog stresa izazvanog teškim metalima kod viših biljaka dolazi do stimulacije procesa lipidne peroksidacije. Tako je povećanje koncentracije MDA kao krajnjeg proizvoda lipidne peroksidacije usled izlaganja teškim metalima detektovano kod graška (Lozano-Rodriguez et al., 1997; Dixit et al., 2001; Metwally et al., 2004.), različitih genotipova raži (Wua et al., 2003), suncokreta (Groppa et al., 2001), *Arabidopsis thaliana* (Cho i Seo, 2004) i korenovim kvržicama soje (Balestrasse et al., 2004), što je u skladu sa rezultatima iz ovog istraživanja. Joni Cd^{2+} doveli su do povišene lipidne peroksidacije u korenovima i listovima pasulja (Chaoui et al., 1997). Međutim, neki autori su zabeležili i smanjenje intenziteta lipidne peroksidacije usled delovanja teških metala. Tako je grupa autora Romero-Puertas i saradnici (1999) otkrila smanjenje lipidne peroksidacije u peroksizomima graška, dok promene u nivou lipidne peroksidacije u korenu šargarepe nisu primećene pod uticajem jona Cd^{2+} (Sanita di Toppi et al., 1998).

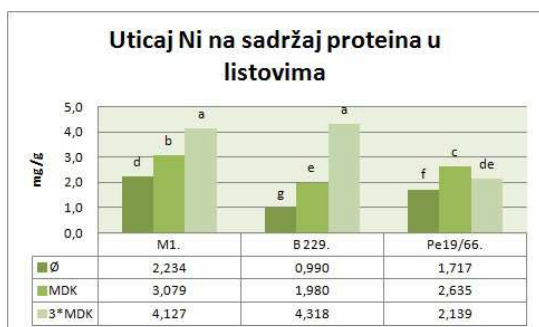
Usled lipidne peroksidacije, dolazi do promena u sastavu masnih kiselina i lipidnih komponenti tilakoidnih membranama, koje značajno utiču na fluidnost tilakoidne membrane (Luna et al, 1994; Maksymiec et al., 1994). Ovim promenama strukture i funkcije tilakoidne membrane *in vivo* se objašnjava i smanjenje fotoaktivnosti izazvano jonima teških metala koji narušavaju konformaciju i funkciju fotosistema, koji se nalaze na tilakoidnim membranama hloroplasta (Lidon et al., 1993; Ouzounidou et al., 1992).

5.13. Uticaj teških metala na sadržaj rastvorljivih proteina u listovima i korenovima klonova topola

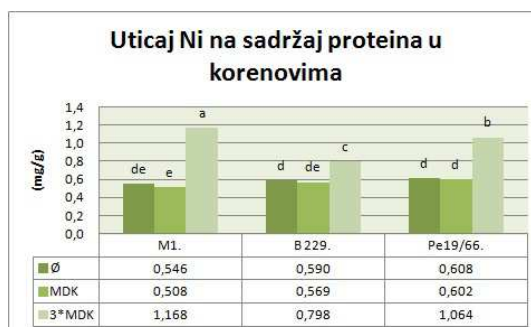
Ispitivanje uticaja teških metala na sadržaj rastvorljivih proteina pokazalo je da prilikom izlaganja jonima nikla u listovima ispitanih klonova topola dolazi do povećanja sadržaja rastvorljivih proteina pri obe primenjene koncentracije nikla (50 i 150 mg/kg). U korenovima topola samo viša koncentracija nikla (150 mg/kg) je izazvala povećanja sadržaja rastvorljivih proteina, dok pri koncentraciji od 50 mg/kg ni u jednom od ispitivanih klonova nije došlo do značajnih promena u odnosu na netretirane topole (slika 79 ab).

Do najznačajnijeg povećanja sadržaja rastvorljivih proteina došlo je usled tretmana sa 100 mg/kg bakra, pri kojem se kod klonova M1 i Pe 19/66 sadržaj rastvorljivih proteina povećao za 102 % i 89 % u odnosu na sadržaj u netretiranim. Takođe, u listovima klona B229 pri tretmanu bakrom od 300 mg/kg, došlo je do povećanja sadržaja rastvornih protein tri puta u poređenju sa sadržajem u listovima netretiranih biljaka tog klona (slika 79 c). Nasuprot tome, iste koncentracije tretmana bakra nisu dovele do promena u sadržaju rastvorljivih proteina u korenovima klonova B229 i M1. Korenovi klona Pe 19/66 su pokazali osetljivost na povećan sadržaj bakra u zemljištu, te je došlo do povećanja sadržaja rastvorljivih proteina za 174% pri izlaganju koncentraciji od 300 mg/kg bakra u zemljištu u poređenju sa kontrolom (slika 79 d).

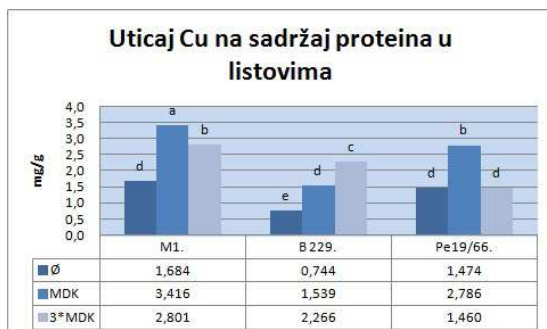
Koncentracija kadmijuma od 9 mg/kg izazvala je inhibiciju biosinteze proteina kod klona M1, te je došlo do smanjenja sadržaja rastvorljivih proteina u listovima za 75 % u poređenju sa kontrolama. Pri istom tretmanu, listovi klona B229 i Pe 19/66 nisu pokazali statistički značajne promene u sadržaju rastvorljivih proteina, dok je pri tretmanu kadmijumom koncentracije 3 mg/kg došlo do povećanja sadržaja rastvorljivih proteina kod listova oba klona (slika 79 e). Sadržaj rastvorljivih proteina u korenovima klonova M1 i B229 nije pokazao značajne promene pod uticajem jona kadmijuma, dok je u korenovima klona Pe19/66 pri koncentraciji od 3 mg/kg došlo do smanjenja sadržaja rastvornih proteina na dvostruko niže vrednosti od onih u kontrolnim biljkama tog klona (slika 79 f).



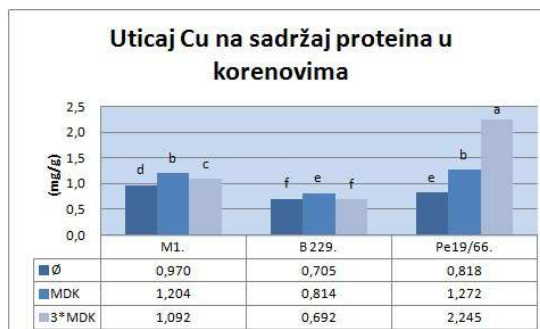
a)



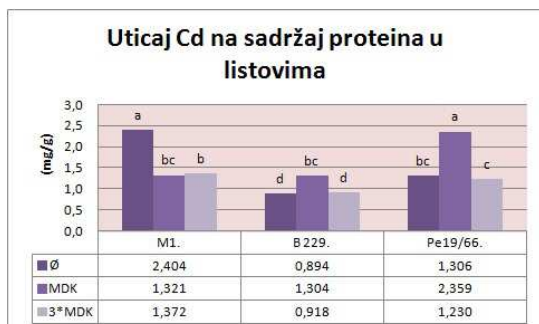
b)



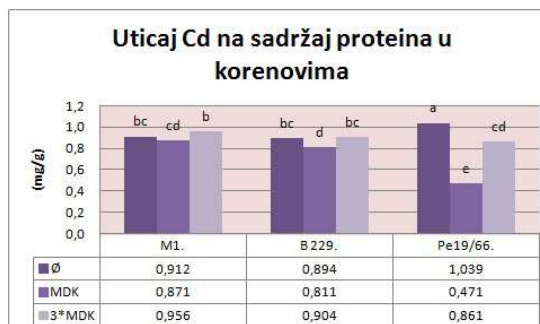
c)



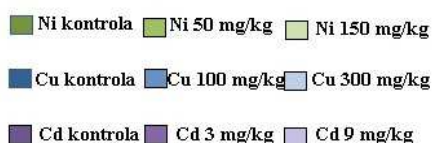
d)



e)



f)



Slika 79. Utjecaj teških metala na sadržaj rastvornih proteina u klonovima topola

5.14. Utjecaj teških metala na aktivnosti enzima uključenih u antioksidantni odgovor topola

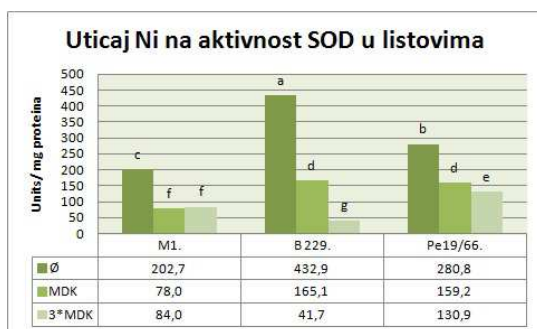
Već je ilustrovano da usled izloženosti teškim metalima dolazi do promena u sadržaju proteina, te je vrlo verovatno da neki od tih proteina imaju i katalitičku funkciju. Teški metali, pored promena u ekspresiji enzima, izazivaju i promene njihove katalitičke aktivnosti zahvaljujući velikom afinitetu vezivanja za sulfhidrilne ili neke druge grupe iz aktivnog centra enzima, što dovodi do smanjenja aktivnosti ili potpune inhibicije (Schutzendubel i Polle, 2002). Teški metali mogu da zamene metale iz aktivnih centara i dovedu do promene aktivnosti ili/i gubitka strukture tih metaloenzima. Usled oksidativnog stresa izazvanog teškim metalima, dolazi

i do aktivacije odbrambenih antioksidantnih enzima, koji kod biljnih vrsta imaju funkciju ublažavanja oksidativnog stresa. Povećanje ekspresije i aktivnosti enzima antioksidantnog odgovora, poput superoksid-dizmutaze (SOD), gvajakol-peroksidaze (GPx) i glutation-reduktaze (GR) i dr. zabeleženo je od strane velikog broja autora (De Vos et al., 1992; Luna et al., 1994; Stohs i Bagchi, 1995; Navari-Izzo et al., 1998; Gupta et al., 1999; Drazkiewicz et al., 2003; Wang et al., 2004).

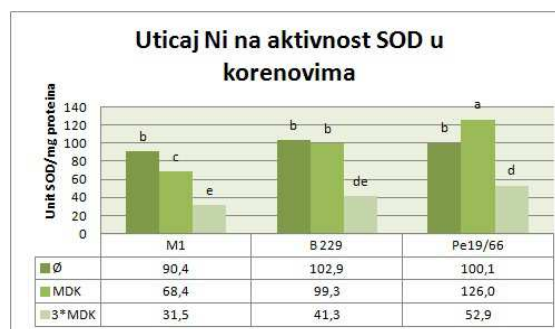
5.14.1. Uticaj teških metala na aktivnosti enzima superoksid-dizmutaze u listovima i korenovima klonova topola

Praćenjem aktivnosti superoksid-dizmutaze u uslovima opterećenosti zemljišta jonima nikla, dolazi do opadanja aktivnosti ovog enzima u listovima pri obema tretiranim koncentracijama nikla (50 i 150 mg/kg) u zemljištu. Najveći pad aktivnosti SOD primećen je u listovima klona B229, gde se aktivnost smanjila više od 10 puta, mada je trend značajanog opadanja aktivnosti primećen i kod druga dva klona, te se pri koncentraciji od 150 mg/kg nikla aktivnost SOD u listovima klona M1 smanjila za 140%, a u listovima klona Pe19/66 za 113 % u poređenju sa netretiranim kontrolama odgovarajućih klonova (slika 80a). Postoje značajne razlike u aktivnosti SOD u listovima netretiranih klonova, tako klon B229 pokazuje skoro dvostruko veću superoksidaznu aktivnost u listovima nego klon M1, i značajno veću aktivnost od netretiranih listova klona Pe19/66. Nasuprot tome, u korenovima biljaka klona Pe19/66 tretiranih maksimalnom dozvoljenoj koncentracijom nikla (50 mg/kg) došlo je povećanja superoksidazne aktivnosti, dok se pri istoj koncentraciji u korenovima klona B229 aktivnost SOD nije menjala. U korenovima klona M1 došlo je do inhibicije aktivnosti za oko 30 % u poređenju sa kontrolama (slika 80b).

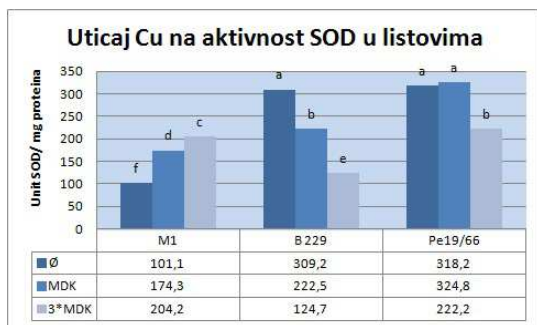
Pod uticajem jona bakra, aktivnost SOD u listovima rasla je kod klona M1, dok je u listovima klona B229 ta aktivnost opadala pri obe tretirane koncentracije. Tretman od 100 mg/kg bakra u zemljištu nije izazvao promene u aktivnosti superoksid-dizmutaze u listovima klona Pe19/66, dok je tretman sa 300 mg/kg bakra inhibirao aktivnost SOD za 40 % u odnosu na netretirane kontrole (slika 80c).



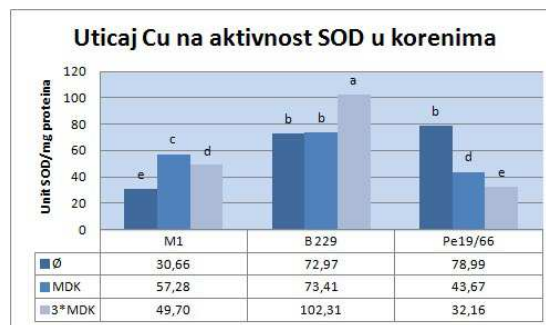
a)



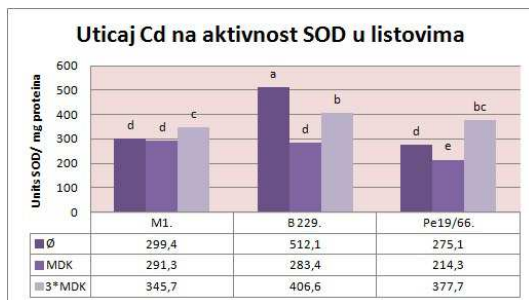
b)



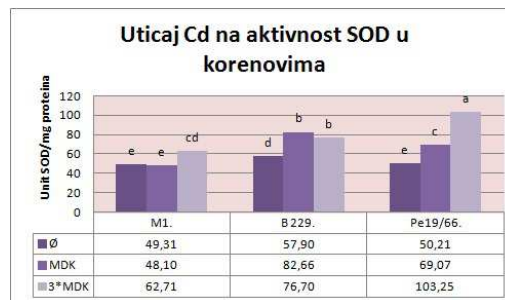
c)



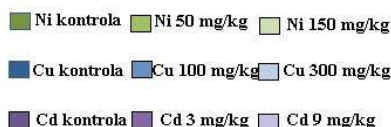
d)



e)



f)



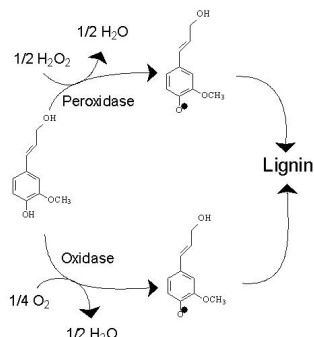
Slika 80. Utjecaj teških metala na enzimsku aktivnost SOD u listovima i korenovima klonova topola

Aktivnost SOD u listovima klonova B229 i Pe19/66 opadala je pod uticajem jona Cd^{2+} u koncentraciji od 3 mg/kg opada, dok kod klona M1 aktivnost SOD je ostala nepromenjena. Pri tretmanu većom koncentracijom kadmijuma u zemljištu (9 mg/kg) u listovima klonova M1 i Pe 19/66 došlo je do povećanja SOD aktivnosti u odnosu na netretirane biljke (slika 80d). Ovo povećanje aktivnosti SOD pod uticajem viskih koncentracija kadmijuma može se objasniti kao aktiviranje SOD u uslovima oksidativnog stresa. Povećanje aktivnosti SOD pod uticajem jona kadmijuma koncentracije od 9 mg/kg zabeleženo je u korenovima sva tri ispitana klona, te je kod klona Pe19/66 aktivnost SOD pri tom tretmanu čak udvostručena u poređenju sa aktivnošću SOD u korenovima kontrolnih biljaka tog klona (slika 80e).

5.14.2. Utjecaj teških metala na enzimsku aktivnost gvajakol-peroksidaze (GPx) u listovima i korenovima klonova topola

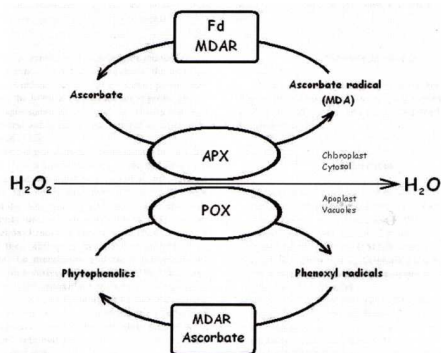
Biljke sadrže različite vrste peroksidaza koje za svoju aktivnost zahtevaju vodonik-peroksid. Askorbat-peroksidaze (APx), lokalizovane u hloroplastima, citosolu i peroksisomima, imaju funkciju da koristeći askorbinsku kiselinu kao elektron donor redukuju vodonik-peroksid nastao u tim organelama. Drugu grupu peroksidaza predstavljaju one koje koriste fenolna jedinjenja kao supstrat i mogu biti podeljene apoplastične i vakuolarne peroksidaze. Smatra se da peroksidaze vezane za

ćelijski zid učestvuju u oksidaciji monomera lignina, obezbeđujući time supstrate za formaciju lignina i druge fiziološke procese (Diaz et al., 2001; Takahama i Oniki, 2000). Peroksidaze, učestvujući u sintezi lignin, izgrađuju fizičku barijeru čime sprečavaju ulazak teških metala u ćeliju (Rei et al., 2004).



Slika 81. Polimerizacija koniferil alkohola u lignin. Reakcija dva metabolička puta, jedan katalizovan peroksidazama, a drugi oksidazama

Rastvorljiva apoplastična peroksidaza može da redukuje vodonik-peroksid uz pomoć fenolnih jedinjenja ili askorbinske kiseline (Takahama i Oniki, 2000). Biljni fenoli, posebno flavonoidi i fenilpropanoidi iz vakuole i apoplasta služe kao elektron-donori nespecifičnim peroksidazama (npr. gvajakol-peroksidaze) koje vrše detoksifikaciju H_2O_2 u ovim organelama. Nastali fenoksil-radikal u ovoj reakciji se neutrališe askorbinskom kiselinom od koje nastaje monodehidroaskorbat-radikal. Novonastali radikal se disproporcioniše do askorbata i dihidroaskorbata DHA (reakcija 3) zahvaljujući aktivnosti dihidroaskorbat-reduktaze (DHAR) (Yamasaki et al., 1997; Sgherri et al., 2003; Sakihama et al., 2002; Takahama i Oniki, 2000). Prema Sakihama i saradnicima (2000) i monodihidroaskorbat reduktaza (MDAR) se može ponašati kao fenoksil-radikal reduktaza u apoplastu, gde regeneriše redoks status fenola.



Slika 82. Sinergističko dejstvo askorbat peroksidaze i peroksidaze koja kao suspratat koristi fenolna jedinjenja (Sakihama et al., 2000)

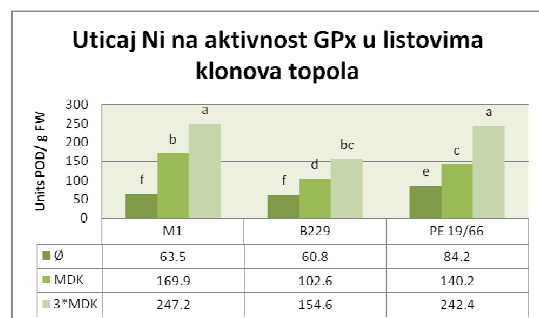
Metalni joni mogu uticati na vreme života fenoksil-radikala zbog sposobnosti ovog radikala da inicira lipidnu peroksidaciju ćelijskih membrana, ali i oksiduje biomolekule koji su inkorporirani u njoj. Toksičnost metala poput Al^{3+} , Cd^{2+} i Zn^{2+} zadržanih u apoplastima korena se objašnjava na ovaj način. U uslovima visoke akumulacije H_2O_2 usled oksidativnog stresa, aktivnost GPx predstavlja značajan mehanizam biljke da aktivnošću ove nespecifične peroksidaze snižava koncentraciju vodonik-peroksida kao potencijalnog prekursora agresivnog hidroksilnog radikala.

Gvajakol-peroksidaza (GPx) je kod svih ispitanih klonova topola pokazala značajnu promenu aktivnosti i aktivaciju pod uticajem jona Ni^{2+} pri obe tretirane koncentracije. U listovima klona M1 pod uticajem jona Ni^{2+} koncentracije 150 mg/kg, došlo je do povećanja aktivnosti GPx za oko četiri puta u odnosu na listove kontrolnih biljaka tog klona, dok se aktivnost GPx u listovima klona Pe 19/66 povećala tri puta u poređenju sa listovima netretiranih biljaka (slika 83a). Značajno povećanje aktivnosti GPx pri toksičnim koncentracijama jona nikla u zemljištu primećeno je i kod korenova klonova B229 i Pe 19/66, gde je ustanovljeno povećanje aktivnosti ovog enzima za 262 i 323 % pri tretmanu sa 150 mg/kg nikla u odnosu na odgovarajuće netretirane klonove. Aktivnost GPx u korenovima klona M1, pri tretmanu sa trostruko većom koncentracijom nikla od dozvoljene, je povećana dva i po puta u odnosu na onu kod netretiranih biljaka (slika 83b).

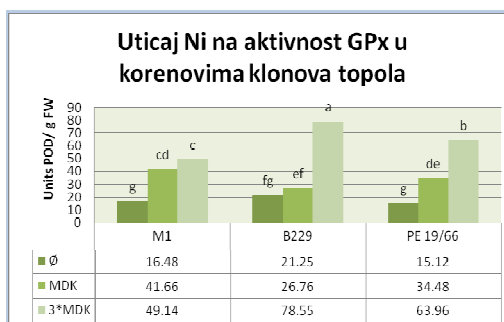
Povećanje aktivnosti GPx primećeno je kod klonova topola i pod uticajem jona bakra u obe ispitane koncentracije (100 i 300 mg/kg). U listovima klona M1, usled tretmana sa 100 mg/kg bakra došlo je do petostrukog povećanja aktivnosti GPx, dok je kod druga dva klona aktivnost GPx povećana dvostruko u odnosu na kontrolne biljke (slika 83c). U listovima svih klonova topola, pri tretmanu bakrom trostruko većom koncentracijom od maksimalno dozvoljene za zemljište (300 mg/kg), dolazi do inhibicije aktivnosti GPx u odnosu na onu kod biljaka raslih na nižoj koncentraciji bakra (100 mg/kg), kako u listovima, tako i u korenovima klonova topola. Najveća aktivnost GPx zabeležena je u korenovima klona Pe 19/66 koji je bio tretiran bakrom koncentracije 100 mg/kg, gde se aktivnost GPx povećala pet puta u odnosu na kontrole, dok je u korenovima klona B229 utrostručena pri istom tretmanu (Slika 83d).

Listovi klona M1 pokazali su se znatno osetljivijim na uticaj jona kadmijuma na aktivnost GPx u odnosu na listove druga dva klona, kod kojih se aktivnost GPx nije promenila pod uticajem 3 mg/kg kadmijuma u zemljištu. Pri tom tretmanu u listovima klona M1 došlo je do povećanja aktivnosti GPx pet puta u odnosu na netretirane biljke, a pri tretmanu trostruko većom koncentracijom kadmijuma (9 mg/kg) došlo je do povećanja aktivnosti GPx na dvostruko više vrednosti u odnosu na netretirane biljke. U listovima klonova B229 i Pe19/66 pod uticajem 3 mg/kg jona kadmijuma došlo je do porasta aktivnosti GPx za 235 i 65%, dok je tretman sa 9 mg/kg jona Cd^{2+} u listovima klona Pe19/66 izazvao inhibiciju aktivnosti ovog enzima za 20% (slika 83e). U korenovima sva tri klona pri toksičnim koncentracijama kadmijuma u zemljištu došlo je do povećanja aktivnosti GPx, a aktivnost ovog enzima u korenovima topola je niža u odnosu na onu izmerenu u listovima.

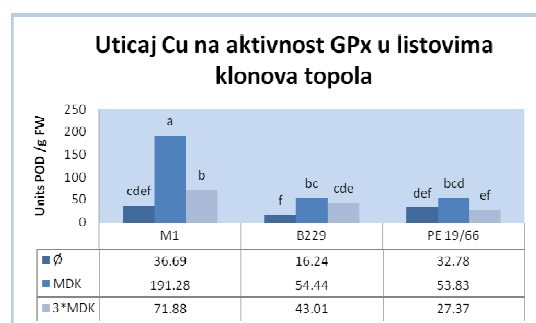
Kod korenova klona B229, aktivnost GPx pod uticajem tretmana od 3 mg/kg kadmijuma se udvostručila u odnosu na kontrole, dok se pri tretmanu od 9 mg/kg kadmijuma aktivnost GPx snizila na vrednost koja odgovara vrednostima kontrole. Kod druga dva klona topole, tretman od 9 mg/kg kadmijuma je izazvao višestruko povećanje aktivnosti GPx u korenovima u odnosu na kontrolne biljke (slika 83f).



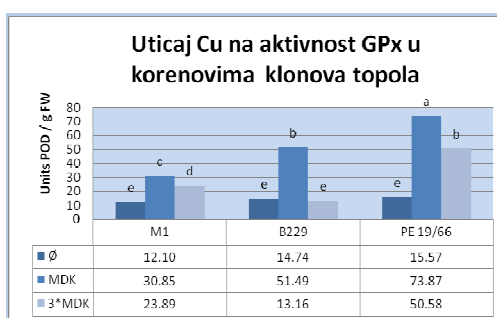
a)



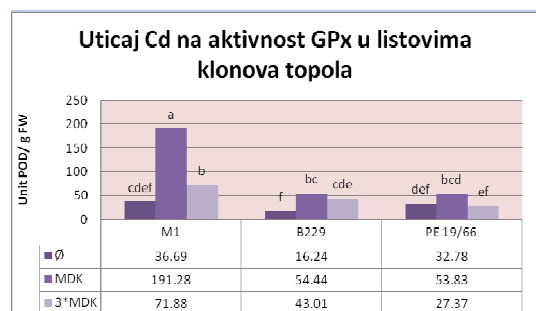
b)



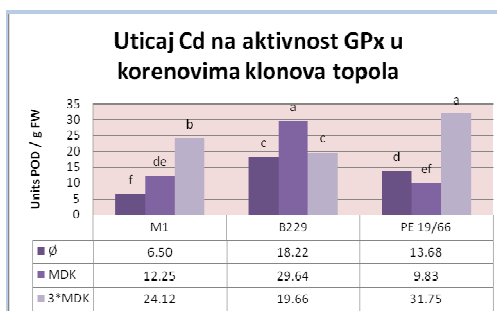
c)



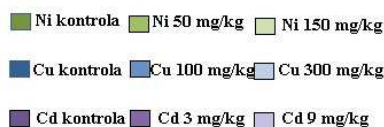
d)



e)



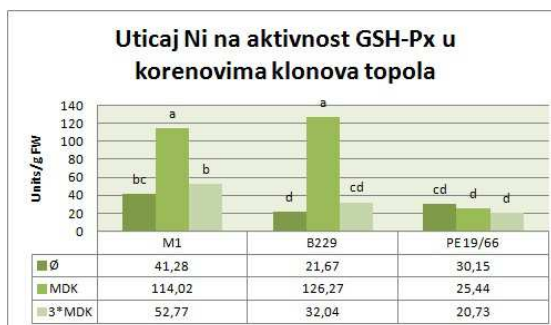
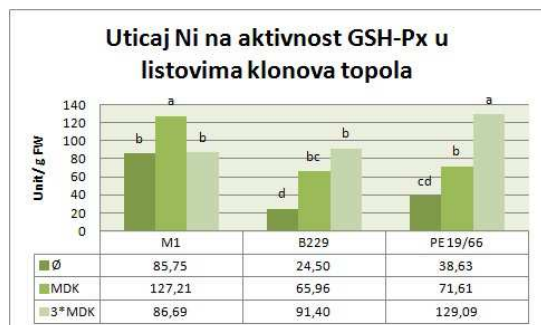
f)



Slika 83. Uticaja teških metala na enzimsku aktivnost GPx u listovima i korenovima klonova topola

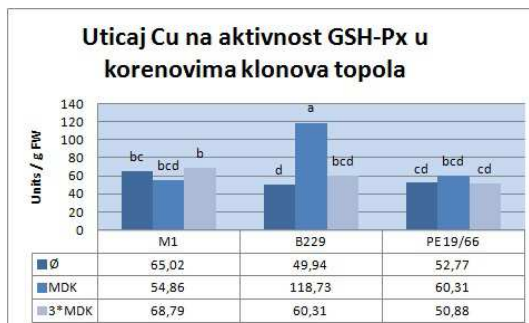
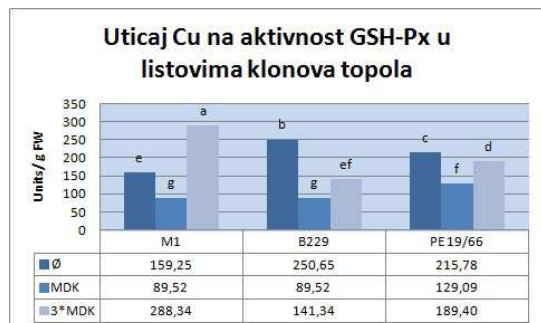
5.14.3. Uticaj teških metala na aktivnost enzima glutation-peroksidaza (GSH-Px) u listovima i korenovima klonova topola

Glutation-peroksidaza je enzim koji ima funkciju sniženja koncentracije vodonik-peroksida i poznat je kao enzim antioksidantne odbrane.



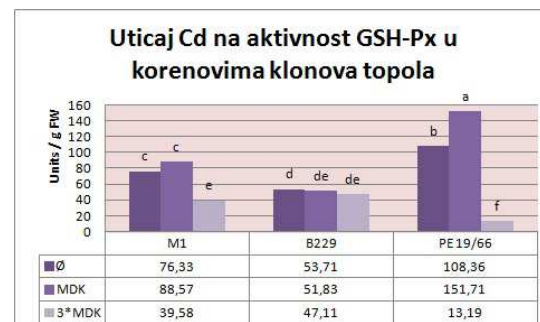
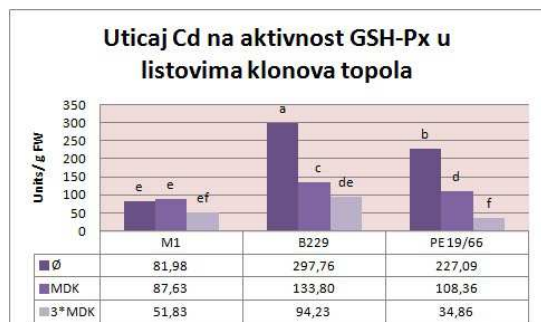
a)

b)



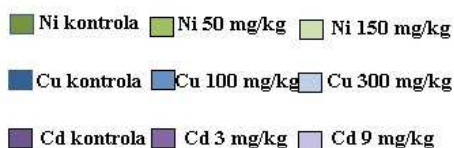
c)

d)



e)

f)



Slika 84. Utjecaj teških metala na aktivnosti glutacion-peroksidaze u listovima i korenovima klonova topola

Pod utjecajem jona Ni^{2+} , u listovima svih ispitanih klonova topola došlo je do povećanja aktivnosti GSH-Px. Pri izlaganju klonova topola koncentraciji od 150 mg/kg nikla, u listovima klonova B229 i Pe19/66 došlo je do povećanja GSH-peroksidazne aktivnosti za više od tri puta u odnosu na netretirane biljke, dok u listovima klona M1 nije došlo do statistički značajnih promena. Pri tretmanu niklom koncentracije 50 mg/kg, aktivnost GSH-Px u listovima svih klonova je povećana, a naročito kod klona B229, gde je povećana za 169 % u odnosu na kontrole (Slika 84a). U korenovima, koncentracija nikla od 50 mg/kg je izazvala drastično povećanje aktivnosti GPx kod klonova B229

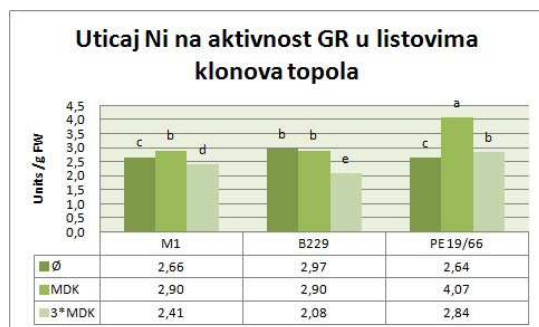
(oko 6 puta) i M1 (skoro 3 puta) u odnosu na kontrolne biljke. Nasuprot tome, pri istom tretmanu niklom, kod korenova klona Pe 19/66 došlo je do inhibicije aktivnosti GSH-Px za 18% u odnosu na kontrole. Pri tretmanu trostruko višim koncentracijama nikla od MDK (150 mg/kg) došlo je do povećanja aktivnosti GSH-Px u korenovima klonova M1 i B229 za 27% 42%, dok je kod klona Pe 19/66 došlo do neznatne inhibicije aktivnost GSH-Px u poređenju sa kontrolnim topolama (slika 84b).

Aktivnost GSH-Px u listovima klonova tretiranih bakrom smanjila se pri koncentraciji bakra od 100 mg/kg, dok je pri tretmanu višom koncentracijom bakra (300 mg/kg) došlo do aktivacije ove aktivnosti. Aktivnost GSH-Px u listovima klona M1 kod biljaka tretiranih sa 300 mg/kg jona bakra bila je dvostruko viša od aktivnosti GSH-Px kod kontrola (slika 84c). U korenovima klonova M1 i Pe19/66, pri visokim koncentracijama jona bakra nije došlo do značajnih promena u aktivnosti GSH-Px, jedino kod klona B229 pri tretmanu od 100 mg/kg, aktivnost GSH-Px je porasla za 82 % u odnosu na netretirane biljke tog klona (slika 84d).

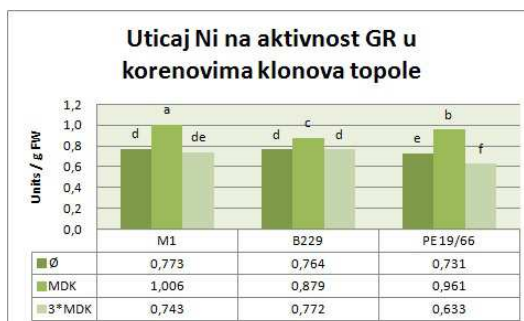
Za razliku od jona druga dva ispitana metala (Ni^{2+} i Cu^{2+}), koji su sa porastom koncentracije u zemljištu izazivali povećanje aktivnosti GSH-Px, joni kadmijuma su u listovima klonova B229 i Pe 19/66 inhibirali aktivnost GSH-Px. Usled tretmana jonima kadmijuma koncentracije 9 mg/kg u listovima klona B229, došlo je do smanjenja aktivnosti na trostruko nižu vrednost u poređenju sa kontrolom, dok je aktivnost GSH-Px kod listova klona Pe 19/66 inhibirana više od šest puta u odnosu na kontrolu (slika 84e). U korenovima klonova M1 i Pe 19/66 aktivnosti ovog enzima su se povećale pri izlaganju koncentraciji od 3 mg/kg kadmijuma. Pod uticajem koncentracije kadmijuma od 9 mg/kg, u korenovima oba klona, M1 i Pe19/66, došlo je do inhibicije aktivnosti GSH-Px, i to kod klona M1 za 90 %, a kod korenova klona Pe 19/66 došlo je do smanjenja aktivnosti GSH-Px skoro 9 puta u odnosu na kontrole (slika 84f).

5.14.4. Uticaj teških metala na enzimsku aktivnost glutation-reduktaze (GR) u listovima i korenovima klonova topola

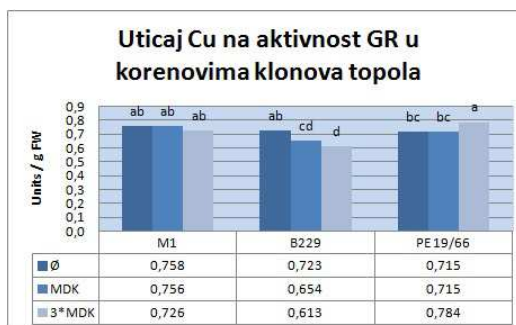
Glutation reduktaza, predstavlja značajan enzim ciklusa glutationa, koja ima funkciju da redukuje oksidovani glutationa do redukovane forme koja je sposobna da učestvuje u antioksidantnom odgovoru biljke na abiotički stres.



a)

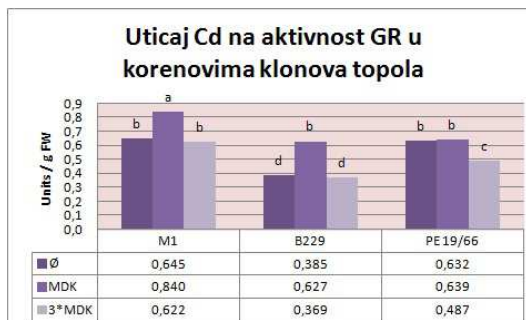
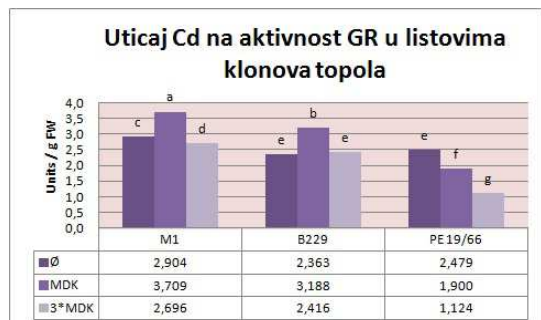


b)



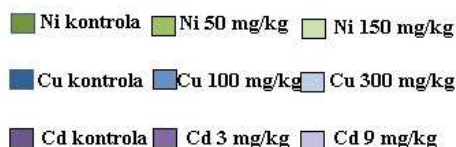
c)

d)



e)

f)



Slika 85. Uticaj teških metala na aktivnosti glutation-reduktaze u listovima i korenovima klonova topola

Pod uticajem jona nikla koncentracije od 50 mg/kg u zemljištu, kod listova klonova M1 i Pe 19/66 došlo je do povećanja aktivnosti GR za 9% i 54 % u poređenju sa odgovarajućim kontrolama. Prisustvo viših koncentracija Ni (150 mg/kg) u zemljištu dovelo je do neznatne inhibicije u aktivnosti GR kod listova klonova B229 i M1, ili kao kod listova klona Pe 19/66 nije dovelo do statistički značajnih promena u aktivnosti GR (slika 85a). Pod uticajem tretmana niže koncentracije nikla (50 mg/kg) u korenovima klonova M1 i B229 došlo je do povećanja aktivnosti GR, dok pod uticajem više koncentracije jona nikla (150 mg/kg) u korenovima istih klonova, nije došlo do promena u aktivnosti GR. Pri istom tretmanu (150 mg/kg Ni²⁺) u korenovima klona Pe19/66, izazvana je neznatna inhibicija (15%) u poređenju sa kontrolnim biljkama (slika 85b).

Aktivnost GR u listovima klonova topola M1 i B229 se pod uticajem povišenih koncentracija jona Cu²⁺ u zemljištu nije menjala, dok se u listovima klona Pe 19/66 aktivnost GR, pri tretmanu od 100 mg/kg Cu²⁺, udvostručila u odnosu na netretirane biljke tog klona. Koncentracija od 300 mg/kg bakra nije dovela do statistički značajnih promena u aktivnosti GR ni kod klona Pe 19/66 (slika 85c). Pri kontaminaciji zemljišta sa 100 mg /kg bakra u korenovima klonova M1 i Pe 19/66 nije došlo do

statistički značajnih promena u aktivnosti GR, osim kod korenova klona B229, kod kojeg je aktivnost GR inhibirana svega 10% u odnosu na netretirane biljke. Tretmani bakrom koncentracije od 300 mg/kg nisu izazvali promene u aktivnosti GR u korenovima klona M1, dok je aktivnost GR kod klona Pe 19/66 povećana za 9% u odnosu na kontrolu. GR aktivnost u korenovima klona B229 pri tretmanu od 300 mg/kg bakra je inhibirana za 17 % (slika 85d).

Pri nižim koncentracijama Cd (3 mg/kg) došlo je do porasta aktivnosti glutation-reduktaze u korenovima i listovima klonova M1 i B229, dok pri tretmanu višom koncentracijom Cd (9 mg/kg) nisu zabeležene statistički značajne promene ni u listovima, ni korenovima pomenutih klonova. Tretman sa 9 mg/kg kadmijuma doveo je do inhibicije aktivnosti GR u klonu Pe19/66 i to u listovima za 120%, a u korenovima za 30 % u poređenju sa aktivnostima u kontrolnim biljkama. Tretman sa 3 mg/kg kadmijuma u zemljištu nije doveo do statistički značajnih promena u aktivnosti GR u korenovima klona Pe 19/66, dok je u listovima istog klona izazvao inhibiciju aktivnosti GR za 30 % (slika 85ef).

Biljke reaguju na oksidativni stres povećanjem aktivnosti enzima antioksidantne zaštite poput enzima koji ulaze u askorbat-glutation ciklus i drugih enzima koji imaju ulogu da štite biljku od slobodnih radikala (Das et al., 1978; Seregin et al., 2001; Schickler i Caspi, 1999). Veliki broj radova, ukazuje na povezanost toksičnih efekata jona Ni^{2+} i oksidativnog stresa (Madhava Rao i Sresty, 2000; Gajewska et al., 2006; Boominathan i Doran 2002; Gonnelli et al., 2001). Nikl nije redoks-aktivan element, te ne može direktno da izazove generaciju reaktivnih kiseoničnih vrsta, ali zato joni Ni^{2+} indirektno interaguju sa velikim brojem antioksidantnih enzima poput superoksid-dizmutaze (SOD), katalaze (CAT), glutation-peroksidaze (GSH-Px), glutation reduktaze (GR), gvajakol-peroksidaze (GPx) i askorbat peroksidazom (APx) (Pandey i Sharma, 2002; Hao et al., 2006; Baccouch et al., 1998; 2001; Gajewska i Sklodowska, 2005). Izloženost biljke niskim koncentracijama Ni (0.05 mM) u kratkom periodu dovodi do povećanja aktivnosti SOD, POD, GR i GSH-Px, a time i ukupne antioksidantne odbrane, kako bi se u najkraćem roku uklonile povećane koncentracije ROS-a (Freeman et al., 2004; Gajewska i Sklodowska 2005; Schickler i Caspi 1999; Gomes-Juniora et al., 2006). Međutim, u visokim koncentracijama joni Ni^{2+} redukuju aktivnost mnogih ćelijskih antioksidantnih enzima, i *in vivo* i *in vitro*, te se smanjuje sposobnost biljke da vrši neutralizaciju slobodno-radikalnih vrste, što vodi ka povećanoj akumulaciji ROS-a i u krajnjoj instanci, oksidativnog stresa u biljci (Zhao et al., 2008; Gajewska i Sklodowska, 2007; El-Maraghy et al., 2001). Aktivnost antioksidantnih enzima može da varira u zavisnosti od vremena izloženosti i vrste tretmana kao i između različitih vrsta i biljnih organa (Tatrai et al., 2001; Del Carmen et al., 2002).

U eksperimentima Gajewske i Sklodowske (2007), aktivnosti SOD i CAT su značajno opadale u listovima pšenice posle tretmana sa 100 μM Ni^{2+} u trajanju od 3, 6 i 9 dana, dok su se aktivnosti GSH-Px, GPx i APx povećavale. Međutim, isti autori (Gajewska i Sklodowska, 2005) navode da izloženost graška jonima nikla u trajanju od 14 dana (koncentracijama od 10, 100, 200 μM

Ni) rezultira u redukciji SOD aktivnosti, i u izbojcima i korenovima, što se slaže i sa rezultatima dobijenim za klonove topole u ovom istraživanju. Aktivnost glutation-S-transferaze (GST) se povećala u izbojcima i korenovima, dok je aktivnost CAT ostala nepromenjena (Gajewska i Sklodowska, 2005). U vodenoj kulturi koncentracija Ni^{2+} od 0.5 mM je izazvala povećanje aktivnosti SOD, GR i GPx i smanjenje aktivnosti CAT kod 6 dana starih reznica *Cajamus cajan* (Madhava Rao i Sresty, 2000). U listovima kupusa, aktivnosti CAT i GPx su značajno opadale nakon tretmana sa 0.5 mM Ni tokom 8 dana (Pandey i Sharma, 2002). Trend opadanja enzimske aktivnosti SOD, CAT i GPx zabeležen je u listovima *Hydrocharis dubia* kao odgovor na tretmane niklom u koncentracijama od 0.5, 1, 2, 3, 4 mM primenjenim u trajanju od tri dana (Papadopoulos et al., 2007). Takođe, dokazano je da u korenovima sadnica pšenice (*Triticum durum*) joni Ni^{2+} izazivaju povećanje aktivnosti plazmamembranske NADPH oksidaze, koja ima ulogu u stvaranju „oksidativne eksplozije“ u uslovima stresa i koja predstavlja izvor ROS-a u biljci (Hao et al., 2006).

Efekti jona Ni^{2+} na aktivnosti enzima sa antioksidantnom ulogom se razlikuju kod biljnih vrsta koje su opisane kao hiperakumulatori tog metala i onih koje nisu. Tako, kod neakumulatorske vrste *A. maritimum* tretirane rastvorima soli nikla, aktivnosti askorbat-peroksidaze, superoksid-dizmutaze, glutation-reduktaze su se povećale, dok su aktivnosti ovih enzima kod biljaka hiperakumulatorske vrste *A. argenteum* ostale nepromenjene, osim aktivnosti SOD koja je bila inhibirana (Schickler i Caspi, 1999).

Unutar ćelije, joni Cu^{2+} se transportuju putem čaperona. Moguće je i da SOD, koja sadrži jone Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} ili Mn^{2+} u svom aktivnom centru, igra dvostruku ulogu u prevenciji toksičnosti metala. SOD sa jedne strane neutralizacijom O_2^- radikala održava niske koncentracije reaktivnih kiseoničnih vrsta, dok je sa druge strane vezivanjem jona metala u aktivne centre sprečava prooksidativno delovanje jona slobodnih metala. Dokazana je povećana koncentracija „slobodnih“ jona Fe^{2+} kod kvasaca sa deficitom Fe-SOD i/ili Mn-SOD, čime je potvrđena važna uloga SOD u mobilizaciji i vezivanju jona Fe^{2+} (Srinivasan et al., 2000). SOD mobilizacijom jona Fe^{2+} sprečava njihovo učešće u Fentonovim reakcijama koje doprinose povećanju koncentracije ROS-a. Pokazano je da izlaganje povišenim koncentracijama jona Cu^{2+} izaziva povećanje aktivnosti Cu/Zn SOD (Chongpraditnum et al., 1992; Kurepa et al., 1997), što sugerše da joni bakra imaju ulogu u modulaciji aktivnosti Cu/Zn SOD na transkripcionom nivou. Ovo istraživanje dokazuje da SOD osim antioksidantne uloge, ima važnu ulogu u regulaciji unutarćelijskih koncentracija slobodnih jona Cu^{2+} .

Višak jona Cu^{2+} u biljkama dovodi i do promena u aktivnosti antioksidantnih enzima poput: askorbat peroksidaze-APx, monodehidroaskorbat-reduktaze (MDHAR), dehidroaskorbat-reduktaze (DHAR), glutation-reduktaze (GR), superoksid-dizmutaze (SOD), gvajakol peroksidaze (De Vos et al., 1992; Luna et al., 1994; Stohs i Bagchi, 1995; Navari-Izzo et al., 1998; Gupta et al., 1999, Drazkiewicz et al., 2003; Wang et al., 2004; Štajner et al., 2013), što može da rezultuje pojavom oksidativnog stresa kod biljaka. Askorbat-glutation ciklus igra važnu ulogu u smanjenju oksidativnog

stresa kod biljaka usled povišenih koncentracija jona Cu^{2+} (Gupta et al., 1999; Drazkiewicz et al., 2003).

U listovima suncokreta usled delovanja jona kadmijuma došlo je do truljenja listova i smanjenja sadržaja redukovanog glutationa (GSH) (Groppa et al., 2001; Gallego et al., 1996). Veliki broj radova, potvrđuje da joni Cd^{2+} izazivaju smanjenje nivoa GSH kod raznih biljnih vrsta (Rauser et al., 1995; Dixit et al., 2001; Balestrasse et al., 2001). Smanjenje nivoa GSH se može objasniti inhibicijom aktivnosti glutation-reduktaze (GR) (Dixit et al., 2001), kao i povećanom potrošnjom redukovanog GSH u sintezi askorbata (Pietrini et al., 2003). Drugi autori (Vogeli-Lange i Wagner, 1990; Grill et al., 1985), su objasnili da do smanjenja koncentracije redukovanog glutationa pod uticajem jona teških metala dolazi usled mobilizacije slobodnog glutationa za sintezu fitohelatina, a te komplekse fitohelatina sa teškim metalima su i dokazali u vakuolama listova duvana. Kompleksi fitohelatina sa jonima Cd^{2+} dokazani su i kod *Avena sativa* i pretpostavlja se da se u ovoj formi joni kadmijuma transportuju kroz tonoplast (Salt i Rauser, 1995). Značajan porast koncentracije fitohelatina, zabeležen je i kod dve vrste pšenice tretirane povišenim koncentracijama kadmijuma (Stolt et al., 2003).

Tretmani jonima Cd^{2+} doveli su do povećanja aktivnosti lipooksigenaze, sa simultanom inhibicijom antioksidantnih enzima, SOD i CAT (Somashekaraiah et al., 1992). Aktivnosti SOD, GR, APx, POD i CAT su pokazale varijabilnost u zavisnosti od koncentracije jona Cd^{2+} i tretirane biljne vrste (Wua et al., 2003). Aktivnost CAT u velikom broju radova je bila smanjena pod uticajem povišenih koncentracija jona Cd^{2+} (Shim et al., 2003; Dalurzo et al., 1997; Sialio et al., 2001; Fornazier et al., 2002). Međutim, Vitoria i saradnici (2001) su dokazali povišene aktivnosti CAT, GR i specifičnih izoenzima SOD u listovima i korenovima otpornih varijeteta rena, pri izlaganju rastućim koncentracijama Cd^{2+} (od 0.25 do 1 mM). Niže koncentracije Cd^{2+} (50 μM) izazvale su povećanje aktivnosti GR, SOD i GSH-Px u kvržicama i korenju soje, dok su umerene (100 μM) i visoke koncentracije (200 μM) jona Cd^{2+} uzrokovale oksidativni stres i inhibiciju ovih enzima u korenju i kvržicama soje (Balestrasse et al., 2001). Proučavane koncentracije metala u ogledima u kontrolisanim uslovima, često ne odgovaraju onima koje se mogu naći u kontaminiranom zemljištu na prirodnim staništima (Sanita di Toppi i Gabrielli, 1999). Tako su, primenjene koncentracije jona Cd^{2+} na vrstu *Thaspi* koja je pokazala sposobnost akumulacije visokih koncentracije jona Cd^{2+} , bile daleko više od onih koje se mogu naći u kontaminiranom zemljištu. Uzimajući ovo u obzir, Milone i saradnici (2003) su izučavali antioksidantni odgovor izazvan jonima kadmijuma u različitim sortama pšenice tretiranih realnim koncentracijama (do 10 μM Cd^{2+}). U tom radu, aktivnosti SOD, APx i CAT su bile inhibirane u korenovima najsenzitivnijih sorti, Adamello, dok je kod najtolerantnije sorte, Ofanto aktivnost SOD pokazala značajnu inhibiciju. U korenovima i listovima graška pod uticajem jona Cd^{2+} došlo je do povećanja lipidne peroksidacije, nivoa H_2O_2 i aktivnosti SOD, CAT, APx i GR, dok su aktivnosti APx i CAT bile snižene pri visokim koncentracijama Cd (Dixit et al., 2001).

Smanjenje aktivnosti SOD i CAT i gotovo potpuni gubitak aktivnosti APx primećen je i u korenovima bora nakon 48h pod uticajem jona Cd^{2+} koncentracije 50 μM (Schützendübel i Polle, 2001). U listovima suncokreta, joni Cd^{2+} uticali su na smanjenje sadržaja redukovano GSH i na povećanje aktivnosti antioksidantnih enzima SOD, CAT, APx, GR i DHAR. Dokazano je da aktivnosti ovih enzima zavise od koncentracije jona Cd^{2+} , ispitivanog organa i starosti biljke (Gallego et al., 1996, 1999; Groppa et al., 2001). U korenovima i listovima biljke pasulja, koncentracija jona Cd^{2+} od 5 mM, dovela je do povećanja aktivnosti GSH-Px i APx, kao i povišene lipidne peroksidacije (Chaoui et al., 1997). U dve vrste roda *Alyssum*, aktivnost GR se povećala pri tretmanu od 0.02 mM jona Cd^{2+} , dok se pri tretmanu sa 0.05 mM Cd^{2+} aktivnost GR smanjila (Schickler i Caspi, 1999). Usled velikog broja radova na ovu temu, dodatna istraživanja uticaja kadmijuma na modifikaciju enzimske aktivnosti su predstavljena u tabeli 9.

Tabela 9. Pregled radova o modifikaciji aktivnosti antioksidantnih enzima kod različitih vrsta biljaka usled različitih primenjenih koncentracija i vremena izloženosti (Benavides et al., 2005)

Koncentracija kadmijuma (μM)	Vreme izlaganja metalu	Biljna vrsta	Modifikovane aktivnosti enzimskih sistema	Referenca
5	10d	<i>Pisum sativum</i>	CAT, APOX, GPOX	Metwally et al., 2003
1 and 10	10d	<i>Triticum durum</i>	CAT, SOD, APOX, GPOX	Milone et al., 2003
4 and 40	7d	<i>Pisum sativum</i>	CAT, SOD, APOX, GPOX	Dixit et al., 2001
5 and 50	48h	<i>Populus canescens</i>	CAT, SOD, APOX, GR, MDAR	Schützendübel i Polle, 2002
50	21d	<i>Phragmites australis</i>	CAT, SOD, APOX, GR	Ianelli et al., 2002
50, 100 and 200	48h	<i>Glycine max</i>	CAT, SOD, APOX	Balestrasse et al., 2001
500	12h	<i>Helianthus annuus</i>	CAT, SOD, APOX, GR, DHAR	Gallego et al., 1996
100 and 500	20d	<i>Oryza sativa</i>	CAT, SOD, GPOX	Shah et al., 2001
300 and 500	21d	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAT, SOD, APOX, GPOX, GR	Cho and Seo, 2004
2000 and 5000	0-96h	<i>Saccharum officinarum</i>	CAT, SOD, GR	Fornazier et al., 2002
5000	0-24h	<i>Oryza sativa</i>	CAT, SOD, APOX, GPOX, GR	Hsu and Kao, 2004

Stobrawa i Lorenc-Plucinka (2007), pratili su antioksidantne odgovore topola *Populus nigra* i *Populus deltoides* na dva lokaliteta teško zagađena teškim metalima. U obe vrste, stimulirana je lipidna peroksidacija u finim korenčićima topola, snižena aktivnost gvajakol-peroksidaze, dok je aktivnost katalaze pokazala veliku osetljivost na prisustvo teških metala u zemljištu. Zagađenje metalima dovelo je do povišene aktivnosti superoksid-dizmutaze, dok su aktivnosti askorbat-peroksidaza i glutation-reduktaza ostale nepromenjene kod korenčića *P. nigra* i *P. deltoides*.

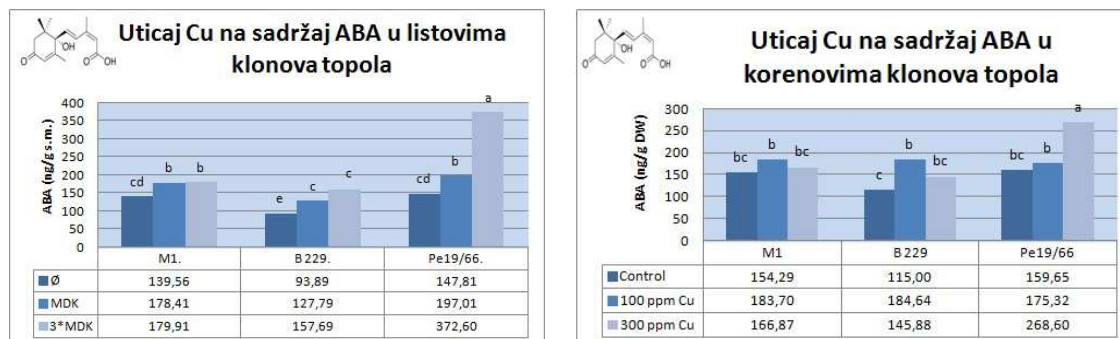
He i saradnici (2013) su takođe pratili promenu enzimske aktivnosti kod šest vrsta topola pod uticajem jona Cd^{2+} u koncentraciji od 200 μM , te dokazali povišene aktivnosti askorbat-peroksidaze, glutation-peroksidaze i katalaze u korenovima *Populus cathayana*.

5.15. Uticaj teških metala na sadržaj biljnih hormona u topolama

5.15.1. Uticaj jona Cu^{2+} na sadržaj abscisinske kiseline (ABA) u listovima i korenovima različitih klonova topola

Sadržaj fitohormona (abscisinske kiseline-ABA i indol-3-sirćetne kiseline-IAA) u okviru ovog rada razmatran je sa dva aspekta. S jedne strane, praćen je uticaj dve koncentracije bakra (100 i 300 mg/kg) u zemljištu, na sadržaj fitohormona u različitim klonovima topola (M1, B229 i Pe 19/66) i njegova distribucija u listovima i korenovima, kako bi se utvrdila klonalna varijabilnost u sadržaju biljnih hormona i razlika u biološkom odgovoru različitih klonova topola na abiotički stres izazvan tretmanima bakra. S druge strane, proučavan je uticaj jona različitih metala (Ni^{2+} , Cu^{2+} i Cd^{2+}) u koncentracijama koje odgovaraju njihovim maksimalnim dozvoljenim koncentracijama i trostruko većih koncentracijama od maksimalnih dozvoljenih u zemljištu za dati metal, na sadržaj biljnih hormona u vrsti *Populus deltoids*, klonu Pe19/66.

Dobijeni rezultati ukazuju da se pod uticajem bakra, sadržaj abscisinske kiseline u listovima različitih klonova topola povećava. Pri tretmanu sa 300 mg/kg bakra sadržaj ABA u listovima klona M1 povećao se za 28 %, a kod klona B229 za 68 % u poređenju sa netretiranim kontrolama odgovarajućih klonova. Najznačajniji porast koncentracije ovog hormona zabeležen je kod klona Pe19/66, kod koga se vrednost ABA u prisustvu bakra koncentracije 300 mg/kg, povećala oko dva i po puta, sa 147,6 ng/g s.m. koliko je iznosila u netretiranom lišću, na vrednost od 372,6 ng/g s.m. (slika 86a).



a)

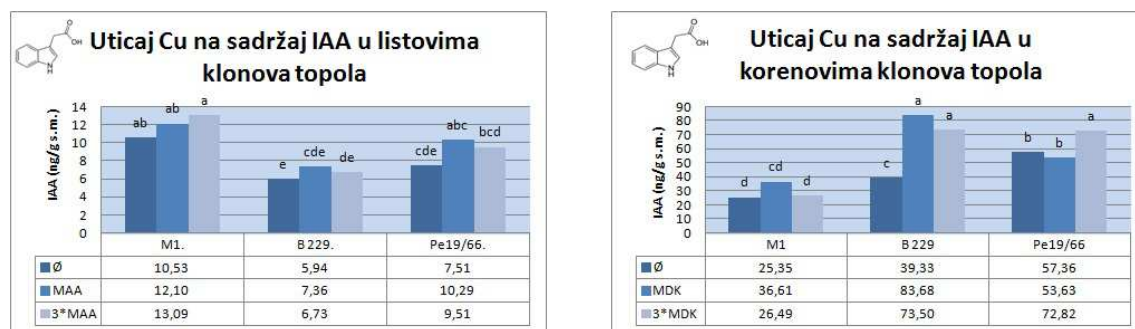
b)

Slika 86. Uticaj jona Cu^{2+} na sadržaj abscisinske kiseline (ABA) u listovima i korenovima različitih klonova topola

Pri tretmanu sa 100 mg/kg jona Cu^{2+} u korenovima svih ispitanih klonova došlo je do povećanja sadržaja ABA i to kod klona M1 za 18%, a kod klona B229 za 60%. Tretman sa 300 mg/kg bakra je izazvao najdrastičnije povećanje u sadržaju ABA kod korenova klona Pe 19/66 i to za 68% u poređenju sa sadržajem ABA u korenovima netretiranih kontrolnih biljaka tog klona (slika 86b).

5.15.2. Uticaj jona Cu^{2+} na sadržaj indol-3-sirćetne kiseline (IAA) u listovima i korenovima klonova topola

U listovima klonova B229 i Pe 19/66 došlo je do neznatnog povećanja sadržaja indol-3-sirćetne kiseline (IAA) pod uticajem tretmana povišenih koncentracija jona bakra. Takođe, nisu uočene statistički značajne razlike u sadržaju ovog auksina u listovima između tretmana bakrom u različitim koncentracijama (100 i 300 mg/kg). Postoji značajna razlika u sadržaju IAA među netretiranim klonovima topola. Tako, sadržaj IAA u listovima topola klona M1 je skoro dvostruko veći od sadržaja IAA u listovima klona B229 i iznosi oko 10 ng/g suve mase (slika 87a). Koncentracija od 100 mg/kg bakra u zemljištu je izazvala povećanje koncentracije IAA u korenovima klona B229 od 112%, dok je pri istom tretmanu u korenovima klona M1 došlo do povećanja sadržaja ovog hormona od 44% u odnosu na netretirane biljke. Tretman sa 100 mg/kg bakra nije doveo do statistički značajnih promena sadržaja IAA u korenovima klona Pe19/66, dok je tretman sa 300 mg/kg bakra izazvao povećanje IAA u korenovima ovog klonova za 26% (slika 87b):



a)

b)

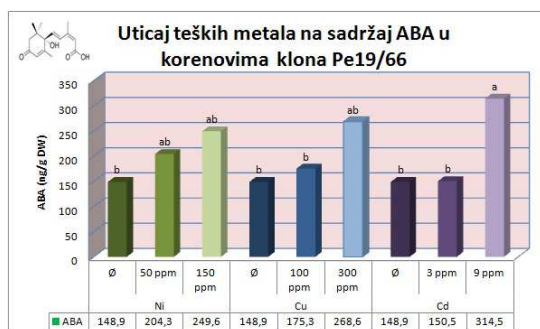
Slika 87. Uticaj jona Cu^{2+} na sadržaj indol-3-sirćetne kiseline (IAA) u listovima i korenovima klonova topola

5.15.3. Uticaj različitih teških metala na sadržaj fitohormona u listovima i korenovima topole

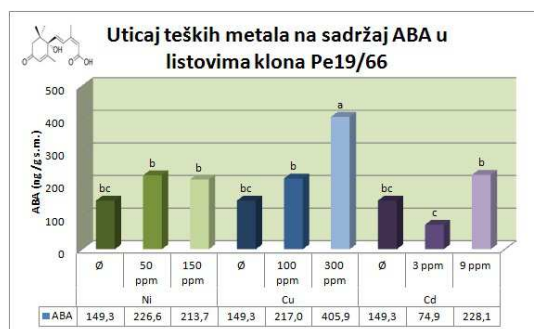
P. deltoides

Pod uticajem sva tri ispitana jona metala (Ni^{2+} , Cu^{2+} i Cd^{2+}) u koncentracijama koje odgovaraju trostruko većim od MDK za dati metal u zemljištu došlo je do povećanja sadržaja abscisinske kiseline u korenovima topola *P. deltoides* (klona Pe19/66). Ni jedan od ispitanih metala (Ni^{2+} , Cu^{2+} i Cd^{2+}) u koncentracijama koje odgovaraju njihovim MDK (50, 100 i 3 mg/kg), nije izazvao statistički značajne promene abscisinske kiseline u korenovima klona Pe19/66. Najveće promene u sadržaju ABA u korenovima pod uticajem koncentracija metala koje odgovaraju 3*MDK za dati metal, izazvao je kadmijum i doveo do povećanja sadržaja ABA od 111%, dok su bakar i nikel u tim koncentracijama doveli do povećanja sadržaja ABA od 78 i 67% u poređenju sa netretiranim biljkama (slika 88a). Pod uticajem tretmana od 300 mg/kg bakra u listovima *P. deltoides* (klona Pe19/66) došlo je do drastičnog povećanja koncentracije ABA (za 170%) u odnosu na listove netretiranih biljaka, dok tretmani sa jonima Ni^{2+} nisu doveli do značajnih promena u sadržaju ABA u listovima. Tretman kadmijumom u koncentraciji od 9 mg/kg, doveo je do povećanja akumulacije

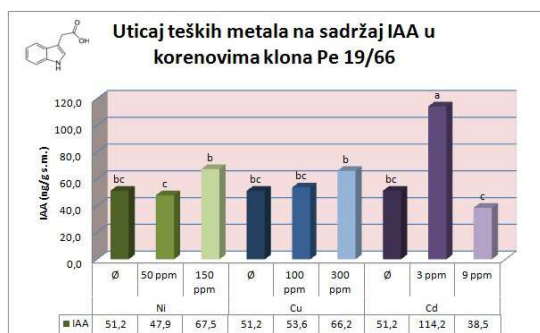
ABA u listovima za 52% u poređenju sa netretiranim biljkama (slika 88b). U korenovima topola klona Pe 19/66, pod uticajem tretmana sa 3 mg/kg kadmijuma došlo je do dvostrukog povećanja sadržaja indol-3-sirćetne kiseline (IAA) u poređenju sa sadržajem IAA u korenovima netretiranih biljaka (slika 88c). Pod uticajem istog tretmana, koncentracija IAA u listovima se povećala za 61 % u poređenju sa sadržajem u listovima kontrolnih biljaka (slika 88d). Koncentracija IAA u korenovima (51,2 ng/g s.m.) je pet puta viša u odnosu na koncentraciju ovog hormona u listovima (9,5 ng/g s.m.) kod netretiranih biljaka topola klona Pe 19/66.



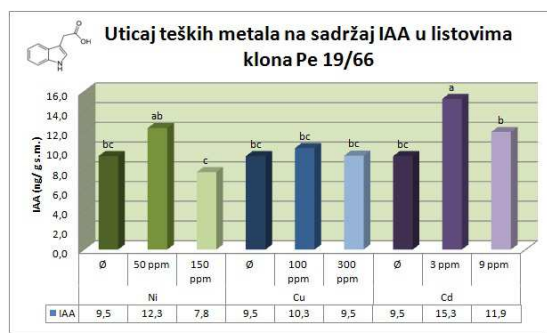
a)



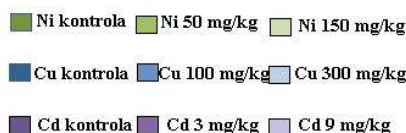
b)



c)



d)



Slika 88. Uticaj teških metala na sadržaj fitohormona u listovima i korenovima topole

P. deltoides

Biljni hormoni (auksini, giberelini i abscisinska kiselina) i opskrbljenost nutrijentima (ugljenim hidratima, azotom i dr.) igraju odlučujuću ulogu u komunikaciji između korena i izbojaka. Složene interakcije hormonalnih puteva i uticaj nutritivnih faktora na njih, još uvek u potpunosti nije objašnjen. Postoji dosta dokaza koji potvrđuju da joni teških metala imaju veliki uticaj na sadržaj ovih jedinjenja sa hormonskom funkcijom. Tako, joni Ni^{2+} u listovima *Phaseolus vulgaris* su izazvali povećanje sadržaja ABA, koja je poznata po efektu zatvaranja stoma (Bishnoi et al., 1993). Veliki broj naučnih radova navodi i da joni Cd^{2+} indukuju biosintezu ABA i etilena u korenovima (Chen i Kao, 1995; Hollenbuch et al., 1997; Sanita di Toppi et al., 1998; 1999b; Chen et al., 2001). Transmisija ovih signalnih molekula iz korena ka izbojcima, omogućava prenos informacije o

povećanim koncentracijama teških metala u zemljištu do izbojaka. ABA, smanjenjem jonskog fluksa u ćelijama “zatvaračicama”, dovodi do stomalnog zatvaranja i time igra glavnu ulogu u adaptaciji biljke na stres suše. Biljka u situacijama izloženosti višku jona Cd^{2+} ili Cu^{2+} pokazuje simptome opšteg biljnog stresa koji se manifestuju u redukciji izduživanja i rasta listova, smanjenju veličine samih ćelija (etilenski odgovor), ali i simptomima vodnog deficit, poput smanjene stomatalne provodljivosti i transpiracije, koji predstvaljaju tipičan ABA odgovor (Haag Kerwer et al., 1999, Perfus-Barbeoch et al., 2002).

Kontaminacija jonima Cd^{2+} dovodi do ometanja unosa vode u korenovima, hidraulična provodljivost je smanjena, te je otuda i opskrbljenost izbojaka vodom smanjena (Marchiol et al., 1996). Sa druge strane, transport jona Cd^{2+} do izbojaka je podstaknut transpiracijom i prilikom egzogene primene ABA ovaj transport je smanjen (Rubio et al., 1994; Salt et al., 1995). Povišene koncentracije jona Cu^{2+} dovele su do simptoma opšteg poremećaja vodnog režima koji su se ogledali u smanjenoj efikasnosti upotrebe vode (WUE) i akumulaciji indikatora suše poput prolina i ABA-e (Maksymiec i Baszynski, 1996; Sha i Dubey, 1998; Scat et al., 1997; Talanova et al., 2000; Chen et al., 2001; Vinit-Dunant et al., 2002). Akumulacija ovih metabolita, ABA i prolina je bitna i kod stvaranja tolerancije na jone Cd^{2+} što ukazuje na umreženost signalnih puteva u uslovima abiotičkog stresa izazvanog vodnim deficitom i povećanim koncentracijama teških metala (Siripornadulsil et al., 2002).

Dokaz postojanja umreženosti signalnih puteva suše i stresa izazvanog jonima Cd^{2+} je to što obe grupe signalnih puteva, i ABA posredovani signalni putevi osmotskog stresa i ABA posredovani signalni putevi izazvani povećanim koncentracijama jona Cd^{2+} , dovode do povećane ekspresije metalotioneina kod graška (Munoz et al., 1998). Morgan i saradnici (1994) su objasnili ovo neočekivano povećanje ekspresije metalotioneina u uslovima suše kod graška time što usled oksidativnog stresa izazvanog sušom dolazi do otpuštanja prelaznih metala iz metaloproteina, koji nadalje aktiviraju gene koji kodiraju metalotioneine.

Dokazano je da ABA signalni putevi dovode do zatvaranja stoma u ćelijama “zatvaračicama”, tako što posredstvom indukcije sinteze H_2O_2 aktiviraju Ca^{2+} -kanale, te blokiraju ulazak jona K^+ (Pei et al., 2000; Murata et al., 2001). Kod ABA-neosetljivog ABI1-1 mutanta, onemogućena je stimulacija H_2O_2 pa stoga i signalna transdukcija, što dalje rezultuje u blokiranju zatvaranja stoma (Pei et al., 2000; Murata et al., 2001). Zatvaranje stoma indukovano jonima Cd^{2+} je nezavisno od ABA signalne kaskade, jer se pojavljuje i kod ABA neosetljivog ABI1-1 mutanta (Perfus-Barbeoch et al., 2002). Perfus-Barbeoch i saradnici (2002) su dokazali da joni Cd^{2+} ulaze u ćelije “zatvaračice” putem Ca^{2+} -kanala, što dovodi do zatvaranja stoma. Zatvaranje stoma indukovano jonima Cd^{2+} kao blokatorima Ca^{2+} -kanala, dokazano je kod ABI1-1 mutanta jednako kao i kod kontrolnih biljaka (Perfus-Barbeoch et al., 2002). Joni Cd^{2+} izazivaju akumulaciju H_2O_2 , koji je obavezan signalni transduktor stomatalnog zatvaranja, te da bi došlo do zatvaranja stoma, neophodno je da joni Cd^{2+} budu usvojeni od strane ćelije, gde će akumulirani joni Cd^{2+} stimulisati neki od sistema koji proizvodi H_2O_2 . Odsustvo dokaza, da nastali

vodonik-peroksid potiče iz drugog izvora osim uticaja jona Cd^{2+} potvrdili su da upravo joni Cd^{2+} dovode do smanjene regulacije ABA signalinga, jer prevashodno utiču na H_2O_2 signaling (Neill et al., 2002). Kao alternativni izvori H_2O_2 kao aktivatora za zatvaranje stoma, razmatrani su hloroplasti, ali i odbačeni zbog njihove opremljenosti sa moćnim antioksidantnim sistemima (Polle, 2001) i nedostatka dokaza o oštećenjima u svetloj fazi fotosinteze (Haag'Kerver et al., 1999; Vinit-Dunand et al., 2002). Zajednička primena ABA i jona Cd^{2+} pogoršava opšte stanje biljaka u poređenju sa pojedinačnim tretmanima, što podržava ideju o sinergističkom delovanju ABA i jona Cd^{2+} (Moya et al., 1995).

Još uvek nije razjašnjeno da li teški metali posredstvom ABA regulišu prvenstveno zatvaranje stoma udruženo sa smanjenjem efikasnosti upotrebe vode (WUE) ili smanjenje ukupnog intenziteta fotosinteze. Koji od ova dva mehanizma će biti prvi aktiviran, zavisi od sposobnosti korenova da zadrže teške metale, sposobnosti sistema da proizvodi ABA (ili druge hormone), kinetike transporta ovih jedinjenja i osetljivosti ciljanih organa. Detaljne ekofiziološke studije pokazale su da efekti jona Cd^{2+} ili viška Cu^{2+} u izbojcima zavise od faze rasta i fiziološkog stadijuma tj. starosti listova (Skorzynska-Polli i Beszynski, 1997; Vinit-Dunand et al., 2002). Egzogeni primena auksina (indol-3-sirćetne kiseline) nije dala nikakve zaštitne efekte, dok je upotreba giberelina prekinula inhibitorski efekat jona Cd^{2+} na rast (Moya et al., 1995).

U zavisnosti od koncentracije, joni nikla mogu da stimulišu i inhibiraju aktivnosti enzima uključenih u metabolizam biljnih hormona. Tako, pod uticajem $50 \mu\text{M}$ NiCl_2 aktivnost oksidaze indol-3-sirćetne kiseline u sadnicama *O. sativa* je znatno povišena, dok je pri višim koncentracijama jona Ni^{2+} enzimski aktivnost ovog enzima značajno opala (Das et al., 1978).

5.16. Uticaj teških metala na sadržaj slobodnih poliamina

U ovom radu praćen je uticaj jona različitih metala (Ni^{2+} , Cu^{2+} i Cd^{2+}) u dve toksične koncentracije na sadržaj slobodnih i konjugovanih poliamina (Put, Spm, Spd) u listovima i korenovima *P. deltoides* (klona Pe19/66) i ispitan uticaj jona bakra na sadržaj poliamina kod različitih klonova topola.

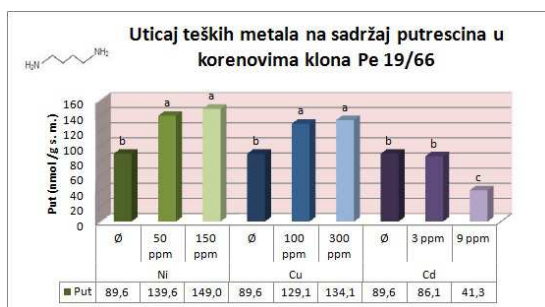
Ispitivanje ukazuje da izlaganje toksičnim koncentracijama jonima bakra (100 i 300 mg/kg) i nikla (100 i 150 mg/kg) dovodi do povećanja sadržaja slobodnog putrescina u korenovima testiranog klona Pe 19/66. Nasuprot tome, izlaganje jonima kadmijuma u koncentraciji od 9 mg/kg dovelo je do dvostrukog smanjenja sadržaja slobodnog putrescina u korenovima ovog klona u poređenju sa netretiranim biljkama, dok primena kadmijuma u nižoj koncentraciji nije dovela do statistički značajnih promena u sadržaju putrescina (slika 89a).

U listovima klona Pe19/66 pod uticajem jona Ni^{2+} koncentracije od 150 mg/kg došlo je do smanjenja sadržaja putrescina na trostruko nižu vrednost (46,5 nmol/g s.m.) od one u listovima kontrolnih biljaka (153,9 nmol/g s.m.). Maksimalno dozvoljene koncentracije bakra i kadmijuma u zemljištu (100 i 3 mg/kg) izazvale su povećanje koncentracije slobodnog putrescina u listovima i to za 120 i 72% u odnosu na kontrolne netretirane biljke. Pod uticajem trostruko većih koncentracija jona

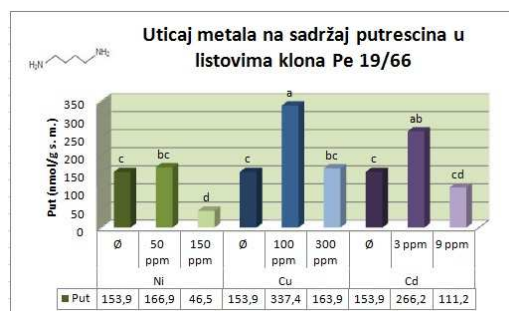
Cu^{2+} i Cd^{2+} od MDK, došlo je do smanjenja sadržaja putrescina u odnosu na tretmane nižim koncentracijama tih metala (slika 89 b). Sadržaj putrescina je u listovima kontrolnih biljaka bio za oko 70 % viši nego sadržaj putrescina u korenovima.

Pod uticajem maksimalno dozvoljenih koncentracija nikla i bakra (50 i 100 mg/kg) došlo je do drastičnog povećanja sadržaja spermidina u korenovima u odnosu na netretirane biljke, tako da je sadržaj spermidina u korenovima biljaka tretiranih niklom i bakrom povećan oko tri puta u odnosu na kontrole. Pri tretmanu kadmijumom od 3mg/kg količina spermidina je udvostručena u odnosu na onu u netretiranim biljkama. Trostruko više koncentracije od maksimalno dozvoljenih za jone bakra i kadmijuma (300 i 9 mg/kg) dovele su do smanjenja koncentracije spermidina kod korenova *P. deltoides*, dok je tretman niklom koncentracije 150 mg/kg doveo do povratka sadržaja spermidina na nivo koji odgovara onom u korenovima kontrolnih biljaka (slika 89 c).

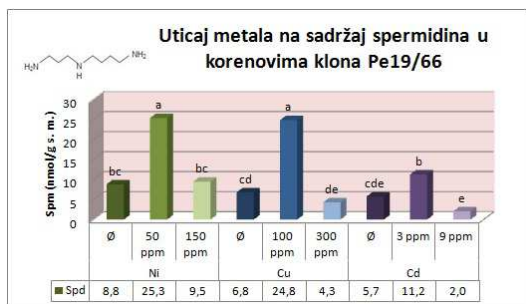
Pod uticajem 50 mg/kg jona nikla u listovima *P. deltoides* sadržaj spermidina se smanjio više od četiri puta u poređenju sa netretiranim topolama (slika 89e).



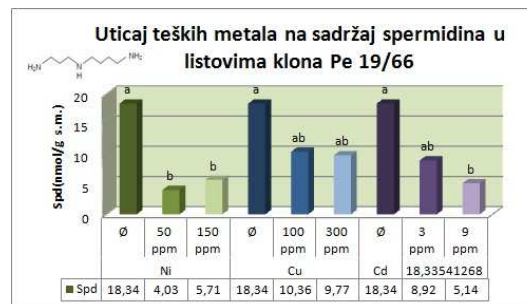
a)



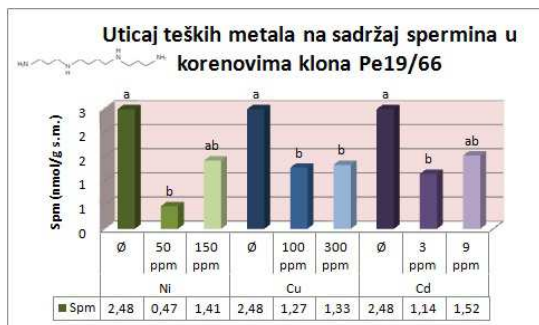
b)



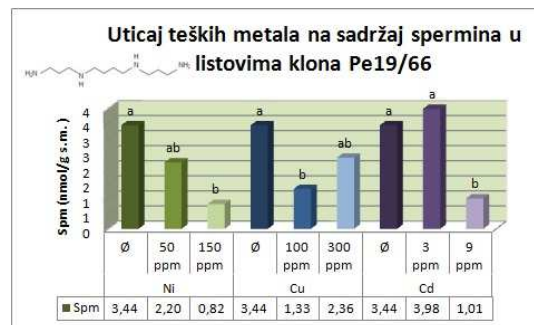
c)



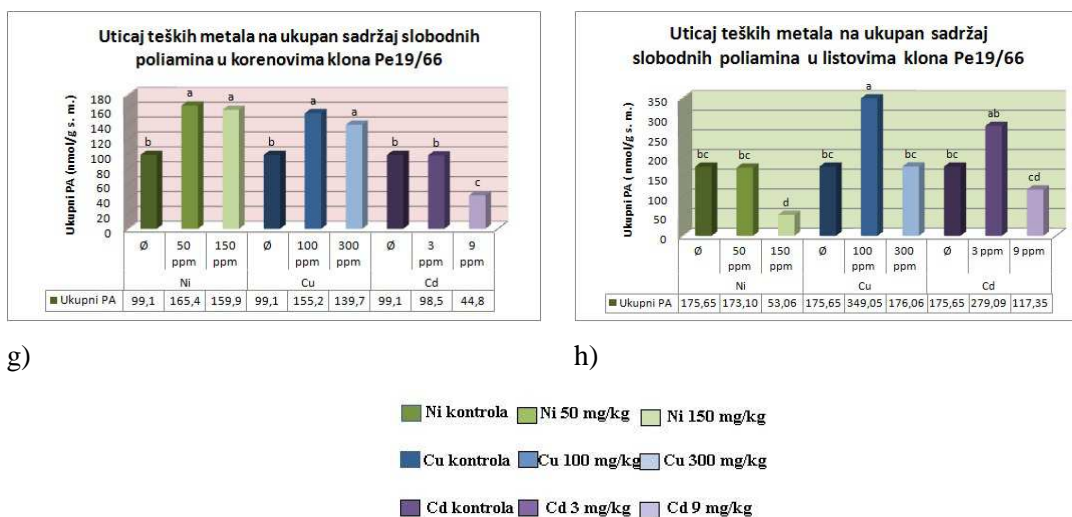
d)



e)



f)



g)

h)

Slika 89. Uticaj jona teških metala na sadržaj slobodnih poliamina (Put, Spd i Spm)

Takođe, obe primenjene koncentracije sva tri ispitana metala (Ni, Cu i Cd) dovele su do opadanja koncentracije spermina u listovima i korenovima topole *P. deltoides* klona Pe19/66. Najveći pad koncentracije spermina u korenu zabeležen je pod uticajem jona nikla koncentracije 50 mg/kg, pri kojoj se sadržaj spermina smanjio pet puta u poređenju sa kontrolom. Sadržaj spermina u korenovima biljaka tretiranih nižim koncentracijama bakra i kadmijuma (100 i 3 mg/kg) bio je dvostruko niži u odnosu na sadržaj u korenovima kontrola. Povećanje koncentracije bakra i kadmijuma nije izazvalo dodatno opadanje sadržaja spermina u korenovima, dok je u listovima pod uticajem jona nikla koncentracije 150 mg/kg, sadržaj spermina bio niži u poređenju sa biljkama tretiranim sa 50 mg/kg nikla. U listovima biljaka tretiranih bakrom koncentracije 300 mg/kg, došlo je do smanjenja sadržaja spermina za 45%, dok se pod uticajem tretmana kadmijuma koncentracije 9 mg/kg, sadržaj spermina smanjio skoro četiri puta u odnosu na kontrolu (slika 89 ef).

Putrescin je dominantni poliamin kod klonova topola, dok su preostala dva zastupljena u manjem procentu, pa tako sadržaj ukupnih slobodnih poliamina i njegova zavisnost od tretmana teškim metalima je posledica ponašanja najjednostavnijeg i najzastupljenijeg poliamina-putrescina. Pod uticajem jona Ni^{2+} i Cu^{2+} u koncentracijama od 50 i 100 mg/kg, u korenovima *P. deltoides* došlo je do porasta sadržaja ukupnih slobodnih poliamina za 66 i 56 %. Tretman jonima kadmijuma u koncentraciji od 3 mg/kg nije izazvao statistički značajne promene u sadržaju ukupnih slobodnih poliamina u korenovima u odnosu na kontrole (slika 89g). Poliamini u korenu nisu pokazali doznu zavisnost pri ispitivanju uticaja različitih koncentracija metala na njihov sadržaj. Kadmijum koncentracije od 3 mg/kg nije izazvao promene u ukupnom sadržaju slobodnih poliamina u korenovima *P. deltoides*, dok je koncentracija od 9 mg/kg jona Cd^{2+} izazvala smanjenje sadržaja ukupnih poliamina u korenovima za 121% u odnosu na kontrolne biljke (slika 89g).

Sadržaj ukupnih poliamina u listovima je za oko 75% viši nego u korenovima ispitanih topola. Pod uticajem jona Ni^{2+} u koncentraciji od 150 mg/kg došlo je do smanjenja sadržaja ukupnih slobodnih poliamina u listovima tri puta u odnosu na netretirane biljke, dok koncentracija jona Ni^{2+} od

50 mg/kg nije uticala na sadržaj ukupnih poliamina. Bakar i kadmijum, u koncentracijama koje odgovaraju koncentracijama njihovim propisanim MDK, izazvali su povećanje sadržaja ukupnih slobodnih poliamina u listovima i to za 102 i 59 %, u odnosu na kontrolu. Koncentracija bakra od 3*MDK dovela je do vraćanja sadržaja ukupnih poliamina na vrednosti koje su slične onima u netretiranim biljkama, dok su tretmani sa 3*MDK nikla i kadmijuma (150 mg/kg Ni²⁺ i 9 mg/kg Cd²⁺) doveli do smanjenja ukupnih poliamina u odnosu kontrole (slika 89h).

Najnovija istraživanja ukazuju da postoji komunikacija poliamina sa biljnim hormonima i interakcija signalinga poliamina sa raznim metaboličkim putevima. Posebno je zanimljivo da je komunikacija između poliamina i abscisinske kiseline omogućena posredstvom signalinga reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS). Poliamini doprinose stvaranju mehanizma tolerancije biljaka na abiotički stres, stimulacijom proizvodnje azot-oksida, moduliranjem aktivnost jonskih kanala i održavanjem homeostaze jona Ca²⁺ (Yamasaki i Cohen, 2006).

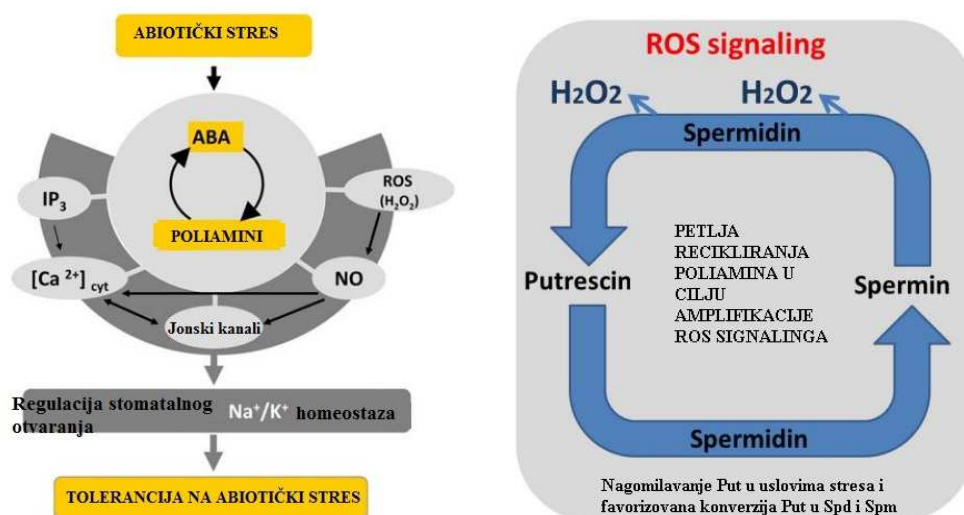
Pod stresom, nivoi poliamina mogu porasti u osegu od 10–100 mikromola do submilimolarnih i milimolarnih koncentracija (Kuznetsov et al., 2006). Brojni rezultati ukazuju da pri koncentracijama poliamina koje mogu biti dostignute u stresnim uslovima, poliamini aktivno moduliraju jonske kanale i učestvuju u stomalnom zatvaranju putem raznih signalnih puteva (Yamasaki i Cohen, 2006). Stoga, poliamini služe kao „ćelijski glasnici“ u situacijama kada je biljka suočena sa stresom (Liu et al. 2000). Poliamini su kao organski polikatjoni idealni molekuli za blokiranje jonskih kanala, nasuprot neorganskim poliakatjonima (npr. Al³⁺, Gd³⁺, La³⁺) koji su takođe efikasni u blokiranju jonskih kanala, ali od kojih je većina visoko toksična, te ne može biti akumulirana u citosolu u potrebnim koncentracijama, a da se ne ometa normalni metabolizam. Poliamini pri fiziološkoj koncentraciji blokiraju brzo-aktivirajuće vakuolarne katjonske kanale u zavisnosti od njihovog naelektrisanja (Spm⁴⁺>Spd³⁺>>Put²⁺) (Bruggemann et al. 1998).

Metabolizam poliamina je ukršten sa drugim metaboličkim putevima koji učestvuju u stvaranju drugih signalnih molekula i metabolita koji su karakteristični u odgovoru biljke na stres. Biosinteze poliamina i etilena su povezane zajedničkim prekursorom S-adenozilmetioninom (SAM), koji u metaboličkim reakcijama predstavlja donor metil grupe. Antagonistički efekat između poliamina i etilena primećen je tokom lisne i cvetne senescencije i tokom opadanja plodova (Pandey et al., 2000; Wi i Park, 2002). Metabolizam poliamina utiče na formiranje NO[•] oksida (Yamasaki i Cohen, 2006). Poliamini izazivaju povećanu produkciju NO[•] koji deluje kao veza između odgovora na stres posredovan poliaminima i drugih medijatora stresa. H₂O₂ nastao dejstvom diamin-oksidaza ili poliamin-oksidaza (DAO i/ili PAO) je uključen u abiotički i biotički stres signaling, kao i u stomalno zatvaranje izazvano ABA-om (Cona et al., 2006; An et al., 2008). Jedan od proizvoda katabolizma putrescina (Put) i spermidina (Spd) je i γ -aminobuterna kiselina (GABA) koja se formira preko pirolina. Nivoi GABA, agmatina (prekursora Put) i nekih komponenti ciklusa limunskih kiselina se povećavaju pri dehidraciji (Urano et al., 2009), zajedno sa povećanjem sadržaja Put (Alcázar et al., 2006a), što ukazuje na metaboličku vezu između ovih puteva u odgovoru na stres. Takođe, dokazano

je da je katabolizam poliamina usko povezan sa akumulacijom prolina u uslovima suše i stresa zaslanjenosti, dok su povišene koncentracije prolina zabeležene kao odgovor i na druge abiotičke stresove poput onog izazvanog teškim metalima (Urano et al., 2009). Povećana akumulacije prolina i poliamina u uslovima stresa može se objasniti činjenicom da obe grupe jedinjenja kao zajednički prekursor imaju ornitin (Mohapatra et al., 2009). Sve navedeno potvrđuje da je metabolizam poliamina povezan sa nekoliko važnih hormonalnih i metaboličkih puteva koji su uključeni u procese razvoja, asimilacije azota i metabolizam ćelijskog disanja.

Dokazano je da postoji uska veza između delovanja ABA, poliamina, reaktivnih kiseoničnih vrsta (H_2O_2) i NO u regulaciji stomalnih pokreta. Abscisinska kiselina, kao endogeni antitranspirant redukuje gubitak vode kroz pore stoma na površini lista, te povećana biosinteza ABA kao odgovor biljke na deficit vode dovodi do redistribucije i akumulacije ABA u ćelijama zatvaračicama. Ovo izaziva oslobađanje vode, zatim efluks i influks jona, gubitak turgora ćelija zatvaračica i zatvaranje stoma. Putevi ABA signala u zatvaranju stoma zahtevaju učestvovanje ABA receptora, G-proteina, protein kinaza i fosfataza, transkripcionih faktora (TFs) i sekundarnih glasnika poput intracelularnog Ca^{2+} , reaktivnih kiseoničnih vrsta i NO radikala (Kuppusamy et al., 2009). Dokazano je da Put, Spd i Spm takođe uzrokuju zatvaranje stoma i smanjenje stomalnog aparata (Liu et al., 2000; An et al., 2008). U odgovoru na abiotički stres, putrescin modulira ABA biosintezu, te na taj način poliamini indirektno učestvuju u odgovorima na stres koji uključuju stomalno zatvaranje izazvano ABA. Dokazana je i interakcija između poliamina i proizvodnje ROS-a i NO signala kod odgovora na stres posredovanih delovanjem ABA (Yamasaki i Cohen, 2006) (slika 90a).

Proizvodnja ROS-a je usko povezana sa kataboličkim procesima poliamina. Amino-oksidaze koje vrše oksidaciju poliamina stvaraju i H_2O_2 koji igra važnu ulogu u odbrani biljke od abiotičkog stresa (Cona et al., 2006).



Slika 90. Sinergizam poliamina i ABA u cilju povećanja tolerancije na abiotički stres (levo) i shema recikliranja poliamina (desno) (Alcazar et al., 2010)

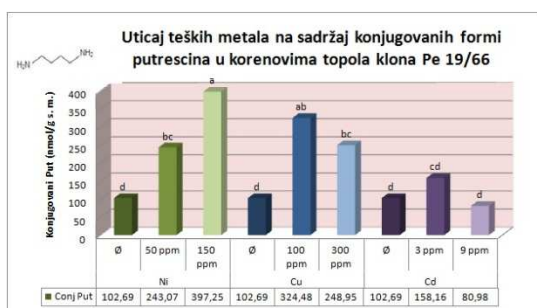
Jedan od mogućih mehanizama učestvovanja poliamina u transdukciji signala na abiotički stres je objašnjen petljom recikliranja poliamina (slika 90b). Usled učestale međusobne transformacije poliamina od Put do Spm u uslovima stresa, dolazi do amplifikacije ROS signalinga što dovodi do učestale proizvodnje vodonik-peroksida, signalnog molekula koji je nosilac odgovora na abiotički stres i koji dalje učestvuje u aktivaciji mitogen-aktivirajućih proteinskih (MAP) kinaznih kaskada (Alcazar et al., 2010).

Poliamini pospešuju i proizvodnju NO radikala u *Arabidopsisu* (Tun et al. 2006). Oba, i H₂O₂ i NO, utiču na regulaciju stomalnih pokreta izazvanih dejstvom ABA, s tim da proizvodnja NO[•] radikala zavisi od proizvodnje H₂O₂ (Neill et al. 2008). U ćelijama zatvaračicama kod *Arabidopsisu*, povećane koncentracije ROS-a nastaju usled ABA-aktivirane proizvodnje H₂O₂ i usled generacije superoksid-anjona od strane NADPH oksidaza kodiranih *AtrbohD* i *AtrbohF* genima. Ovako nastale ROS izazivaju povećanje koncentracije citosolnog Ca²⁺, čime se objašnjava ROS-zavisna aktivacija Ca²⁺ kanala (Kwak et al., 2003; Desikan et al., 2004). Osim NADPH oksidaza, apoplastne amino-oksidge su takođe izvori ROS-a (Cona et al., 2006). Dokazano je da ABA aktivira katabolizam i produkciju H₂O₂ kroz povećanje aktivnosti DAO tokom indukcije stomalnog zatvaranja u ćelijama zatvaračicama kod *Vicia faba* (An et al., 2008). Usled stresa, ABA i Put povećavaju koncentraciju Ca²⁺ u ćelijama zatvaračicama, a ovo povećanje je povezano sa DAO inhibitorima. Sve navedeno ukazuje da je H₂O₂, koji je nastao oksidacijom Put katalizovanom DAO u ćelijama zatvaračicama, posredovan zapravo jonima Ca²⁺. Nasuprot efluksu putrescina, spermidin i spermin nisu doprineli ABA indukovanoj proizvodnji H₂O₂ u ćelijama zatvaračicama *V. Faba* (An et al., 2008), uprkos činjenici da sva tri poliamina izazivaju zatvaranje stoma (Liu et al. 2000). Prvobitno je bilo pretpostavljeno da je proizvodnja NO[•] u biljci posredovana aktivnošću enzima sličnih NO sintazi ili nitrat reduktazi. Međutim, skorija istraživanja osporavaju učešće NO sintazi sličnih enzima u H₂O₂ izazvanoj sintezi NO radikala u ćelijama zatvaračicama (Bright et al., 2006; Neill et al., 2008). Tun i saradnici (2006) su pokazali da Spd i Spm izazivaju brzu biosintezu NO[•], dok egzogena primena Put nije imala taj efekat. Stoga, iako još nisu otkriveni enzimi koji dovode do konverzije poliamina do NO[•] radikala, neminovno je da poliamini regulišu stomalno zatvaranje aktivirajući biosintezu signalnih molekula poput NO i H₂O₂ kroz različite metaboličke puteve (Yamasaki i Cohen, 2006). Sumarno, svi dostupni podaci ukazuju da poliamini, ROS i NO sinergički pospešuju ABA odgovore u ćelijama zatvaračicama usled abiotičkog stresa.

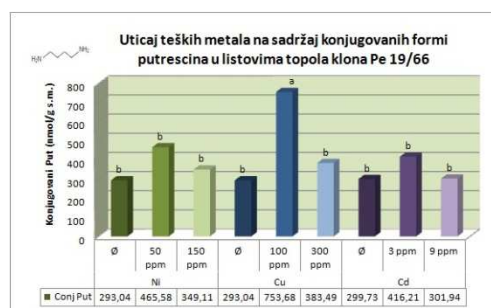
5.17. Uticaj različitih jona teških metala (Ni²⁺, Cu²⁺ i Cd²⁺) na sadržaj konjugovanih poliamina (Put, Spd i Spm)

Sadržaj konjugovanih poliamina u korenovima i listovima topole je pokazao varijabilnost u zavisnosti od vrste i koncentracije teškog metala kojem su topole bile izložene. Tako, sadržaj konjugovanog putrescina pokazuje zavisnost od koncentracije nikla u zemljištu, te dolazi do gradijentnog povećanja istog pri porastu koncentracije nikla u zemljištu. Pod uticajem tretmana jonima nikla u koncentraciji od 3*MDK (Ni) (150 mg/kg), dolazi do povećanja sadržaja

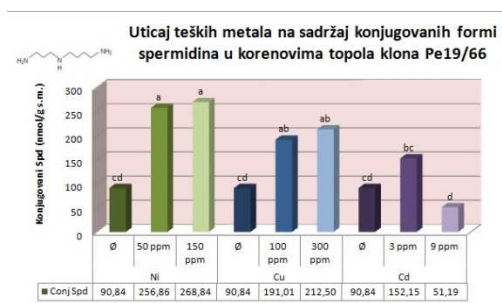
konjugovanog putrescina u korenovima topole *P. deltoides* i do četiri puta u odnosu na netretirane biljke. Takođe, sadržaj konjugovanog putrescina se trostruko povećao pri tretmanu nižom koncentracijom bakra od 100 mg/kg, da bi sa daljim povećanjem koncentracije bakra, sadržaj konjugovanog putrescina pokazao blago opadanje. Zemljište zagađeno jonima kadmijuma u koncentraciji od 3 mg/kg dovelo je do povećanja konjugovanog putrescina za 54% u odnosu na kontrole, da bi pri tretmanu kadmijumom od 9 mg/kg, sadržaj konjugovanog putrescina se vratio na vrednosti koje su pokazale i netretirane biljke (slika 91a). U listovima je takođe zabeležen porast konjugovanog putrescina sa porastom koncentracije teških metala u zemljištu. Pod uticajem koncentracija metala koje odgovaraju njihovim MDK vrednostima, sadržaj konjugovanih formi putrescina se povećava pod uticajem nikla (50 mg/kg) za 58%, bakra (100 mg/kg) za 156%, dok je kadmijum koncentracije 9 mg/kg doveo do povećanja sadržaja konjugovanog putrescina u listovima za 39% u poređenju sa kontrolama. Pod uticajem sva tri ispitana jona teških metala u tretmanima sa višim koncentracijama koje odgovaraju 3*MDK, sadržaj konjugovanog putrescina se vratio na vrednosti jednake onim iz kontrolnih biljaka (slika 91b).



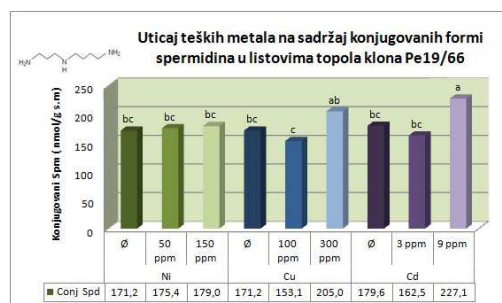
a)



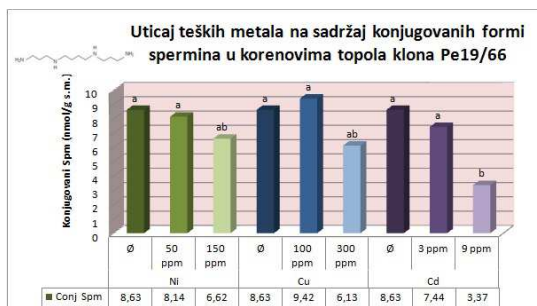
b)



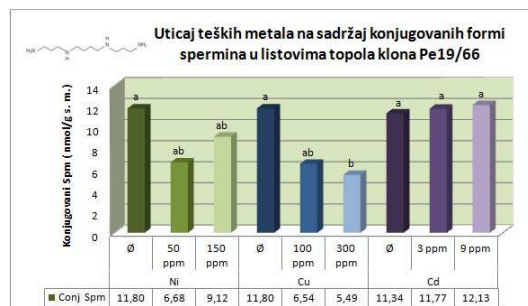
c)



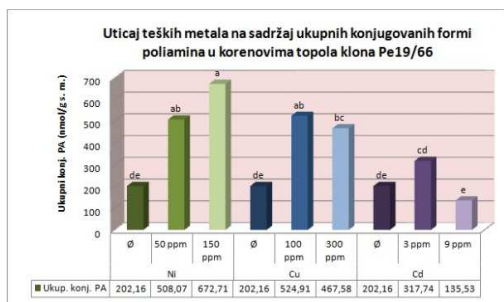
d)



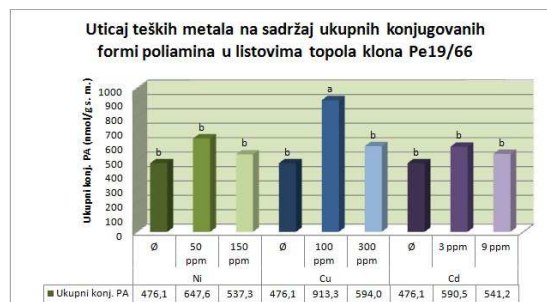
e)



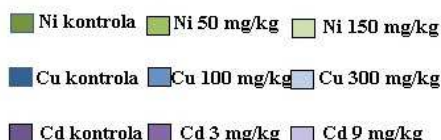
f)



g)



h)



Slika 91. Utjecaj jona teških metala na sadržaj konjugovanih poliamina (Put, Spd i Spm)

Sadržaj konjugovanog spermidina u korenovima *P. deltoides* se povećao tri puta pri tretmanu sa 150 mg/kg Ni²⁺, dok se pod uticajem bakra koncentracije 300 mg/kg sadržaj konjugovanog spermidina povećao dva puta u odnosu na netretirane kontrole. Pod uticajem kadmijuma koncentracije 3 mg/kg, sadržaj konjugovanog spermidina je porastao za 68% u poređenju sa kontrolom, dok je koncentracija kadmijuma od 9 mg/kg izazvala smanjenje sadržaja konjugovanog spermidina za 79% u odnosu na korenove kontrolnih biljaka (slika 91c). Pri tretmanima sa nižim koncentracijama svih ispitanih teških metala nije došlo do statistički značajnih promena sadržaja konjugovanog spermidina u listovima, dok je pri tretmanima višim koncentracijama bakra i kadmijuma, došlo do blagog porasta u sadržaju konjugovanog spermidina u listovima u odnosu na netretirane biljke (slika 91d).

Sadržaj konjugovanih formi spermina u korenovima *P. deltoides* se smanjio pod uticajem tretmana svih teških metala u koncentracijama koje odgovaraju 3* MDK. Pod uticajem teških metala u nižim koncentracijama (MDK), nije došlo do statistički značajnih razlika u sadržaju konjugovanog spermina kod tretiranih i kontrolnih biljaka (slika 91e). U listovima, pod uticajem tretmana od 50 mg/kg nikla i 100 mg/kg bakra, došlo je do redukcije sadržaja konjugovanih formi spermina i to za 77 i 80%. Tretmani kadmijumom nisu doveli do statistički značajnih razlika u sadržaju konjugovanog spermina kod tretiranih u odnosu na kontrolne biljke (slika 91f).

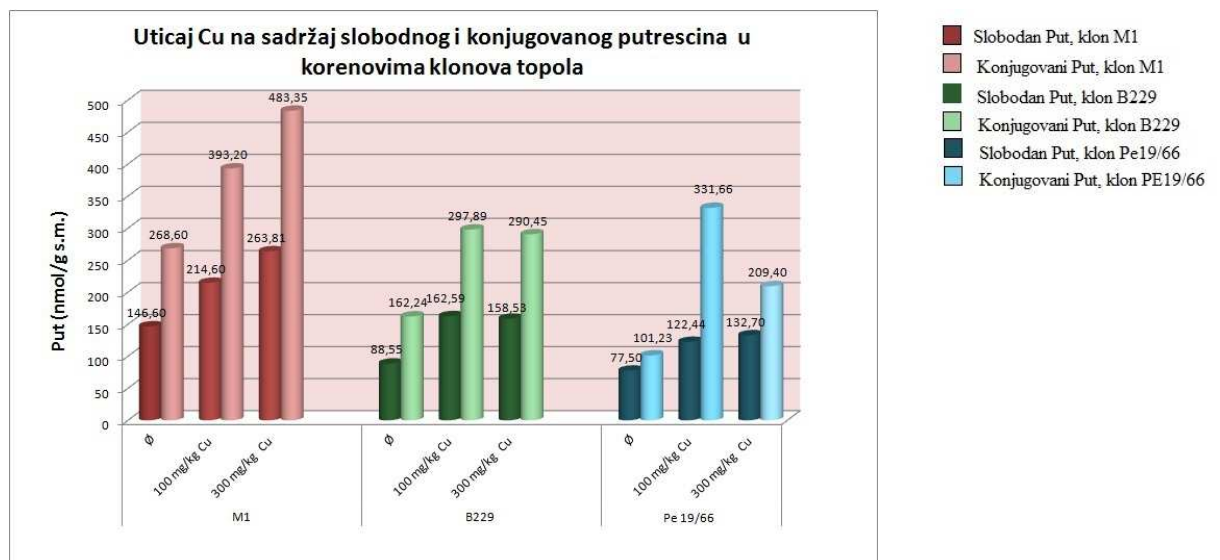
Joni Ni²⁺ su u korenovima *P. deltoides* indukovali najveću akumulaciju konjugovanih formi poliamina, gde se primećuje dozna zavisnost od koncentracije nikla, te pri tretmanu višim koncentracijama nikla (150 mg/kg) dolazi do akumulacije trostruko veće koncentracije ukupnih konjugovanih poliamina, nego u netretiranim biljkama. Povećanje ukupnih konjugovanih poliamina u korenovima dokazano je i nakon izlaganja *P. deltoides* delovanju jona bakra, s tim da različite primenjene koncentracije metala nisu dovele do statistički značajnih promena u koncentraciji konjugovanih poliamina. Joni kadmijuma koncentracije 3 mg/kg doveli su do povećanja sadržaja konjugovanih poliamina u korenovima *P. deltoides*, dok je tretman sa koncentracijom bakra od 300 mg/kg izazvao smanjenje sadržaja konjugovanih formi poliamina za 49% u odnosu na korenove

netretiranih biljaka (slika 91 g). U listovima *P. deltoides*, nije došlo do statistički značajnih promena u sadržaju ukupnih konjugovanih poliamina pri tretmanima niklom i kadmijumom u obe koncentracije. Koncentracija bakra od 100 mg/kg dovela je do povećanja sadržaja konjugovanih poliamina i akumulacije od čak 913,9 nmol/ g s.m. u listovima, što je dvostruko više u odnosu na sadržaj u listovima netretiranih topola *P. deltoides* (slika 91 h).

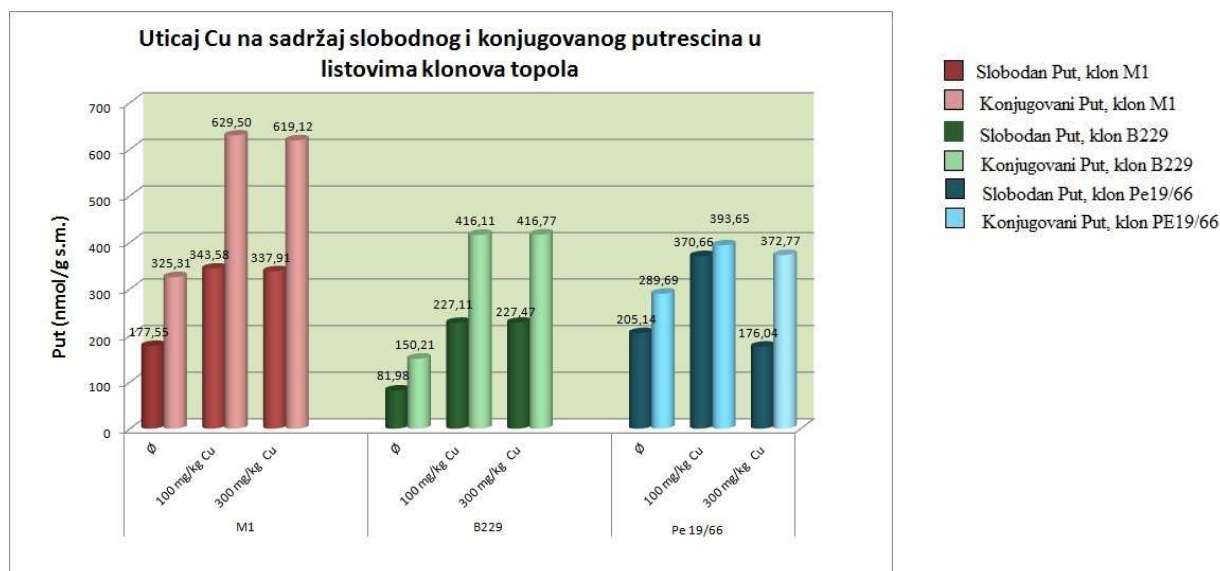
5.17.1. Uticaj jona Cu^{2+} na sadržaj konjugovanih poliamina (Put, Spm, Spd) u listovima i korenovima klonova topola

U radu je praćena klonalna varijabilnost topola u sadržaju konjugovanih oblika poliamina pod uticajem dve koncentracije bakra, 100 i 300 mg/kg. Zahvaljujući antioksidantnom delovanju i sposobnosti da heliraju jone gvožđa i onemogućavaju Fentonovu reakciju, poliamini predstavljaju molekule koji imaju veliki uticaj na toleranciju biljaka prema abiotičkom stresu. Razlike u sadržaju ovih jedinjenja predstavljaju značajan kriterijum za odabir klonova koji su otporniji na sadržaj teških metala u zemljištu. Ovakvi rezultati su značajni za planiranje i gazdovanje šumama u odabiru vrsta i klonova koji su bolje adaptirani staništima sa nepovoljnim klimatskim uslovima ili sa zagađenim zemljištima.

Klon topole M1 je najbogatiji u sadržaju slobodnog putrescina i u poređenju sa klonom B229 sadrži za 65 % više slobodnog putrescina, dok u odnosu na klon Pe19/66 sadrži dvostruko veću količinu ovog diamina (slika 92a). U listovima i korenovima sva tri ispitana klona, sadržaj konjugovanih formi putrescina je viši u odnosu na sadržaj slobodnog putrescina. Najveći odnos konjugovanog i slobodnog putrescina u korenovima zabeležen je kod klona M1. U korenovima kontrolnih biljaka ovog klona (M1), sadržaj konjugovanog putrescina je viši za 84% u odnosu na slobodni, dok je u korenovima klonova B229 i Pe19/66 sadržaj konjugovanih formi putrescina viši za 80% i 30% od sadržaja slobodnog putrescina. Pod uticajem obe koncentracije bakra u korenovima svih ispitanih klonova topola dolazi do povećanja sadržaja i slobodnog i konjugovanog putrescina. Koncentracija bakra od 300 mg/kg u korenovima klona M1 je izazvala akumulaciju konjugovanog putrescina od 483,35 nmol/g s.m., što je za 63% više nego kod klona B299 i za 130 % više nego kod klona Pe 19/66 pri istim uslovima (slika 92a).



a).



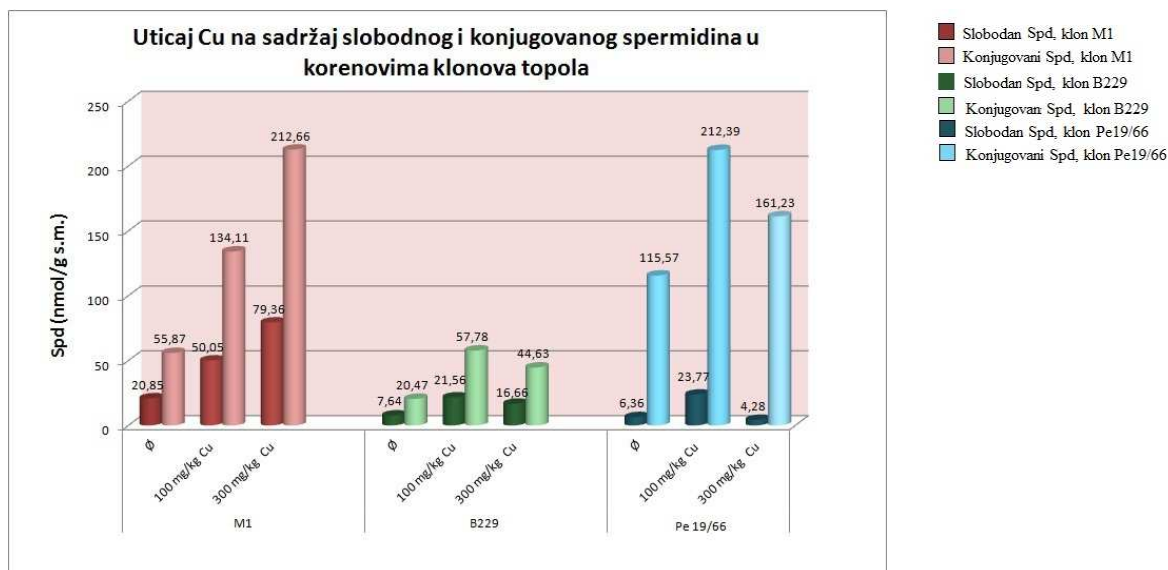
b)

Slika 92. Uticaj različitih koncentracija jona bakra na sadržaj slobodnih i konjugovanih putrescina u a) korenovima i b) listovima klonova topola

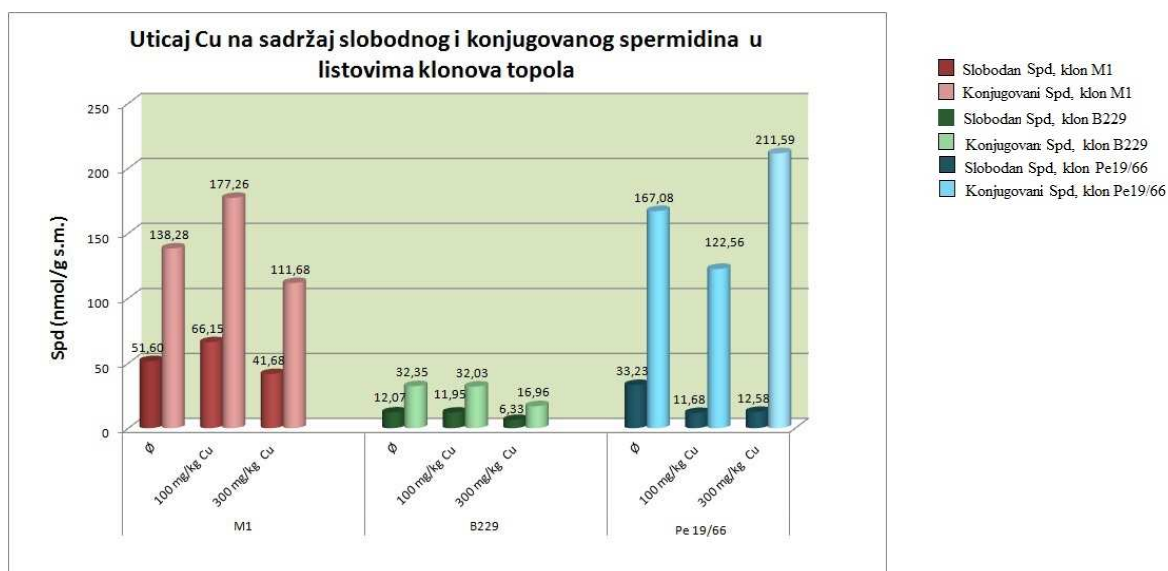
Sadržaj slobodnog i konjugovanog putrescina u listovima je viši nego u korenovima kod sva tri klona topole. Najveći sadržaj konjugovanog putrescina u listovima zabeležen je pod uticajem tretmana sa 100 mg/kg jona bakra u zemljištu kod klona M1 i iznosio je 629,3 nmol/g s.m. Pri istom tretmanu klon B229 sadržao je 416,11 nmol/g s.m, a klon Pe 16/99 svega 393,65 nmol/g s.m. konjugovanog putrescina. Pod uticajem jona Cu^{2+} u koncentraciji od 100 mg/kg došlo je do promene odnosa konjugovanog i slobodnog putrescin i promene njihove distribucije po različitim organima, pa tako taj odnos kod klona Pe 19/66 u korenovima iznosi 2,71, a u listovima 1,06, što ukazuje da pod uticajem stresa izazvanog bakrom, dolazi do oslobađanja putrescina iz vezanog u slobodni oblik u listovima (slika 92b).

Značajne klonalne razlike u sadržaju spermidina su dokazane i kod korenova i listova topola kontrolnih i biljaka tretiranih bakrom. U poređenju sa ostalim klonovima, korenovi i listovi klona B229 se se pokazali kao najsiromašniji u sadržaju konjugovanog i slobodnog spermidina. Pri koncentraciji od 100 mg/kg bakra u zemljištu sva tri klona su pokazala povećanje u sadržaju slobodnog i konjugovanog spermidina u korenovima u odnosu na kontrolne biljke odgovarajućih klonova. Pod uticajem 100 mg/kg bakra sadržaj slobodnog spermidina se kod sva tri klona povećao tri puta. Sa povećanjem koncentracije bakra u zemljištu u korenovima klona M1 došlo je do povećanja sadržaja slobodnog i konjugovanog spermidina. Tako, sadržaj konjugovanog spermidina u korenovima klona M1 u netretiranim biljkama je iznosio 55,87 nmol/g s.m. i pod uticajem 100 mg/kg jona bakra se povećao na 134,11 nmol/g s.m., dok je tretman sa 300 mg/kg bakra izazvao akumulaciju konjugovanog spermidina od 212,56 nmol/g s.m., što je četiri puta više u odnosu na korenove netretiranih biljaka klona M1. U korenovima klona Pe 19/66 takođe je došlo je do povećanja sadržaja slobodnog spermidina, te je pri tretmanu bakrom niže koncentracije, sadržaj slobodnog spermidina porastao za 139%, a pri tretmanu višom koncentracijom bakra porastao za 279% u poređenju sa netretiranim biljkama. Klona Pe 19/66 je specifičan zbog odnosa konjugovanog i slobodnog spermidina, koji iznosi čak 18,06, te se skoro ceo spermidin nalazi u konjugovanom obliku. Ovaj odnos kod druga dva klona, M1 i B229, iznosi oko 2,7. Pod uticajem niže koncentracije bakra (100 mg/kg) kod korenova klonova B229 i Pe19/66 došlo je do povećanja slobodnog i konjugovanog spermidina, dok je pri višim koncentracijama došlo do opadanja i vraćanja vrednosti slobodnog i konjugovanog spermidina na one vrednosti koje odgovaraju onim u kontrolnim biljkama (slika 93 a).

Postoje razlike u sadržaju slobodnog spermidina u listovima klonova topola i kod netretiranih biljaka. Tako klona M1 sadrži četiri puta više slobodnog spermidina u odnosu na klona B229 i za 55 % više spermidina od klona Pe 19/66. Klona Pe 19/66 sadrži najveće koncentracije konjugovanog spermidina u listovima, što je oko pet puta više od sadržaja u listovima klona B229 i trostruko više u odnosu na listove klona M1. Pod uticajem jona bakra, došlo je do različitih bioloških odgovora kod ispitanih klonova topola u akumulaciji spermidina u listovima. Tretman od 100 mg/kg jona bakra doveo je do povećanja sadržaja slobodnog i konjugovanog spermidina u listovima klona M1, dok je sadržaj slobodnog i konjugovanog spermidina kod klona Pe 19/66 pod istim tretmanom smanjen u poređenju sa sadržajem u listovima netretiranih biljaka. Pod uticajem istog tretmana klona B229 nije pokazao statistički značajne razlike u sadržaju slobodnog i konjugovanog spermidina. Pri višim koncentracijama bakra (300 mg/kg) sadržaj obe forme spermidina se kod klona B229 dvostruko smanjio u odnosu na kontrolne biljke datog klona. Sadržaj slobodnog spermidina pod uticajem tretmana od 300 mg/kg bakra se smanjio i kod preostala dva klona, dok se sadržaj konjugovanog spermidina u listovima klona Pe19/66 pod tim tretmanom povećao u odnosu na sadržaj u listovima netretiranih biljaka (slika 93b).



a)

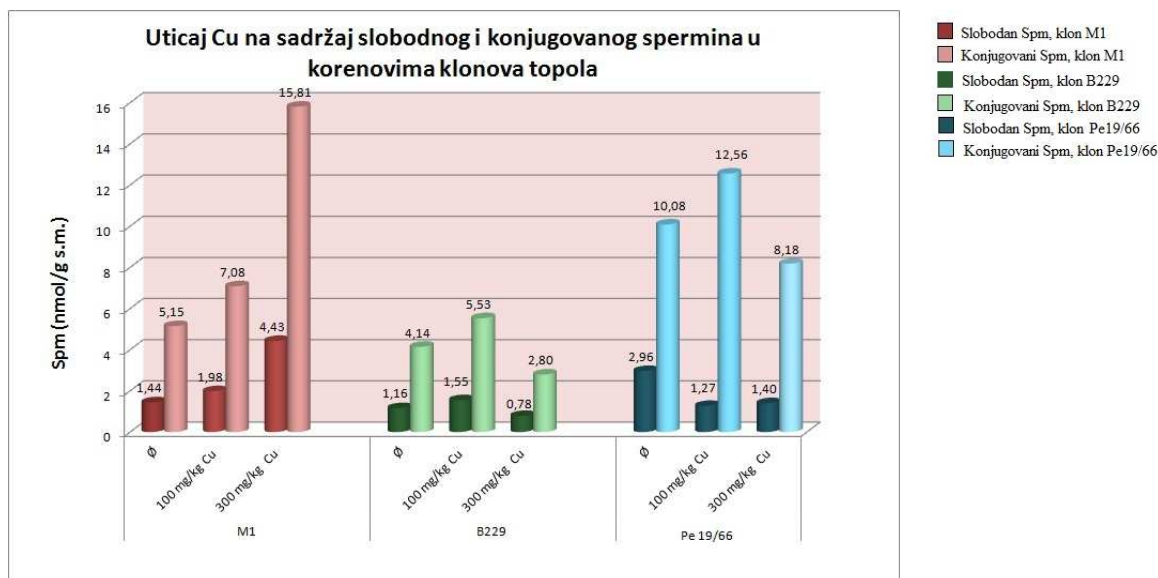


b)

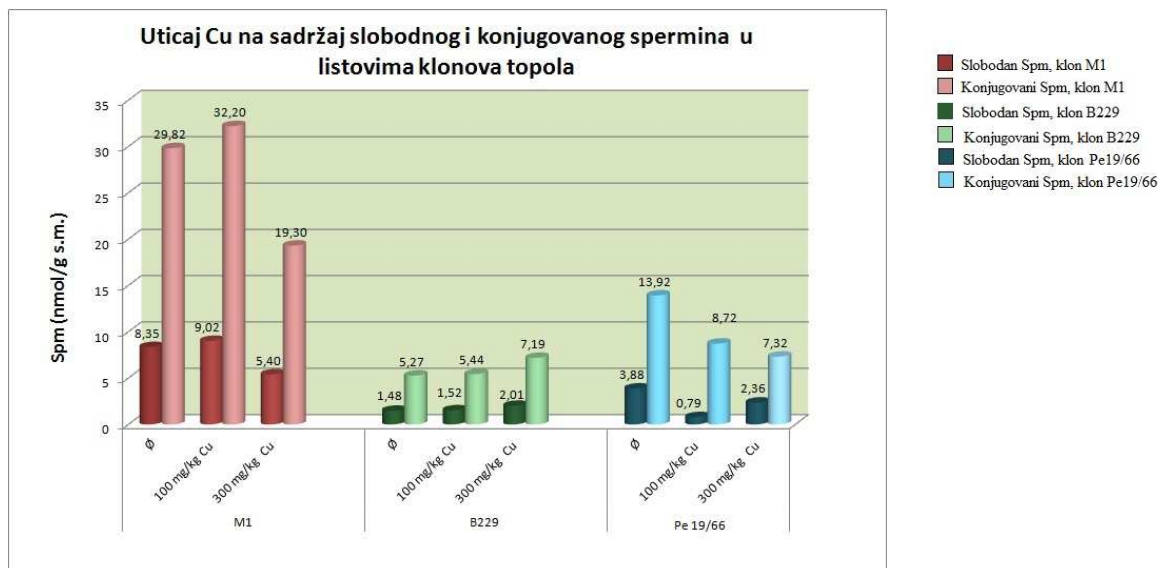
Slika 93. Uticaj različitih koncentracija jona bakra na sadržaj slobodnih i konjugovanih oblika spermidina u a) korenovima i b) listovima klonova topola

Postoje klonalne razlike kod topola u sadržaju slobodnog i konjugovanog spermina. Tako klon Pe 19/66 sadrži najviše koncentracije slobodnog i konjugovanog spermina u listovima, dok je klon M1 najbogatiji po sadržaju oba oblika spermina u korenovima. Sadržaj konjugovanog i slobodnog spermina u korenovima klona M1 pod uticajem tretmana jona bakra koncentracije 300 mg/kg se povećao tri puta u odnosu na njihov sadržaj u kontrolama tog klona. Međutim, u korenovima klonova B229 i Pe 19/66, sadržaj konjugovanog spermina pri nižoj koncentraciji bakra je porastao, dok se pri višoj koncentraciji smanjio u odnosu na netretirane biljke. U korenovima klona Pe19/66 pod uticajem 100 mg/kg bakra, došlo je do istovremenog porasta sadržaja konjugovanog i smanjenja sadržaja slobodnog spermina, čime se povećao odnos konjugovanog i slobodnog spermina u korenovima ovog klona. Nisu dokazane statistički značajne razlike u odnosu konjugovanog i

slobodnog spermina među klonovima, te je taj odnos kod netretiranih biljaka iznosio oko 4, da bi pod uticajem jona bakra koncentracije 100 mg/kg ovaj odnos kod klona Pe 19/66 porastao na vrednost od oko 10. Ovo ukazuje da pod uticajem jona bakra, spermin se nalazi dominantno u vezanom, a manje u slobodnom obliku. Sadržaj slobodnog spermina je pod uticajem 300 mg/kg bakra porastao u korenovima klona M1 i listovima klona B229, dok je svim ostalim slučajevima zabeležena redukcija u koncentraciji slobodnog spermina i u korenovima i listovima ispitanih klonova u odnosu na kontrolne biljke odgovarajućih klonova (slika 94ab).



a)

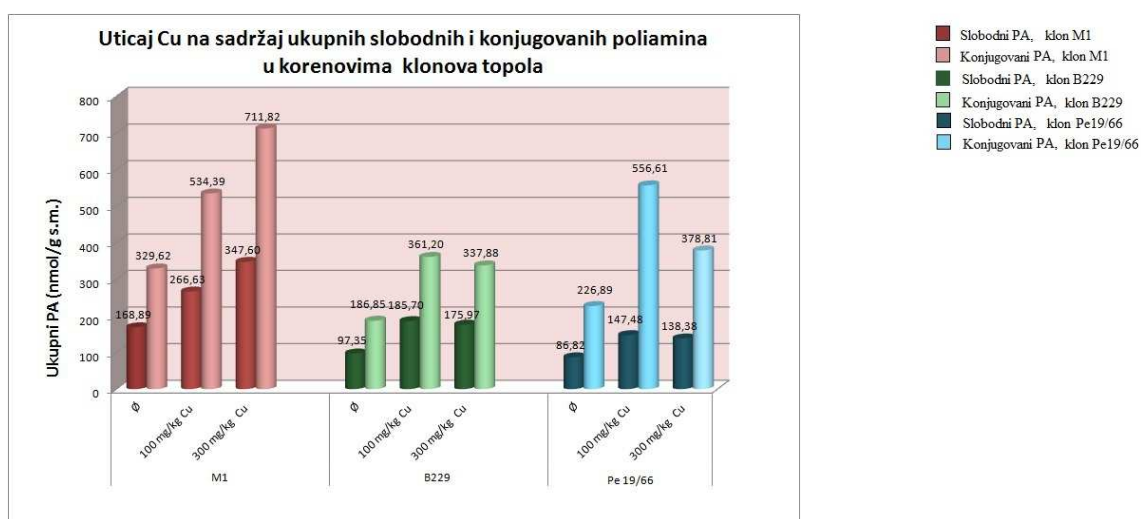


b)

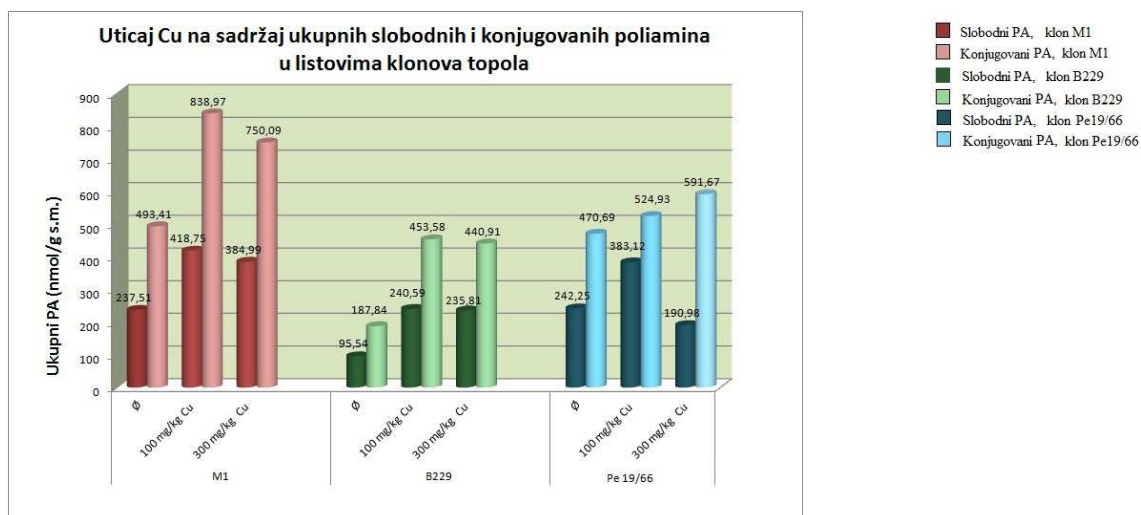
Slika 94. Uticaj jona Cu^{2+} na sadržaj slobodnog i konjugovanog spermina u a) korenovima i b) listovima klonova topola

Zaključno, klon M1 se pokazao kao klon topola najbogatiji u sadržaju slobodnih i konjugovanih poliamina. Dokazana je zavisnost sadržaja konjugovanih poliamina od koncentracije

bakra, te pod uticajem jona bakra od 300 mg/kg u korenovima i listovima klona M1 sadržaj slobodnih i konjugovanih poliamina se povećao dva puta u poređenju sa vrednostima u netretiranim biljkama (slika 95). Uprkos tome, pod uticajem tretmana koncentracije od 300 mg/kg bakra došlo je do smanjenja sadržaja ukupnih konjugovanih formi poliamina u korenovima klona Pe 19/66, dok je u listovima istog klona došlo do smanjenja sadržaja slobodnih poliamina. Odnos konjugovanih i slobodnih poliamina kod netretiranih klonova je približno isti kod različitih klonova i iznosi oko 2, dok se pod uticajem tretmana bakrom od 300 mg/kg kod klona Pe 19/66 taj odnos povećao u korenovima na 2,4, a u listovima na 3. Ovo opet potvrđuje da su pod uticajem bakra, konjugovani oblici poliamina favorizovani u odnosu na slobodne oblike.



a)



b)

Slika 95. Uticaj različitih koncentracija jona bakra na sadržaj slobodnih i konjugovanih oblika poliamina u a) korenovima i b) listovima klonova topola

Prisustvo poliamina je potvrđeno i u ćelijkom jedru, pa se pretpostavlja da je njihova funkcija vezana za procese koji se tamo odvijaju (Galston et al., 1997). Poliamini (PAs) su uključeni u procese replikacije, transkripcije i translacije, stabilizacije membrane, modulacije enzimske aktivnosti, a mogu

da regulišu i genomsku aktivnost, deobu ćelije, biljni rast i razvoj, embriogenezu, formaciju korena i zrenje plodova (Bouchereau et al., 1999). Najvažnija uloga poliamina je u ublažavanju abiotičkog i biotičkog stresa kod biljaka (Kaur-Sawhney et al., 2003). Koncentracije PAs u biljkama (10^{-9} - 10^{-5} M) su mnogo više od koncentracija endogenih fitohormona (10^{-13} - 10^{-7} M) (Kuznetsov et al., 2006). Koncentracije utvrđene u ovom radu odgovaraju ovom literaturnom podatku. Ukupna koncentracija PAs i odnos između pojedinih PAs varira značajno u zavisnosti od biljne vrste, organa, tkiva i faze razvoja, što je u skladu sa dobijenim rezultatima i u ovom istraživanju. Akumulacija PAs izazvana stresom i njihova protektivna uloga su od specijalne važnosti za opstanak biljke u uslovima stresa (Kuznetsov et al., 2006), što je potvrđeno i u ovom radu gde je dokazana povećana akumulacija PAs usled delovanja različitih koncentracija teških metala kod dve vrste topola.

Velika pažnja je posvećena izučavanju interakcije (direktne ili/i indirektne) između PAs i fitohormona. Kod nekih biljaka je nađeno da auksini, citokini i giberelini stimulišu biosintezu i porast sadržaja PAs, dok su egzogeno primenjeni poliamini uticali na koncentraciju endogenih fitohormona. Jedan od prvih rezultata o uticaju auksina na sadržaj Spd i Spm u biljkama je dobijen u krtolama *Heliandrus tuberosus* (Galston et al., 1997). Dokazano je da IAA kod *Arabidopsis* vrši indukciju gena *ACL5* koji kodira i spermin- sintazu, dok ABA i giberelinska kiselina ne mogu da indukuju ovaj gen (Hanzawa et al., 2000). Prema biološkoj funkciji PAs mogu biti podeljeni na dve grupe. Prvoj grupi poliamina pripadaju Put i Cad, koji po funkciji utiču slično kao auksini i giberelini i stimulišu rast ćelija i formaciju korenova (Galston et al., 1997, Walden et al., 1997). Drugoj grupi pripadaju Spm i Spd, koji su prema funkciji više nalik citokinima jer vrše regulaciju ćelijske deobe, organogeneze i senescencije (Galston et al., 1997).

Veliki broj radova beleži akumulaciju poliamina usled faktora stresa u raznim biljnim vrstama (Bouchereau et al., 1999). Pod uticajem abiotičkog stresa, primećena je dvostruka uloga PAs. Odbrambena funkcija PAs se manifestuje u njihovoj sposobnosti da neutrališu oksiradikale i vrše aktivaciju ekspresije gena antioksidantnih enzima. Sa druge strane, PAs pokazuju prooksidativne efekte, koji su rezultat intenzivne oksidativne degradacije PAs i prekomerne proizvodnje vodonik-peroksida. Nepoznato je da li vodonik-peroksid koji nastaje u katabolizmu PAs, doprinosi štetnim efektima oksidativnog stresa u biljnoj ćeliji, ili je vodonik-peroksid uključen u procese adaptacije obavljajući njegove signalne i zaštitne uloge u biljci. PAs su do sada manje posmatrani kao izvori vodonik-peroksida, a više kao kao efikasni antioksidanti, posebno Spm i Spd koji se smatraju efikasnim u neutralizaciji oksiradikala (Bors et al., 1989). PAs neutrališu oksiradikale zahvaljujući jednostavnoj kiseonik zavisnoj autoksidaciji ili enzimskoj oksidaciji amino grupa katalizovanih od strane DAO i PAO. Ustanovljena je značajna veza između povećanih endogenih koncentracija PAs i sistemske biljne tolerancije na abiotički stres kakav je onaj uzrokovan parakvatom (metilviolagenom) (Ye et al., 1997).

Povećana aktivnost enzima biosinteze PAs, posebno Put, je primećena kod biljaka koje pokazuju konstitutivnu toleranciju na stres u odbrani od oksidativnog stresa. Uloga PAs u rezistenciji

na stres kod prirodno tolerantnih ekoloških grupa biljaka, kao što su halofite, kserofite i biljke hiperakumulatori teških metala, još uvek je nepotpuno razjašnjena.

5.18. Uticaj teških metala na brojnost mikroorganizama u zemljištu

Mikrobiološki je ispitan uticaj različitih koncentracija jona Ni^{2+} , Cu^{2+} i Cd^{2+} na promene brojnosti oligotrofnih bakterija, filamentoznih gljiva i algi u zemljištu na kom su bile zasadene topole tri različita klona (M1, Pe 19/66 i B229). Na osnovu utvrđenih pH vrednosti zemljišta ustanovljeno je da blago alkalna pH vrednost zemljišta nije imala značajan uticaj na ukupnu brojnost mikroorganizama. Prema dobijenim rezultatima, utvrđeno je da promena broja bakterija zavisi od koncentracije i vrste metala. Najveća brojnost bakterija nađena je u kontrolnim uzorcima, pri odsustvu jona metala. Različiti metali pokazali su različite uticaje na brojnost bakterija. Broj bakterija u zasadima sva tri klona je pri višoj koncentraciji jona Ni^{2+} (150 mg/kg) pokazao značajno smanjenje u odnosu na kontrolne uzorke. Ovo smanjenje broja bakterija je najdrastičnije u zemljištu na kome je rastao klon Pe19/66. Tretman nižom koncentracijom bakra (50 mg/kg) delovao je stimulatивно na brojnost bakterija kod klona B229 ($20,97 \times 10^5$), što doprinosi povećanju otpornosti ovog klona prema povećanoj koncentraciji jona Ni^{2+} .

Testirana hipoteza da sa povećanjem koncentracije jona Ni^{2+} dolazi do redukcije brojnosti bakterija potvrđena je samo kod klona topole PE19/66. U zasadima klona M1, pri obe koncentracije, joni Ni^{2+} ispoljili su inhibitorski efekat prema brojnosti bakterija u odnosu na netretirano zemljište. Veći broj bakterija nađen je u zemljištu sa višom koncentracijom nikla u donosu na zemljište sa nižom koncentracijom nikla (tabela 10). Inhibitorski efekat jona Ni^{2+} je naročito izražen pri koncentracijama većim od 500 mg Ni/kg zemljišta (Anyanwu et al., 2011). Utvrđeno je da je nepromenjen broj bakterija pri većim koncentracijama jona Ni^{2+} rezultat pojave Ni-rezistentnih sojeva. Brojnost ovih rezistentnih sojeva bakterija je viša ukoliko su u zemljištu prisutne biljke koje svojim ekskudatima povećavaju sadržaj organskih materija u zemljištu što dodatno stimuliše razmnožavanje bakterija. Porast pH vrednost utiče na povećanje rezistentnosti bakterija i na sposobnost uklanjanja jona Ni^{2+} iz zemljišta, pa je tako usvajanje jona Ni^{2+} iz zemljišta od strane *Micrococcus sp.* pri pH=5 iznosilo 55%, dok je pri višoj pH vrednosti taj procenat bio znatno veći (Congeevarum et al., 2006). Congeevarum i saradnici (2006) još navode da je smanjena sposobnost uklanjanja Ni^{2+} , pri nižim pH vrednostima (pH<5) rezultat kompeticije hidronijum jona i metalnih jona za vezujuća mesta na površini bakterijske ćelije tokom ekspanzijske faze rasta. Pojava rezistentnih sojeva može biti posledica produkcije pioverdina, jednog od siderofora, kao što je slučaj kod *Pseudomonas aeruginosa* (Elsas et al., 1997).

Pod uticajem jona bakra došlo je do smanjenja ukupnog broja bakterija sa porastom koncentracije bakra kod klonova topola M1 i Pe 19/66. Uprkos opštem trendu opadanja broja bakterija sa povećanjem koncentracije Cu^{2+} , u uzorcima tretiranim sa 100 mg/kg Cu zabeležen je porast brojnosti bakterija naročito kod klona B229, što ukazuje na postojanje rezistentnih sojeva (tabela 10).

Tabela 10. Brojnost mikroorganizama usled izloženosti različitim koncentracijama teških metala

Metal	Konc. (mg/kg)	Klon	Broj bakterija x 10 ⁵	Broj plesni	Broj algi/ml
Ni	0	M1	10,97	5015,52	75
	50		3,84	13,24	20
	150		5,94	15,57	/
	0	PE19/66	30,52	21993,57	9
	50		13,06	1747,34	25
	150		2,04	3472,98	/
	0	B229	10,65	5137,66	105
	50		20,97	35167,41	95
	150		4,68	7422,14	/
Cu	0	M1	10,34	1414,83	110000
	100		33,33	2841,56	/
	300		4,46	16,97	140000
	0	PE19/66	53,97	1,35	45
	100		9,66	4528,34	/
	300		8,34	360,76	4
	0	B229	12,4	52,26	350
	100		36,11	3177,45	/
	300		28,55	2319,9	110
Cd	0	M1	7,08	4342,44	1500
	3		19,7	19327,16	/
	9		8,77	1129,32	30000
	0	PE19/66	39,46	6827,15	400
	3		40,31	5452,2	/
	9		8,74	7012,18	20000
	0	B229	27,34	4079,5	500
	3		20,94	14247,27	/
	9		15,28	3342,23	15000

Pojava većeg broja bakterija pod uticajem povećanih koncentracija Cu²⁺ može biti rezultat prethodne izloženosti mikroorganizama delovanju jona Cu²⁺ (Elsas et al., 1997). Prema Cevik i saradnicima (2009), broj bakterija je značajno manji pri koncentraciji jona Cu²⁺ od 150 mg/kg, dok je kombinovani efekat jona Cu²⁺ i fluorantena (FLA) imao daleko jači efekat u smanjenju broja bakterija pri istim koncentracijama Cu²⁺. Rezistentnost bakterija prema jonima Cu²⁺ se javlja zahvaljujući kompartmentizaciji u periplazmi i spoljašnjoj ćelijskoj membrani usled delovanja četiri proteina kodiranih od strane plazmida kod *P. syringae* ili zahvaljujući efluksu jona Cu²⁺ iz ćelije u spoljašnju sredinu, kao kod *Escherchia coli*. Povećana ekspresija gena plazmida i rezistenstnost bakterija na toksične efekte jona metala je primećena kod bakterija koje su rasle na industrijski zagađenim staništima.

Pojava sojeva otpornih na visoke koncentracije jona Cu^{2+} može dovesti do razvoja rezistentnosti i prema antibioticima, što je naročito izraženo kod Gr- bakterija (Berg, 2004). Toksični efekti teških metala u visokim koncentracijama, ublaženi su formiranjem manje toksičnih metaloorganskih kompleksa, te njihovom akumulacijom i kompartmentizacijom. Ustanovljeno je da su Gram pozitivne (Gr+) bakterije znatno osetljivije na visoke koncentracije jona Cu^{2+} , što se objašnjava razlikom u građi ćelijskog zida između Gr+ i Gr- bakterija (Rathnayake, 2010). Brojni naučni radovi, navode inhibitorski uticaj jona Cu^{2+} na brojnost bakterija, što je potvrđeno i u ovom istraživanju na zasadima klonova Pe19/66 i M1. U zemljištu gde je bio zasađen klon B229, došlo do porasta brojnosti bakterija pri koncentraciji od 300 mg/kg bakra, što se može objasniti ne samo postojanjem rezistentnih sojeva bakterija, nego i složenom uzajamnom interakcijom klonova topole i mikroorganizama u zemljištu. Inhibitorski efekat jona Cu^{2+} koncentracije 300 mg/kg na diverzitet mikroorganizama se povećava sa periodom inkubacije dužim od 45 dana (Banu, 2006).

Ispitivanjem uticaja jona Cd^{2+} na brojnost bakterija ustanovljeno je da pri koncentraciji jona Cd^{2+} koja odgovara trostruko većoj koncentraciji od MDK (9 mg/kg), došlo do smanjenja broja bakterija kod klonova Pe19/66 i B229, dok kod klona M1 nije došlo do značajne promene u broju bakterija u zemljištu. Broj bakterija u zemljištu na kojem je bio zasađen klon topole M1 je pokazao porast pri koncentraciji Cd^{2+} od 3 mg/kg, dok ista koncentracija nije dovela do promena brojnosti bakterija u zemljištu na kome su bili zasađeni klonovi topola Pe 19/66, dok se broj bakterija u zemljištu klona B229 redukovao. Prema Cevik i saradnicima (2009) broj bakterija pri koncentraciji jona Cd^{2+} od 75 mg/kg je bio veći u odnosu na koncentraciju Cd^{2+} od 50 mg/kg, dok je kombinovani tretman Cd^{2+} sa FLA izazvao linearni pad broja bakterija. Utvrđeno je da se inhibitorski efekat jona Cd^{2+} na rast bakterija povećava sa dužinom perioda inkubacije što je utvrđeno za bakterije neustona (Kim, 1985). Stimulatorsko dejstvo nižih koncentracija jona Cd^{2+} u zemljištu na biomasu bakterija primećeno je u zasadima zobi, dok su više koncentracije jona Cd^{2+} ispoljile inhibitorski efekat na biomasu bakterija, pogotovo u kombinaciji sa jonima Zn^{2+} , Cu^{2+} i Pb^{2+} (Walker, 2008). Toksični efekti teških metala u šumskom zemljištu rastu po ovom redosledu $\text{Cd}^{2+}=\text{Ni}^{2+}<\text{Zn}^{2+}=\text{Cu}^{2+}<\text{Pb}^{2+}$, dok se toksični efekti jona Cd^{2+} najjače ispoljavaju na poljoprivrednim zemljištima (Elsas, 1997). Usled redukcije brojnosti bakterija izazvane jonima Cd^{2+} u zemljištu, posledično dolazi do opadanja količine produkovanog CO_2 od strane bakterija, na zemljištu koje je bogato sadržajem P i N (Abdousalam, 2010). U našem ogledu, dodatak nitratskih soli teških metala u zemljišni medijum, može biti razlog porasta broja bakterija usled povećanja raspoloživog azota u zemljištu.

Poznato je da se efekti teških metala na mikroorganizme zemljišta ispoljavaju promenom diverziteta mikroflore zemljišta usled toksičnog delovanja metala na osetljive vrste mikroorganizama (Anyanwu et al., 2011). Produkcija siderofora od strane bakterija povećava vezivanje esencijalnih metala, čime se onemogućava opstanak potencijalnih biljnih patogenata (Saharan et al., 2011). U takvom odnosu biljka-mikroorganizam, bakterije pružaju biljci pored nutrijenata i vid zaštite od patogenih organizama, što stimuliše rast vrsta koje su otporne na visoke koncentracije teških metala.

5.19. Uticaj jona Ni^{2+} , Cu^{2+} i Cd^{2+} na brojnost filametoznih gljive

Gljive su više tolerantne prema stresnim uslovima izazvanim visokim koncentracijama metala u odnosu na druge grupe mikroorganizama, te se produkcija njihove biomase može koristiti kao bioindikator zagađenja teškim metalima (Elsas et al., 1997). Na osnovu dobijenih vrednosti broja plesni za različite koncentracije Ni^{2+} , utvrđeno je smanjenje broja filametoznih gljiva sa povećanjem koncentracije jona Ni^{2+} , iako su klonovi topola M1 i B229 pokazali neznatno povećanje broja plesni pri koncentraciji jona Ni^{2+} od 150 mg/kg (tabela 10.). Prema Sarkar i saradnicima (2010), sa povećanjem koncentracije jona Ni^{2+} dolazi do opadanja broja plesni, dok je totalna inhibicija rasta plesni ustanovljena pri koncentraciji jona Ni^{2+} od 200 mg/kg. Lankinen i saradnici (2011) navode povećanu osetljivost filametoznih gljiva koje vrše razgradnju šumskog pokrivača na niže koncentracije jona Ni^{2+} (do 100 mg/kg), što se značajno odražava na njihove fiziološke i metaboličke procese i uzrokuje smanjenje biomase. Kod zasada klona topole B229, broj plesni sa povećanjem koncentracije jona Ni^{2+} je pokazao tendenciju rasta. Povećanje otpornosti prema jonima Ni^{2+} koje se odlikuje porastom broja plesni je rezultat vezivanja Ni^{2+} za histidin u vakuolama, što je potvrđeno kod *Sacharomices cerevisiae* (Lankinen et al., 2011). Povećanje broja plesni pri većim koncentracijama Ni^{2+} se može objasniti aktiviranjem odbrambenih mehanizama i uklanjanjem Ni^{2+} iz podloge bioakumulacijom. Povećanje otpornosti gljiva prema jonima Ni^{2+} i sposobnost njegovog uklanjanja u procesu bioremedijacije se povećava ukoliko se podloga obogati dodatkom glukoze i saharoze (Lacina. 2003). Otpornost plesni prema Ni^{2+} i sposobnost uklanjanja jona Ni^{2+} od strane plesni zavisi i od pH sredine, te se pri $\text{pH}>5$ povećava vezivanje jona Ni^{2+} za negativno naelektrisane delove ćelijskog zida (Congeevarum et al., 2006). Ova pojava bi mogla objasniti povećanje broja plesni pri većim koncentracijama Ni^{2+} za klon topole B229 pri $\text{pH}=8,24$, koji je ustanovljen u zemljištu ovog ogleda.

Najveća brojnost plesni ustanovljena je pri koncentraciji Cu^{2+} od 100 mg/kg. Najmanja brojnost filamentoznih gljiva za sva tri klona topole je utvrđena pri koncentraciji Cu^{2+} od 300 mg/kg, što ukazuje na toksičnost jona Cu^{2+} i nisku otpornost plesni prema jonima ovog metala. Na različitim tipovima zemljišta sa različitim koncentracijama metala, najveći broj plesni je potvrđen na obradivim površinama, dok je njihova brojnost bila znatno manja u zemljištu koje sadrži povećane koncentracije jona Cu^{2+} koji deluje kao inhibitor rasta plesni (Elsas et al., 1997). Toksičan efekat jona Cu^{2+} zavisi i od pH vrednosti podloge na kojoj plesan raste. Rast *Endothia parasitica* je bio stimulisan prisustvom CuSO_4 pri $\text{pH}=4-8$, dok je rast iste vrste bio znatno slabiji u odsustvu jona Cu^{2+} pri istoj pH vrednosti podloge. Rast micelije *E. parasitica* u tečnoj podlozi je bio značajno bolji pri nižim nego pri višim koncentracijama jona Cu^{2+} , koje su delovale izuzetno stimulatивно na rast micelije u čvrstoj podlozi. Ispitivanjem tolerancije *Aspergillus lentilus* na toksične efekte Cu^{2+} , utvrđeno je da ova vrsta može da podnese visoke koncentracije Cu^{2+} , čak do 550 mg/l u čvrstoj podlozi. Tokom intenzivne faze rasta kod *A. lentilus* usvajanje glukoze je bilo znatno slabije u prisustvu jona Cu^{2+} što je rezultiralo manjom biomasom, međutim nakon 120 h, produkcija biomase je bila ista kao i u odsustvu jona Cu^{2+} , što

ukazuje na mehanizme aklimacije na prisustvo jona Cu^{2+} (Jha, 2011). Visoke vrednosti broja plesni u ovom radu su najverovatnije rezultat povećanog usvajanja Cu^{2+} pri pH oko 8 kao i razvijene tolerancije prema ovom metalu.

Smanjenje broja plesni sa povećanjem koncentracije jona Cd^{2+} zabeleženo je samo za zemljište na kome su rasli klonovi topole M1 i B229, dok je broj plesni na zemljištu na kom je rastao klon topole Pe 19/66 porastao sa povećanjem koncentracije jona Cd^{2+} . Relativno visok broj plesni je ustanovljen na zemljištu tretiranom sa 3 mg/kg Cd na kom su rasli klonovi M1 i B229, dok je najveća brojnost plesni ustanovljena pri koncentraciji jona Cd^{2+} od 9 mg/kg na zemljištu na kom je rastao klon Pe 19/66. Nasuprot dobijenim rezultatima, Walker (2008) je zabeležio da joni Cd^{2+} redukuje broj plesni u opsegu koncentracije Cd od 125 $\mu\text{g/g}$ do 550 $\mu\text{g/g}$ zemljiša. Zbog svoje mobilnosti u zemljištu, joni Cd^{2+} su lakše dostupni biljkama i mikrororganizmima u odnosu na druge metale. Cd^{2+} je izuzetno toksičan za gljive i njegova toksičnost raste sa povećanjem pH vrednosti sredine (Karaman et al., 2010). Osnovni uzrok toksičnosti jona Cd^{2+} leži u njegovoj sposobnosti vezivanja za tiolne grupe enzima i proteina, inhibiciji procesa disanja i transporta elektrona u procesu oksidativne fosforilacije (Govedarica et al., 1993). *A. niger* je pokazao redukciju rasta micelije pri koncentraciji Cd^{2+} od 100-250 $\mu\text{g/g}$ u alkalnoj sredini (Babich et al., 1976).

5.20. Uticaj jona Ni^{2+} , Cu^{2+} i Cd^{2+} na broj algi

Pod uticajem jona Ni^{2+} ustanovljen je pad brojnosti algi u zemljištu na kom je bio gajen klon topole M1, dok je na zemljištu klona Pe 19/66 broj algi rastao sa povećanjem koncentracije Ni^{2+} . Najveći broj algi ustanovljen je u zemljištu na kom je rastao klon topole Pe 19/66, pri koncentraciji jona Ni^{2+} od 150 mg/kg u zemljištu (tabela 10). Prema Shakaya (2007), inhibitorski efekat jona Ni^{2+} se povećava sa rastom njegove koncentracije, što odgovara smanjenju broja algi u zemljištu gde je gajen klon topole M1. Povećanje broja algi u zemljištu klona Pe 19/66, po dodatku nitratnih soli nikla, objašnjava se povećanjem raspoloživog azota u zemljištu koji je vrlo bitan faktor za rast algi.

Price i saradnici (1991), navode da uticaj jona Ni^{2+} na rast algi zavisi pre svega od prisustva dostupnog azota u podlozi. Ispitivanjem uticaja jona Ni^{2+} utvrđen je veći inhibitorski efekat jona Ni^{2+} na divlje sojeve nego na mutantni soj *Chlorella sp.* (Shakaya, 2007). Pojava rasta broja algi sa povećanjem koncentracije nikla može se objasniti kao posledica veće rezistentnosti mutantnih vrsta algi na prisustvo nikla. Nikal pri većim koncentracijama deluje inhibitorski, ne samo na rast algi nego i na intenzitet fotosinteze (Parikh et al., 2005). Nikal može imati stimulatoran efekat na rast algi kao što je *Scenedesmus abundans*, što zavisi od koncentracije, jer Ni podstiče rast algi pri nižim koncentracijama, dok pri većim koncentracijama deluje inhibitorski na rast (Manju et al., 2001).

Bakar je esencijalni mikroelement za rast algi, koji ima ulogu i kao kofaktor nekih enzima i kao nosilac elektrona u procesu disanja i fotosinteze. Praćenjem promena broja algi utvrđeno je da sa porastom koncentracije Cu^{2+} dolazi do pada broja algi što je uočeno na zemljištu klonova topola Pe 19/66 i B229, dok je broj algi na zemljištu klona M1 rastao sa povećanjem koncentracije jona Cu^{2+} . Uticaj jona Cu^{2+} na rast algi zavisi i od vrednosti pH sredine, jer sa povećanjem pH opada inhibitorski

delovanje Cu^{2+} na rast algi. Međutim, ispitivanja vršena na *Chlorella sp.* ukazuju povećanje toksičnosti jona Cu^{2+} pri $\text{pH}=6.5$ u odnosu na niži $\text{pH}=5.7$, što je posledica povećanog usvajanja jona Cu^{2+} od strane algi usled jačeg vezivanja jona Cu^{2+} za ćelijski zid pri višem pH . Niže koncentracije jona Cu^{2+} (25 mg/l) mogu delovati stimulatorno na rast algi kao i na intenzitet fotosinteze, što je utvrđeno praćenjem rasta *Padina boergeseni*, dok je koncentracija Cu^{2+} od 500 mg/l dovela do značajnog inhibitornog efekta kod iste alge. Smanjenje broja algi u ovom radu usled delovanja povišenih koncentracija jona Cu^{2+} su u skladu sa navedenim radovima u kojima se ističe inhibitorni efekat jona Cu^{2+} na rast algi. Pojava povećanja broja algi na zemljištu gde je rastao klon topole M1, može se dovesti u vezu sa povećanjem raspoloživog azota u zemljištu usled dodavanja bakra u obliku nitratnih soli.

Prema dobijenim rezultatima, ustanovljen je pozitivan uticaj jona Cd^{2+} na rast algi, pri čemu je koncentracija jona Cd^{2+} od 9 mg/kg u zemljištima svih klonova topola dovela do povećanja broja algi. Nasuprot tome, Wu i saradnici (1986) su zabeležili pad broja algi usled toksičnog efekta Cd^{2+} pri koncentracijama od 200 μM . Efekti jona Cd^{2+} na rast algi se ogledaju u izazivanju poremećaja usvajanja esencijalnih elementa poput jona Ca^{2+} i Mg^{2+} (Shariati et al., 2006). Inhibitorni uticaj jona Cd^{2+} na broj algi se može sprečiti dodavanjem jona Ca^{2+} , što dovodi do povećane brojnosti algi pri visokim koncentracijama jona Cd^{2+} . Povećanje brojnosti algi sa porastom koncentracije Cd^{2+} u ovom radu se svakako može dovesti u vezu sa smanjenjem toksičnosti jona Cd^{2+} , usled prisustva visokih koncentracija jona Ca^{2+} u zemljištu.

6. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata dobijenih ispitivanjem promena biohemijskih i fizioloških karakteristika klonova topola (M1, B229 i Pe 19/66) pod uticajem različitih koncentracija jona teških metala (Ni^{2+} , Cu^{2+} i Cd^{2+}) u zemljištu, mogu se izvesti sledeći zaključci:

- ✓ Postoje jasne razlike između klonova topole u količini usvojenih metala iz zemljišnog medijuma. Klon topole B229 se pokazao kao najefikasniji za fitoekstrakciju Ni^{2+} u nadzemne delove pri visokim koncentracijama ovog metala u zemljištu, dok je klon M1 bio efikasniji pri nižim koncentracijama nikla. Klon topole M1 pokazao se i kao najefikasniji u fitoekstrakciji jona Cu^{2+} iz zemljišta, dok je klon Pe19/66 bio najbolji u procesu fitoekstrakcije Cd^{2+} iz zemljišta, pri obe primenjene koncentracije. Za sve metale osim kadmijuma, BCF su u nadzemnim delovima niži od 1, što ukazuje da ovi klonovi topola ne mogu biti svrstani u hiperakumulatorske vrste za ove metale.
- ✓ Slaba sposobnost translokacije teških metala u nadzemne delove kod svih ispitivanih klonova topola predstavlja najveći nedostatak za njihovu primenu u svrhe fitoekstrakcije. Zbog niskih vrednosti TF ovi klonovi topola mogu naći primenu u procesima fitostabilizacije i rizofiltracije. Najveći procenat metala se akumulira u korenovima, zatim izbojcima, dok se najmanje metala akumulira u listovima ispitivanih klonova.
- ✓ Intenzitet fotosinteze, stomalna provodljivost, brzina transpiracije i efikasnost iskorišćenja vode su pod uticajem teških metala pokazali statistički značajne promene u zavisnosti od klona, primenjenog metala i njegove koncentracije. Pri povećanju koncentracije jona Ni^{2+} i Cu^{2+} uočeno je značajno sniženje ovih parametara, naročito kod klona M1, dok je klon B229 pokazao najveće oscilacije u vrednostima parametara fotosinteze pod uticajem jona Cd^{2+} .
- ✓ Promene u parametarima fotosinteze su direktna posledica smanjenog sadržaja hlorofila u listovima ispitivanih klonova topola pod uticajem teških metala. Tako, joni bakra dovode do najvećeg smanjenja sadržaja pigmenata hloroplasta. Najveće promene u sadržaju hlorofila pod uticajem jona Cu^{2+} zabeležene su kod klonova topola M1 i Pe 19/66, dok se pod uticajem jona Ni^{2+} sadržaj hlorofila značajno smanjio kod klonova M1 i B229. Klon Pe 19/66 nije pokazao značajne promene u sadržaju hlorofila pod uticajem jona Ni^{2+} , dok pod uticajem jona Cd^{2+} jedino ovaj klon pokazuje značajno smanjenje sadržaja pigmenata hloroplasta.

- ✓ Pod uticajem jona teških metala, u korenovima svih klonova primećeno je značajno smanjenje sadržaja esencijalnih jona poput Mg^{2+} i Ca^{2+} , usled sličnosti odnosa veličina/naelektrisanje jona esencijalnih i teških metala. Klon M1 je pokazao posebnu osetljivost zbog redukcije usvajanja jona Mg^{2+} u korenovima prilikom izlaganja jonima Ni^{2+} i Cd^{2+} , dok je klon B229 pokazao značajno smanjenje sadržaja Ca^{2+} u korenovima pri tretmanima zemljišta jonima Cu^{2+} i Ni^{2+} . Do većih promena u sadržaju jona esencijalnih metala Mg^{2+} i Ca^{2+} došlo je u korenovima, nego u listovima klonova topola zato što se veća koncentracija teških metala akumulirala u korenovima nego u listovima. Eksperimentalno je dokazano da dodatkom nitratnih soli teških metala u zemljište dolazi do značajnog povećanja sadržaja azota u listovima i korenovima svih ispitanih klonova topola. Povećanje sadržaja azota u biljnim organima, ublažilo je toksične efekte teških metala, zahvaljujući povećanju raspoloživog azota za sintezu azotom bogatih jedinjenja koja učestvuju u procesu rasta poput indol-3-sirćetne kiseline, ili u antioksidantnoj zaštiti i osmoregulaciji poput poliamina. Uticaj teških metala na mineralnu ishranu i proces fotosinteze kod ispitivanih klonova topola zavisi od vrste i koncentracije teškog metala, kao i organa i klona topole u kom se uticaji ispituju.
- ✓ Dokazano je da usled zagađenja zemljišta jonima nikla dolazi do povećanja ukupnog antioksidantnog kapaciteta u ekstraktima listova i korenova ispitivanih klonova topola. Klon topole Pe 19/66 pokazao je značajno povećanje antioksidantnog kapaciteta pri nižim, a klon M1 pri višim koncentracijama nikla u zemljištu. U korenovima, gde je najveća akumulacija jona bakra i kadmijuma, došlo je do smanjenja ukupnog antioksidantnog kapaciteta, dok u listovima niske koncentracije akumuliranih teških metala stimulatивно utiču na ukupni antioksidantni kapacitet. Klonovi topola M1 i Pe 19/66 su pokazali značajno veći antioksidantni kapacitet od klona B229.
- ✓ Joni nikla izazvali su smanjenje sposobnosti ekstrakata listova i korena topola da neutrališu DPPH radikal, dok su joni bakra indukovali povećanje sposobnosti ekstrakata da neutrališu ovaj sintetički radikal u odnosu na ekstrakte netretiranih topola odgovarajućih klonova. U slučaju zagađenosti zemljišta jonima kadmijuma, u ekstraktima korenova i listova klonova M1 i Pe19/66 došlo je do porasta sposobnosti neutralizacije DPPH radikala u odnosu na ekstrakte kontrola, dok su ekstrakti klona B229 pokazivali smanjenu sposobnost neutralizacije DPPH radikala. Sposobnost ekstrakata topola da neutrališu NO radikal se razlikovala u zavisnosti od koncentracije i vrste metala. Pod uticajem viših koncentracija nikla, ekstrakti korenova topola pokazali su

značajno smanjenje sposobnosti neutralizacije NO radikala, posebno kod klonova M1 i B229, dok su pri tretmanima jonima kadmijuma ekstrakti korenova i listova svih klonova pokazali povećanje sposobnosti neutralizacije NO radikala.

- ✓ Joni Ni^{2+} izazvali su povećanje redukcionne moći u ekstraktima listova, dok su joni Cd^{2+} i Cu^{2+} izazvali smanjenje redukcionne sposobnosti ekstrakata listova i korenova klonova B229 i Pe 19/66, sa izuzetkom ekstrakta klona M1, kod kojeg je pod uticajem jona bakra došlo do povećanja redukcionne moći ekstrakata.
- ✓ Tretmani jonima nikla doveli su do statistički značajnog povećanja enzimske aktivnosti peroksidaza (glutation-peroksidaze i gvajakol-peroksidaze) i glutacion-reduktaze, ali i do smanjenja aktivnosti superoksid-dizmutaze u korenovima i listovima svih klonova topola u odnosu na kontrole. Joni bakra su u ekstraktima korenova i listova klona M1 stimulisali aktivnost SOD, dok su u ekstraktima klonova B229 i Pe 19/66 doveli do njene inhibicije. Klon M1 pokazao je izrazito povećanje GPx aktivnosti u listovima pod uticajem jona bakra, dok kod preostala dva klona nije došlo do promene aktivnosti ovog enzima. Joni bakra nisu uticali na aktivnost glutacion-reduktaze u listovima i korenovima klonova M1 i B229, dok su u ekstraktima klona Pe 19/66 izazvali značajno povećanje aktivnosti ovog enzima. SOD je bila aktivirana jonima kadmijuma kod svih ispitanih klonova topole, dok je GPx bila aktivirana kod korenova svih klonova i listova klona M1, a nepromenjena kod listova klonova B229 i Pe 19/66. Aktivnost GSH-Px je bila inhibirana kod korenova i listova klonova M1 i Pe 19/66, a nepromenjena u korenovima i listovima klona B229. Značajno veće aktivnosti enzima su zabeležene u listovima u odnosu na aktivnosti enzima u korenovima klonova topola.
- ✓ Promene ispitivanih parametara (količine malonildialdehida i sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja, flavonoida i rastvorljivih proteina) u ekstraktima korena i lista klonova topola ukazuju da je pod uticajem jona bakra, nikla i kadmijuma došlo do pojave oksidativnog stresa. Usled povećanja aktivnosti GR, SOD i peroksidaza u listovima i korenovima različitih klonova topole, dolazi do smanjenja koncentracije reaktivnih kiseoničnih vrsta i ublažavanja oksidativnog stresa. Dokazane su statistički značajne razlike u biohemijskom odgovoru različitih klonova topola u zavisnosti od vrste i koncentracije teškog metala.
- ✓ Sva tri ispitana teška metala dovela su do statistički značajnog povećanja sadržaja biljnih hormona (ABA i IAA) i u korenovima i listovima topola vrste *Populus deltoides*. Joni bakra su pri koncentraciji od 300 mg/kg doveli do najvećeg povećanja sadržaja ABA

u listovima klona Pe 19/66 (170%), dok su joni kadmijuma pri koncentraciji koja odgovara trostrukoj vrednosti MDK (9 mg/kg) izazvali povećanje sadržaja ovog hormona za 52% u odnosu na netretirane kontrole. Vrednosti ABA su se udvostručile i u korenovima topola usled tretmana većom koncentracijom kadmijuma (9 mg/kg), a značajno su se povećale i pod uticajem nikla što potvrđuje da ABA pozitivno deluje na povećanje otpornosti na stres izazvan povišenim koncentracijama teških metala. Zahvaljujući izuzetno povišenim koncentracijama ABA, klon topole Pe19/66 se izdvojio kao najbolje adaptirani klon topole na povišene koncentracije bakra u zemljištu.

- ✓ Trostruko veće koncentracije od MDK za jone Ni^{2+} i Cu^{2+} dovele su do statistički značajnog povećanja sadržaja IAA u korenovima. Najveći skok koncentracije ovog hormona rasta indukovan je pri nižim koncentracijama kadmijuma, gde je došlo do povećanja koncentracije IAA za 123% u odnosu na sadržaj u kontrolnim biljkama. Porast sadržaja ovog hormona rasta pod uticajem teških metala može se objasniti povećanjem količine neophodnog azota za njegovu biosintezu nakon dodavanja metala u obliku njihovih nitratnih soli.
- ✓ Izolacijom i određivanjem sadržaja slobodnih i konjugovanih poliamina HPLC analizom iz listova i korenova *Populus deltoides* u uslovima kontaminacije bakrom, niklom i kadmijumom, dokazano je da su dati metali doveli do indukcije biosinteze slobodnih i konjugovanih poliamina pri obe koncentracije metala. Najzastupljeniji poliamini u topolama su putrescin, zatim spermidin i na kraju spermin. Koncentracije konjugovanih poliamina su više nego dvostruko veće od koncentracije slobodnih poliamina. Veće koncentracije poliamina su dokazane u listovima nego u korenovima. Konjugovani i slobodni oblici poliamina pokazuju klonalnu varijabilnost i zavisnost od koncentracije bakra u zemljištu. Do najveće indukcije biosinteze poliamina pod uticajem jona bakra došlo je kod klona M1, pa zatim klona Pe 19/66, dok je klon B229 najsiromašniji u pogledu sadržaja svih oblika poliamina i sadrži znatno niže koncentracije nego druga dva ispitana klona topola. Ukupni antioksidantni kapacitet izražen troloks ekvivalentima je u visokoj korelaciji sa sadržajem poliamina u klonovima topola, što potvrđuje ulogu poliamina u antioksidantnim procesima. Pod uticajem teških metala klonovi M1 i Pe 19/66 su pokazali veći antioksidantni kapacitet u odnosu na B229 zahvaljujući povišenoj koncentraciji poliamina i njihovih konjugata sa fenolnim kiselinama.

- ✓ Povećanje koncentracije teških metala je u najvećem broju slučajeva izazvalo inhibitorni efekat na brojnost mikroorganizama. Pretpostavlja se da je do izuzetaka u povećanju brojnosti mikroorganizama usled povećanja koncentracije teškog metala došlo zbog veće tolerancije mikroorganizama na teške metale u okruženju. Obe tretirane koncentracije jona Cu^{2+} povećavale su broj plesni, a najveća brojnost je uočena pri koncentraciji od 100 mg/kg, što ukazuje da plesni pokazuju veću tolerantnost prema jonima Cu^{2+} u odnosu na bakterije i alge. Joni Cd^{2+} ispoljili su inhibitorni efekat na rast bakterija i plesni, a sa povećanjem koncentracije jona Cd^{2+} u zemljištu, kod klonova topola M1 i B229, dolazilo je do opadanja brojnosti plesni usled nemogućnosti adaptacije na veće koncentracije jona Cd^{2+} . Sve navedeno ukazuje da teški metali uzrokuju promenu broja mikroorganizama u zemljištu zasada topola koji imaju važnu ulogu u procesima bioremedijacije zemljišta. Prisustvo rezistentnih oblika mikroorganizama koje izaziva povećanje brojnosti pri određenim koncentracijama jona Ni^{2+} , Cu^{2+} i Cd^{2+} bi trebalo ispitati sa stanovišta rezistentnosti sojeva, u cilju određivanja potencijalnih bioindikatora zagađenja teškim metalima, kao i mogućnosti upotrebe određenih sojeva u procesima bioremedijacije teških metala iz zemljišta.
- ✓ Ispitivani klonovi topola nisu pokazali letalan efekat pri tretmanima teškim metalima u koncentracijama koje odgovaraju trostruko većim od maksimalno dozvoljenih koncentracija po Nacionalnoj legislaciji, dok su pri maksimalnim dozvoljenim koncentracijama teških metala kod sva tri klona topola primećene morfološke, biohemijske i fiziološke promene.

Rezultati ovog istraživanja su značajni za odabir klonova topola tolerantnih na stres izazvan jonima teških metala. Odabrani klonovi topola mogu naći značajnu primenu u fitoremedijaciji, i čišćenju površina zagađenih teškim metalima. Osim navedenog, dobijeni rezultati se mogu koristiti u programima pošumljavanja staništa koja su zagađena teškim metalima. Ovaj rad predstavlja sintezu rezultata dobijenih ispitivanjem različitih aspekata bioloških odgovora topola u prisustvu teških metala u koncentracijama iznad dozvoljenih u zemljištu, što su ujedno i prvi rezultati vezani za testirane klonove topola koji su odgajani na zemljišnom medijumu. Slična ispitivanja bi trebalo uraditi i na drugim klonovima topole koji bi se mogli koristiti u fitoremedijaciji.

Dalja istraživanja u ovoj oblasti bi trebala biti usmerena na ispitivanje uticaja teških metala na druge metabolite topola sa signalnom i hormonskom ulogom poput jasmonske, salicilne ili giberelinske kiseline kako u zemljišnom medijumu, tako i u vodenoj i kulturi tkiva. Zbog sve većeg zagađenja životne

sredine teškim metalima, ispitivanje uticaja metala u drastično većim koncentracijama od maksimalnih dozvoljenih u zemljištu i ispitivanje kombinacija različitih teških metala, kao i kombinacija organskih zagadivača u prisustvu teških metala bi bila opravdana i korisna.

7. LITERATURA

- Aidid, S. B., Okamoto, H. (1992) Effects of lead, cadmium and zinc on the electric membrane potential at the xylem symplast interface and cell elongation of *Impatiens balsamina*. *Environ. Exp. Bot.* 32: 439-448.
- Alcázar, R., Marco, F., Cuevas, J. C., Patron, M., Ferrando, A., Carrasco, P., Tiburcio, A. F., Altabella, T. (2006) Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnol. Lett.* 28: 1867-1876.
- Alcázar, R., Planas, J., Saxena, T., Zarza, X., Bortolotti, C., Cuevas, J. C., Bitrián, M., Tiburcio, A. F., Altabella, T. (2010) Putrescine accumulation confers drought tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing the homologous Arginine decarboxylase 2 gene. *Plant Physiol. Biochem.* doi:10.1016/j.plphy.2010.02.002
- Ali, B., Hayat, S., Fariduddin, Q., Ahmad, A. (2008) 24-Epibrassinolide protects against the stress generated by salinity and nickel in *Brassica juncea*. *Chemosphere* 72: 1387-1392.
- Allan, A. C., Fricker, M. D., Ward, J. L., Beale, M. H., Trewavas, A. J. (1994) Two transduction pathways mediate rapid effects of abscisic acid in *Commelina* guard cells. *Plant Cell* 6: 1319-1328.
- Alloway, B. J. (1995) In: Heavy Metal in Soils (Ed: B. J. Alloway), 2nd ed., Blackie Academic and Professional, London, pp. 25-34.
- Amirsadeghi, S., Robson, C. A., Vanlerberghe, G. C. (2007) The role of the mitochondrion in plant responses to biotic stress. *Physiol. Plant.* 129: 253-266.
- An, Z. F., Jing, W., Liu, Y. L., Zhang, W. H. (2008) Hydrogen-peroxide generated by copper amine oxidase is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *J. Exp. Bot.* 59: 815-825.
- Andreeva, I. V., Govorina, V. V., Vinogradova, S. B., Yagodin, B. A. (2001) Nickel in Plants, *Agrokhimiya* 3: 82-94.
- Antoniadis, V., Robinson, J. S., Alloway, B. J. (2008) Effects of short-term pH fluctuations on cadmium, nickel, lead, and zinc availability to ryegrass in a sewage sludge-amended field, *Chemosphere* 71: 759-764.
- Arellano, J. B., Lázaro, J. J., López-Gorgé, J., Barón, M. (1995) The donor side of PSII as the copper-inhibitory binding site. *Photosynth. Res.* 45: 127-134.
- Arnao, M. B., Cano, A., Acosta, M., (2001) The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry* 73: 239-244.
- Arora, A., Byrem, T. M., Nari, M. G., Strasburg, G. M. (2000) Modulation of liposomal membranes fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Archives of Biochemistry and Biophysic.* 373: 102-116.

Asada, K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 50 :601-639.

Baccouch, S., Chaoui, A., Ferjani, E. E. (1998) Nickel-induced oxidative damage and antioxidant responses in *Zea mays* shoots, *Plant Physiol. Biochem.*, 36: 689-694.

Baccouch, S., Chaoui, A., Ferjani, E. E. (2001) Nickel toxicity induces oxidative damage in *Zea mays* roots, *J. Plant Nutr.* 24: 1085-1097.

Bagni, N., Tassoni, A. (2001) Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids* 20: 301-317.

Baker, A. J. M., Brooks, R. R. (1989) Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 1: 81-126.

Baker, A. J. M., McGrath, S. P., Reeves, R. D., Smith, J. A. C. (2000) Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In: Terry N, Baelos G., editors. *Phytoremediation of contaminated soil and water*. Boca Raton, FL: Lewis Publishers; p. 85-107.

Balaguer, J. (1998) Tomato growth and yield affected by nickel presented in the nutrient solution, *Acta. Hort.*, 458: 269-272.

Balestrasse, K. B., Gallego, S. M., Tomaro, M. L. (2004) Cadmium-induced senescence in nodules of soybean (*Glycine max.* L.) plants. *Plant Soil* 262: 373-381.

Banskota, A. H., Tezuka, Y., Kadota, S. (2001) Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother. Res.*, 15: 561-71.

Barcelo, J. Posehrieder, C. (1990) Plant water relations as affected by heavy metal stress a review. *J. Plant Nutr.* 13: 1-37.

Barkawi, L. S., Cohen, J. D. (2010) A method for concurrent diazomethane synthesis and substrate methylation in a 96-sample format. *Nature protocols* 10: 1619-1626.

Barón, M, Arellano, J. B., López-Gorgé, J. (1995) Copper and photosystem II: A controversial relationship. *Physiol. Plant.* 94:174-180.

Barroso, J. B., Corpas, F. J., Carreras, A., Rodríguez-Serrano, M., Esteban, F. J., Fernández-Ocaña, A. (2006) Localization of S-nitrosoglutathione and expression of S-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress. *J Exp Bot.* 57: 1785-93.

Barsukova, V. S., Gamzikova, O. I. (1999) Effects of Nickel Surplus on the Element Content in Wheat Varieties Contrasting in Ni Resistance, *Agrokimiya*, 1: 80-85.

Barylá, A., Carrier, P., Franck, F., Coulomb, C., Sahut, C., Havaux, M. (2001) Leaf chlorosis in oil seed rape plants (*Brassica napus*) grown on cadmium-polluted soil causes and consequences for photosynthesis and growth. *Planta* 212: 696-709.

Bassard, J. E., Ullmann, P., Bernier, F., Werck-Reichhart, D. (2010) Phenolamides. Bridging polyamines to the phenolic metabolism. *Phytochemistry* 71: 1808-1824.

Basu, R., Maitra, N., Ghosh, B., (1998) Salinity Results in Polyamine Accumulation in Early Rice (*Oryza sativa* L.) Seedlings, *Aust. J. Plant Physiol.* 15: 777-786.

Baszyński, T., Wajda, L., Król, M., Wolińska, D., Krupa, Z., Tukendorf, A. (1980) Photosynthetic activities of cadmium-treated tomato plants. *Physiol Plant* 48: 365-370.

Beardsell, M. F., Cohen, D. (1975) Relationships between leaf water status, abscisic acid levels, and stomatal resistance in maize and sorghum. *Plant Physiol.* 56: 207-212.

Belenghi, B., Romero-Puertas, M. C., Vercammen, D., Brackenier, A., Inze, D., Delledonne, M., Van Breusegem, F. (2007) Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue. *J. Biol. Chem.* 282: 1352-1358.

Bellion, M. (2007) Metal induction of a *Paxillus involutus* metallothionein and its heterologous expression in *Hebeloma cylindrosporum*. *New Phytol.*, 174: 151-158.

Benavides, M. P., Gallego, S. M., Tomaro, K. L. (2005) Cadmium toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 170: 21-34.

Bennett, M. J., Marchand, A., Green, H. G., May, S. T., Ward, S. P., Millner, P. A., Walker, A. R., Schultz, B., Feldmann, K. A. (1996) *Arabidopsis* AUX1 gene: A permease-like regulator of root gravitropism. *Science* 273: 948-950.

Benzie, I. F. F.; Strain, J. J. (1999) Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol.* 299: 15-27.

Berg, J., Tom-Petersen, A., Nybroe, O., (2004) Copper amendment of agricultural soils selects for bacterial antibiotic resistance in the field, *Letters in Applied Microbiology* 3: 149-150.

Bernal, M., Roncel, M., Ortega, J. M., Picorel, R., Yruela, I. (2004) Copper effect on cytochrome *b559* of photosystem II under photoinhibitory conditions. *Physiol. Plant.* 120: 686-694.

- Bernasconi, P. (1996) Effect of synthetic and natural protein tyrosine kinase inhibitors on auxin efflux in zucchini (*Cucurbita pepo*) hypocotyls. *Physiol. Plant.* 96: 205-210.
- Berrna, A., Benier, F. (1999) Regulation by biotic and abiotic stress on a wheat germin gene oxalate oxidase. A H₂O₂ producing enzyme. *Plant Mol. Biol.* 39: 539-549.
- Besson-Bard, A., Pugin, A., Wendehenne, D. (2008) New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annu.Rev. Plant Biol.* 59: 21-39.
- Bethke, P. C., Badger, M., Jones, R. (2004) Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell* 16: 332-341.
- Bethke, P. C., Libourel, I. G., Jones, R. L. (2006) Nitric oxide reduces seed dormancy in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 57: 517-526.
- Bianco-Trinchant, J., Le Page-Degivry, M. T. (1998) ABA synthesis in protoplasts of different origin in response to osmotic *Plant Growth Regulation* 25: 135-141.
- Bishnoi, N. R., Sheoran I. S., Singh R. (1993) Influence of Cadmium and Nickel on Photosynthesis and Water Relations in Wheat Leaves of Different Insertion Level. *Photosynthetica* 28: 473-479.
- Boeckler, A. G., Gershenzon, J., Unsicker, S. B. (2013) Gypsy moth caterpillar feeding has only a marginal impact on phenolic compounds in old-growth black poplar. *J. Chem. Ecol.* 39: 1301-1312.
- Boominathan R., Doran P. M. (2002) Ni-induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumulator, *Alyssum bertolonii*, *New Phytol.* 156: 205-215.
- Bors, W., Langebartels, C., Michel, C., Sandermann, H. (1989) Polyamines as Radical Scavengers and Protectants against Ozone Damage. *Phytochemistry*, 28: 1589-1595.
- Bošnjak Đ., Hadžić V., Babović D., Kostić N., Burlica Ć., Đorović M., Pejković M., Mihajlović T.D., Stojanović S., Vasić G., Stričević R., Gajić B., Popović V., Šekularac G., Nešić Lj., Belić M., Đorđević A., Pejić B., Maksimović L., Karagić Đ., Lalić B., Arsenić I. (1997): Metode istraživanja i određivanja svojstava zemljišta. Jugoslovensko društvo za proučavanje zemljišta Komisija za fiziku zemljišta, str. 278, Novi Sad
- Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F., Martin-Tanguy, J. (1999) Polyamines and Environmental Challenges: *Recent Development Plant Sci.* 140: 103-125.
- Brazeau, B. J., Johnson, B. J., Wilmot, C. M. (2004) Copper-containing amine oxidases. Biogenesis and catalysis; a structural perspective. *Arch. Biochem. Biophys.* 428: 22-31.

- Breckle, S.W. (1991) Growth under Stress: Heavy Metals, Plant Roots: The Hidden Half, Waisel Y., Eshel A., Kafkafi, U., Eds., New York: Marcel Dekker, pp. 351-373.
- Bright, J., Desikan, R., Hancock, J. T., Weir, I. S., Neill, S. J. (2006) ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. *Plant J.* 45: 113-122.
- Brooks, R. R., Chambers, M. F., Nicks, L. J., Robinson, B. H. (1998) Phytomining. *Trends Plant Sci.* 3: 359-362.
- Brown, D. E., Rashotte, A. M., Murphy, A. S., Normanly, J., Tague, B.W., Peer W. A., Taiz, L., Muday, G. K. (2001) Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126: 524-535.
- Brown, J. E. (1998) Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties, *Biochem. J.* 33: 1173-1197.
- Brüggemann, L., Pottosin, I., Schönknecht, G. (1998) Cytoplasmic polyamines block the fast-activating vacuolar cation channel. *Plant J.* 16: 101-105.
- Buckley, C., Bund S. J., McTaggart F. (1996) Oxidized low-density lipoproteins inhibit endotheliumdependent relaxations in isolated large and small rabbit coronary arteries. *J. Auton. Pharmacol.* 16: 261-267.
- Burda, K., Kruk, J., Schmid, G. H., Strzalka, K. (2003) Inhibition of oxygen evolution in photosystem II by Cu (II) ions is associated with oxidation of cytochrome *b559*. *Biochem. J.* 371: 597-601.
- Burke, D. J., Weis, J. S., Weis, P. (2000) Release of metals by the leaves of the salt marsh grasses *Spartina alterniflora* and *Phragmites australis*, *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 51: 153-159.
- Capell, T., Bassie, L., Christou, P. (2004) Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. *Proc. Natl. Aca. Sci. USA* 101: 9909-9914.
- Castaldo, S., Capasso, F. (2002) Propolis and old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73: (Suppl. 1), S1-6.
- Castiglione, S., Todeschini, V., Franchin, C., Torrigiani, P., Gastaldi, D., Ciatelli, A. C., Rinaudo, C., Berta, G., Biondi, S. G., Lingua G. (2009) Clonal differences in survival capacity, copper and zinc accumulation, and correlation with leaf polyamine levels in poplar: A large-scale field trial on heavily polluted soil. *Environ Pollut.* 157: 2108-2117.
- Cataldo, D. A., Garland, T. R., Wildung R. E. (1978) Nickel in plants: I. Uptake kinetics using intact soybean seedlings, *Plant Physiol.* 62: 563-565.
- Cedeño-Maldonado, A, Swader, J. A. (1972) The cupric ion as an inhibitor of photosynthetic electron transport in isolated chloroplasts. *Plant Physiol.* 50: 698-701.

Centritto, M., Lucas, M. E., Javris, G. P. (2002) Gas exchange, biomass, whole-plant water-use efficiency and water uptake of peach (*Prunus persica*) seedlings in response to elevated carbon dioxide concentration and water availability *Tree Physiology* 22: 699-706.

Cervelli, M., Polticelli, F., Federico, R., Mariottini, P. (2003) Heterologous expression and characterization of mouse spermine oxidase. *J. Biol. Chem.* 278: 5271-5276.

Cervera, M. T., Storme, V., Soto, A., Ivens, B., Van Montagu, M., Rajora, O. P., Boerjan, W. (2005) Intraspecific and interspecific genetic and phylogenetic relationships in the genus *Populus* based on AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 111: 1440-1456.

Chalker-Scott, L. (1999) Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses, *Photochem. Photobiol.* 70: 11-27.

Chalker-Scott, L. (2002) Do anthocyanins function as osmoregulators in leaf tissues, In Anthocyanins in Leaves. Advances in Botanical Research, vol. 37, Gould, K.S. and Lee, D.W., Eds., Academic Press, Amsterdam, 103.

Chaney, R. L., Malik, M., Li, Y. M., Brown, S. L., Brewer, E. P., Angle, J. S., Baker, A. J. M. (1997) Phytoremediation of soil metals. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 279-284.

Chang, C., Yang, M., Wen, H., Chern, J. (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Analysis* 10: 178-182.

Chaoui, A., Mazhoudi, S., Gnorbani, M. H., Ferjani, E. (1997) Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Sci.* 127: 139-147.

Chattopadhyay, M. K., Tiwari, B. S., Chattopadhyay, G., Bose, A., Sengupta, D. N., Ghosh, B. (2002) Protective role of exogenous polyamines on salinity-stressed rice (*Oryza sativa*) plants. *Physiol Plant* 116: 192-199.

Chattopadhyay, M. K., Tabor, C. W., Tabor, H. (2003) Polyamines protect *Escherichia coli* cells from the toxic effect of oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 2261-2265.

Chattopadhyay, M. K., Tabor, C. W., Tabor, H. (2006) Polyamine deficiency leads to accumulation of reactive oxygen species in a spe2Delta mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23: 751-761.

Chen, C. T., Chen, L. M., Lin, C. C., Kao, C. H. (2001) Regulation of proline accumulation in detached rice leaves exposed to excess copper. *Plant Sci.* 160: 283-290.

Chen, K. H, Miller, A. N., Patterson, G. W., Cohen, J. D. (1988) A rapid and simple procedure for purification of indole-3-acetic acid prior to GC-SIM-MS analysis. *Plant Physiol.* 86: 822-825.

- Chen, S. L., Kao, C. H. (1995) Gluzazhiopne reduces the inhibition of rice seedling root growth caused by cadmium. *Plant Growth Reg.* 16: 249-252.
- Chesters, C. A., Starke, D. W., Mielke, J. J. (2000) Acute cadmium exposure inactivates thiol transferase glutaredoxin, inhibits intracellular reduction of protein-glutathionyl mixed disulfides, and initiates apoptosis. *J. Biol. Chem.* 275: 26556-26565.
- Cho, U., Seo, N. (2004) Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Sci.* 168: 113-120.
- Choi, Y. E., Harada, E., Wada, M., Tsuboi, H., Morita, Y., Kusano, T., Sano, H. (2001) Detoxification of cadmium in tobacco plants: formation and active excretion of crystals containing cadmium and calcium through trichomes. *Planta* 213: 45-50.
- Chongpraditnorn, P., Mori, S., Chino, M. (1992) Excess copper induces a cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase in soybean root. *Plant Cell Physiol.* 33: 239-244.
- Christie, P. J., Alfenito, M. R., Walbot, V. (1994) Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta* 194: 541-555.
- Ciscato, M., Valcke, R., van Loven, K., Clijsters, H., Navari-Izzo, F. (1997) Effects of in vivo copper treatment on the photosynthetic apparatus of two *Triticum durum* cultivars with different stress sensitivity. *Physiol. Plant.* 100: 901-908.
- Clemens, S., Antonsiewicz, D. M., Ward, J. M., Schachtman, D. P., Schroder, J. J. (1998) The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 95: 2043-2048.
- Clemens, S., Palmgren, M. G., Krämer, U. (2002) A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends Plant Sci.* 7: 309-315.
- Cobbett, C. (2000) Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol.* 123: 825-832.
- Cobbett, C., Goldsbrough, P. (2002) Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 159-182.
- Cocker, K. M., Evans, D. E., Hobson, M. J. (1998) The amelioration of aluminium toxicity by silicon in higher plants: solution chemistry or an in planta mechanism? *Physiol. Plant.* 104: 608-624.
- Cohen, J. D., Baldi, B. G., Slovin, J. P. (1986) ¹³C-[Benzene ring]-indole-3-acetic acid. A new internal standard for quantitative mass spectral analysis of indole-3-acetic acid in plants. *Plant Physiol.* 80: 14-19.

- Cohen, J. D., Bausher, M. G., Bialek, K., Buta, G. J., Gocal, G. F. W., Janzen, L. M., Pharis, B. P., Reed, A. N., Slovin, J. P. (1987) Comparison of a commercial ELISA assay for indole-3-acetic acid at several stages of purification and analysis by gas chromatography-selected ion monitoring-mass spectrometry using a $^{13}\text{C}_6$ -labeled internal standard. *Plant Physiol.* 84: 982-986.
- Cohen, S. S. (1998) A guide to the polyamines. Oxford University Press, New York
- Colcombet, J., Hirt, H. (2008) Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochem J.* 413: 217-226.
- Collard, J. M. (1994) Plasmids for heavy metal resistance in *Alcaligenes eutrophus* CH34: Mechanisms and applications, *FEMS Microbiol. Rev.* 14: 405-414.
- Cona, A., Rea, G., Angelini, R., Federico R, Tavladoraki, P. (2006) Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends Plant Sci.* 11: 80-88.
- Congeevaram, S., Dhanarani, S., Park, J., Dexilin, M., Thamaraiselvi, K. (2006) Biosorption of chromium and nickel by heavy metal resistant fungal and bacterial isolates, *Journal of Hazardous Materials* 27: 276-277.
- Conklin, D. S., MacMasters, J. A., Culbertson, M. R., Kung, C. (1992) COT1 genes involved in cobalt accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 12: 3678-3688.
- Corpas, F. J., Barroso, J. B., Carreras, A., Quiros, M., Leon, A. M., Romero-Puertas, M. C., Esteban, F. J., Valderrama, R., Palma, J. M., Sandalio, L. M., Gomez, M., del Rio, L. A. (2004) Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiol.* 136: 2722-2733.
- Costa, G., Morel, J. L. (1994) Water relations, gas exchange and amino acid content in Cd-treated lettuce. *Plant Physiol. biochem.* 32: 561-570.
- Courbot, M. (2004) Cadmium-responsive thiols in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*, *Appl. Environ. Microb.* 70: 7413-7417.
- Crawford, N. M. (2006) Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. *J. Exp. Bot.* 57: 471-478.
- Crawford, N. M., Galli, M., Tischner, R., Heimer, Y. M., Okamoto, M., Mack, A. (2006) Response to Zemojtel et al. Plant nitric oxide synthase: Back to square one. *Trends Plant Sci.* 11: 526-527.
- Curie, C., Panaviene, Z., Loulerguech, C., Delaporta, S. L., Briat, J. F., Walker, E. L. (2001) Maize yellow stripe encodes a membrane protein directly involved in Fe (III) uptake. *Nature* 409: 346-349.
- Cutler, S., Ghassemian, M., Bonetta, D., Cooney, S., McCourt, P. (1996) A protein farnesyl transferase involved in abscisic acid signal transduction in Arabidopsis, *Science* 273: 1239-1241.

- Dai, H. P., Shan, C. J., Lu, C., Jia, G. L., Wei, A. Z., Sa, W. Q., (2013) Response to cadmium tolerance, accumulation and translocation in *Populus × canescens*, *Water Air Soil Pollut.* 224: 1504-18.
- Dalton, D. A., Evans, H. J., Hanus, F.J., (1985) Stimulation by Nickel of Soil Microbial Urease Activity and Urease and Hydrogenase Activities in Soybeans Grown in a Low- Nickel Soil, *Plant Soil* 88: 245-258.
- Dalurzo, H.C., Sandalio L. M., Gomez M., Del Rio L. A. (1997) Cadmium infiltration of detached pea leaves: effect on its activated oxygen metabolism. *Phyton Ann. Rei. Bot.* 37: 59-64.
- Dan, T. V., Krishnaraj, S., Saxena, P. K. (2002) Cadmium and nickel uptake and accumulation in scented Geranium (*Pelargonium sp. 'Frensham'*), *Water Air Soil Pollut.* 137: 355-364.
- Das, P. K., Kar, M., Mishra, D. (1978) Nickel Nutrition of Plants: Effect of Nickel on Some Oxidase Activities during Rice (*Oryza sativa L.*) Seed Germination, *Z. Pflanzenphysiol.* 90: 225-233.
- Das, P. K., Samantaray, S., Rout, G. R. (1997) Study on toxicity in a plants: a review. *Environ. Poll.* 98: 853-858.
- Davenport, R. (2002) Glutamate receptors in plants. *Ann. Bot.* 90: 549-557.
- Davies, P. J. (1995) *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, 2nd ed. Kluwer, Dordrecht, Netherlands.
- Davies, W. J., Zhang, J. (1991) Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 55-76.
- De Vos, C. H. R., Vonk, M. J., Voojjs, R., Schat, H. (1992) Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus*. *Plant Physiol.* 98: 853-858.
- Del Carmen, E. M. (2002) Cadmium induces alpha (1) collagen (I) and metallothionein II gene and alters the antioxidant system in rat hepatic stellate cells, *Toxicology*, 170: 63-73.
- Del Duca, S., Betti, L., Trebbi, G., Serafini-Fracassini, D., Torrigiani, P. (2007) Transglutaminase activity changes during the hypersensitive reaction, a typical defense response of tobacco plants to TMV. *Physiol. Plant* 131: 241-250
- Della Mea, M., Caparro`s-Ruiz, D., Claparols, I., Serafini-Fracassini, D., Rigau, J. (2004) AtPng1p. The first plant transglutaminase. *Plant Physiol.* 135: 2046-2054
- Delledonne, M. (2005) NO news is good news for plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 390-396.
- Desikan, R. H. A., Mackerness, S., Hancock, J., Neill, S. (2001) Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol.* 127: 159-173.

- Di Baccio, D., Tognetti, R., Minnocci, A., Sebastiani, L. (2009) Responses of the *Populus x euramericana* clone I-214 to excess zinc: carbon assimilation, structural modifications, metal distribution and cellular localization. *Environ. Exp. Bot.* 67: 153-163.
- Di Baccio, D., Tognetti, R., Sebastiani, L., Vitagliano, C. (2003) Responses of *Populus deltoides x Populus nigra* (*Populus x euramericana*) clone I-214 to high zinc concentrations. *New Phytol.* 159: 443-452
- Di Tomaso, J. M., Hart, J. J., Kochian, L. V. (1992) Transport kinetics and metabolism of exogenously applied putrescine in roots of intact maize seedlings. *Plant Physiol.* 98: 611-620.
- Diaz, J., Bernal, A., Pomar, F., Merino, F. (2001) Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. *Plant Sci.* 161: 179-192.
- Dietz, A. C., Schnoor, J. L. (2001) Advances in phytoremediation. *Environ Health Perspect* 109: 163-168.
- Dietz, K. J., Baier, M., Kramer, U. (1999) Free radicals and reactive oxygen species are mediators of heavy metal toxicity in plants. In: Prasad, M.N.V., Hagemmeyer, J. (ed.): Heavy Metal Stress in Plants: from Molecules to Ecosystem. pp. 79-97. Springer-Verlag, Berlin.
- Dixit, V., Pandey, V., Shyam, R. (2001) Differential oxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad) *J. Exp. Bot.* 52: 1101-1109.
- Dixon, D. P., Cummins, L., Cole, D. J., Edwards, R. (1998) Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 258-266.
- Dixon, D. P., Laphorn, A., Edwards, R. (2002) Plant glutathione transferases. *Gen. Biol.* 3: 1-10.
- Dobrovinskaya, O. R., Muñiz, J., Pottosin, I. (1999a) Inhibition of vacuolar ion channels by polyamines. *J. Membr. Biol.* 167:127-140.
- Dobrovinskaya, O. R., Muñiz, J., Pottosin, I. (1999b) Asymmetric block of the plant vacuolar Ca²⁺-permeable channel by organic cations. *Eur. Biophys. J.* 28: 552-563.
- Dominguez-Solis, J. R., Gutierrez-Alcala, G., Romero, L. C., Gotor, C. (2001) The cytosolic O-acetylserine (thiol) lyase gene is regulated by heavy-metals and can function in cadmium tolerance. *J. Biol. Chem.* 276: 9297-9302.
- Donaldson, J. R., Stevens, M. T., Barnhill, H. R., Lindroth, R. L. (2006) Age-related shifts in leaf chemistry of clonal aspen (*Populus tremuloides*). *J Chem. Ecol.* 32: 1415-1429.
- Douchkov D. (2005) Ectopic expression of nicotianamine synthase genes results in improved iron accumulation and increased nickel tolerance in transgenic tobacco, *Plant Cell Environ.* 28: 365-374.

- Dražić, G., Mihalović, N., Lojić, M. (2006) Cadmium concentration in *Medicago sativa* seedlings treated with salicylic acid. *Biol. Plant.* 50: 239-244.
- Drazkiewicz, M., Skórzynska-Polit, E., Krupa, Z. (2003) Response of the ascorbate-glutathione cycle to excess copper in *Arabidopsis thaliana* (L.). *Plant Sci.* 164:195-202.
- Droppa, M., Horváth, G. (1990) The role of copper in photosynthesis. *Plant Sci.* 9:111-123.
- Duarte, B., Delgado, M., Calador, I., (2007) The role of citric acid in cadmium and nickel uptake and translocation, in *Halimione portulacoides*, *Chemosphere* 69: 836-840.
- Duchaufour, P. (1977). *Pedology*. George Allen and Unwin, London.
- Dudonne, S., Poupard, P., Coutiere, P., Woillez, M., Richard, T., Merillon, J. M., Vitrac, X. (2011) Phenolic composition and antioxidant properties of poplar bud (*Populus nigra*) extract: individual antioxidant contribution of phenolics and transcriptional effect on skin aging, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 9: 362-371.
- Dunlap, J. R., Guinn, G. (1989) A simple purification of indole-3-acetic acid and abscisic acid for GC-SIM-MS analysis by microfiltration of aqueous samples through nylon. *Plant Physiol.* 90: 197-201.
- Easton, D. F. (1992) In: Nickel and Human Health: Current Perspectives (Eds: E. Nieboer, J. O. Nriagu), John Wiley & Sons, New York, pp. 603 - 619.
- Edreva, A. M., Velikova, V. B, Tsonev, T. D. (2007) Phenylamides in Plants. *Russ J. Plant Phys.* 54: 287-301.
- Edwards, R. (1996) Characterization of glutathione transferase and glutathione peroxidase in pea (*Pisum sativum*). *Physiolol. Plant* 98: 594-604.
- Edwards, R., Dixon, D. P., Walbot, V. (2000) Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci.* 5: 193-198.
- Eitinger, T., Mandrand-Berthelot, M. A. (2000) Nickel transport systems in microorganisms, *Arch. Microbiol.* 173: 1-9.
- Ekmekçi, Y., Tanyola Ç. D., Ayhan B. (2008) Effects of cadmium on antioxidant enzyme and photosynthetic activities in leaves of two maize cultivars. *Journal of Plant Physiology* 165: 600-611.
- El-Maraghy, S. A., Gad M. Z., Fahim A. T., Hamdy M. A. (2001) Effect of cadmium and aluminum intake on the antioxidant status and lipid peroxidation in rat tissues, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 15: 207- 214.
- Elsas, van J., D., Trevors, T., J., Wellington, E., M., H. (1997) Modern soil microbiology, Marcel Dekker, INC, New York, New York.

- El-Shintinawy, F., El-Ansary, A. (2000) Differential Effect of Cd²⁺ and Ni²⁺ on Amino Acid Metabolism in Soybean Seedlings, *Biol. Plant.* 43: 79-84.
- Emsley, J., (1991) *The Elements*, Oxford: Clarendon
- Englander, C., M., Corden, M., E. (1971): Stimulation of mycelial growth of *Endothia parasitica* by heavy metals, *Botany and plant pathology department* 13: 1001-1016.
- English, S., Greenaway, W., Whatley, F. R. (1991) Analysis of phenolics of *Populus trichocarpa* bud exudate by GC-MS. *Phytochemistry* 30: 531-533.
- Ermiler, U. (1998) Active sites of transition -metal enzymes with a focus on nickel. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8: 749-758.
- Eskew, D.L., Welch R.M., Norvell, W.A. (1984) Nickel in Higher Plants: Further Evidence for an Essential Role. *Plant Physiol.* 76: 691-693.
- Evans, K. M., Gatehouse, J. A., Lindsay, W. P., Shi, J., Tommey, A. M., Robinson, N. J. (1992) Expression of the pea metallothionein-like gene *PsMTA* in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana* and analysis of trace metal ion accumulation: implications for *PsMTA* function. *Plant Mol. Biol.* 20: 1019-1028.
- Ewais, E. A. (1997) Effects of Cadmium, Nickel and Lead on Growth, Chlorophyll Content and Proteins of Weeds, *Biol. Plant.* 39: 403-410.
- Fan, L. M., Zhao, Z., Assmann, S. M. (2004) Guard cells: A dynamic signaling model. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 537-546.
- Farrant, J. M. (2000) A comparison of mechanisms of desiccation tolerance among three angiosperm resurrection plant species, *Plant Ecol.* 151: 29-43.
- Farrant, J. M. (2003) An investigation into the role of light during desiccation of three angiosperm resurrection plants, *Plant Cell Environ.* 26: 1275-1291.
- Federico, R., Cona, A., Angelini, R., Schininà, M. E., Giartosio, A. (1990) Characterization of maize polyamine oxidase. *Phytochemistry* 29: 2411-2414.
- Feechan, A., Kwon, E., Yun, B.W., Wang, Y., Pallas, J. A., Loake, G. J. (2005) A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 8054-8059.
- Ferguson, L. R. (2001) Role of plant polyphenols in genomic stability, *Mutat. Res.* 475: 89-104.

Finkelstein, R. R., Gampala S. S, Rock C. D. (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell*, 14: S15-S45.

Finkelstein, R. R., Lynch, T. J. (2000) The *Arabidopsis* abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell* 12: 599-609.

Finkelstein, R. R., Rock, C. D. (2002) Abscisic acid biosynthesis and response. In: Somerville, C. R., Meyerowitz E. M. (eds) *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, Rockville, M. D., doi:10.1199/tab.0058, www.aspb.org/publications/arabidopsis/

Finkelstein, R. R., Wang, M. L., Lynch, T. J., Rao, S., Goodman, H. M. (1998) The *Arabidopsis* abscisic acid response locus ABI4 encodes an APETALA2 domain protein. *Plant Cell* 10: 1043-1054.

Folk, J. E., Park, M. H., Chung, S. I, Schrode, J., Lester, E. P., Cooper, H. L. (1980) Polyamines as physiological substrates for transglutaminases. *J. Biol. Chem.* 255: 3695-3700.

Fornazier, R. F., Ferreira R. R., Vitoria, A. P., Molina, S. M. G., Lea, P. J., Azevedo, R. A. (2002) Effect of cadmium on antioxidative enzyme activity in sugar cane. *Biol. Plant* 45: 91-97.

Fox, T. C., Guerinot, M. L. (1998) Molecular biology of cation transport in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 49: 669-696.

Foyer, C. H., Theodoulou, F., Delrot, S. (2001) The functions inter- and intracellular glutathione transport systems in plants. *Trends Plant Sci.* 6: 486-492.

Franchin, C., Fossati, T., Pasquini, E., Lingua, G., Castiglione, S., Torrigiani, P., Biondi, S. (2007) High concentrations of zinc and copper induce differential polyamine responses in micropropagated white poplar (*Populus alba*). *Physiol Plant* 130: 77-90.

Frankel, E. F., Waterhouse, A. L., Teissedre, P. L., (1995) Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human lowdensity lipoproteins, *J. Agric. Food Chem.* 43: 890-904.

Frankel, E. N., Meyer, A. S. (2000) The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. Sci. Food Agric.* 80: 1925-1941.

Freeman, J. L., Persans, M.W., Nieman, K., Albrecht, C., Peer, W., Pickering, I. J., Salt, D. E. (2004) Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators. *Plant Cell* 16: 2176-2191.

Fridovich J. (1995) Superoxide radical and SODs. *Annual Reviews of Biochemistry* 64: 97-104.

- Fuhrer, J. (1982) Ethylene biosynthesis and cadmium toxicity in leaf tissue of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *Plant Physiol* 70: 162-167.
- Funada, R., Sugiyama, T. K., Fishitani, M. (1988) Determination of abscisic acid in *Pinus densiflora* by selected ion monitoring. *Plant Physiol.* 88: 525-527.
- Gajewska, E., Sklodowska, M. (2005) Antioxidative responses and proline level in leaves and roots of pea plants subjected to nickel stress, *Acta Physiol. Plant.* 27: 329-339.
- Gajewska, E., Sklodowska, M. (2007) Effect of nickel on ROS content and antioxidative enzyme activities in wheat leaves, *BioMetals* 20: 27-36.
- Gajewska, E., Sklodowska, M., Slaba M, Mazur, J. (2006) Effect of nickel on oxidative enzyme activities, proline and chlorophyll contents in wheat shoots. *Biologia Plantarum* 50: 653-659.
- Galle A., Benyo D., Leviczky T., Takacz K., Csiszar J., Erdei L., Tari I. (2013) The effect of osmotic and heavy metal stress on the water potential and stomatal conductance of poplar clones. Book of final reports "Characterization and oxidative stress tolerance in plants: from models to trees. HUSRB/1002/214/036 pp.19.
- Gallego, S. M., Benavides M. P., Tomaro, M. L. (1996) Effect of heavy metal ions excess on sunflower leaves:evidence for involvement of oxidative stress. *Plant. Sci.* 121: 151-159.
- Galston, A. (1994) Life Processes of Plants. Scientific American Library, New York.
- Galston, A. W., Kaur-Sawhney, R., Atabella, T., Tiburcio, A. F. (1997) Plant Polyamines in Reproductive Activity and Response to Abiotic Stress. *Bot. Acta* 110: 197-207.
- Garcia-Mata, C., Gay, R., Sokolovski, S., Hills, A., Lamattina, L., Blatt, M. R. (2003) Nitric oxide regulates K⁺ and Cl⁻ channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 11116-11121.
- Gekeler, W., Grill, E., Winnacker, E. L., Zenk, M. H. (1989) Survey of the plant kingdom for the ability to bind metals through phytochelatins. *Z. Naturforsch.* 44: 361-369.
- Geldner, N., Friml, J., Stierhof, Y. D., Jurgens, G., Palme, K. (2001) Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* 413: 425-428.
- Gerendas, J., Sattelmacher, B. (1999) Influence of Ni Supply on Growth and Nitrogen Metabolism of *Brassica napus* L. Grown with NH₄NO₃ or Urea as N Source. *Ann. Bot.* 83: 65-71.
- Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F., Scaccini, C. (2000) Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical review and experimental data. *Free Radical Biol. Med.* 29: 1106-1114.

- Gocal, G. F. W., Pharis, R. P., Yeung, E. C., Pearce, D. (1991) Changes after decapitation in concentrations of indole-3-acetic acid and abscisic acid in the larger axillary buds of *Phaseolus vulgaris* L. cv Tender Green. *Plant Physiol.* 95: 344-350
- Gomes-Juniora, R. A. (2006) Nickel elicits a fast antioxidant response in *Coffea arabica* cells, *Plant Physiol. Biochem.* 44: 420-429.
- Gonnelli, C., Galardi, F., Gabbriellini, R. (2001) Nickel and copper tolerance and toxicity in three Tuscan populations of *Silene paradoxa*, *Physiol. Plant.*, 113: 507-514.
- Gould, K. S., Neill, S.O., Vogelmann, T. C. (2002) A unified explanation for anthocyanins in leaves? In: Anthocyanins in Leaves. Advances in Botanical Research, vol. 37, Gould, K.S. and Lee, D.W., Eds., Academic Press, Amsterdam, 167.
- Govedarica, M., Jarak, M. (1995) Opšta mikrobiologija, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Institut za ratarstvo i povrtarstvo
- Govedarica, M., Jarak, M., Milošević, N. (1993) Teški metali i pesticidi u zemljištu, Poljoprivredni fakultet, Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad.
- Greenaway, W., May, J., Scaysbrook, T. Whatley, F.R. (1992) Compositions of bud and leaf exudates of some *Populus* species compared. *Z. Naturforsch.* 47c: 329-334.
- Greenaway, W.; May, J.; Whatley, F. R. (1989) Flavonoid aglycone identified by gas chromatography-mass spectrometry in bud exudate of *Populus balsamifera*. *J. Chromatogr.* 472: 393-400.
- Grill, E., Winnacker, E. L., Zenk, M. H. (1985) Phytochelatins: the principal heavy metal complexing peptides of higher plants. *Science* 230: 674-676.
- Grill, E., Winnacker, E. L., Zenk, M. H. (1986) Homo-phytochelatins as heavy metal-binding peptides of homogluthathione containing *Fabales*. *FEBS Lett.* 205: 47-50.
- Groppa, M. D., Benavides, M. P. (2007) Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids* 34: 35-45.
- Groppa, M. D., Tomaro, M. L., Benavides, M. P. (2001) Polyamines as protectors against cadmium or copper-induced oxidative damage in sunflower leaf discs. *Plant Sci.* 161: 481-488.
- Guan, L. M., Zhao, J., Scandalios, J. G. (2000) Cis-elements and trans-factors that regulate expression of the maize CAT1 antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H₂O₂ is the likely intermediary signaling molecule for the response. *Plant J.* 22: 87-95.

- Guerinot, M. L., Salt, D. E. (2001) Fortified foods and phytoremediation. Two sides of the same coin. *Plant Physiol.* 125: 164-167.
- Guo, F. Q. (2006) Response to Zemojtel et al. Plant nitric oxide synthase: *AtNOS1* is just the beginning. *Trends Plant Sci.* 11: 527-528.
- Gupta, M., Cuypers, A., Vangronsveld, J., Clijsters, H. (1999) Copper affects the enzymes of the ascorbate-gluthathione cycle and its related metabolites in the roots of *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plant.* 106: 262-267.
- Ha, H. L., Sirisoma, N. S., Kuppusamy, P., Zweller, J. L., Woster, P.M., Casero, R. A. Jr., (1998) The Natural Polyamine Spermine Functions as a Free Radical Scavenger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 11140-11145.
- Haag-Kerwer, A., Schater, H. J., Heiss, S., Walter, C., Rausch, T. (1999) Cadmium exposure in *Brassica juncea* cause a decline in transpiration rate and leaf expansion without effect on photosynthesis. *J Exp Bot* 50:1827-1835.
- Hadžić, V., Belić M., Nešić Lj. (2004) Praktikum iz pedologije. Poljoprivredni fakultet, Departman za ratarstvo i povrtarstvo, str. 80.
- Hale, K. L. (2001) Molybdenum sequestration in *Brassica* species. A role for anthocyanins? *Plant Physiol.* 126: 1391-1404.
- Hale, K. L. (2002) Anthocyanins facilitate tungsten accumulation in *Brassica*, *Physiol. Plant.* 116: 351-371.
- Hall, J. L. (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* 366: 1-11.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219: 1-14.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1989) Free radicals in biology and medicine, Science Publications, Oxford
- Hamer, D. H. (1986) Metallothioneins. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 913-951.
- Hanfrey, C., Sommer, S., Mayer, M. J., Burtin, D., Michael, A. J. (2001) *Arabidopsis* polyamine biosynthesis: absence of ornithine decarboxylase and the mechanism of arginine decarboxylase activity. *Plant J.* 27: 551-560.
- Hannink, N. K., Rosser, S. J., Bruce, N. C. (2002) Phytoremediation of explosives. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21: 511-538.
- Hanzawa, Y., Takahashi, T., Michael, J., Burtin, D., Long, D., Pineiro, M., Coupland, G., and Komeda, Y., (2000) ACAULIS5, an *Arabidopsis* Gene Required for Stem Elongation, Encodes a Spermine Synthase, *EMBO J.* 19: 4248-4256.
- Hao, F., Wang, X., Chen, J. (2006) Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in nickel-induced oxidative stress in roots of wheat seedlings, *Plant Sci.* 170: 151-158.

- Hausinger, R. P. (1997) Metallocenter assembly in nickel-containing enzymes, *J. Biol. Inorg. Chem.* 2: 279-286.
- He, J., Ma, C., Ma, Y., Li, H. Kang, J., Liu, T., Polle, A., Peng C., Luo Z. B. (2013) Cadmium tolerance in six poplar species. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20: 163-174.
- He, Y. (2004) Nitric oxide represses the Arabidopsis floral transition. *Science* 305: 1968-1971.
- Heinloth A., Brune B., Fischer B., Galle J. (2002) Nitric oxide prevents oxidised LDL-induced p53 accumulation, cytochrome c translocation and apoptosis in macrophages via guanylate cyclase stimulation. *Atherosclerosis* 162: 93-101.
- Hermle, S., Günhardt-Goerg, M., Schulin, R.. (2006) Effects of metal-contaminated soil on the performance of young trees growing in model ecosystems under field conditions. *Environ. Pollut.* 144: 703-714.
- Hermle, S., Vollenweider, P., Günhardt-Goerg, M., McQuattie, C., Matyssek, R. (2007) Leaf responsiveness of *Populus tremula* and *Salix viminalis* to soil contaminated with heavy metals and acidic rainwater. *Tree Physiol.* 27: 1517-1531.
- Hollenbach, B., Schreiber, I., Hartung, W., Dietz, K. J. (1997) Cadmium leads to stimulated expression of the lipid transfer protein genes in barley: implication for the involvement of lipid transfer proteins in wax assembly. *Planta* 203: 9-19.
- Hong, Y. Y., Pan, X. Q., Welti, R., Wang, X. M. (2008) Phospholipase D alpha 3 is involved in the hyperosmotic response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20: 803-816.
- Howden, R., Goldsborough, P. B., Anderson, C. R., Cobbett, C. S. (1995). Cadmium-sensitive, *cad1* mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. *Plant Physiol.* 107: 1059-1066.
- Hsu, B. D., Lee, J. Y. (1988) Toxic effects of copper on photosystem II of spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* 87: 116-119.
- Hu, C. (2003) Black rice (*Oryza sativa* L. Indica) pigmented fraction suppresses both reactive oxygen species and nitric oxide in chemical and biological model systems, *J. Agric. Food Chem.*, 51:5271-5291.
- Huang, D., Ou B., Prior, L. R. (2005) The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 1841-1853
- Huttermann, A., Arduini, I., Gbold D. L., (1999) Metal pollution and Forest decline In: Prasad MNV. Hagemeyer J. (eds.) Heavy metal stress in plants. Springer Verlag. Berlin. pp. 253-272.
- Igarashi, K., Kashiwagi, K. (2000) Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271: 559-564.

- Imai, A., Akiyama, T., Kato, T., Sato, S., Tabata, S., Yamamoto, K. T., Takahashi, T. (2004) Spermine is not essential for survival of *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* 556: 148-152.
- Imam, H. S., Mehvar, R. (2006) Rapid determination of reduced and oxidized glutathione levels using a new thiol masking reagent and enzymatic recycling method. Application on the rat liver bile samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 385: 105-113.
- Isaeva, E. V. Lozhkina, G. A. Ryazanova, T. V. (2010) A study of the alcohol extract from balsam poplar buds. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 36: 929-933.
- Jackson, A. P., Alloway, B. J., (1991) The transfer of cadmium from sewage sludge amended soils into the edible component of food crops. *Water Air Soil Poll.* 57:873-881.
- Jacobs, M., Rubery, P. H. (1988) Naturally occurring auxin transport regulators. *Science* 241: 346-349.
- Janero, D. R. (1990) Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic. Biol. Med.* 9: 515-40.
- Jean, L. (2008) Effect of citric acid and EDTA on chromium and nickel uptake and translocation by *Datura innoxia*, *Environ. Pollut.* 153: 555-563.
- Jensen, D. E., Belka, G. K., Du Bois, G. C. (1998) S-Nitrosoglutathione is a substrate for rat alcohol dehydrogenase class III isoenzyme. *Biochem. J.* 331: 659-668
- Johnson, P., Ecker, J. (1998) The ethylene gas signal transduction pathwaya molecular perspective. *Annu. Rev. Genet.* 32: 227-254.
- Jovanović, B. (1967) Dendrologija sa osnovama fitocenologije. Naučna knjiga, Beograd
- Julkunen-Tiitto, R. (1985) Chemotaxonomical screening of phenolic glycosides in northern willow twigs by capillary gas chromatography. *J. Chromatogr.* 324: 129-139.
- Kabata-Pendias A., Pendias, H. (1992) *Trace Elements in Soils and Plants*, 2nd edition, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H. (2001) *Trace Elements in Soils and Plants*, 3 rd ed., CRC Press Inc., Boca Raton, FL, pp. 413.
- Kadukova, J, Manousaki, E, Kalogerakis, N. (2006) Lead and cadmium accumulation from contaminated soils by *Nerium oleander*. *Acta Metallurgica Slovaca* 12: 181-187.

Karaman, M., Petrović, O., Knežević, P., Simeunović, J. (2010) Interekcije gljiva sa teškim metalima, Departman za biologiju i ekologiju, Univerzitet u Novim Sadu, Novi Sad.

Katoh, A., Shoji, T., Hashimoto, T. (2007) Molecular cloning of N-methylputrescine oxidase from tobacco. *Plant Cell Physiol.* 48: 550-554.

Kaur-Sawhney, R., Tiburcio, A.F., Atabella, T., Galston, A.W. (2003) Polyamines in Plants: An Overview, *J. Cell Mol. Biol.* 2: 1-12.

Kebert, M., Trudić, B., Stojnić, S., Orlović, S., Štajner, D., Popović, B., Galić, Z. (2011) Estimation of antioxidant capacities of poplar clones involved in phytoremediation processes. STREPOW International Workshop, February 23-24, 2011, Andrevlje-Novi Sad, Serbia. p. 273-280.

Kerkeb L., Kramer, U. (2003) The role of free histidine in xylem loading of nickel in *Alyssum lesbiacum* and *Brassica juncea*, *Plant Physiol.* 131: 716-724.

Kevrešan, S., Petrović, N., Popović, M., Kandrač, J. (1998) Effect of Heavy Metals on Nitrate and Protein Metabolism in Sugar Beet, *Biol. Plant.* 41: 235-240.

Khalid, B. Y., Tinsley, J. (1980) Some Effects of Nickel Toxicity on Rye Grass, *Plant Soil* 55: 139-144.

Khan, A. G. (2006) Mycorrhizoremediatio-An enhanced form of phytoremediation. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* 7: 503-51.

Kidd, P. S. (2001) The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.). *J. Exp. Bot.* 52: 1339-1353.

Kim, C. G., Bell, N. B., Power S. A. (2003) Effects of soil cadmium on *Pinus sylvestris* L. seedlings. *Plant and Soil* 257: 443-449.

King, B. J., Siddiqi, M. Y., Glass, A. D. M. (1992) Studies of uptake of nitrite in barley. Estimation of root cytoplasmic nitrate concentration using nitrate reductase activity-implications for nitrite influx. *Plant Physiology.* 99: 1582-1589.

Klapheck, S., Crost, B., Stark, J., Zimmermann, H. (1992) Glutamylcysteinylserine: a new homologue of glutathione in plants of the family *Poaceae*. *Bot. Acta* 105: 174-179.

Kochian L. V. (1991) In: Micronutrients in Agriculture (Eds: J. J. Mortvedt), Soil Science Society of America Madison, WI, pp. 251-270.

Kohler, A., Blaudez, D., Chalot, M., Martin, F. (2004) Cloning and expression of multiple metallothioneins from hybrid poplar. *New Phytol.* 164: 83-93.

Kömives, T., Gullner, G., Rennenberg, H., Casida, J. E. (2003) Ability of poplar (*Populus* spp.) to detoxify chloroacetanilide herbicides. *Water Air Soil Pollut. Focus* 3: 277-28.

Kositsin, A. V., (1991) Interaction of Metals and Enzymes, Ustoichivost' k tyazhelym metallam dikorastushchikh vidov (Resistance of Wild Species to Heavy Metals), Alekseeva-Popova, N.V., Ed., Leningrad: Lenuprizdat, pp. 15-22.

Kovačević, G, Kastori R, Merkulov Lj. (1999) Dry matter and leaf structure in young wheat plants as affected by cadmium, lead, and nickel. *Biologia Plantarum* 42: 119-123.

Kovtun, Y., Chiu, W. L., Tena, G., Sheen, J. (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 97: 2940-2945.

Kozlow, M. V. (2005) Pollution resistance of mountain birch, *Betula pubescens* subsp. *czerepanovii*, near the copper-nickel smelter: Natural selection or phenotypic acclimation? *Chemosphere* 59: 189-197.

Králová, K., Sersen, F., Blahová, M. (1994) Effects of Cu (II) complexes on photosynthesis in spinach chloroplasts. Aqua (aryloxiacetato) copper (II) complexes. *Gen. Physiol. Biophys.* 13:483-491.

Krämer, U., Chardonnens, A. N. (2001) The use of transgenic plants in the bioremediation of soils contaminated with trace elements. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55: 661-672.

Krupa, Z., Baranowska, M., Orzol, D., (1996) Can anthocyanins be considered as heavy metal stress indicator in higher plants? *Acta Physiol. Plant.* 18:147-162.

Krupa, Z., Baszynski, T. (1995) Some Aspects of Heavy Metals Toxicity towards Photosynthetic Apparatus - Direct and Indirect Effects on Light and Dark Reactions, *Acta Physiol. Plant.* 17: 177-190.

Krupa, Z., Moniak, M. (1998) The stage of leaf maturity implicates the response of the photosynthetic apparatus to cadmium toxicity. *Plant Sci.* 138:19-156.

Kukier, U. (2004) The effect of pH on metal accumulation in two *Alyssum* species, *J. Environ. Qual.* 33: 2090-2102.

Kumar, A., Altabella, T., Taylor, M., Tiburcio, A. F. (1997) Recent advances in polyamine research. *Trends Plant Sci.* 2: 124-130.

Kupper, H., Kupper, F., Spiller, M. (1998) *In situ* detection of heavy metal substituted chlorophylls in water plants, *Photosynth. Res.* 58: 125-133.

Kuppusamy, K., Walcher, C., Nemhauser, J. (2009) Cross-regulatory mechanisms in hormone signaling. *Plant Mol. Biol.* 69: 375-381.

- Kurepa, J., van Montagu M., Inze, D. (1997) Expression of *sodCp* and *sodB* genes in *Nicotiana tabacum*: effects of light and copper excess. *J. Exp. Bot.* 48: 2007-2014
- Kurner, L. E., Mfller, L. M., Jens_n, P. (1987) Effects of Ca^{2+} and other divalent cations on uptake of Ni^{2+} by excised barley roots, *Physiol. Plant.* 71, 49-54.
- Kusano, T., Yamaguchi, K., Berberich, T., Takahashi, Y. (2007) Advances in polyamine research in 2007. *J. Plant Res.* 120:345-350.
- Kuznetsov ,V., Radyukina, N. L., Shevyakova, N. I. (2006) Polyamine and stress: Biological role, metabolism and regulation. *Russian J. of Plant Physiology* 5: 658-683.
- Kwak, J. M., Mori, I. C., Pei, Z. M., Leonhardt, N., Torres, M. A., Dangl, J. L., Bloom, R. E., Bodde, S., Jones, J. D., Schroeder, J. I. (2003) NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 22: 2623-2633.
- Lacina, C., Germain, G., Spiros, A. N. (2003) Utilization of fungi for biotreatment of raw watewaters, *African journal of biotechnology* 2: 625-627.
- Lahr, W., Raschke, K. (1988) Abscisic-acid contents and concentrations in protoplasts from guard cells and mesophyll cells of *Vicia faba* L. *Planta* 173: 528-531.
- Lamattina, L., Garcia-Mata, C., Graziano, M., Pagnussat, G. (2003) Nitric oxide: The versatility of an extensive signal molecule. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 109-136.
- Landhüsser, S. M., Muhsin, T. M., Zwiazek, J. J. (2002) The effect of ectomycorrhizae on water relations in aspen (*Populus tremuloides*) and white spruce (*Picea glauca*) at low soil temperatures. *Can J. Bot.* 80: 684-689.
- Lankinen, P., Kähkönen, M. A., Rajasärkkä, J., Virta, M., Katakka, A. (2011) The effect of nickel contamination on the growth of litter-decomposing fungi, extracellular enzyme activation and toxicity in soil, *Boreal Enviroment Research* 23: 236-237.
- Laureysens, I., De Temmerman, L., Hastir, T., Van Gysel, M., Ceulemans, R., (2005) Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a poplar coppice culture. II. Vertical distribution and phytoextraction potential. *Environmental Pollution* 133, 541-551.
- Lavid N., Schwartz A., Yarden O., Tel-Or E. (2001) The involvement of polyphenols and peroxidase acitivities in heavy metal accumulation by epidermal glands of waterlily (*Nymphaeaceaea*). *Planta* 212: 323-342.

- Lee, U., Wie, C., Fernandez, B. O., Feelisch, M., Vierling, E. (2008) Modulation of Nitrosative Stress by S-Nitrosoglutathione Reductase Is Critical for Thermotolerance and Plant Growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 20: 786-802.
- Leng, P., Qi, J.X. (2003) Effect of anthocyanin on David peach (*Prunus davidiana* Franch) under low temperature stress, *Sci. Hort.* 97: 27-37.
- Letierrier, M., Airaki, Barroso J.B., Palma, J. M., del Río L. A., Corpas, F. J. (2010) Arsenic impairs the metabolism of RNS and ROS in *Arabidopsis* plants. Salamanca: International Symposium on the Pathophysiology of Reactive Oxygen and Nitrogen Species. ISBN: 978-84-692-9284-6.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., Lamb, C. (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583-593.
- Lichtenthaler, H. K., Wellburn, A. R. (1983) Determination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Trans.* 11: 591-592.
- Lidon, F. C., Henriques, F. S. (1993) Changes in the thylakoid membrane polypeptide patterns triggered by excess Cu in rice. *Photosynthetica* 28:109-117.
- Lindroth, R. L, Peterson, S. S. (1988) Effects of plant phenols on performance of southern armyworm larvae. *Oecologia* 75: 185-189.
- Linger, P, Ostwald, A., Haensler, J. (2005) *Cannabis sativa* L. growing on heavy metal contaminated soil: growth, cadmium uptake and photosynthesis. *Biologia Plantarum* 49: 567-576.
- Liu, J. H, Kitashiba, H., Wang, J., Ban, Y., Moriguchi, T. (2007) Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants. *Plant Biotechnol.* 24: 117-126.
- Liu, K., Fu, H., Bei, Q., Luan, S. (2000) Inward potassium channel in guard cells as a target for polyamine regulation of stomatal movements. *Plant Physiol.* 124: 1315-1326.
- Liu, L., Hausladen, A., Zeng, M., Que, L., Heitman, J., Stamler, J. S. (2001) A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* 410: 490-494.
- Ljung, K., Bhalerao, R. P., Sandberg, G. (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant J.* 29: 325-332.
- Loikema, P. C., Vooijs R. (1986) Copper tolerance in *Silene-Cucubalus* - subcellular distribution of copper and its effects on chloroplasts and platocyanin synthesis. *Planta* 167: 30-36.

Lozano- Rodriguez, E., Hernandez, L.E., Bonay, P., Carpena-Ruiz, R. O. (1997) Distribution of Cd in shoots and root tissues of maize and pea plants: physiological distribution. *J. Exp. Bot.* 48: 123-128.

Luna, C. M., González, C. A., Trippi, V. S. (1994) Oxidative damage caused by excess of copper in oat leaves. *Plant Cell Physiol.* 35:11-15.

Lunáčková, L., Šottníková, A., Masarovičová, E., Lux, A., Streško, V. (2003) Comparison of cadmium effect on willow and poplar in response to different cultivation conditions. *Biologia Plantarum* 47: 403-411.

Lunáčková, L., Masarovičová, E., Králova, K., Streško, V. (2003) Response of fast growing woody plants from family *Salicaceae* to cadmium treatment. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 70: 576-585.

Luo, Y., Rimmer, D. L. (1995) Zinc-copper interaction affecting plant growth on a metal -contaminated soil, *Environ. Pollut.* 88: 79-83.

Madhava Rao, K. V., Sresty, T. V. S. (2000) Antioxidative parameters in the seedlings of pigeon pea (*Cajanuscajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stress. *Plant Sci.* 157: 113-128.

Maitani, T., Kubota, H., Sato, K., Yamada, T. (1996) The composition of metal bound to class III metallothioneins (phytochelatin and its desglycyl peptide) induced by various metals in root culture of *Rubiatinctorum*. *Plant Physiol.* 110: 1145-1150.

Maksimiec, W., Baszynski, T. (1996) Chlorophyll II fluorescence in primary leaves of excess Cu treated runner bean plants depends on their growth stages and the duration of Cu action. *J Plant Physiol.* 149:196-200.

Maksymiec, W. (1997) Effect of Copper on Cellular Processes in Higher Plants, *Photosynthetica* 34: 321-342.

Malenčić Đ., Cvejić J. M., Miladinovic J. A. (2012) Polyphenol Content and Antioxidant Properties of Colored Soybean Seeds from Central Europe. *Journal of medicinal food* 15: 89-95.

Malenčić Đ., Kiproviski B., Popović M. T., Prvulović D. Miladinovic J. A. Đordjević V. B (2010) Changes in antioxidant systems in soybean as affected by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary *Plant physiology and biochemistry*, 48: 903-908.

Manju, M., R., Balakrishum, K., P., (2001): Physiological response to sublethal concentration of nickel on marine and freshwater algae, *Indian, J. Fish.* 7: 160-163.

Marchant, A., Kargul, J., May, S. T., Muller, P., Delbarre, A., Perrot Rechenmann, C., Bennet, M. J. (1999) AUX1 regulates root gravitropism in *Arabidopsis* by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *EMBO J.* 18: 2066-2073.

- Marchiol, L., Leita, L., Martin, M., Peresotti, A. Zerbi, G. (1996) physiological responses of two soybean cultivars to cadmium. *J Environm Qual.* 25: 562-566.
- Marjanović, Ž., Uwe, N., Hampp, R. (2005) Mycorrhiza formation enhances adaptive response of hybrid poplar to drought. *Ann. NY Acad. Sci.* 1048: 496-499.
- Marrs, K. A., Walbot, V. (1997) Expression and RNA splicing of the maize glutathione- S- transferase Bronze2 gene is regulated by cadmium and other stresses. *Plant Physiol.* 113:93-102.
- Marschner, H (1995) Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London.
- Martin-Tanguy, J. (1985) The occurrence and possible function of hydroxycinnamoyl acid amides in plants. *Plant Growth Regul.* 3: 381-399.
- Martin-Tanguy, J., (2001) Metabolism and Function of Polyamines in Plants: Recent Development (New Approaches), *Plant Growth Regul.* 3: 135-148.
- Mathys, W. (1997) The role of malate, oxalate and mustard oil glucosides in the evolution of zinc resistance of herbage plants. *Physiol. Plant.* 40: 130-136.
- McGrath, S. P. (2006) Field evaluation of Cd and Zn phytoextraction potential by the hyperaccumulators *Thlaspi caerulescens* and *Arabidopsis halleri*. *Environ.Pollut.* 141: 115-125.
- McKown, R., Kuroki, G., Warren, G. (1996) Cold responses of *Arabidopsis* mutants impaired in freezing tolerance, *J. Exp. Bot.*, 47: 1919-1932.
- Meagher, R. B. (2000) Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 153-162.
- Metwally, A., Safronova, V.I., Belimov, A.A., Dietz, K. J. (2004) Genotypic variation of the response to Cd toxicity in *Pisum sativum* L. *J. Exp. Bot.* 56: 167-178.
- Milborrow, B. V. (2001) The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: A review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. *J. Exp. Bot.* 52: 1145-1164.
- Miller, G., Shulaev, V., Mittler, R. (2008) Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiol. Plantarum* 133: 481-489.
- Miller, N., Rice-Evans, C. (1997) Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS radical cation assay. *Free Radical Research* 26: 195-199.

Milone, M. T., Sgherri C., Clijters H., Navari-Izzo F. (2003) Antioxidative responses of wheat treated with realistic concentration of Cd. *Environ. Exp. Bot.* 405-410.

Milošević N., Bogdanović D., Ubavić M., Čuvarčić M. (1995) *Mikrobiologija*, 259-262.

Mimica-Dukić, N. (1997) *In vivo* i *in vitro* ispitivanja antioksidantnih svojstava biljnih ekstrakata, *Arh. farm.* 5: 475-493.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9:490-498.

Mohanty, N., Vass, I., Demeter, S. (1989a) Copper toxicity affects photosystem II electron transport at the secondary quinone acceptor QB. *Plant Physiol.* 90: 175-179.

Mohanty, N., Vaas, I., Demeter, S. (1989b) Impairment of Photosystem 2 Activity at the Level of Secondary Quinone Electron Acceptor in Chloroplasts Treated with Cobalt, Nickel and Zinc Ions, *Physiol. Plant.* 76: 386-390.

Molas, J. (2002) Changes of chloroplast ultrastructure and total chlorophyll concentration in cabbage leaves caused by excess of organic Ni (II) complexes, *Environ. Exp. Bot.* 47: 111-126.

Molas, J., (2001) Comparison of nickel toxicity and resistance strategies of cabbage plants grown in soil with addition of inorganic and organic Ni (II) complexes, *Dev. Plant Soil Sci.* 92: 464-465.

Moon, H., Lee, B., Choi, G., Shin, D., Prasad, D.T., Lee, O., Kwak, S. S., Kim, D. H., Nam, J., Bahk, J., Hong J. C., Lee, S. Y., Cho M. J, Lim, C. O., Yun, D. J. (2003) NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 100: 358-363.

Morgan, J. F., Klucas, R. V., Grayer, R. J., Abian, J., Becana, M. (1997) Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: prooxidant and antioxidant properties. *Free Radic. Biol. Med.* 22: 861-875.

Morgan, J. F., Becana, I., Turbe-Ormaetxe, I., Frechilla, S., Klucas, R., Aparicio-Tejo, P. (1994) Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta* 194: 346-352.

Mori, I. C., Muto, S. (1997) Abscisic acid activates a 48-kilodalton protein kinase in guard cell protoplasts. *Plant Physiol.* 113: 833-839.

Morkunas, I., Gmerek, J. (2007) The possible involvement of peroxidase in defense of yellow lupine embryo axes against *Fusarium oxysporum*. *Journal of Plant Physiology* 164: 185-194.

- Morrison, R. S., Brooks, R. D., Reeves, R. D., Malaise, F., Iiorowitz, P., Aronson, M., Merriam, G. R. (1981) The diverse chemical forms of heavy metals in tissue extracts of metallophytes from Shaba province, Zaire. *Photochem.* 20: 155-158.
- Moustakas, M., Ouyounidou, G., Symeonidis, L., Karatagalis, S. (1997) Field studies of the effect of excess copper on wheat photosynthesis and productivity. *Soil Sci Plant Nutr* 43: 531-539.
- Moya, J. L., Ros, R., Picazo, I. (1995) Heavy metal-hormone interactions in rice plants effects on growth, net photosynthesis, and carbohydrate distribution. *J Plant Growth Reg.* 14: 61-67.
- Mulrooney, S. B., Hausinger, R. P. (2003) Nickel uptake and utilization by microorganisms, *FEMS Microbiol. Rev.*, 27: 239-261.
- Munoz, F. J., Uilan, R.V., Labrador, E., Dopico, B. (1998) Increased expression of two cDNAs encoding metallothionein-like proteins during growth of *Cicer arietinum*. *epicoryls. Physiol. Plant* 101: 273-279.
- Murata, Y., Pei, Z. M., Mori, I. C., Schroeder, J. (2001) Abscisic acid activation of plasma membrane Ca^{2+} channels in guard cells require cytosolic NAD(P)H and is differentially disrupted upstream and down stream of reactive oxygen species production in abi 1-1 and abi2-1 phosphatase 2C mutants. *Plant Cell* 13: 2513-2523.
- Navari-Izzo, F., Quartacci, M. F., Pinzino, C., Dalla Vecchia, F., Sgherri, C. L. M. (1998) Thylakoid-bound and stromal enzymes in wheat treated with excess copper. *Physiol. Plant.* 104: 630-638.
- Neill, S. J., Desikan, R., Clarke, A., Hancock, J. T. (2002) Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol.* 128: 13-16.
- Neill, S., Barros, R., Bright, J., Desikan, R., Hancock, J., Harrison, J., Morris, P., Ribeiro, D., Wilson, I. (2008) Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *J. Exp. Bot.* 59: 165-176.
- Nieminen, T. M., Ukonmaanaho, L., Rausch, N., Shoty, W. (2007) Biogeochemistry of nickel and its release into the environment, *Met. Ions Life Sci.* 2: 1-30.
- Nikolić, N., Kojić, D., Pilipović, A., Pajević, S., Krstić, B., Borišev, M., Orlović, S. (2008) Responses of hybrid poplar to cadmium stress: Photosynthetic characteristics, cadmium and proline accumulation and antioxidative enzyme activity. *Acta Biologica Cracoviensia* 50: 95-103.
- Noctor, G., Foyer, C. H. (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 249-279.
- Nomura, H., Komori, T., Kobori, M., Nakahira, Y., Shiina, T. (2008) Evidence for chloroplast control of external Ca^{2+} -induced cytosolic Ca^{2+} transients and stomatal closure. *Plant J.* 53: 988-998

Nonhebel, J. M., Cooney T. P., Simpson, R. (1993) The route, control and compartmentation of auxin synthesis. *Aust. J. Plant Physiol.* 20: 527-539.

Normanly, J. P., Slovin, J., Cohen, J. (1995) Rethinking auxin biosynthesis and metabolism. *Plant Physiol.* 107: 323-329.

Nozzolillo, C. (2002). Anthocyanins of jack pine (*Pinus banksiana*) seedlings, *Can. J. Bot.*, 80: 796-811.

Oller, A. R., Costa, M., Oberd_rster, G. (1997) Carcinogenicity assessment of selected nickel compounds, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 143: 152-166.

Oshima, T. (2007) Unique polyamines produced by an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *Amino Acids* 33: 367-372.

Ouzounidou, G., Eleftheriou, E. P., Karataglis, S. (1992) Ecophysiological and ultrastructural effects of copper in *Thlaspi ochroleucum* (Cruciferae). *Can. J. Bot.* 70:947-957.

Ouzounidou, G., Moustakas, M., Strasser, R. J. (1997) Sites of action of copper in the photosynthetic apparatus of maize leaves: kinetic analysis of chlorophyll fluorescence, oxygen evolution, absorption changes and thermal dissipation as monitored by photoacoustic signals. *Aust. J. Plant Physiol.* 24:81-90.

Oven, M., Grill, E., Golan-Goldhirsh, A., Kutcxhan, T. M., Zenk, M. H. (2002) Increase in free cysteine and citric acid in plant cells exposed to cobalt ions. *Phytochemistry* 60: 467-474.

Pajević, S., Borišev, M., Nikolić, N., Krstić, B., Pilipović, A., Orlović, S. (2009) Phytoremediation capacity of poplar (*Populus spp.*) and willow (*Salix spp.*) clones in relation to photosynthesis. *Archive of Biological Science* 61: 239-247.

Palme, K., Gälweiler, L. (1999) PIN-pointing the molecular basis of auxin transport. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 375-381.

Panda, G. C., Das, S. K., Bandopadhyay, T. S., Guha, A. K. (2007) Adsorption of nickel on husk of *Lathyrus sativus*: Behavior and binding mechanism. *Colloids Surf. B.* 57: 135-142.

Panda, S. K., Chaudhury, I., Khan, M. H. (2003) Heavy metal induce lipid peroxidation and affect antioxidants in leaves of wheat. *Biologia Plantarum* 46: 289-294.

Pandey, N., Sharma C. P. (2002) Effect of heavy metals Co^{2+} , Ni^{2+} and Cd^{2+} on growth and metabolism of cabbage, *Plant Sci.* 163: 753-758.

Pandolfini, T., Gabbrielli, R., Comparini, C. (1992) Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of *Triticum aestivum* L. *Plant Cell Environ.* 15; 719-725.

- Papadakis, A. K., Roubelakis-Angelakis, K. A. (2005) Polyamines inhibit NADP oxidase mediated superoxide generation and putrescine prevents programmed cell death induced by polyamine oxidase-generated hydrogen peroxide. *Planta* 220: 826-837.
- Papadopoulos, A. (2007) Determination and evaluation of cadmium, copper, nickel, and zinc in agricultural soils of western Macedonia, Greece. *Environ. Manage.* 40: 719-726.
- Pätsikkä, E., Aro, E. M., Tyystjärvi, E. (1998) Increase in the quantum yield of photoinhibition contributes to copper toxicity in vivo. *Plant Physiol.* 117:619-627.
- Paul, M. Pellny, T. K. (2003) Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. *J. Exp. Bot.* 54: 539-547.
- Peer, W. A., Brown, D., Taiz, L., Muday, G. K., Murphy, A. S. (2001) Flavonol accumulation patterns correlate with developmental phenotypes of transparent testa mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 126: 536-548.
- Pei, Z. M., Murata, Y., Benning, C., Thomine, S., Klusener, B., Allen, G. J., Grill, E., Schroeder, J. M. (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells: *Nature* 406: 731-734.
- Perazzolli, M., Dominici, P., Romero-Puertas, M. C., Zago, E., Zeier, J., Sonoda, M., Lamb, C., Delledonne, M. (2004) Arabidopsis nonsymbiotic hemoglobin AHb1 modulates nitric oxide bioactivity. *Plant Cell* 16: 2785-2794.
- Perfus-Barbeoch, L., Leonhardt, N., Vavasseur, A., Forestier, C. (2002) Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *Plant J.* 32: 539-548.
- Persans, M. W., Nieman, K., Salt, D. E. (2001) Functional activity and role of cation-efflux family members in Ni hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 9997-10000.
- Peuke, A. D., Rennenberg, H. (2005) Phytoremediation: molecular biology, requirements for application, environmental protection, public attention, and feasibility. *EMBO J.* 6: 497-501.
- Piccini, D. F., Malavolta, E. (1992) Effect of Nickel on Two Common Bean Cultivars, *J. Plant Nutr.* 15: 2343-2350.
- Pietrini, F., Iannelli, M. A., Pasqualini, S., Massacci, A. (2003) Interaction of Cadmium with glutathion photosynthesis in developed leaves and chloroplasts of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. Ex. Steudel. *Plant Physiol.* 133:829-837.
- Pilipović, A. (2005) Uloga topola (*Populus sp.*) u fitoremedijaciji voda zagađenih nitratima, Magistarska teza, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

Pilipović, A., Nikolić, N., Orlović, S., Petrović N., Krstić, B. (2005) Cadmium phytoextraction potential of poplar clones (*Populus sp.*). *Zeitschrift für Naturforschung C* 60: 247-251.

Pilon-Smits, E. (2005) Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56:15-39.

Pilon-Smits, E., Pilon, M. (2002) Phytoremediation of metals using transgenic plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21:439-456.

Podar, D., Ramsey, M. H., Hutchings, M. J. (2004) Effect of cadmium, zinc and substrate heterogeneity on yield, shoot metal concentration and metal uptake by *Brassica juncea*: Implications for human health risk assessment and phytoremediation, *New Phytol.* 163: 313-324.

Polie, A. (2001) Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-gltathione pathway by metabolic medeling:computer analysis as a step towards flux analysis. *Plant physiol.* 126:445-462.

Pollard, A. J., Powell, K. D., Harper, F. A., Smith, J. A. C. (2002) The genetic basis of metal hyperaccumulation in plants, *Crit. Rev. Plant Sci.* 21: 539-566.

Pontier, D., Gan, S., Amasino, R., Roby, D., Lam, E. (1999) Markers for hypersensitive response and senescence show distinct pattern of expression. *Plant Mol Biol.* 39: 1243-125.

Poschenrieder, C., Gunse, B., Barcelo, J. (1989) Influence of cadmium on water relations, stomatal resistance and abscisic acid content in expanding bean leaves. *Plant Physiol.* 90:1365-1371.

Prasad, M. N. V., Strzalka, K. (1999) Impact of heavy metals on photosynthesis. In: Prasad MNV, Hagemeyer J (eds), *Heavy Metal Stress in Plants*, pp. 117-138. Springer Publishers, Berlin.

Pratico D., Lawson, J. A., Rokach, J., Fitzgerald G. A. (2001) The isoprostanes in biology and medicine. *Trends Endocrinol. Metab.* 12: 243-247.

Prior, R. L., Cao, G. H. (2000) Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: A review. *J. AOAC Int.* 83: 950-956.

Quartacci, M. F., Pinzino, C., Sgherri, C. L. M., Dalla Vecchia, F., Navari- Izzo, F. (2000) Growth in excess copper induces changes in the lipid composition and fluidity of PSII-enriched membranes in wheat. *Physiol. Plant.* 108:87-93.

Quy Hai, D., Kovacs, K., Matkovics, I., Matkovics, B. (1975) Properties of enzymes X., Peroxidase and superoxide dismutase contents of plant seeds. *Biochem Physiol Pflanzen.* 167: 357-359.

Rademacher, P. (2005) Schwermetallgehalte in den KompartimentenwichtigerWirtschaftsbaumarten und derenBedeutungfür die Reststoffverwertung. *HolzRoh. Werkstoff.* 63: 220-230.

- Ramirez-Tortosa, (2001) Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats, *Free Radical Biol. Med.* 31: 1033-1056
- Rathnayake, I. V. N., Mellavarapu, M., Naidu, R., (2010) Tolerance of heavy metals by Gram positive bacteria, *International Journal of Civil and Environmental Engineering* 4: 192-195.
- Rausser, W. E. (1995) Phytochelatins and related peptides: structure, biosynthesis and functions. *Plant Physiol.* 109: 1141-1149.
- Rausser, W. E. (1999) Structure and function of metal chelators produced by plants-the case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins, *Cell Biochem. Biophys.* 31: 19-48.
- Raven, J. A., Evans, M. C. W., Korb, R. E. (1999) The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O₂-evolving organisms. *Photosynth. Res.* 60: 111-149.
- Rea, P. (1999) MRP subfamily ABC transporters from plants and yeast. *J. Exp. Bot.* 50: 895-913.
- Rea, P. A., Li, Z. S., Lu, Y. P., Drosdowicz, Y. M., Martinoia, E. (1995) From vacuolar GS-X pumps to multi-specific transporters. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant mol. Biol.* 49: 727-760, 1998. alt, D. E., Rausser, W. E.: Mg-ATP dependent transport of phytochelatins across the tonoplast of oat roots. *Plant Physiol.* 107: 1293-1301.
- Renger, G., Gleiter, H. M., Haag, E., Reifarh, F. (1993) Photosystem II: Thermodynamics and kinetics of electron transport from QA to QB (QB⁻) and deleterious effects of copper (II). *Z. Naturforsch.* 48c:234-240.
- Rhee, H. J., Kim, E. J., Lee, J. K. (2007) Physiological polyamines: simple primordial stress molecules. *J. Cell. Mol. Med.* 11: 685-703.
- Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20: 933-944.
- Rice-Evans, C. E., Miller, N. J. (1996) Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem. Soc. Trans.* 24: 790-795.
- Ridnour, L. A., Thomas, D. D., Mancardi, D., Espey, M. G., Miranda, K. M., Paolocci, N., Feelisch, M., Fukuto, J., Wink, D.A. (2004) The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. *Biol. Chem.* 385: 1-10.
- Rob, M., Roelfsema, G., Hedrich, R. (2005) In the light of stomatal opening: new insights into 'the Watergate'. *New Phytol.* 167: 665-691.
- Robinson, B. H., Brooks, R. R., Clothier, B. E, (1999) Soil amendments affecting nickel and cobalt uptake by *Berkheya coddii*: Potential use for phytomining and phytoremediation, *Ann. Bot.* 84: 689-694.

- Rock, C. D. (2000) Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. *New Phytol.* 148: 357-396.
- Romero-Puertas, M. C., McCarthy, I., Sandalio, L.M., Palma, J.M., Corpas, F. J., Gomez, M., del Rio, L. A., (1999) Cadmium toxicity and oxidative metabolism of pea leaf peroxisomes. *Free Rad. Res.* 31: 25-31.
- Roncel, M., Ortega, J. M., Losada, M. (2001) Factors determining the special redox properties of photosynthetic cytochrome b559. *Eur. J. Biochem.* 268: 4961-4968.
- Rubio, M. L., Escrig, I., Martinezcortina, C., Lopezbenet, F. J., Sanz, A. (1994) Cadmium and nickel accumulation in rice plants - effects on mineral-nutrition and possible interactions of abscisic and gibberellic acids. *Plant Growth Reg* 14: 151-157.
- Ruste'rucci, C., Espunya, M. C., Diaz, M., Chabannes, M., Martinez, M. C. (2007) S-Nitrosoglutathione reductase affords protection against pathogens in *Arabidopsis*, both locally and systemically. *Plant Physiol.* 143: 1282-1292.
- Sairam, R. K., Singh, D. V., Srivastava, G. C. (2004) Changes in activities of antioxidant enzymes in sunflower leaves of different ages. *Biologia Plantarum* 47: 61-66.
- Saito, K. (2004) Sulfur assimilatory metabolism. The long and smelling road. *Plant Physiol.* 136: 2443-2450
- Sakihama Y., Cohen M. F., Grace S. C., Yamasaki H. (2002) Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolisc-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* 177: 67-80.
- Sakihama Y., Mano J., Sano S., Asada K., Yamasaki H. (2000) Reduction of phenoxyl radicals mediated by monodehydroascorbate reductase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 279: 949-962.
- Salt, D. E. (2000) In: *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water* (Eds: N. Terry, G. Banuelos), Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp. 189-200.
- Salt, D. E., Prince, R. C., Piekerling, U., Raskin, I. (1995) Mechanism of cadmium mobility and accumulation in Indian Mustard. *Plant Physiol.* 109: 1472-1433.
- Salt, D. E., Smith, R. D., Raskin, I. (1998) Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 643-668.
- Salt, D.E, Rauser, W.E. (1995) MgATP-dependent transport of phytochelatins across the tonoplast of oat roots. *Plant Physiol.* 107: 1293-1301.
- Samson, G., Morissette, J. C., Popović, R. (1988) Copper quenching of the variable fluorescence in *Dunaliella tertiolecta*. New evidence for a copper inhibition effect on PSII photochemistry. *Photochem. Photobiol.* 84: 329-332.

Samuelsson, G., Öquist, G. (1980) Effects of copper chloride on photosynthetic electron transport and chlorophyll-protein complexes of *Spinacea oleracea*. *Plant Cell Physiol.* 21: 445-454.

Sanchez-Moreno, C. (2002) Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci. Technol. Int.* 8: 121-137.

Sanita di Toppi, I., Lambardi, M., Pecchioni, N., Pazzagli, L., Durante, M., Gabrielli, M., di Toppi, L. S. (1999b) Effects of cadmium stress on hairy roots of *Daucus carota*. *J Plant Physiol.* 199: 385-391.

Sanita di Toppi, L. S., Lambardi, M., Pazzagli, L., Cappugi, G., Durante, M., Gabrielli, R. (1998) Response to cadmium in carrot in vitro plants and cell suspension cultures. *Plant Sci.* 137: 119-129.

Sanita di Toppi, L., Gabrielli, R. (1999a) Response to cadmium in higher plants. *Environm. Exp. Bot.* 41: 105-130.

Sarkar, S., Satheskumar, A., Jayanathi, R., Premkumar, R., (2010) Biosorption of nickel by live biomass of *Trichoderma harzianum*, *Research Journal of Agricultural Science* 6: 70-82.

Schickler, H., Caspi, H. (1999) Response of antioxidative enzymes to nickel and cadmium stress in hyperaccumulator plants of the genus *Alyssum*. *Physiol. Plant.* 105: 39-44.

Schmoger, M. C., Oven, M., Grill, E. (2000) Detoxification of arsenic by phytochelatin in plants. *Plant Physiol.* 128: 793-801.

Schröder, W. P., Arellano, J. B., Bittner, T., Barón, M. (1994) Flashinduced absorption spectroscopy studies of copper interaction with photosystem II in higher plants. *J. Biol. Chem.* 52: 32865-32870.

Schurr, U., Gollan, T., Schulze, E. D. (1992) Stomatal response to drying soil in relation to changes in the xylem sap composition of *Helianthus annuus*. II. Stomatal sensitivity to abscisic acid imported from the xylem sap. *Plant Cell Environ.* 15: 561-567.

Schutzendubel, A., Nikolova, P., Rudolf, C., Polle A. (2002a) Cadmium and H₂O₂-induced oxidative stress in *Populus x canescens* roots. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 577-584.

Schutzendubel, A., Polle, A. (2002b) Plant responses to abiotic stresses: heavy metals induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J. Exp. Bot.* 53: 1351-1365.

Schutzendubel, A., Schwanz, P., Teichmann, T., Gross, K., Langenfeldheyser, R., Godbold, D., Polle A. (2001) Cadmium induced changes in antioxidative system. H₂O₂ content and differentiation in pine (*Pinus sylvestris*) roots. *Plant Physiol.* 127: 887-898.

Schwitzgudubel, J. P., Van der Lelie, D., Baker, A., Glass, D., Vangronsveld, J. (2002) Phytoremediation: European and American trends: successes, obstacles and needs. *J. Soils Sediments* 2: 91-99.

- Seregin, I. V., Ivanov, V. B. (2001) Physiological Aspects of Cadmium and Lead Toxic Effects on Higher Plants, *Fiziol. Rast. (Moscow)*, 48: 606-630. *Russ. J. Plant Physiol., Engl. Transl.* 5: 523-544.
- Seregin, I. V., Kozhevnikova, A. D. (2006) Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants, *Russ. J. Plant Physiol.* 53: 257-277.
- Sersen, K., Králová, K., Bumbálová, A., Svajlenova, O. (1997) The effect of Cu(II) ions bound with tridentate Schiff base ligands upon the photosynthetic apparatus. *J. Plant Physiol.* 151: 299-305.
- Sgherri C., Cosi E., Navari -Izzo F. (2003) Phenols and antioxidative status of *Raphanus sativus* grown in copper excess. *Physiol. Plant.* 118: 21-35.
- Shah, K., Dubey, R. S. (1998) Effect of cadmium on proline accumulation and ribonuclease activity in rice seedlings: role of proline as possible enzyme protectant. *Biol. Plant.* 40: 121-130.
- Shah, K., Kumar, R. G., Verma, S., Dubey, R. S. (2001) Effects of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Sci.* 161: 1135-1144.
- Shakya, P. R. (2007) Nickel adsorption by wild type and nickel resistant isolate of *Chlorella sp.* *J. Anal. Environ. Chem.* 8: 87-90.
- Shariati, M., Yahyaabudi, S. (2006) The effect of different concentration of cadmium on the growth rate and beta-caroten synthesis in unicellular green algae *Dunaliella salina*, *Iranian Journal of Science and Technology A.* 30: 58-62.
- Sharp, R. E., LeNoble, M. E., Else, M. A., Thorne, E. T., Gherardi, F. (2000) Endogenous ABA maintains shoot growth in tomato independently of effects on plant water balance: Evidence for an interaction with ethylene. *J. Exp. Bot.* 51: 1575-1584.
- Sheoran, I. S., Singal, H. R., Singh, R. (1990) Effects of cadmium and nickel on photosynthesis and the enzymes of the photosynthetic carbon reduction cycle in pigeon pea (*Cajanus cajan L.*). *Photosynth. Res.* 23: 345-351.
- Shim, I. S., Momose, Y., Yamamoto, A., Kim, D. W., Usui, K. (2003) Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relationship to salicylic acid accumulation in plants. *Plant Growth Regul.* 39: 285-292.
- Shioi, Y., Tamai, H., Sasa, T. (1978a) Effects of copper on photosynthetic electron transport systems in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 19: 203-209.
- Shioi, Y., Tamai, H., Sasa, T. (1978b) Inhibition of photosystem II in the green algae *Ankistrodesmus falcatus* by copper. *Plant Physiol.* 44: 434-438.

Simon, L. M., Fatrai, Z., Jonas, D. E., Matkovic, B. (1974): Study of peroxide metabolism enzymes during the development of *Phaseolus vulgaris*. *Biochem. Physiol. Pfl.* 166: 387-392.

Simpson, G. G. (2005) NO flowering. *Bioessays* 27: 239-241.

Singel, H., Singel, A. (1986) Metal Ions in Biological Systems, Concepts on Metal Ion Toxicity, vol 20, Eds., New York: Marcel Dekker

Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299: 152-178.

Siripornadulsil, S., Traina, S., Verna, D. P., Sayre R. T. (2002) Molecular mechanism of proline mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *Plant Cell* 14:2837-2847.

Sirko, A., Blaszczyk, A., Liszewska, F. (2004) Overproduction of SAT and/or OASTL in transgenic plants: a survey of effects. *J. Exp. Bot.* 55: 1881-1888.

Skorzynska-Polit, E., Baszynski, T. (1997) Differences in sensitivity of the photosynthetic apparatus in Cd-stressed runner bean plants in relation to their age. *Plant Sci.* 128: 11-22.

Solecka, D., Kacperska, A., (2003) Phenylpropanoid deficiency affects the course of plant acclimation to cold, *Physiol. Plant.* 119: 253-265.

Soler-Rivas, C., Espin, J. C., Wichers, H. J. (2000) An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochem. Anal.* 11: 330-338.

Solymosi, K. (2004) Depending on concentration, Hg²⁺ reacts with different components of the NADPH: protochlorophyll I deoxidoreductase macrodomains, *Plant Biol.* 6: 358-363.

Somashekariah, B. V., Podmaja, K., Prasad, A. R. K. (1992) Phytotoxicity of cadmium ions on germination seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): Involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. *Physiol. Plant.* 85: 85-89.

Spollen, W. G., LeNoble, M. E., Samuels, T. D., Bernstein, N., Sharp, R. E. (2000) Abscisic acid accumulation maintains maize primary root elongation at low water potentials by restricting ethylene production. *Plant Physiol.* 122: 967-976.

Srinivasan, C., Liba, A. Imlay, J., Valentine, J. S., Gralla, E. B. (2000) Yeast lacking superoxide dismutase(s) show elevated levels of "free iron" as measured by whole cell electron paramagnetic resonance. *J Biol Chem.* 275:29187-29192.

Štajner D., Popović, B. (2008) Oksidativni stres kod biljaka, Novi Sad.

- Štajner, D., Orlović, S., Popović, B. M., Kebert, M., Galić, Z. (2011) Screening of drought oxidative stress tolerance in Serbian melliferous plant species. *Afr. J. Biotechnol.* 10: 1609-1614.
- Štajner, D., Orlović, S., Popović, B. M., Kebert, M., Stojnić, S., Klačnja, B. (2013) Chemical parameters of oxidative stress adaptability in beech. *J. Chem.* 4: 1-8.
- Štajner, D., Popović, B. (2008) Oksidativni stres kod biljaka, Novi Sad.
- Stobraw, K., Lorenc-Plucińska, G. (2007) Changes in antioxidant enzyme activity in the fine roots of black poplar (*Populus nigra L.*) and cottonwood (*Populus deltoides Bartr. ex Marsch*) in a heavy-metal-polluted environment, *Plant Soil.* 298: 57-68.
- Stohs S. J., Bagchi, D., Hassoun, E., Bagchim, M. (2001) Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions, *J. Environ. Pathol.Toxicol.Oncol.* 20: 77-88.
- Stohs S.J., Bagchi, D. (1995) Oxidative mechanism in the toxicity of metal ions. *Free Rad. Biol. Med.* 18: 321-336
- Stolt, J.P., Sneller, F. F. C., Bryngelsson, T., Lundborg, T., Schat, H. (2003) Phytochelatin and cadmium accumulation in wheat. *Environ. Exp. Bot.* 49: 21-28.
- Stoscheck, C. M. (1990) Quantitation of Proteins. *Methods in Enzymology* 182: 50-69.
subjected to Zn excess. *Biol. Plant* 54: 502-508.
- Suzuki, N., Koizumi, N., Sano, H. (2001) Screening of cadmium-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 24: 1177-1188
- Sykes, M., Yang, V., Blankenburg, J., Abu Bakr, S. (1999) Biotechnology: working with nature to improve forest resources and products. *Int. Environ. Conf.* 29: 631-637.
- Szalontai, B. (1999) Molecular rearrangements of thylakoids after heavy metal poisoning, as seen by Fourier transform infrared (FTIR) and electron spin resonance (ESR) spectroscopy, *Photosynth. Res.*, 61: 241-252.
- Tabor, C. W., Tabor, H. (1984) Polyamines. *Annu Rev Biochem.* 53: 749-790.
- Tadolini, B. (1989) Polyamine inhibition of lipoperoxidation. The influence of polyamines on iron oxidation in the presence of compounds mimicking phospholipids polar heads. *Biochem. J.* 249: 33-36.
- Taitz, L., Zeiger, E. (2002) *Plant Physiology*, 3rd ed., Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Takahama U., Oniki T. (2000) Flavonoid and some other phenolics as substrates of peroxidase: physiological significance of the redox reactions. *J. Plant Res.* 113: 301-315.

- Takahashi, S., Katagiri, T., Hirayama, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2001) Hyperosmotic stress induces a rapid and transient increase in inositol 1, 4, 5-trisphosphate independent of abscisic acid in *Arabidopsis* cell culture. *Plant Cell Physiol.* 42: 214-222.
- Talanova, V. V., Titov, A. F., Boeva, N. P. (2000) Effects of increasing concentrations of lead and cadmium on cucumber seedlings. *Biologia Plant* 43: 441-444.
- Tang, R. H., Han, S., Zheng, H., Cook, C. W., Choi, C. S., Woerner, T. E., Jackson, R. B., Pei, Z. M. (2007) Coupling diurnal cytosolic Ca²⁺ oscillations to the CAS-IP₃ pathway in *Arabidopsis*. *Science* 315: 1423-1426.
- Tatrai, E. (2001) Comparative in vitro toxicity of cadmium and lead on redox cycling in type II pneumocytes, *J. Appl. Toxicol.* 21: 479-483.
- Thieme, H., Benecke, R. (1971) Die Phenolglykoside der Salicaceen. Mitteilung: Untersuchung über die Glykosidakkumulation in einigen mitteleuropäischen Populus-Arten. *Pharmazie* 26: 227-231.
- Thomas, T., Thomas, T. J. (2001) Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol. Life Sci.* 58: 244-258.
- Thumann, J., Grill, E., Winnacker, E. L., Zenk, M. H. (1991) Reactivation of metal-requiring enzymes by phytochelatinmetal complexes. *FEBS Lett.* 284: 66-69.
- Todeschini, V, Franchin, C, Castiglione, S, Burlando, B., Biondi, S., Torrigiani, P., Berta, G., Lingua, G. (2007) Responses to copper of two registered poplar clones inoculated or not with arbuscular mycorrhizal fungi. *Caryologia* 60: 146-155.
- Trudić, B., Kebert, M., Popović, B. M., Štajner, D., Orlović, S., Galović V. (2012) The level of oxidative stress in poplars due to heavy metal pollution in soil. *Baltic forestry* 18: 214-227.
- Tsai, P., Tsai, T.H., Yu, C., Ho, S. C. (2007) Comparison of NO-scavenging and NO-suppressing activities of different herbal teas with those of Green Tea, *Food Chem.* 103: 181-187.
- Tun, N. N., Santa-Catarina, C., Begum, T., Silveira, V., Handro, W., Floh, E. I. S., Scherer, G. F. E. (2006) Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis* thaliana seedlings. *Plant Cell Physiol.* 47: 346-354.
- Turnau, K., Orłowska, E., Ryszka, P., Zubek, S. Anielska, T., Gawronski, S., Jurkiewicz, A. (2006) Role of mycorrhizal fungi in phytoremediation and toxicity monitoring of heavy metal rich industrial wastes in southern Poland in Twardowska et al. (eds.) *Soil and Water Pollution Monitoring, Protection and Remediation* 3-23.

Urano, K., Maruyama, K., Ogata, Y., Morishita Y, Takeda, M., Sakurai, N., Suzuki, H., Saito, K., Shibata, D., Kobayashi, M., Yamaguchi, Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2009) Characterization of the ABA-regulated global responses to dehydration in *Arabidopsis* by metabolomics. *Plant J.* 57: 1065-1078.

Urano, K., Yoshiba, Y., Nanjo, T., Igarashi, Y., Seki, M., Sekiguchi, F., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2003) Characterization of *Arabidopsis* genes involved in biosynthesis of polyamines in abiotic stress responses and developmental stages. *Plant Cell Environ.* 26: 1917-1926.

Vacchina, V. (2003) Speciation of nickel in a hyperaccumulating plant by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray MS/MS assisted by cloning using yeast complementation. *Anal. Chem.* 75: 2740-2745.

Valderrama, R., Corpas, F. J., Carreras, A., Fernandez-Ocana, A., Chaki, M., Luque, F., Gomez-Rodriguez, M. V., Colmenero-Varea, P., Del Rio, L. A., Barroso, J. B. (2007) Nitrosative stress in plants. *FEBS Lett.* 581: 453-461.

Van Assche, F., Clijster, H. (1990) Effects of metal in enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ.* 13: 773-780.

Van der Lelie, D., Schwitzguébel, J. P., Glass, D. J., Vangronsveld, J., Baker, A. (2001) Assessing phytoremediation's progress in the United States and Europe. *Environ. Sci. Technol.* 35: 446A-452A.

Vardar-Unlu, G., Silici, S., Unlu, M. (2008) Composition and in vitro antimicrobial activity of *Populus* buds and poplar-type propolis. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 1011-1017.

Vassilev, A., Schwitzguebel, J. P., Thewys, T., van der Lelie, D., Vangronsveld, J. (2004) The use of plants for remediation of metal-contaminated soils. *Sci. World J.* 4: 9-34.

Veeranjaneyulu, K., Das, V. S. R. (1982) Intrachloroplast Localization of ^{65}Zn and ^{63}Ni in a Zn-Tolerant Plant, *Ocimum basilicum Benth*, *J. Exp. Bot.* 33: 1161-1165.

Verma, A. R., Vijayakumar M., Rao C. V., Mathela C. S. (2010) In vitro and in vivo antioxidant properties and DNA damage protective activity of green fruit of *Ficus glomerata*. *Food Chem. Toxicol.* 48: 704-70.

Vierke, G., Struckmeier, P. (1977) Binding of copper (II) to protein of the photosynthetic membrane and its correlation with inhibition of electron transport in class II chloroplasts of spinach. *Z. Naturforsch.* 32c:605-610.

Vine, J. H., Noiton, D., Plummer, J. A., Lucas, C. B., Mullins, M. G. (1987) Simultaneous quantification of indole-3-acetic acid and abscisic acid in small samples of plant tissues by gas chromatography/mass spectrometry/selected ion monitoring. *Plant Physiol.* 85: 419-422.

Vinit-Dunand, F. Epron, D. Alaoui-Sosse, B. Badot, P. M. (2002) Effects of copper on growth and on photosynthesis of mature and expanding leaves in cucumber plant. *Plant Sci.* 163:53-58.

- Vogeli-Range, F., Wagner, G. (1990) Subcellular localization of cadmium and cadmium binding peptides in tobacco leaves. Implication of a transport function for cadmium binding peptides. *Plant Physiol.* 92: 1086-1093.
- Vogeli-Range, L. Wagner, G. (1996) Relationship between cadmium, glutathione and cadmium-binding peptides (phytochelatins) in leaves of intact tobacco seedlings. *Plant Sci.* 114: 11-18.
- Wagner, G. J. (1993) Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Adv Agron.* 51: 173-212.
- Walters, D. R. (2003) Resistance to plant pathogens: possible roles for free polyamines and polyamine catabolism. *New Phytol.* 159: 109-115.
- Wang, H., Nakazato, T., Sakanishi, K., Yamada, O., Tao, H., Saito, I. (2004a) Microwave digestion with HNO₃/H₂O₂ mixture at high temperatures for determination of trace elements in coal by ICP/OES and ICP-MS. *Analytica Chimica Acta* 514: 115-12.
- Wang, H., Shan, X. Q., Wen, B., Zhang, S., Wang, Z. J. (2004b) Responses of antioxidative enzymes to accumulation of copper in a copper hyperaccumulator of *Commoelina communis*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 47: 185-192.
- Wang, Y., Yun, B. W., Kwon, E., Hong, J. K., Yoon, J., Loake, G. J. (2006) S-Nitrosylation: An emerging redox-based post-translational modification in plants. *J. Exp. Bot.* 57: 1777-1784.
- Watt, R. K., Ludden, P. W. (1998) The identification, purification, and characterization of CooJ. A nickel-binding protein that is co-regulated with the Ni-containing CO dehydrogenase from *Rhodospirillum rubrum*, *J. Biol. Chem.* 273: 10019-10025.
- Wen, X. P., Pang, X. M., Matsuda, N., Kita, M., Inoue, H., Hao, Y. J., Honda, C., Moriguchi, T. (2007) Over-expression of the apple spermidine synthase gene in pear confers multiple abiotic stress tolerance by altering polyamine titers. *Transgenic Res.* 17: 251-263.
- West, M. B., Hill, B. G., Xuan, Y. T., Bhatnagar, A. (2006) Protein glutathiolation by nitric oxide: An intracellular mechanism regulating redox protein modification. *FASEB J.* 20: 1715-1717.
- White, P. I., Broadley, M. R. (2003) Calcium in Plants. *Ann Bot.* 92: 487-511.
- White, P. J., Broadley, M. R. (2000) Mechanisms of caesium uptake by plants. *New Phytol.* 147: 241-256.
- Wilkinson, S., Davies, W. J. (1997) Xylem sap pH increase: A drought signal received at the apoplastic face of the guard cell that involves the suppression of saturable abscisic acid uptake by the epidermal symplast. *Plant Physiol.* 113: 559-573.

Wolfe, A. K., Bjornstad, D. J. (2002) Why would anyone object? An exploration of social aspects of phytoremediation acceptability. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21: 429-438.

Woodala, B., Borak, N., Bernula, D., Ortog, A. (2013) Impact of zinc and copper stress on the photosynthesis of three poplar lines studied by gas exchange, chlorophyll fluorescence and P700 absorbance, Book of final reports "Characterization and oxidative stress tolerance in plants: from models to trees. HUSRB/1002/214/036 pp. 39.

Wortham, B. W., Patel, C. N., Oliveira, M. A. (2007) Polyamines in bacteria: pleiotropic effects yet specific mechanisms. *Adv Exp Med Biol.* 603: 106-115.

Wu, S. L., Feng, X. B., Wittmeier, A. (1997) Microwave digestion of plant and grain reference materials in nitric acid or a mixture of nitric acid and hydrogen peroxide for the determination of multielements by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 12: 797-806.

Wua, F., Zhang, G., Dominy, P. (2003) Four barley genotypes respond differently to cadmium: lipid peroxidation and activities of antioxidant capacity. *Environ. Exp. Bot.* 50: 63-78.

Xiaoyue, L., Clifford, E., La Motte, Cecil, R., Stewart, I., Norman, P., Cloud, S., Wear, B., Cai-Zhong, J. (1992) Determination of IAA and ABA in the same plant sample by a widely applicable method using GC-MS with Selected Ion Monitoring. *J. Plant Growth Regul.* 11: 55-65.

Yamaguchi, K., Takahashi, Y., Berberich, T., Imai, A., Miyazaki, A., Takahashi, T., Michael, A., Kusano, T. (2006) The polyamine spermine protects against high salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 580: 783-6788.

Yamaguchi, K., Takahashi, Y., Berberich, T., Imai, A., Takahashi, T., Michael, A., Kusano, T. (2007) A protective role for the polyamine spermine against drought stress in *Arabidopsis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352: 86-490.

Yamasaki, H., Cohen, M. F. (2006) NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants? *Trends Plant Sci.* 11: 522-524.

Yamasaki, H., Sakihama, Y., Ikehara, N., (1997) Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂, *Plant Physiol.* 115:1405.

Yanai J., Zhao F. J., McGrath S. P., Kosaki T. (2006) Effect of soil characteristics on Cd uptake by the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, *Environ. Pollut.* 139: 167-175.

Yasuhara, T., K. Nokihara. (2001) High-throughput analysis of total nitrogen content that replaces the classic Kjeldahl method. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4581-4583.

- Ye, B., Müller, H., Zhang, J., Gressel, J., (1997) Constitutively Elevated Levels of Putrescine and Putrescine-Generating Enzymes Correlated with Oxidant Stress Resistance in *Coniza bonariensis* and Wheat, *Plant Physiol.* 115: 1443-1451.
- Yoda, H., Hiroi, Y., Sano, H. (2006) Polyamine oxidase is one of the key elements for oxidative burst to induce programmed cell death in tobacco cultured cells. *Plant Physiol.* 142: 193-206.
- Yoda, H., Yamaguchi, Y., Sano, H. (2003) Induction of hypersensitive response by hydrogen peroxide produced through polyamine degradation in tobacco plants. *Plant Physiol.* 132:1973-1981.
- Yoshino, M., Murakami, K., (1998) Interaction of iron with polyphenolic compounds: application to antioxidant characterization, *Anal. Biochem.* 257: 40-61.
- Yruela, I., Montoya, G., Alonso, P. A., Picorel, R. (1991) Identification of the pheophytin-QA-Fe domain of the reducing side of the photosystem II as the Cu(II)-inhibitory binding site. *J. Biol. Chem.* 266: 22847-22850.
- Yruela, I., Alfonso, M., Barón, M., Picorel, R. (2000) Copper effect on the protein composition of photosystem II. *Physiol. Plant.* 110: 551-557.
- Yruela, I., Gatzen, G., Picorel, R., Holzwarth, A. R. (1996a) Cu(II)- inhibitory effect on photosystem II from higher plants. A picosecond time-resolved fluorescence study. *Biochemistry* 35: 9469-9474.
- Zacchini, M., Pietrini, F., Mugnozza, G. S., Iori, V., Pietrosanti, L., Massacci, A. (2009) Metal tolerance, accumulation and translocation in poplar and willow clones treated with cadmium in hydroponics. *Water, Air and Soil Pollution* 197: 23-34.
- Zayed, A., Gowthaman, S., Terry, N. (1998) Phytoaccumulation of trace elements by wetlands plants: I. Duckweed. *Journal of Environmental Quality* 27: 715-721.
- Zeidler, D., Zahringer, U., Gerber, I., Dubery, I., Hartung, T., Bors, W., Hutzler, P., Durner, J. (2004) Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: Lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 15811-15816.
- Zeremski, T. (2005) Određivanje sadržaja teških metala i njihovog oblika vezivanja u černozeu Vojvodine metodom sekvencijalne ekstrakcije, Magistarska teza, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Zhang, A., Jiang, M., Zhang, J., Tan, M., Hu, X. (2006) Mitogen activated protein kinase is involved in abscisic acid induced antioxidant defense and acts downstream of reactive oxygen species production in leaves of maize plants. *Plant Physiol.* 141:475-487.

Zhang, X., Hung, T. M., Phuong, P. T., Ngoc, T. M., Min, B. S., Song, K. S., Seong, Y. H., Bae, K. (2006) Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Populus davidiana*. *Arch. Pharm. Res.* 29: 1102-8.

Zhao, J., Shi, G., Yuan, Q. (2008) Polyamines content and physiological and biochemical responses to ladder concentration of nickel stress in *Hydrocharis dubia* (Bl.) Backer leaves, *BioMetals* 21: 665-674.

Zhu, Y. L., Pilon-Smits, E. A. H., Tarun, A. S., Weber, S. U., Jouanin, L., Terry, N. (1999) Cadmium tolerance and accumulation in Indian mustard is enhanced by overexpressing γ -glutamylcysteinesynthetase. *Plant Physiol.* 121: 1169-1177.

Zsigmond, L., Rigo, G., Szarka, A., Szekely, G., Otvos, K., Darula, Z., Medzihradzsky, K. F., Koncz, C., Koncz, Z., Szabados, L. (2008) Arabidopsis PPR40 connects abiotic stress responses to mitochondrial electron transport. *Plant Physiol.* 146: 1721-1737.

8. PRILOG

Tabela 11. Integracija pikova nastalih HPLC/DAD analizom slobodnih poliamina (Put, Spd i Spm) u listovima klona topole Pe 19/66 pod uticajem jona teških metala različite koncentracije

Broj hromatograma	Biljni organ	Metal	Koncentracija metala	Poliamin	Retenciono vreme (min)	Površina pika	Visina pika	Koncentracija (nmol/g s.m.)
2a	List	Kontrola	0	Put	8.630	24409	1477	42.5
2a	List	Kontrola	0	Spd	12.363	1305	124	1.2
2a	List	Kontrola	0	Spm	13.730	2013	157	1.3
5a	List	Ni	50	Put	8.643	32046	1866	185.0
5a	List	Ni	50	Spd	12.343	1377	112	3.8
5a	List	Ni	50	Spm	13.620	768	64	1.4
8a	List	Ni	150	Put	8.630	22953	1366	131.2
8a	List	Ni	150	Spd	12.373	1370	120	3.8
8a	List	Ni	150	Spm	13.850	2490	113	4.6
11a	List	Kontrola	0	Put	8.633	37771	2336	211.9
11a	List	Kontrola	0	Spd	12.337	7441	598	20.1
11a	List	Kontrola	0	Spm	13.633	1005	75	1.8
14a	List	Cu	50	Put	13.697	2346	152	393.0
14a	List	Cu	50	Spd	8.843	24425	1540	9.2
14a	List	Cu	50	Spm	12.443	10529	631	0.0
17a	List	Cu	150	Put	8.577	23423	1397	130.8
17a	List	Cu	150	Spd	12.323	2161	172	5.8
17a	List	Cu	150	Spm	13.690	1177	77	2.1
20a	List	Kontrola	0	Put	8.740	22100	1347	128.8
20a	List	Kontrola	0	Spd	12.403	3542	227	9.9
20a	List	Kontrola	0	Spm	13.733	2654	172	5.0
23a	List	Cd	50	Put	8.743	57679	3526	323.6
23a	List	Cd	50	Spd	12.423	3264	283	8.8
23a	List	Cd	50	Spm	13.760	3354	189	6.1
26a	List	Cd	150	Put	8.750	19936	1064	112.4
26a	List	Cd	150	Spd	12.440	1079	93	2.9
26a	List	Cd	150	Spm	13.630	857	47	1.6

Tabela 12. Integracija pikova nastalih HPLC/DAD analizom slobodnih poliamina (Put, Spd i Spm) u korenovima klona topole Pe 19/66 pod uticajem jona teških metala različite koncentracije

Broj hromatograma	Biljni organ	Metal	Koncentracija metala (mg/kg)	Poliamin	Retenciono vreme (min)	Površina pika	Visina pika	Koncentracija (nmol/g s.m.)
29a	Koren	Kontrola	0	Put	8.743	20402	1269	118.9
29a	Koren	Kontrola	0	Spd	12.403	5588	324	15.7
29a	Koren	Kontrola	0	Spm	13.700	153	21	0.3
32a	Koren	Ni	50	Put	8.790	25783	1554	148.8
32a	Koren	Ni	50	Spd	12.437	10306	678	28.7
32a	Koren	Ni	50	Spm	13.747	130	13	0.2
35a	Koren	Ni	150	Put	8.780	27635	1704	163.4
35a	Koren	Ni	150	Spd	12.437	4403	289	12.5
35a	Koren	Ni	150	Spm	13.663	678	44	1.3
38a	Koren	Kontrola	0	Put	8.810	16812	1032	98.5
38a	Koren	Kontrola	0	Spd	12.410	2686	184	7.6
38a	Koren	Kontrola	0	Spm	13.697	2346	152	4.5
41a	Koren	Cu	50	Put	8.843	24425	1540	137.0
41a	Koren	Cu	50	Spd	12.443	10529	631	28.5
41a	Koren	Cu	50	Spm	13.710	979	77	1.8
44a	Koren	Cu	150	Put	8.857	26735	1683	155.1
44a	Koren	Cu	150	Spd	12.487	1536	105	4.3
44a	Koren	Cu	150	Spm	13.787	535	50	1.0
47a	Koren	Kontrola	0	Put	8.847	8665	609	50.0
47a	Koren	Kontrola	0	Spd	12.440	2039	130	5.7
47a	Koren	Kontrola	0	Spm	13.783	700	35	1.3
50a	Koren	Cd	50	Put	8.870	15092	942	86.7
50a	Koren	Cd	50	Spd	12.480	4471	263	12.4
50a	Koren	Cd	50	Spm	13.763	1113	51	2.1
53a	Koren	Cd	150	Put	8.847	7181	461	41.1
53a	Koren	Cd	150	Spd	12.463	1062	64	2.9
53a	Koren	Cd	150	Spm	13.770	1092	60	2.0

Tabela 13. Integracija pikova nastalih HPLC/DAD analizom konjugovanih poliamina (Put, Spd i Spm) u listovima klona topole Pe 19/66 pod uticajem jona teških metala različite koncentracije

Broj hromatograma	Organ	Metal	Koncentracija metala (mg/kg)	Poliamin	Retenciono vreme (min)	Površina pika	Visina pika	Koncentracija poliamina (nmol/g s.m.)
2b	List	Kontrola	0	Konj Put	8.603	6814	401	386.8
2b	List	Kontrola	0	Konj Spd	12.380	850	59	180.1
2b	List	Kontrola	0	Konj Spm	13.700	2301	146	12.8

5b	List	Ni	50	Konj Put	8.667	28113	1734	451.8
5b	List	Ni	50	Konj Spd	12.353	1959	123	190.6
5b	List	Ni	50	Konj Spm	13.607	940	50	8.9
8b	List	Ni	150	Konj Put	8.700	18813	1164	326.5
8b	List	Ni	150	Konj Spd	12.380	2986	210	235.7
8b	List	Ni	150	Konj Spm	13.423	722	63	12.2
11b	List	Kontrola	0	Konj Put	8.687	25861	1620	322.3
11b	List	Kontrola	0	Konj Spd	12.780	23360	1415	173.2
11b	List	Kontrola	0	Konj Spm	13.723	995	78	12.7
14b	List	Cu	50	Konj Put	8.580	62948	3825	393.6
14b	List	Cu	50	Konj Spd	12.323	5296	383	122.6
14b	List	Cu	50	Konj Spm	13.700	878	62	8.7
17b	List	Cu	150	Konj Put	8.567	39628	2390	372.8
17b	List	Cu	150	Konj Spd	12.340	7190	482	211.6
17b	List	Cu	150	Konj Spm	13.733	1427	89	7.3
20b	List	Kontrola	0	Konj Put	8.687	57440	3433	257.1
20b	List	Kontrola	0	Konj Spd	12.353	14149	959	161.0
20b	List	Kontrola	0	Konj Spm	13.683	3621	236	15.1
23b	List	Cd	50	Konj Put	8.707	44593	2712	538.5
23b	List	Cd	50	Konj Spd	12.393	4083	268	133.9
23b	List	Cd	50	Konj Spm	13.753	1021	61	15.7
26b	List	Cd	150	Konj Put	8.730	18102	1126	295.8
26b	List	Cd	150	Konj Spd	12.410	2460	182	222.2
26b	List	Cd	150	Konj Spm	13.703	244	24	16.2

Tabela 14. Integracija pikova nastalih HPLC/DAD analizom konjugovanih poliamina (Put, Spd i Spm) u korenovima klona topole Pe 19/66 pod uticajem jona teških metala različite koncentracije

Broj hromatograma	Organ	Metal	Koncentracija metala (mg/kg)	Poliamin	Retenciono vreme (min)	Površina pika	Visina pika	Koncentracija poliamina (nmol/g s.m.)
29b	Koren	Kontrola	0	Konj Put	8.720	19890	1190	114.7
29b	Koren	Kontrola	0	Konj Spd	12.390	4663	281	117.4
29b	Koren	Kontrola	0	Konj Spm	13.733	842	58	16.2
2bis	Koren	Ni	50	Konj Put	8.810	7402	466	153.5
2bis	Koren	Ni	50	Konj Spd	12.460	316	34	193.2
2bis	Koren	Ni	50	Konj Spm	13.647	698	52	10.9
38c	Koren	Ni	150	Konj Put	8.757	13175	849	244.5
38c	Koren	Ni	150	Konj Spd	12.373	1814	121	202.7
38c	Koren	Ni	150	Konj Spm	13.697	2040	144	8.8
41c	Koren	Kontrola	0	Konj Put	8.757	19223	1192	87.8
41c	Koren	Kontrola	0	Konj Spd	12.403	7060	407	113.8
41c	Koren	Kontrola	0	Konj Spm	13.697	415	26	4.0
44c	Koren	Cu	50	Konj Put	8.790	19023	1168	331.7
44c	Koren	Cu	50	Konj Spd	12.390	1527	95	212.4
44c	Koren	Cu	50	Konj Spm	13.670	954	59	12.6
47b	Koren	Cu	150	Konj Put	8.787	14614	930	209.4

47b	Koren	Cu	150	Konj Spd	12.410	2545	155	161.2
47b	Koren	Cu	150	Konj Spm	13.793	1182	89	8.2
47b	Koren	Kontrola	0	Konj Put	8.787	14614	930	87.8
47b	Koren	Kontrola	0	Konj Spd	12.410	2545	155	36.1
47b	Koren	Kontrola	0	Konj Spm	13.793	1182	89	5.7
50b	Koren	Cd	50	Konj Put	8.820	13888	865	176.4
50b	Koren	Cd	50	Konj Spd	12.423	3238	209	109.4
50b	Koren	Cd	50	Konj Spm	13.677	109	14	9.9
53b	Koren	Cd	150	Konj Put	8.810	7402	466	76.9
53b	Koren	Cd	150	Konj Spd	12.460	448	41	39.7
53b	Koren	Cd	150	Konj Spm	13.647	698	52	4.5

Tabela 15. Integracija pikova nastalih HPLC/DAD analizom slobodnih poliamina (Put, Spd i Spm) u listovima različitih klonova topola pod uticajem različitih koncentracija jona Cu²⁺

Broj hromatograma	Organ	Klon	Metal	Koncentracija tretmana (mg/kg)	Retenciono vreme (min)	Poliamin	Površina pika	Visina pika	Površina standarda	Količina poliamina (nmol)	Koncentracija poliamina (nmol/g s.m.)
1ak	List	M1	Cu	0	9.037	Put	35535	2124	83816	11.438	339.433
	List	M1	Cu	0	12.513	Spd	32014	2282	133911	4.404	147.123
	List	M1	Cu	0	13.783	Spm	7365	515	160122	1.000	35.846
1bk	List	M1	Cu	0	9.087	Put	51830	2989	83816	14.169	420.458
	List	M1	Cu	0	12.527	Spd	46272	3177	133911	6.252	208.864
	List	M1	Cu	0	13.760	Spm	8613	627	160122	1.176	42.137
2ak	List	M1	Cu	0	9.153	Put	44157	2598	83816	11.968	347.185
	List	M1	Cu	0	12.553	Spd	41154	2795	133911	4.518	147.532
	List	M1	Cu	0	13.817	Spm	9401	633	160122	0.797	27.934
2bk	List	M1	Cu	0	8.997	Put	59646	3524	83816	6.693	194.169
	List	M1	Cu	0	12.480	Spd	53750	3786	133911	1.519	49.605
	List	M1	Cu	0	13.757	Spm	11877	800	160122	0.382	13.369
3ak	List	M1	Cu	100	9.083	Put	109014	6480	83816	20.512	605.909
	List	M1	Cu	100	12.537	Spd	66948	4384	133911	6.349	211.129
	List	M1	Cu	100	13.770	Spm	10418	753	160122	1.002	35.729
3bk	List	M1	Cu	100	9.080	Put	95252	5728	83816	23.666	699.073
	List	M1	Cu	100	12.573	Spd	60728	3929	133911	7.673	255.146
	List	M1	Cu	100	13.800	Spm	12251	762	160122	1.136	40.520
4ak	List	M1	Cu	100	9.077	Put	107322	6369	83816	18.446	549.902
	List	M1	Cu	100	12.527	Spd	67046	4495	133911	3.193	107.156
	List	M1	Cu	100	13.773	Spm	11683	840	160122	0.788	28.362
4bk	List	M1	Cu	100	9.013	Put	100063	6056	83816	22.244	663.133
	List	M1	Cu	100	12.493	Spd	56520	4022	133911	4.041	135.613

	List	M1	Cu	100	13.750	Spm	10716	759	160122	0.672	24.189
5ak	List	M1	Cu	300	9.150	Put	102351	6257	83816	18.341	562.312
	List	M1	Cu	300	12.563	Spd	59953	4049	133911	2.624	90.551
	List	M1	Cu	300	13.780	Spm	11137	791	160122	0.438	16.234
5bk	List	M1	Cu	300	9.077	Put	108976	6682	83816	20.800	637.726
	List	M1	Cu	300	12.517	Spd	65293	4253	133911	2.690	92.844
	List	M1	Cu	300	13.757	Spm	10494	737	160122	0.438	16.219
6ak	List	M1	Cu	300	9.110	Put	102075	6020	83816	18.891	573.755
	List	M1	Cu	300	12.540	Spd	53434	3689	133911	2.284	78.076
	List	M1	Cu	300	13.763	Spm	8330	631	160122	0.361	13.231
6bk	List	M1	Cu	300	12.493	Put	56520	4022	83816	23.136	702.677
	List	M1	Cu	300	13.750	Spd	10716	759	133911	5.418	185.248
	List	M1	Cu	300	9.150	Spm	102351	6257	160122	0.859	31.497
7ak	List	B229	Cu	0	9.077	Put	35690	2033	83816	4.344	127.723
	List	B229	Cu	0	12.530	Spd	29127	1999	133911	0.854	28.260
	List	B229	Cu	0	13.753	Spm	3807	284	160122	0.123	4.371
7bk	List	B229	Cu	0	9.040	Put	32631	1851	83816	5.407	158.984
	List	B229	Cu	0	12.517	Spd	28254	1909	133911	1.001	33.149
	List	B229	Cu	0	13.753	Spm	4121	297	160122	0.171	6.057
8ak	List	B229	Cu	0	8.947	Put	35888	2064	83816	5.081	148.721
	List	B229	Cu	0	12.470	Spd	29565	2006	133911	0.983	32.399
	List	B229	Cu	0	13.720	Spm	4560	323	160122	0.170	6.011
8bk	List	B229	Cu	0	9.017	Put	31562	1885	83816	5.651	165.419
	List	B229	Cu	0	12.490	Spd	27270	1932	133911	1.081	35.610
	List	B229	Cu	0	13.710	Spm	4267	319	160122	0.132	4.651
9ak	List	B229	Cu	100	9.067	Put	78080	4717	83816	11.482	340.719
	List	B229	Cu	100	12.543	Spd	25725	1781	133911	0.586	19.591
	List	B229	Cu	100	13.790	Spm	3218	228	160122	0.150	5.373
9bk	List	B229	Cu	100	9.093	Put	82775	5037	83816	14.384	426.847
	List	B229	Cu	100	12.547	Spd	25502	1799	133911	0.827	27.616
	List	B229	Cu	100	13.793	Spm	2645	198	160122	0.082	2.948
10ak	List	B229	Cu	100	8.977	Put	81367	4834	83816	13.736	405.745
	List	B229	Cu	100	12.480	Spd	26655	1829	133911	0.737	24.513
	List	B229	Cu	100	13.737	Spm	3035	214	160122	0.161	5.735
10bk	List	B229	Cu	100	9.010	Put	82780	4881	83816	16.626	491.134
	List	B229	Cu	100	12.507	Spd	25680	1805	133911	1.696	56.399
	List	B229	Cu	100	13.773	Spm	4324	264	160122	0.216	7.689
11ak	List	B229	Cu	300	8.933	Put	90040	5439	83816	13.523	399.463
	List	B229	Cu	300	12.467	Spd	19029	1383	133911	0.495	16.469

	List	B229	Cu	300	13.767	Spm	4257	291	160122	0.220	7.850
11bk	List	B229	Cu	300	8.980	Put	91032	5498	83816	13.628	402.573
	List	B229	Cu	300	12.497	Spd	21614	1451	133911	0.412	13.706
	List	B229	Cu	300	13.790	Spm	4684	274	160122	0.165	5.883
12ak	List	B229	Cu	300	9.027	Put	93762	5582	83816	14.378	426.678
	List	B229	Cu	300	12.510	Spd	23965	1651	133911	0.567	18.950
	List	B229	Cu	300	13.763	Spm	6275	431	160122	0.177	6.340
12bk	List	B229	Cu	300	9.043	Put	103324	6204	83816	14.772	438.347
	List	B229	Cu	300	12.513	Spd	23187	1593	133911	0.560	18.718
	List	B229	Cu	300	13.767	Spm	5222	371	160122	0.242	8.677

Tabela 16. Integracija pikova nastalih HPLC/DAD analizom slobodnih poliamina (Put, Spd i Spm) u korenovima različitih klonova topola pod uticajem različitih koncentracija jona Cu²⁺

Broj hromatograma	Organ	Klon	Metal	Koncentracija tretmana (mg/kg)	Retenciono vreme (min)	Poliamin	Površina pika	Visina pika	Površina standarda	Količina poliamina (nmol)	Koncentracija poliamina (nmol/g s.m.)
13a	Koren	M1	Cu	0	9.213	Put	60844	3755	237384	2.922	137.179
	Koren	M1	Cu	0	12.567	Spd	18046	1166	492749	0.418	19.601
	Koren	M1	Cu	0	13.820	Spm	3498	247	731796	0.054	2.558
13b	Koren	M1	Cu	0	9.217	Put	63225	3982	237384	3.036	142.549
	Koren	M1	Cu	0	12.553	Spd	14699	1005	492749	0.340	15.966
	Koren	M1	Cu	0	13.803	Spm	1044	82	731796	0.016	0.764
14a	Koren	M1	Cu	0	9.203	Put	71023	4288	237384	3.411	158.641
	Koren	M1	Cu	0	12.580	Spd	25332	1669	492749	0.586	27.258
	Koren	M1	Cu	0	13.793	Spm	2115	165	731796	0.033	1.532
14b	Koren	M1	Cu	0	9.217	Put	66274	4190	237384	3.183	148.033
	Koren	M1	Cu	0	12.573	Spd	19121	1258	492749	0.442	20.575
	Koren	M1	Cu	0	13.840	Spm	1257	106	731796	0.020	0.911
15a	Koren	M1	Cu	100	9.230	Put	97858	5830	237384	4.699	220.634
	Koren	M1	Cu	100	12.567	Spd	42887	2711	492749	0.992	46.583
	Koren	M1	Cu	100	13.830	Spm	2118	144	731796	0.033	1.549
15b	Koren	M1	Cu	100	9.247	Put	95178	5830	237384	4.571	214.590
	Koren	M1	Cu	100	12.570	Spd	55757	3484	492749	1.290	60.562
	Koren	M1	Cu	100	13.787	Spm	3872	260	731796	0.060	2.832
16a	Koren	M1	Cu	100	9.253	Put	93643	5692	237384	4.497	211.129
	Koren	M1	Cu	100	12.570	Spd	48478	3051	492749	1.122	52.410
	Koren	M1	Cu	100	13.787	Spm	2930	215	731796	0.046	2.133
16b	Koren	M1	Cu	100	9.277	Put	94500	5758	237384	4.538	212.067
	Koren	M1	Cu	100	12.600	Spd	37584	2382	492749	0.870	40.632

	Koren	M1	Cu	100	13.813	Spm	1950	147	731796	0.030	1.419
17a	Koren	M1	Cu	300	9.273	Put	106178	6464	237384	5.099	234.978
	Koren	M1	Cu	300	12.573	Spd	67837	4219	492749	1.569	72.324
	Koren	M1	Cu	300	13.803	Spm	6862	473	731796	0.107	4.926
17b	Koren	M1	Cu	300	9.290	Put	116596	6974	237384	5.599	258.034
	Koren	M1	Cu	300	12.590	Spd	74843	4631	492749	1.732	79.794
	Koren	M1	Cu	300	13.790	Spm	7695	504	731796	0.120	5.524
18a	Koren	M1	Cu	300	9.297	Put	123414	7415	237384	5.927	271.869
	Koren	M1	Cu	300	12.593	Spd	85959	5232	492749	1.989	91.225
	Koren	M1	Cu	300	13.803	Spm	5762	409	731796	0.090	4.118
18b	Koren	M1	Cu	300	9.303	Put	131809	8071	237384	6.330	290.363
	Koren	M1	Cu	300	12.593	Spd	69821	4298	492749	1.615	74.099
	Koren	M1	Cu	300	13.810	Spm	4394	326	731796	0.068	3.140
19a	Koren	B229	Cu	0	9.327	Put	38217	2381	237384	1.835	84.577
	Koren	B229	Cu	0	12.620	Spd	7525	520	492749	0.174	8.023
	Koren	B229	Cu	0	13.827	Spm	2988	217	731796	0.047	2.145
19b	Koren	B229	Cu	0	9.310	Put	40327	2485	237384	1.937	89.245
	Koren	B229	Cu	0	12.597	Spd	7275	515	492749	0.168	7.757
	Koren	B229	Cu	0	13.830	Spm	1016	83	731796	0.016	0.729
20a	Koren	B229	Cu	0	8.917	Put	41415	2394	237384	1.989	92.506
	Koren	B229	Cu	0	12.483	Spd	6767	473	492749	0.157	7.281
	Koren	B229	Cu	0	13.780	Spm	1445	106	731796	0.023	1.047
20b	Koren	B229	Cu	0	8.907	Put	39338	2384	237384	1.889	87.868
	Koren	B229	Cu	0	12.463	Spd	6970	472	492749	0.161	7.501
	Koren	B229	Cu	0	13.733	Spm	990	86	731796	0.015	0.717
21a	Koren	B229	Cu	100	9.017	Put	97066	6017	237384	4.661	219.879
	Koren	B229	Cu	100	12.513	Spd	27840	1897	492749	0.644	30.381
	Koren	B229	Cu	100	13.813	Spm	2351	177	731796	0.037	1.727
21b	Koren	B229	Cu	100	9.017	Put	15948	965	237384	0.766	36.126
	Koren	B229	Cu	100	12.513	Spd	4799	281	492749	0.111	5.237
	Koren	B229	Cu	100	13.813	Spm	572	40	731796	0.009	0.420
22a	Koren	B229	Cu	100	9.017	Put	89660	5496	237384	4.306	203.103
	Koren	B229	Cu	100	12.530	Spd	25358	1714	492749	0.587	27.673
	Koren	B229	Cu	100	13.780	Spm	3887	284	731796	0.061	2.856
22b	Koren	B229	Cu	100	8.960	Put	84423	5192	237384	4.054	191.239
	Koren	B229	Cu	100	12.483	Spd	21034	1438	492749	0.487	22.955
	Koren	B229	Cu	100	13.697	Spm	1624	117	731796	0.025	1.193
23a	Koren	B229	Cu	300	8.937	Put	77626	4858	237384	3.728	179.225
	Koren	B229	Cu	300	12.497	Spd	16552	1130	492749	0.383	18.411

	Koren	B229	Cu	300	13.777	Spm	1124	96	731796	0.018	0.842
23b	Koren	B229	Cu	300	9.037	Put	48609	3003	237384	2.334	112.230
	Koren	B229	Cu	300	12.533	Spd	9646	654	492749	0.223	10.729
	Koren	B229	Cu	300	13.773	Spm	709	54	731796	0.011	0.531
24a	Koren	B229	Cu	300	9.037	Put	71964	4439	237384	3.456	166.152
	Koren	B229	Cu	300	12.523	Spd	16379	1110	492749	0.379	18.218
	Koren	B229	Cu	300	13.773	Spm	1245	78	731796	0.019	0.932
24b	Koren	B229	Cu	300	9.057	Put	76444	4755	237384	3.671	176.496
	Koren	B229	Cu	300	12.513	Spd	17324	1149	492749	0.401	19.269
	Koren	B229	Cu	300	13.763	Spm	1107	84	731796	0.017	0.829

Tabela 17. Integracija pikova nastalih HPLC/DAD analizom konjugovanih poliamina (Put, Spd i Spm) u listovima različitih klonova topola pod uticajem različitih koncentracija jona Cu²⁺

Broj hromatograma	Organ	Klon	Metal	Koncentracija tretmana (mg/kg)	Retenciono vreme (min)	Poliamin	Površina pika	Visina pika	Površina standarda	Količina poliamina (nmol)	Koncentracija poliamina (nmol/g s.m.)
1ak	List	M1	Cu	0	9.037	Konj Put	35535	2124	83816	11.438	339.433
	List	M1	Cu	0	12.513	Konj Spd	32014	2282	133911	4.404	147.123
	List	M1	Cu	0	13.783	Konj Spm	7365	515	160122	1.000	35.846
1bk	List	M1	Cu	0	9.087	Konj Put	51830	2989	83816	14.169	420.458
	List	M1	Cu	0	12.527	Konj Spd	46272	3177	133911	6.252	208.864
	List	M1	Cu	0	13.760	Konj Spm	8613	627	160122	1.176	42.137
2ak	List	M1	Cu	0	9.153	Konj Put	44157	2598	83816	11.968	347.185
	List	M1	Cu	0	12.553	Konj Spd	41154	2795	133911	4.518	147.532
	List	M1	Cu	0	13.817	Konj Spm	9401	633	160122	0.797	27.934
2bk	List	M1	Cu	0	8.997	Konj Put	59646	3524	83816	6.693	194.169
	List	M1	Cu	0	12.480	Konj Spd	53750	3786	133911	1.519	49.605
	List	M1	Cu	0	13.757	Konj Spm	11877	800	160122	0.382	13.369
3ak	List	M1	Cu	100	9.083	Konj Put	109014	6480	83816	20.512	605.909
	List	M1	Cu	100	12.537	Konj Spd	66948	4384	133911	6.349	211.129
	List	M1	Cu	100	13.770	Konj Spm	10418	753	160122	1.002	35.729
3bk	List	M1	Cu	100	9.080	Konj Put	95252	5728	83816	23.666	699.073
	List	M1	Cu	100	12.573	Konj Spd	60728	3929	133911	7.673	255.146
	List	M1	Cu	100	13.800	Konj Spm	12251	762	160122	1.136	40.520
4ak	List	M1	Cu	100	9.077	Konj Put	107322	6369	83816	18.446	549.902
	List	M1	Cu	100	12.527	Konj Spd	67046	4495	133911	3.193	107.156
	List	M1	Cu	100	13.773	Konj Spm	11683	840	160122	0.788	28.362
4bk	List	M1	Cu	100	9.013	Konj Put	100063	6056	83816	22.244	663.133

	List	M1	Cu	100	12.493	Konj Spd	56520	4022	133911	4.041	135.613
	List	M1	Cu	100	13.750	Konj Spm	10716	759	160122	0.672	24.189
5ak	List	M1	Cu	300	9.150	Konj Put	102351	6257	83816	18.341	562.312
	List	M1	Cu	300	12.563	Konj Spd	59953	4049	133911	2.624	90.551
	List	M1	Cu	300	13.780	Konj Spm	11137	791	160122	0.438	16.234
5bk	List	M1	Cu	300	9.077	Konj Put	108976	6682	83816	20.800	637.726
	List	M1	Cu	300	12.517	Konj Spd	65293	4253	133911	2.690	92.844
	List	M1	Cu	300	13.757	Konj Spm	10494	737	160122	0.438	16.219
6ak	List	M1	Cu	300	9.110	Konj Put	102075	6020	83816	18.891	573.755
	List	M1	Cu	300	12.540	Konj Spd	53434	3689	133911	2.284	78.076
	List	M1	Cu	300	13.763	Konj Spm	8330	631	160122	0.361	13.231
6bk	List	M1	Cu	300	12.493	Konj Put	56520	4022	83816	23.136	702.677
	List	M1	Cu	300	13.750	Konj Spd	10716	759	133911	5.418	185.248
	List	M1	Cu	300	9.150	Konj Spm	102351	6257	160122	0.859	31.497
7ak	List	B229	Cu	0	9.077	Konj Put	35690	2033	83816	4.344	127.723
	List	B229	Cu	0	12.530	Konj Spd	29127	1999	133911	0.854	28.260
	List	B229	Cu	0	13.753	Konj Spm	3807	284	160122	0.123	4.371
7bk	List	B229	Cu	0	9.040	Konj Put	32631	1851	83816	5.407	158.984
	List	B229	Cu	0	12.517	Konj Spd	28254	1909	133911	1.001	33.149
	List	B229	Cu	0	13.753	Konj Spm	4121	297	160122	0.171	6.057
8ak	List	B229	Cu	0	8.947	Konj Put	35888	2064	83816	5.081	148.721
	List	B229	Cu	0	12.470	Konj Spd	29565	2006	133911	0.983	32.399
	List	B229	Cu	0	13.720	Konj Spm	4560	323	160122	0.170	6.011
8bk	List	B229	Cu	0	9.017	Konj Put	31562	1885	83816	5.651	165.419
	List	B229	Cu	0	12.490	Konj Spd	27270	1932	133911	1.081	35.610
	List	B229	Cu	0	13.710	Konj Spm	4267	319	160122	0.132	4.651
9ak	List	B229	Cu	100	9.067	Konj Put	78080	4717	83816	11.482	340.719
	List	B229	Cu	100	12.543	Konj Spd	25725	1781	133911	0.586	19.591
	List	B229	Cu	100	13.790	Konj Spm	3218	228	160122	0.150	5.373
9bk	List	B229	Cu	100	9.093	Konj Put	82775	5037	83816	14.384	426.847
	List	B229	Cu	100	12.547	Konj Spd	25502	1799	133911	0.827	27.616
	List	B229	Cu	100	13.793	Konj Spm	2645	198	160122	0.082	2.948
10ak	List	B229	Cu	100	8.977	Konj Put	81367	4834	83816	13.736	405.745
	List	B229	Cu	100	12.480	Konj Spd	26655	1829	133911	0.737	24.513
	List	B229	Cu	100	13.737	Konj Spm	3035	214	160122	0.161	5.735
10bk	List	B229	Cu	100	9.010	Konj Put	82780	4881	83816	16.626	491.134
	List	B229	Cu	100	12.507	Konj Spd	25680	1805	133911	1.696	56.399
	List	B229	Cu	100	13.773	Konj Spm	4324	264	160122	0.216	7.689
11ak	List	B229	Cu	300	8.933	Konj Put	90040	5439	83816	13.523	399.463

	List	B229	Cu	300	12.467	Konj Spd	19029	1383	133911	0.495	16.469
	List	B229	Cu	300	13.767	Konj Spm	4257	291	160122	0.220	7.850
11bk	List	B229	Cu	300	8.980	Konj Put	91032	5498	83816	13.628	402.573
	List	B229	Cu	300	12.497	Konj Spd	21614	1451	133911	0.412	13.706
	List	B229	Cu	300	13.790	Konj Spm	4684	274	160122	0.165	5.883
12ak	List	B229	Cu	300	9.027	Konj Put	93762	5582	83816	14.378	426.678
	List	B229	Cu	300	12.510	Konj Spd	23965	1651	133911	0.567	18.950
	List	B229	Cu	300	13.763	Konj Spm	6275	431	160122	0.177	6.340
12bk	List	B229	Cu	300	9.043	Konj Put	103324	6204	83816	14.772	438.347
	List	B229	Cu	300	12.513	Konj Spd	23187	1593	133911	0.560	18.718
	List	B229	Cu	300	13.767	Konj Spm	5222	371	160122	0.242	8.677

Tabela 18. Integracija pikova nastalih HPLC/DAD analizom konjugovanih poliamina (Put, Spd i Spm) u korenovima različitih klonova topola pod uticajem različitih koncentracija jona Cu²⁺

Broj hromatograma	Organ	Klon	Metal	Koncentracija tretmana (mg/kg)	Retenciono vreme (min)	Poliamin	Površina pika	Visina pika	Površina standarda	Količina poliamina (nmol)	Koncentracija poliamina (nmol/g s.m.)
13ak	Koren	M1	Cu	0	9.040	Konj Put	32815	2042	83816	8.275	251.338
	Koren	M1	Cu	0	12.513	Konj Spd	12471	856	133911	1.536	52.526
	Koren	M1	Cu	0	13.813	Konj Spm	1511	119	160122	0.249	9.133
13bk	Koren	M1	Cu	0	9.060	Konj Put	34561	2216	83816	8.599	261.176
	Koren	M1	Cu	0	12.517	Konj Spd	14560	1007	133911	1.251	42.784
	Koren	M1	Cu	0	13.737	Konj Spm	1449	118	160122	0.074	2.727
14ak	Koren	M1	Cu	0	9.023	Konj Put	39584	2396	83816	9.660	290.661
	Koren	M1	Cu	0	12.543	Konj Spd	16862	1130	133911	2.157	73.044
	Koren	M1	Cu	0	13.800	Konj Spm	4305	272	160122	0.151	5.470
14bk	Koren	M1	Cu	0	9.053	Konj Put	50157	2966	83816	9.014	271.224
	Koren	M1	Cu	0	12.537	Konj Spd	31837	1804	133911	1.628	55.135
	Koren	M1	Cu	0	13.813	Konj Spm	2207	155	160122	0.090	3.253
15ak	Koren	M1	Cu	100	9.053	Konj Put	50157	2966	83816	13.310	404.242
	Koren	M1	Cu	100	12.537	Konj Spd	31837	1804	133911	3.651	124.827
	Koren	M1	Cu	100	13.813	Konj Spm	2207	155	160122	0.151	5.530

15bk	Koren	M1	Cu	100	9.057	Konj Put	57187	3334	83816	12.945	393.169
	Koren	M1	Cu	100	12.563	Konj Spd	34938	2008	133911	4.747	162.286
	Koren	M1	Cu	100	13.803	Konj Spm	1771	132	160122	0.276	10.109
16ak	Koren	M1	Cu	100	9.003	Konj Put	56712	3282	83816	12.737	386.828
	Koren	M1	Cu	100	12.510	Konj Spd	37453	2067	133911	4.127	140.441
	Koren	M1	Cu	100	13.797	Konj Spm	3734	209	160122	0.209	7.614
16bk	Koren	M1	Cu	100	8.970	Konj Put	54288	3235	83816	12.853	388.546
	Koren	M1	Cu	100	12.520	Konj Spd	32479	1964	133911	3.200	108.880
	Koren	M1	Cu	100	13.870	Konj Spm	2961	185	160122	0.139	5.067
17ak	Koren	M1	Cu	300	8.857	Konj Put	56750	3457	83816	14.441	430.523
	Koren	M1	Cu	300	12.473	Konj Spd	47246	2756	133911	5.775	193.806
	Koren	M1	Cu	300	13.783	Konj Spm	4107	272	160122	0.489	17.587
17bk	Koren	M1	Cu	300	9.060	Konj Put	68197	4060	83816	15.858	472.766
	Koren	M1	Cu	300	12.560	Konj Spd	47402	2762	133911	6.372	213.824
	Koren	M1	Cu	300	13.827	Konj Spm	3912	253	160122	0.548	19.723
18ak	Koren	M1	Cu	300	9.007	Konj Put	72083	4305	83816	16.786	498.115
	Koren	M1	Cu	300	12.517	Konj Spd	54352	3166	133911	7.318	244.454
	Koren	M1	Cu	300	13.763	Konj Spm	5566	333	160122	0.410	14.701
18bk	Koren	M1	Cu	300	8.960	Konj Put	29913	1733	83816	17.928	532.000
	Koren	M1	Cu	300	12.503	Konj Spd	35623	2315	133911	5.944	198.561
	Koren	M1	Cu	300	13.777	Konj Spm	4009	281	160122	0.313	11.209
19ak	Koren	B229	Cu	0	8.960	Konj Put	29913	1733	83816	5.198	154.961
	Koren	B229	Cu	0	12.503	Konj Spd	35623	2315	133911	0.641	21.500
	Koren	B229	Cu	0	13.777	Konj Spm	4009	281	160122	0.213	7.658
19bk	Koren	B229	Cu	0	9.040	Konj Put	29403	1598	83816	5.485	163.514
	Koren	B229	Cu	0	12.527	Konj Spd	31106	2021	133911	0.619	20.785
	Koren	B229	Cu	0	13.777	Konj Spm	5088	274	160122	0.072	2.603
20ak	Koren	B229	Cu	0	9.103	Konj Put	28872	1619	83816	5.633	169.488
	Koren	B229	Cu	0	12.563	Konj Spd	34626	2185	133911	0.576	19.512

	Koren	B229	Cu	0	13.843	Konj Spm	4548	299	160122	0.103	3.739
20bk	Koren	B229	Cu	0	8.993	Konj Put	34688	1998	83816	5.350	160.990
	Koren	B229	Cu	0	12.510	Konj Spd	42703	2661	133911	0.593	20.099
	Koren	B229	Cu	0	13.740	Konj Spm	4830	324	160122	0.070	2.562
21ak	Koren	B229	Cu	100	9.077	Konj Put	64654	3783	83816	13.202	402.859
	Koren	B229	Cu	100	12.557	Konj Spd	71902	4473	133911	2.370	81.413
	Koren	B229	Cu	100	13.847	Konj Spm	5533	375	160122	0.167	6.167
21bk	Koren	B229	Cu	100	9.130	Konj Put	57831	3414	83816	2.169	66.190
	Koren	B229	Cu	100	12.563	Konj Spd	65555	4087	133911	0.409	14.034
	Koren	B229	Cu	100	13.827	Konj Spm	5455	398	160122	0.041	1.499
22ak	Koren	B229	Cu	100	9.123	Konj Put	57643	3489	83816	12.195	372.122
	Koren	B229	Cu	100	12.570	Konj Spd	64878	4043	133911	2.159	74.155
	Koren	B229	Cu	100	13.813	Konj Spm	4855	352	160122	0.277	10.197
22bk	Koren	B229	Cu	100	9.070	Konj Put	53903	3208	83816	11.482	350.386
	Koren	B229	Cu	100	12.527	Konj Spd	61005	3685	133911	1.791	61.511
	Koren	B229	Cu	100	13.760	Konj Spm	4853	332	160122	0.116	4.260
23ak	Koren	B229	Cu	300	9.020	Konj Put	51052	2991	83816	10.558	328.375
	Koren	B229	Cu	300	12.507	Konj Spd	44150	2790	133911	1.409	49.335
	Koren	B229	Cu	300	13.783	Konj Spm	4276	299	160122	0.080	3.005
23bk	Koren	B229	Cu	300	9.110	Konj Put	60776	3598	83816	6.611	205.626
	Koren	B229	Cu	300	12.537	Konj Spd	55845	3445	133911	0.821	28.751
	Koren	B229	Cu	300	13.790	Konj Spm	6777	482	160122	0.050	1.896
24ak	Koren	B229	Cu	300	9.060	Konj Put	49886	2905	83816	9.788	304.421
	Koren	B229	Cu	300	12.520	Konj Spd	44461	2785	133911	1.394	48.818
	Koren	B229	Cu	300	13.803	Konj Spm	4517	310	160122	0.089	3.328
24bk	Koren	B229	Cu	300	9.047	Konj Put	50156	2950	83816	10.397	323.374
	Koren	B229	Cu	300	12.527	Konj Spd	48108	2999	133911	1.475	51.634
	Koren	B229	Cu	300	13.780	Konj Spm	4812	323	160122	0.079	2.960

Tabela 19. GC/MS/SIM integracija pikova molekulskih jona nastalih od ABA u korenovima klonova topola pod uticajem jona teških metala različitim koncentracijama

Organ	Metal	Koncentracija	Klon	Oznaka uzorka	Odvaga suvog materijala	Naziv fajla hromatograma	ABA (površina pika molekulskog jona)		Koncentracija ABA [ng/g s.m.]
							190	194	
Koren	Ni	0	PE 19/66	1.6. R	0.1021	R16_A1	13642	70961	188.3
Koren	Ni	0	PE 19/66	1.6. R	0.1027	R16_B1	14856	101157	143.0
Koren	Ni	0	PE 19/66	1.6. R	0.1028	R16_C1	2194	22181	96.2
Koren	Ni	50	PE 19/66	1.8. R	0.1010	R18_A1	15729	82417	189.0
Koren	Ni	50	PE 19/66	1.8. R	0.1047	R18_B1	16419	88308	177.6
Koren	Ni	50	PE 19/66	1.8. R	0.1032	R18_C1/C2/C3	8821	34681	246.4
Koren	Ni	150	PE 19/66	1.10.R	0.1016	R110_A1	17866	67556	260.3
Koren	Ni	150	PE 19/66	1.10.R	0.1027	R110_B1	25419	108355	228.4
Koren	Ni	150	PE 19/66	1.10.R	0.1027	R110_C1	6837	25610	259.9
Koren	Cu	0	M1	2.1.R.	0.1035	R21_A1	4723	12522	364.4
Koren	Cu	0	M1	2.1.R.	0.1051	R21_B1	14084	103370	129.6
Koren	Cu	0	M1	2.1.R.	0.1009	R21_C1	7673	45049	168.8
Koren	Cu	100	M1	2.3.R.	0.1023	R23_A1	4258	13674	304.4
Koren	Cu	100	M1	2.3.R.	0.1005	R23_B1	17675	98939	177.8
Koren	Cu	100	M1	2.3.R.	0.1023	R23_C1	5982	30946	189.0
Koren	Cu	300	M1	2.5.R.	0.1029	R25_A1	7713	26127	286.9
Koren	Cu	300	M1	2.5.R.	0.1001	R25_B1	23344	185600	125.7
Koren	Cu	300	M1	2.5.R.	0.1031	R25_C1	70995	366139	188.1
Koren	Cd	0	PE 19/66	3.6.R.	0.1004	R36_A1	16559	64912	254.1
Koren	Cd	0	PE 19/66	3.6.R.	0.1039	R36_B1	6726	41334	156.6
Koren	Cd	0	PE 19/66	3.6.R.	0.1005	R36_C1/C2/C4	3192	5959	532.9
Koren	Cd	3	PE 19/66	3.8.R.	0.1033	R38_A1	828	5726	140.0
Koren	Cd	3	PE 19/66	3.8.R.	0.1015	R38_B1	5189	40650	125.8
Koren	Cd	3	PE 19/66	3.8.R.	0.1063	R38_C1	4995	25307	185.7
Koren	Cd	9	PE 19/66	3.10.R.	0.1012	R310_A2	4937	35292	138.2
Koren	Cd	9	PE 19/66	3.10.R.	0.1016	R310_B2	5030	17861	277.2
Koren	Cd	9	PE 19/66	3.10.R.	0.1062	R310_C1/C2/C3	5688	33978	152.9
Koren	Cu	0	PE 19/66	2.6.R.	0.101	R26_A1	9593	57732	164.5
Koren	Cu	0	PE 19/66	2.6.R.	0.1025	R26_B1	4132	27481	146.7
Koren	Cu	0	PE 19/66	2.6.R.	0.1028	R26_C1	7517	43594	167.7
Koren	Cu	100	PE 19/66	2.8.R.	0.1025	R28_A1	17954	137008	127.8
Koren	Cu	100	PE 19/66	2.8.R.	0.1039	R28_B1	6420	31006	199.3
Koren	Cu	100	PE 19/66	2.8.R.	0.1041	R28_C1	8189	39566	198.8

Koren	Cu	300	PE 19/66	2.10.R.	0.1000	R210_A1	7184	29949	239.9
Koren	Cu	300	PE 19/66	2.10.R.	0.1025	R210_B1	6839	29434	226.7
Koren	Cu	300	PE 19/66	2.10.R.	0.1033	R210_C1	8665	24726	339.2
Koren	Cu	0	B229	2.11.R.	0.1037	R211_A1	3601	29374	118.2
Koren	Cu	0	B229	2.11.R.	0.1037	R211_B1	10455	89553	112.6
Koren	Cu	0	B229	2.11.R.	0.1036	R211_C1	7985	27933	264.2
Koren	Cu	100	B229	2.13.R.	0.1014	R213_B1	5530	30020	181.7
Koren	Cu	100	B229	2.13.R.	0.1036	R213_A1	6023	31064	187.2
Koren	Cu	100	B229	2.13.R.	0.1014	R213_C1	5846	9591	201.1
Koren	Cu	300	B229	2.15.R.	0.1036	R215_B1	6668	75814	87.4
Koren	Cu	300	B229	2.15.R.	0.103	R215_A1	5846	45138	125.7
Koren	Cu	300	B229	2.15.R.	0.1034	R215_C1	7077	39221	174.5

Tabela 20. GC/MS/SIM integracija pikova molekularnih jona nastalih od IAA u korenovima klonova topola pod uticajem jona teških metala različitih koncentracija

Organ	Metal	Koncentracija metala u zemljištu [mg/kg]	Klon	Oznaka uzorka	Odvaga suvog materijala [g]	Naziv fajla hromatograma	IAA (površina pika molekularnog jona)		Koncentracija IAA [ng/g s.m.]
							130	136	
Koren	Ni	0	PE 19/66	1.6. R	0.102	R16_A1	23979	643185	32.3
Koren	Ni	0	PE 19/66	1.6. R	0.103	R16_B1	24090	786690	26.4
Koren	Ni	0	PE 19/66	1.6. R	0.103	R16_C2	7152	172143	35.8
Koren	Ni	50	PE 19/66	1.8. R	0.101	R18_A1	58053	951499	53.5
Koren	Ni	50	PE 19/66	1.8. R	0.105	R18_B1	20451	625880	27.6
Koren	Ni	50	PE 19/66	1.8. R	0.103	R18_C1/2/3	62245	895228	62.6
Koren	Ni	150	PE 19/66	1.10.R	0.102	R110_A1	66693	805314	72.1
Koren	Ni	150	PE 19/66	1.10.R	0.103	R110_B1	71846	863055	71.7
Koren	Ni	150	PE 19/66	1.10.R	0.103	R110_C1	52415	771144	58.6
Koren	Cu	0	M1	2.1.R.	0.1035	R21_A1	11992	425824	24.1
Koren	Cu	0	M1	2.1.R.	0.1051	R21_B1	28479	977746	24.5
Koren	Cu	0	M1	2.1.R.	0.1009	R21_C1	32289	1032269	27.4
Koren	Cu	100	M1	2.3.R.	0.1023	R23_A1	12965	294000	38.1
Koren	Cu	100	M1	2.3.R.	0.1005	R23_B1	31221	731570	37.6
Koren	Cu	100	M1	2.3.R.	0.1023	R23_C1	28993	735506	34.1
Koren	Cu	300	M1	2.5.R.	0.1029	R25_A1	16404	535072	26.4
Koren	Cu	300	M1	2.5.R.	0.1001	R25_B1	29506	1225653	21.3

Koren	Cu	300	M1	2.5.R.	0.1031	R25_C1	298622	8052813	31.8
Koren	Cd	0	PE 19/66	3.6.R.	0.1004	R36_A1	31266	513142	53.7
Koren	Cd	0	PE 19/66	3.6.R.	0.1039	R36_B1	60019	746386	68.5
Koren	Cd	0	PE 19/66	3.6.R.	0.1005	R36_C1/2/3/4	15855	186449	72.1
Koren	Cd	3	PE 19/66	3.8.R.	0.1033	R38_A1	23773	152564	133.5
Koren	Cd	3	PE 19/66	3.8.R.	0.1015	R38_B1	71040	606277	102.2
Koren	Cd	3	PE 19/66	3.8.R.	0.1063	R38_C1	74697	580752	107.1
Koren	Cd	9	PE 19/66	3.10.R.	0.1012	R310_A2	29534	711485	36.3
Koren	Cd	9	PE 19/66	3.10.R.	0.1016	R310_B2	32434	749084	37.7
Koren	Cd	9	PE 19/66	3.10.R.	0.1062	R310_C1	42502	839065	41.5
Koren	Cu	0	PE 19/66	2.6.R.	0.101	R26_A1	22430	407281	48.3
Koren	Cu	0	PE 19/66	2.6.R.	0.1025	R26_B1	8445	122956	59.3
Koren	Cu	0	PE 19/66	2.6.R.	0.1028	R26_C1	49010	653711	64.5
Koren	Cu	100	PE 19/66	2.8.R.	0.1025	R28_A1	59776	938537	55.0
Koren	Cu	100	PE 19/66	2.8.R.	0.1039	R28_B1	15659	242913	54.9
Koren	Cu	100	PE 19/66	2.8.R.	0.1041	R28_C1	16680	277988	51.0
Koren	Cu	300	PE 19/66	2.10.R.	0.1000	R210_A1	21848	344638	56.1
Koren	Cu	300	PE 19/66	2.10.R.	0.1025	R210_B1	20574	271747	65.4
Koren	Cu	300	PE 19/66	2.10.R.	0.1033	R210_C1	72146	802664	77.0
Koren	Cu	0	B229	2.11.R.	0.1037	R211_A1	32545	738650	37.6
Koren	Cu	0	B229	2.11.R.	0.1037	R211_B1	63488	1374340	39.4
Koren	Cu	0	B229	2.11.R.	0.1036	R211_C1/C3	70671	1549353	41.0
Koren	Cu	100	B229	2.13.R.	0.1014	R213_B1	79908	991873	70.3
Koren	Cu	100	B229	2.13.R.	0.1036	R213_A1	94837	1025575	79.0
Koren	Cu	100	B229	2.13.R.	0.1014	R213_C1/C2	6983	1308915	101.7
Koren	Cu	300	B229	2.15.R.	0.1036	R215_B1	91575	995459	79.4
Koren	Cu	300	B229	2.15.R.	0.1030	R215_A1	61369	738188	71.4
Koren	Cu	300	B229	2.15.R.	0.1034	R215_C1	75084	922597	69.7

Tabela 21. GC/MS/SIM integracija pikova molekulkih jona nastalih od ABA u listovima klonova topola u zavisnosti od uticaja jona teških metala različitih koncentracija

Organ	Metal	Koncentracija metala u zemljištu [mg/kg]	Klon	Oznaka uzorka	Odvaga suvog materijala [g]	Naziv fajla hromatograma	ABA (površina pika molekulkog jona)		Konzentracija ABA [ng/g s.m.]
							190	194	
List	Ni	0	PE 19/66	1.6. L	0.1012	L16_A2	25663	36107	102.32
List	Ni	0	PE 19/66	1.6. L	0.0522	L16_E1	7127	124913	109.30
List	Ni	0	PE 19/66	1.6. L	0.1035	L16_F1	6370	38688	159.08
List	Ni	50	PE 19/66	1.8. L	0.1021	L18_A1	4441	10358	149.93
List	Ni	50	PE 19/66	1.8. L	0.1021	LT1_1	7072	51077	135.61
List	Ni	50	PE 19/66	1.8. L	0.0536	L18_D1	12082	181460	124.22
List	Ni	150	PE 19/66	1.10.L	0.1015	L110_A	1677	5746	187.54
List	Ni	150	PE 19/66	1.10.L	0.1015	L110_D1/D2	7111	46946	152.00
List	Ni	150	PE 19/66	1.10.L	0.0506	L110_A1	7720	75695	201.56
List	Cu	0	M1	2.1.L.	0.0522	L21_D1	10429	83737	238.59
List	Cu	0	M1	2.1.L.	0.1032	L21_F1	9413	71140	128.21
List	Cu	0	M1	2.1.L.	0.1016	L21_E1	12009	77829	151.87
List	Cu	100	M1	2.3.L.	0.0515	L23_D1	10796	114108	183.71
List	Cu	100	M1	2.3.L.	0.102	L23_E1	5395	28935	182.80
List	Cu	100	M1	2.3.L.	0.1007	L23_F1	7080	41672	168.72
List	Cu	300	M1	2.5.L.	0.0502	L25_D1	7584	94550	159.78
List	Cu	300	M1	2.5.L.	0.1012	L25_E1	7041	36853	188.79
List	Cu	300	M1	2.5.L.	0.1027	L25_F1	8141	41471	191.14
List	Cu	0	PE 19/66	2.6.L.	0.1007	L26_A1/A2	7893	63705	129.26
List	Cu	0	PE 19/66	2.6.L.	0.1020	L26_B1	6661	43236	146.61
List	Cu	0	PE 19/66	2.6.L.	0.1029	L26_C1/2/3	6568	43509	167.57
List	Cu	100	PE 19/66	2.8.L.	0.1013	L28_C2	4784	23911	197.51
List	Cu	100	PE 19/66	2.8.L.	0.1018	L28_B2	5684	29340	190.30

List	Cu	100	PE 19/66	2.8.L.	0.1022	L28_A2	4679	17394	263.21
List	Cu	300	PE 19/66	2.10.L.	0.1016	L210_C1/C2	9631	30228	261.47
List	Cu	300	PE 19/66	2.10.L.	0.1018	L210_B1/B2	5935	27995	182.99
List	Cu	300	PE 19/66	2.10.L.	0.1033	L210_A1/A2	24502	49216	173.34
List	Cu	0	B229	2.11.L.	0.104	L211_C1/C2	7429	65543	117.13
List	Cu	0	B229	2.11.L.	0.1034	L211_B1/B2	7297	82023	90.49
List	Cu	0	B229	2.11.L.	0.1033	L211_A1/A2	11197	110402	93.85
List	Cu	100	B229	2.13.L.	0.1017	L213_A1	6661	67286	97.34
List	Cu	100	B229	2.13.L.	0.1013	L213_B1	7025	53998	128.43
List	Cu	100	B229	2.13.L.	0.1019	L213_C1	5890	41940	137.82
List	Cu	300	B229	2.15.L.	0.1017	L215_A1	5069	29523	168.83
List	Cu	300	B229	2.15.L.	0.1027	L215_B1	3814	24895	149.18
List	Cu	300	B229	2.15.L.	0.1022	L215_C1	3029	12609	155.05

Tabela 22. GC/MS/SIM integracija pikova molekulskih jona nastalih od IAA u listovima klonova topola u zavisnosti od uticaja jona teških metala različitih koncentracija

Organ	Metal	Koncentracija metala u zemljištu [mg/kg]	Klon	Oznaka uzorka	Odvaga suvog materijala [g]	Naziv fajla hromatograma	IAA (površina pika molekuskog jona)		Koncentracija IAA [ng/g s.m.]
							130	136	
List	Ni	0	PE 19/66	1.6. L	0.1012	L16_A2	5384	476537	9.9
List	Ni	0	PE 19/66	1.6. L	0.0522	L16_E1	4212	835295	8.5
List	Ni	0	PE 19/66	1.6. L	0.1035	L16_F1	7009	690081	8.7
List	Ni	50	PE 19/66	1.8. L	0.1021	L18_A1	4332	255646	14.7
List	Ni	50	PE 19/66	1.8. L	0.1021	LT1_1	4333	336493	11.2
List	Ni	50	PE 19/66	1.8. L	0.0536	L18_D1	6756	1003985	11.1
List	Ni	150	PE 19/66	1.10.L	0.1015	L110_A	4680	520852	7.8
List	Ni	150	PE 19/66	1.10.L	0.0518	L110_C1/C2	5655	636554	15.3
List	Ni	150	PE 19/66	1.10.L	0.1015	L110_D1	4546	722106	5.5

List	Ni	150	PE 19/67	1.10.L	0.0506	L110_A1	4188	716211	10.2
List	Cu	0	M1	2.1.L.	0.0522	L21_D1	8095	1008347	13.6
List	Cu	0	M1	2.1.L.	0.1032	L21_F1	6611	570941	9.9
List	Cu	0	M1	2.1.L.	0.1016	L21_E1	8454	913544	8.1
List	Cu	100	M1	2.3.L.	0.0515	L23_D1	7241	932455	13.3
List	Cu	100	M1	2.3.L.	0.102	L23_E1	10722	834636	11.1
List	Cu	100	M1	2.3.L.	0.1007	L23_F1	9852	732505	11.8
List	Cu	300	M1	2.5.L.	0.0502	L25_D1	5277	592819	15.7
List	Cu	300	M1	2.5.L.	0.1012	L25_E1	7697	794247	8.5
List	Cu	300	M1	2.5.L.	0.1027	L25_F1	9054	772678	10.1
List	Cu	0	PE 19/66	2.6.L.	0.1007	L26_/A2	5320	616086	7.6
List	Cu	0	PE 19/66	2.6.L.	0.102	L26_/B2	1953	269249	6.3
List	Cu	0	PE 19/66	2.6.L.	0.1029	L26_/C2	2985	296569	8.7
List	Cu	100	PE 19/66	2.8.L.	0.1013	L28_C1/C2	4217	411100	9.1
List	Cu	100	PE 19/66	2.8.L.	0.1018	L28_B2	4692	420460	9.7
List	Cu	100	PE 19/66	2.8.L.	0.1022	L28_A2	3467	248767	12.1
List	Cu	300	PE 19/66	2.10.L.	0.1016	L210_C2	4752	410277	10.1
List	Cu	300	PE 19/66	2.10.L.	0.1018	L210_B2	3996	345060	10.1
List	Cu	300	PE 19/66	2.10.L.	0.1033	L210_A2	5805	593595	8.4
List	Cu	0	B229	2.11.L.	0.1040	L211_C2	4768	625777	6.5
List	Cu	0	B229	2.11.L.	0.1034	L211_B2	2958	448590	5.6
List	Cu	0	B229	2.11.L.	0.1033	L211_A2	5146	773243	5.7
List	Cu	100	B229	2.13.L.	0.1017	L213_A1	5493	605828	7.9
List	Cu	100	B229	2.13.L.	0.1013	L213_B1	5081	583122	7.6
List	Cu	100	B229	2.13.L.	0.1019	L213_C1	4400	581790	6.6
List	Cu	300	B229	2.15.L.	0.1017	L215_A1	4453	563073	6.9
List	Cu	300	B229	2.15.L.	0.1027	L215_B1	4375	593461	6.4
List	Cu	300	B229	2.15.L.	0.1022	L215_C1	4075	506885	7.0

9. BIOGRAFIJA



Marko Kebert, rođen je 02.02.1984. godine u Vrbasu. Osnovnu školu “Petefi brigada“ u Kuli završava kao nosilac Vukove diplome. Prirodno-matematički smer Gimnazije „Žarko Zrenjanin“ u Vrbasu završava odličnim uspehom, sa posebnim interesovanjem za biologiju. Tokom srednje i osnovne škole učestvovao je više puta na Republičkim takmičenjima iz biologije i pohađao seminare u ISP Petnica. Studije na Departmanu za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu, smer biohemija upisao je 2003. godine. Tokom studija učestvovao je na skupovima prirodno-matematičkih fakulteta-Primatijada i u programu razmene studenata sa Tehničkim Univerzitetom u Gracu. Za vreme studija bio je stipendista Republičke fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka. Diplomirao je 29.10.2007. godine sa prosečnom ocenom tokom studiranja 9,1, stekavši zvanje diplomirani hemičar-biohemija. Akademske master studije na istom fakultetu završava u julu 2009. godine, sa prosečnom ocenom 10. Od jula 2008. radi kao istraživač-pripravnik na Institutu za nizijsko šumarstvo i životnu sredinu u Novom Sadu, a iste godine upisuje i doktorske studije na smeru biohemija istog fakulteta. U septembru 2010. izabran je u zvanje istraživač-saradnik u naučnoj oblasti Biotehničke nauke, naučnoj disciplini »Genetika, oplemenjivanje, fiziologija i biohemija šumskog i ukrasnog drveća i žbunja i agrošumarstvo«. Ima iskustva u radu na instrumentima za atomsku apsorpcionu spektrofotometrijsku analizu, CHN elementarnu analizu, gasnu i tečnu hromatografiju sa masenom detekcijom i u primeni biohemijskih testova *in vitro*. Učesnik je dva nacionalna projekta Ministarstva nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (III43002 i III43007), a istraživanja za doktorsku disertaciju uradio je u okviru pograničnog IPA projekta sa Mađarskom »Oxidative stress tolerance in plants: from models to trees-OXIT« i tri kratkoročne naučne misije u Bolonji u okviru COST akcija. Koautor i autor je više od 20 naučnih radova od kojih je 7 na ISI listi. Član je Srpskog hemijskog društva i Biohemijskog društva Srbije.

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET**

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Marko Kebert
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Dr Neda Mimica Dukić, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu Dr Dubravka Štajner, redovni profesor Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu
Naslov rada: NR	Biohemijska i fiziološka karakterizacija klonova topole (<i>Populus spp.</i>) u procesu fitoekstrakcije bakra, nikla i kadmijuma
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	Srpski / Engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2014.
Izdavač: IZ	Autorski reprint

Mesto i adresa: MA	Novi Sad; Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad, Republika Srbija
Fizički opis rada: FO	Broj poglavlja: 8; Stranica: 250; Lit.citata: 450 Slika: 57; Tabela: 15; Grafikona: 182
Naučna oblast: NO	Biohemija
Naučna disciplina: ND	Biohemija i fiziologija biljaka
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Klonovi topola, teški metali, fitoekstrakcija, reaktivne kiseonične vrste, abscisinska kiselina (ABA), indol-3 sirćetna kiselina (IAA), antioksidantna aktivnost, poliamini, AAS, HPLC, GC/MS
UDK	
Čuva se: ČU	Biblioteka Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad, Republika Srbija
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	Predmet ovog istraživanja bio je ispitivanje uticaja jona tri teška metala (Ni^{2+} , Cu^{2+} i Cd^{2+}) u dve toksične koncentracije u zemljištu na fiziološke i biohemijske karakteristike odabranih klonova topola, M1, B229 i Pe 19/66. Ispitan je i potencijal odabranih klonova topola da vrše fitoekstrakciju -akumulaciju teških metala iz zemljišta u svoje nadzemne delove što dovodi do dugoročnog uklanjanja ovih perzistentnih polutanata iz životne sredine. Takođe, ispitan je uticaj teških metala na antioksidantni potencijal, sposobnost neutralizacije slobodnih radikala, aktivnosti antioksidantnih enzima kao i na sadržaj slobodnih i konjugovanih poliamina (Put, Spm, Spd), određenih HPLC analizom, i sadržaj biljnih hormona poput indol-3-sirćetne kiseline i abscisinske kiseline, određenih GC/MS analizom, u listovima i korenovima klonova topola.

Datum prihvatanja teme od strane 23. Oktobar 2013.

NN veća:

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:

(Naučni stepen/ime i
prezime/zvanje/fakultet)

KO

Predsednik:

Dr Đorđe Malenčić, redovni profesor
Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u
Novom Sadu

Član:

Dr Saša Orlović, redovni profesor
Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u
Novom Sadu

Član:

Dr Dejan Orčić, docent Prirodno-matematičkog
fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCES**

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number:
ANO

Identification number:
INO

Document type: Monograph documentation
DT

Type of record: Textual printed material
TR

Contents code: PhD Thesis
CC

Author: Marko Kebert
AU

Mentor: Professor Neda Mimica-Dukić, PhD, Faculty of
MN Sciences, University of Novi Sad

Professor Dubravka Štajner, PhD, Faculty of
Sciences, University of Novi Sad

Title: Biochemical and physiological characterization of
TI three poplar clones (*Populus* spp.) during the
copper, nickel and cadmium phytoextraction
process

Language of text: Serbian (Latin)
LT

Language of abstract: English / Serbian
LA

Country of publication: Republic of Serbia
CP

Locality of publication: Vojvodina
LP

Publication year: 2014.
PY

Publisher: Author's reprint
PU

Publication place:
PP

Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad,
Republic of Serbia

Physical description:
PD

Chapters: 8; Pages: 250; References: 450;
Tables: 15; Figures: 57; Charts: 182

Scientific field
SF

Biochemistry

Scientific discipline
SD

Biochemistry and plant physiology

Subject, Key words
SKW

Poplars, phytoextraction, heavy metals, reactive oxygen species, abscisic acid (ABA), indol-3 acetic acid (IAA), antioxidant activity, polyamines, AAS, HPLC, GC-MS,

UC

Holding data:
HD

Library of Department of Chemistry,
Biochemistry and Environmental Protection,
Faculty of Sciences, University of Novi Sad,
Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad,
Republic of Serbia

Note:

-

N

Abstract:

AB

The aim of this study was to estimate and compare phytoextraction capacities of three poplar clones (M1, B229 and Pe 19/66) in soil. Furthermore, the goal was to assess different biological responses among the poplar clones during exposure to different concentration of three heavy metal ions (Ni^{2+} , Cu^{2+} i Cd^{2+}). In order to track changes in poplars' mineral, physiological, biochemical and antioxidant status during the abiotic stress, quantification of physiological properties, free and conjugated polyamines, total phenolics as well as quantification of phytohormones (indol-3-acetic and abscisic acid) was done. Furthermore, assessment of antioxidant potential by tracking radical scavenger capacities (RSC) against DPPH, ABTS, OH and NO radicals and by measuring enzymes activities (SOD, GSH-Px, GPx, GR) in vitro was performed in root and leaves of poplar clones.

Accepted on Scientific Board on: 23th October 2013.

AS

Defended:

DE

Thesis Defend Board:

DB

President:

Professor Đorđe Malenčić, PhD, Faculty of
Agriculture, University of Novi Sad

Member:

Professor Saša Orlović, PhD, Faculty of
Agriculture, University of Novi Sad

Member:

Assistant Professor Dejan Orčić, PhD, Faculty
of Science, University of Novi Sad