



UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA BIOLOGIJU I EKOLOGIJU



Danijela Arsenov

**Fiziološki aspekti potencijala vrba (*Salix* spp.) u
asistiranoj fitoremedijaciji kadmijuma upotrebom
limunske kiseline
-doktorska disertacija-**

Novi Sad, 2018.

Ovaj rad je realizovan u Laboratoriji za fiziologiju biljaka na Departmanu za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu u okviru projekta III 43007 "Istraživanje klimatskih promena i njihovog uticaja na životnu sredinu - praćenje uticaja, adaptacija i ublažavanje" koji je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Neizmerno zahvalnost dugujem svojim dragim kolegama, članovima Laboratorije za Fiziologiju biljaka, koji su me prihvatili kao deo tima i nesebično mi pomogali da zajedno realizujemo ovo istraživanje.

Hvala kolegama sa Instituta za nizijsko šumarstvo i životnu sredinu na ustupljenom biljnom materijalu, saradnji i kolegijalnosti.

Beskrajno hvala mami, tati i Dragani,

Hvala Milošu

Danijela Arsenov

Sadržaj

1. Uvod	1
Pregled literature	3
1.1. Karakteristike teških metala	4
1.1.1. Bio(fito)dostupnost teških metala u zemljištu	5
1.1.2. Usvajanje i transport teških metala u biljkama	6
1.2. Toksičnost kadmijuma – osobine i uticaj na životne procese biljaka	9
1.2.1. Uticaj kadmijuma na produkciju biomase	10
1.2.2. Uticaj kadmijuma na mineralnu ishranu	11
1.2.3. Uticaj kadmijuma na parametre fotosinteze i transpiracije	13
1.2.4. Uticaj kadmijuma na biohemijske pokazatelje	14
1.2.5. Uticaj kadmijuma na gensku ekspresiju	18
1.3. Fitoremedijacija	19
1.4. Mehanizmi tolerancije i detoksifikacije biljaka na stres teškim metalima	22
1.4.1. Uloga fitohelatina i metalotioneina u procesu fitoekstrakcije	25
1.4.2. Vakuolarna sekvestracija	26
1.4.3. Upotreba helatora u procesu fitoekstrakcije	27
1.5. Upotreba limunske kiseline u procesu fitohelacije	30
1.6. Efikasnost primene fitoremedijacije u praksi	32
1.7. Novi trendovi u fitoremedijaciji	34
1.8. Karakteristike roda <i>Salix</i> i njihova uloga u fitoremedijaciji	34
1.8.1. Biologija analiziranih vrsta	36
2. Cilj istraživanja	38
3. Materijal i metode	40
3.1. Odabir biljnog materijala i uslovi gajenja	40
3.2. Dizajn prvog eksperimenta	41
3.3. Dizajn drugog eksperimenta	43
3.4. Analize zemljišta	44
3.4.1. Određivanje pH vrednosti zemljišta	45
3.4.2. Određivanje biodostupnosti kadmijuma u zemljištu	45
3.5. Analize morfometrijskih parametara	45
3.6. Analize fizioloških parametara	46
3.6.1. Parametri razmene gasova	46

3.6.2.	<i>Određivanje sadržaja pigmenata hloroplasta</i>	47
3.6.3.	<i>Priprema matičnih rastvora</i>	47
3.6.4.	<i>Određivanje sadržaja mineralnih elemenata (azot, fosfor, kalijum)</i>	48
3.6.5.	<i>Određivanje sadržaja kadmijuma (Cd) u biljnom tkivu</i>	48
3.7.	<i>Analize biohemijskih parametara</i>	49
3.7.1.	<i>Određivanje sadržaja slobodnog prolina</i>	49
3.7.2.	<i>Priprema biljnih ekstrakata za enzimske eseje</i>	50
3.7.3.	<i>Određivanje sadržaja ukupnih rastvorljivih proteina</i>	50
3.7.4.	<i>Određivanje aktivnosti enzima katalaze (CAT)</i>	50
3.7.5.	<i>Određivanje aktivnosti enzima gvajakol-peroksidaze (GPOD)</i>	50
3.7.6.	<i>Određivanje aktivnosti enzima askorbat-peroksidaze (APX)</i>	51
3.7.7.	<i>Određivanje aktivnosti enzima glutation-s-transferaze (GST)</i>	51
3.7.8.	<i>Određivanje sadržaja redukovanog glutationa (GSH)</i>	51
3.7.10.	<i>Određivanje sadržaja vodonik-peroksida (H₂O₂)</i>	52
3.7.11.	<i>Određivanje sadržaja aminokiseline cisteina</i>	52
3.7.12.	<i>Određivanje sadržaja ukupnih (UT), neproteinskih tiola (NPT) i proteinskih tiola (PT)</i>	52
3.8.	<i>Statistička obrada podataka</i>	53
4.	<i>Rezultati</i>	55
4.1.	<i>Karakteristike zemljišta</i>	55
4.2.	<i>Prvi eksperiment</i>	57
4.2.1.	<i>Akumulacija Cd, parametri fitoremedijacije (biokoncentracijski i translokacijski faktor)</i>	57
4.2.2.	<i>Morfometrijski parametri i indeks tolerancije</i>	60
4.2.3.	<i>Mineralna ishrana</i>	62
4.2.4.	<i>Sadržaj fotosintetičkih pigmenata</i>	64
4.2.5.	<i>Parametri razmene gasova</i>	66
4.2.6.	<i>Sadržaj prolina</i>	67
4.2.7.	<i>Sadržaj ukupnih rastvorljivih proteina</i>	68
4.2.8.	<i>Antioksidativni sistem zaštite</i>	69
4.3.	<i>Drugi eksperiment</i>	72
4.3.1.	<i>Akumulacija Cd, parametri fitoremedijacije (biokoncentracijski i translokacijski faktor)</i>	72

4.3.2.	<i>Morfometrijski parametri i indeks tolerancije</i>	76
4.3.3.	<i>Mineralna ishrana</i>	78
4.3.4.	<i>Sadržaj fotosintetičkih pigmenata</i>	80
4.3.5.	<i>Parametri razmene gasova</i>	81
4.3.6.	<i>Sadržaj prolina</i>	83
4.3.7.	<i>Sadržaj ukupnih rastvorljivih proteina</i>	84
4.3.8.	<i>Antioksidativni sistem zaštite</i>	85
4.3.9.	<i>Sadržaj aminokiseline cisteina</i>	89
4.3.10.	<i>Sadržaj vodonik peroksida</i>	90
4.4.	<i>Korelacije</i>	91
4.5.	<i>Analiza glavnih komponenti (PCA)</i>	93
5.	<i>Diskusija</i>	96
5.1.	<i>Kadmijum u zemljištu</i>	96
5.2.	<i>Uticaj kadmijuma i limunske kiseline na akumulaciju i distribuciju kadmijuma u biljnom tkivu</i>	98
5.3.	<i>Uticaj kadmijuma i limunske kiseline na produkciju biomase i tolerantnost analiziranih klonova vrba</i>	102
5.4.	<i>Uticaj kadmijuma i limunske kiseline na sadržaj neophodnih makroelementa azot (N), fosfor (P) kalijum (K)</i>	106
5.5.	<i>Uticaj kadmijuma i limunske kiseline na sadržaj fotosintetičkih pigmenata</i>	108
5.6.	<i>Uticaj kadmijuma i limunske kiseline na parametre razmene gasova</i>	109
5.7.	<i>Uticaj kadmijuma i limunske kiseline na akumulaciju aminokiseline prolina</i> ...	111
5.8.	<i>Uticaj kadmijuma i limunske kiseline na sadržaj ukupnih proteina</i>	113
5.9.	<i>Uticaj kadmijuma i limunske kiseline na produkciju enzimskih i neenzimskih komponenti antioksidativnog sistema zaštite</i>	114
6.	<i>Zaključak</i>	125
7.	<i>Literatura</i>	129
8.	<i>Prilog</i>	156

Lista ilustracija

Slika 1. Model transportnog puta kadmijuma iz zemljišta preko korenskih dlaka i dalji tok ksilemom do nadzemnih delova biljaka. 1. Usvajanje jona Cd iz zemljišnog rastvora u ćelije korena aktivnošću ZIP i Nramp transporterima i Ca^{2+} kanalima; 2-4. Uloga endoplazmatičnog retikuluma i Goldžijevog aparata u obrazovanju GSH-Cd kompleksa i mehanizmima detoksifikacije Cd izbacivanjem u zonu korenskih dlaka; 5. Sekvestracija Cd u vakuolu posredstvom ABC familije transportera koja je lokalizovana na tonoplastu; 6. Aktivacija HMA transportera i premeštanje Cd u ksilem 8

Slika 2. Uticaj kadmijuma (Cd) na fotosintetički aparat. (a) Usvajanje Cd preko korena i transport do listova zahvaljujući transporterima (NRAMP i ZIP familije transportera); (b) Dejstvo Cd na fotosistem II (P680) i fotosistem I (P700); (c) substitucija jona Mg^{2+} jonima Cd^{2+} u molekulu hlorofila 14

Slika 3. Biosinteza reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS), mehanizmi regulacije produkcije ovih molekula i aktivnost različitih antioksidativnih enzima u biljnoj ćeliji. 1. Fenton i Haber-Weiss reakcija ciklus detoksifikacije $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 aktivnošću alternativnih oksidaza (AOKS) u tilakoidima. Kod nekih biljaka moguća je zamena CuZnSOD (bakar-cink-superoksid-dismutaza) sa gvožđe-superoksid-dismutazom (FeSOD) u hloroplastima. H_2O_2 koji izlazi iz ovog ciklusa detoksifikuje se pomoću superoksid-dismutaze (SOD) i uključuje se u askorbat-glutation ciklus. Peroksiredoksin (PrxR) i glutathion peroksidaza (GPx) su takođe uključeni u neutralizaciju H_2O_2 . 2. U mitohondrijama, SOD i druge komponente askorbat-glutationa ciklusa indukuju proizvodnju vodonik-peroksida. 3. U peroksisomima, ROS molekuli se prihvataju od strane SOD, katalaza (CAT) i askorbat peroksidaza (Apx). Prekomerna proizvodnja i nagomilavanje H_2O_2 indukovano je (I) NADPH oksidazom, (II) peroksidazama ćelijskog zida, (III) oksalatnim oksidazama i (IV) amin oksidazama. Iako su putevi nastanka H_2O_2 u različitim ćelijskim organelama odvojeni jedni od drugih, ovaj molekul lako može difundovati kroz membrane, a antioksidanti poput glutathiona i askorbinske kiseline se mogu lako transportovati između različitih delova ćelije 16

Slika 4. Šematski prikaz usvajanja i transporta jona Cd^{2+} iz korena u nadzemne delove biljke pomoću ZIP familije transportera i Ca^{2+} kanala. Endogena sinteza prolina i uticaj na održavanje redoks balansa u ćeliji, prenos signala i aktivnost mehanizama detoksifikacije Cd i njegov dalji iz transport Cd iz citosola u vakuolu preko Cd^{2+}/H^+ antiport sistema 17

Slika 5. Mehanizmi detoksifikacije teških metala – vakuolarna sekvestracija. 1. Usvajanje jona teških metala aktivnošću ZIP familije proteina 2. Ulazak jona Cd^{2+} u citosol stimuliše glutathion da dejstvom enzima fitohelati-sintaze (PCS) sintetiše fitohelatine (PC) 3. Fitohelatini se vezuju za citosolni Cd i obrazuju niskomolekularni metal-helatni kompleks 4. Transport metal-helatnog kompleksa preko ABC transportera u vakuolu 5. Stvaranje helata sa različitim visokomolekularnim ligandima u citosolu, 6. Učešće različitih proteinskih familija u kompartmentalizaciji metala u vakuoli, 7. Uloga metalotioneina, organskih i aminokiselina u pufisanju teških metala u citosu i njihovo održavanje na niskom nivou 24

Slika 6. Primena različitih helatora sintetičkih i organskih kiseline u procesu asistiranе fitoremedijacije 29

Slika 7. Krebsov ciklus (ciklus limunske kiseline) 30

Slika 8. Prvi eksperiment zemljišnih kultura vrba u staklari	40
Slika 9. Šematski prikaz tretmana (biljke <i>S. viminalis</i> –90 dana gajenja)	42
Slika 10. Gajenje vrba tokom drugog eksperimenta u staklari	44
Slika 11. Merenje mase i površine listova biljaka	46
Slika 12. Merenje fotosintetičkih parametara upotrebom aparata LCPro+ (<i>S. viminalis</i> , tretman limunska kiselina)	47
Slika 13. Atomski apsorpcioni spektrofotometar sa plamenim atomizerom	49
Slika 14. Sadržaj kadmijuma u zemljištu nakon završetka prvog eksperimenta	56
Slika 15. Sadržaj kadmijuma u zemljištu nakon završetka drugog eksperimenta	56
Slika 16. Akumulacija kadmijuma u mladim listovima vrba (<i>Salix</i> spp.)	57
Slika 17. Akumulacija kadmijuma u starim listovima vrba (<i>Salix</i> spp.)	58
Slika 18. Akumulacija kadmijuma u izdanku vrba (<i>Salix</i> spp.)	58
Slika 19. Akumulacija kadmijuma u korenu vrba (<i>Salix</i> spp.)	58
Slika 20. Uticaj primenjenih tretmana na indeks tolerancije (TI) u analiziranim klonovima vrba (<i>Salix</i> spp.)	62
Slika 21. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj prolina u mladim listovima analiziranih klonova vrba (<i>Salix</i> spp.)	68
Slika 22. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj prolina u starim listovima analiziranih klonova vrba (<i>Salix</i> spp.)	68
Slika 23. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj ukupnih rastvorljivih proteina u mladim listovima analiziranih klonova vrba (<i>Salix</i> spp.)	69
Slika 24. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj ukupnih rastvorljivih proteina u starim listovima analiziranih klonova vrba (<i>Salix</i> spp.)	69
Slika 25. Akumulacija kadmijuma u mladim listovima vrba (<i>Salix</i> spp.)	73
Slika 26. Akumulacija kadmijuma u starim listovima vrba (<i>Salix</i> spp.)	73
Slika 27. Akumulacija kadmijuma u izdanku vrba (<i>Salix</i> spp.)	74
Slika 28. Akumulacija kadmijuma u korenu vrba (<i>Salix</i> spp.)	74
Slika 30. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj prolina u mladim listovima analiziranih klonova vrba (<i>Salix</i> spp.)	84

Slika 31. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj prolina u starim listovima analiziranih klonova vrba (<i>Salix</i> spp.)	84
Slika 32. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj ukupnih rastvorljivih proteina u mladim listovima analiziranih klonova vrba (<i>Salix</i> spp.)	85
Slika 33. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj ukupnih rastvorljivih proteina u starim listovima analiziranih klonova vrba (<i>Salix</i> spp.)	85
Slika 34. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj cisteina u mladim listovima analiziranih klonova vrba (<i>Salix</i> spp.)	90
Slika 35. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj cisteina u starim listovima analiziranih klonova vrba (<i>Salix</i> spp.)	90
Slika 36. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj vodonik peroksida (H_2O_2) u mladim listovima analiziranih klonova vrba (<i>Salix</i> spp.)	91
Slika 37. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj vodonik peroksida (H_2O_2) u starim listovima analiziranih klonova vrba (<i>Salix</i> spp.)	91
Slika 38. Korelacije između analiziranih morfoloških i fiziološko-biohemijskih, i akumulacije Cd u mladim listovima <i>S. viminalis</i>	92
Slika 39. Korelacije između analiziranih morfoloških i fiziološko-biohemijskih parametara, i akumulacije Cd u mladim listovima <i>S. matsudana</i>	93
Slika 40. Korelacije između analiziranih morfoloških i fiziološko-biohemijskih parametara, i akumulacije Cd u mladim listovima <i>S. alba</i>	93
Slika 41. Bi-plot radvajanja morfoloških i fiziološko-biohemijskih parametara analiziranih klonova vrba (<i>Salix</i> spp.) na osnovu primenjenih tretmana	94
Slika 42. Bi-plot radvajanja morfoloških i fiziološko-biohemijskih parametara analiziranih klonova vrba (<i>Salix</i> spp.) poređenjem tretmana bez (-) i tretmana sa limunskom kiselinom (+).....	95
Slika 43. Bi-plot razdvajanja klonova vrba (<i>Salix</i> spp.) na osnovu analiziranih morfoloških i fiziološko-biohemijskih parametara	95

Lista tabela

Tabela 1. Različite tehnike u procesu fitoremedijacije	21
Tabela 2. Odabrani klonovi vrba (<i>Salix</i> spp.) gajeni u polu-kontrolisanim uslovima u staklari	40
Tabela 3. Osnovne fizičko-hemijske karakteristike zemljišta	55
Tabela 4. Koncentracija kadmijuma (Cd) u zemljištu pre početka postavljanja eksperimenta i biodostupnost Cd u zemljišnom rastvoru	56
Tabela 5. Uticaj primenjenih tretmana na biokoncentracijske faktore (BKF) korena i nadzemnog dela u analiziranim klonovima vrba (<i>Salix</i> spp.)	59
Tabela 6. Uticaj primenjenih tretmana na translokacijski faktor (Tf) u analiziranim klonovima vrba (<i>Salix</i> spp.)	60
Tabela 7. Uticaj primenjenih tretmana na morfometrijske parametre analiziranih klonova vrba (<i>Salix</i> spp.)	61
Tabela 8. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj azota (N) u različitim biljnim organima analiziranih klonova vrba (<i>Salix</i> spp.)	63
Tabela 9. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj fosfora (P) u različitim biljnim organima analiziranih klonova vrba (<i>Salix</i> spp.)	63
Tabela 10. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj kalijuma (K) u različitim biljnim organima odabranih klonova vrba (<i>Salix</i> spp.)	64
Tabela 11. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj pigmenata hloroplasta (hlorofil <i>a</i> , <i>b</i> , <i>a+b</i> i karotenoida) u mladim i starim listovima analiziranih klonova vrba (<i>Salix</i> spp.)	65
Tabela 12. Uticaj primenjenih tretmana na parametre razmene gasova u analiziranim klonovima vrba (<i>Salix</i> spp.)	67
Tabela 13. Uticaj primenjenih tretmana na aktivnost antioksidativnih enzima u analiziranim klonovima vrba (<i>Salix</i> spp.)	71
Tabela 14. Uticaj primenjenih tretmana na intenzitet lipidne peroksidacije (MDA sadržaj) i sadržaj redukovanog glutation (GSH) u analiziranim klonovima vrba (<i>Salix</i> spp.)	72
Tabela 15. Uticaj primenjenih tretmana na biokoncentracijske faktore (BKF) korena i nadzemnog dela analiziranih klonova vrba (<i>Salix</i> spp.)	75
Tabela 16. Uticaj primenjenih tretmana na translokacijski faktor (Tf) analiziranih klonova vrba (<i>Salix</i> spp.)	75

Tabela 17. Uticaj primenjenih tretmana na morfometrijske parametre analiziranih klonova vrba (<i>Salix</i> spp.)	77
Tabela 18. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj azota (N) u različitim biljnim organima analiziranih klonova vrba (<i>Salix</i> spp.)	79
Tabela 19. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj fosfora (P) u različitim biljnim organima analiziranih klonova vrba (<i>Salix</i> spp.)	79
Tabela 20. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj kalijuma (K) u različitim biljnim organima odabranih klonova vrba (<i>Salix</i> spp.)	80
Tabela 21. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj pigmenata hloroplasta (hlorofil <i>a</i> , <i>b</i> , <i>a+b</i> i karotenoida) u mladim i starim listovima analiziranih klonova vrba (<i>Salix</i> spp.)	81
Tabela 22. Uticaj primenjenih tretmana na parametre razmene gasova u analiziranim klonovima vrba (<i>Salix</i> spp.).....	83
Tabela 23. Uticaj primenjenih tretmana na aktivnost antioksidativnih enzima u analiziranim klonovima vrba (<i>Salix</i> spp.)	87
Tabela 24. Uticaj primenjenih tretmana na intenzitet lipidne peroksidacije (MDA sadržaj) u analiziranim klonovima vrba (<i>Salix</i> spp.)	88
Tabela 25. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj tiola u analiziranim klonovima vrba (<i>Salix</i> spp.)	89
Tabela P1. Korelacije između analiziranih parametara (različitih morfoloških i fiziološko-biohemijskih karaktera) i akumulacije Cd u mladim listovima <i>S. viminalis</i>	156
Tabela P2. Korelacije između analiziranih parametara (različitih morfoloških i fiziološko-biohemijskih karaktera) i akumulacije Cd u mladim listovima <i>S. matsudana</i>	157
Tabela P3. Korelacije između analiziranih parametara (različitih morfoloških i fiziološko-biohemijskih karaktera) i akumulacije Cd u mladim listovima <i>S. alba</i>	158

1. Uvod

U svetu nagle industrijalizacije i intenzivne poljoprivrede, uz sve veću ekspanziju rasta ljudske populacije, prisustvo zagađujućih supstanci u životnoj sredini je u konstantnom porastu. Među polutantima, značajno mesto zauzimaju teški metali. Imajući u vidu perzistentnost ovih polutanata i mogućnost njihovog nagomilavanja tokom vremena, zagađenje životne sredine teškim metalima predstavlja globalni problem, te dekontaminacija zagađenih područja predstavlja jedan od najvećih izazova današnjice.

Teški metali pokazuju toksično dejstvo na sve žive organizme. Ovi polutanti kod biljaka utiču na sve životne procese, a ulaskom u trofičke lance predstavljaju rizik za zdravlje životinja i čoveka. Prisustvo teških metala u biljkama dovodi do niza morfoloških, anatomskih i fiziološko-biohemijskih promena, a kao rezultat toga dolazi do smanjenja produkcije organske materije. Toksični efekti povišenih koncentracija teških metala uzrokuju poremećaje u metaboličkim procesima biljaka, u usvajanju jona, vodnom režimu, u procesu fotosinteze, transpiracije, kao i translokacije asimilata. Pored toga, toksične koncentracije metala mogu dovesti do pojave oksidativnog stresa, što se manifestuje produkcijom reaktivnih kiseoničnih vrsta, oksidacijom biomolekula, kao i promenom aktivnosti antioksidativnih enzima.

U cilju prečišćavanja zemljišta danas su u upotrebi različite tehnike koje dovode do smanjenja sadržaja teških metala u zemljištu. Široku primenu u dekontaminaciji zemljišta našla je fitoremedijacija koja se zasniva na sposobnosti biljaka da usvajaju, akumuliraju i na taj način da uklanjaju teške metale iz životne sredine. Generalna prednost ove tehnike, u odnosu na klasične metode prečišćavanja zemljišta, poput iskopavanja i ispiranja zemljišta, je neinvazivnost, ekološka prihvatljivost, energetska efikasnost i ekonomska opravdanost. Uzevši u obzir da je interakcija zemljište-biljka veoma složen i dinamičan proces, razumevanje fizioloških procesa u biljkama je od ključnog značaja pri odabiru vrsta koje će se koristiti u sanaciji kontaminiranog zemljišta.

Različite biljne vrste se odlikuju različitim afinitetom za usvajanje teških metala, pa se samim tim razlikuju i u sposobnosti da vrše dekontaminaciju zemljišta. Među kandidatima za proces fitoremedijacije, široku primenu našle su brzorastuće drvenaste vrste, poput predstavnika roda *Salix* (vrbe). Ove vrste se odlikuju nizom poželjnih osobina za proces fitoremedijacije, kao što su brz rast, velika produkcija biomase, dobro razvijen korenov sistem, lako vegetativno razmnožavanje, visok stepen tolerantnosti prema toksičnom dejstvu teških metala.

Iako biljke poseduju sposobnost da usvajaju teške metale iz podloge, ovi polutanti se u zemljištu često nalaze u formi koja je nedostupna biljkama. Samim tim, mogućnost prečišćavanja zemljišta može biti veoma limitirana, što nameće potrebu za usavršavanjem tehnika fitoremedijacije. Novije studije pokazuju sve veću upotrebu različitih supstanci koje poboljšavaju efikasnost biljaka u procesu fitoremedijacije, među kojima je široku primenu našla limunska kiselina. Tretiranje kontaminiranog zemljišta limunskom kiselinom može uticati na povećano usvajanje, akumulaciju i translokaciju metala, što je utvrđeno kod velikog broja biljnih vrsta. Međutim, u literaturi nedostaju istraživanja vezana za potencijalni uticaj limunske kiseline na morfološke karakteristike i fiziško-biohemjske procese kod vrba. Stoga, u ovom radu je predstavljen uticaj asistiranе fitoremedijacije na morfološke, fiziološke i biohemjske parametre kod odabranih klonova različitih vrsta vrba. Na osnovu dobijenih rezultata moguće je definisati odgovarajuće klonove kao potencijalne kandidate pogodne za proces fitoremedijacije. Takođe, na osnovu sveobuhvatnih analiza moguće je izvršiti selekciju parametara koji mogu poslužiti kao indikatori prisutnosti teških metala, a koji bi se mogli koristiti u budućim istraživanjima u ovoj oblasti.

Pregled literature

Životna sredina je u velikoj meri zagađena različitim hemijskih materijama, organskim i neorganskim supstancama, među kojima teški metali zauzimaju značajno mesto. Nagomilavanje teških metala u životnoj sredini može da bude rezultat procesa litogeneze i pedogeneze (formiranje zemljišta od matičnog supstrata), erozije, vulkanskih erupcija, šumskih požara, atmosferske depozicije čestica iz vazduha), kao i antropogenih aktivnosti (Prasad i Freitas, 2003). Čitav niz ljudskih aktivnosti (intenzivna urbanizacija, saobraćaj, industrija, metalurgija, poljoprivreda i dr.) znatno doprinose povećanju emisije teških metala, što za posledicu ima njihovo kumulativno nakupljanje u životnoj sredini (Kabata-Pendias, 2007). Povećanje koncentracije teških metala na poljoprivrednim zemljištima je sve učestalije zbog intenzivne upotrebe mehanizacije, nepravilne i prekomerne upotrebe organskih i mineralnih đubriva, stajnjaka, pesticida i herbicida, kao i zbog dodatnog zagađenja otpadnim vodama (Toth i sar., 2016). Jedan od osnovnih razloga za nakupljanje teških metala u biosferi je taj što su to nerazgradivi elementi, pa se ne mogu uništiti, već se mogu samo prevesti u manje toksične oblike ili se mogu deponovati u vidu neaktivnih hemijskih formi (Prasad, 2003). Prisustvo povećanih koncentracija teških metala u zemljištu i vodi može ugroziti zdravlje ljudi i životinja direktno, upotrebom zagađene vode, ili indirektno ishranom zagađenim biljkama. Prema navodima Singh i saradnika (2011) sadržaj teških metala u životnoj sredini, u svetskim razmerama dostiže čak 22.000 tona kadmijuma; 939.000 tona bakra; 783.000 tona olova i čak 1.350.000 tona cinka. Generalno gledano, procenjuje se da emisija kadmijuma na globalnom nivou iznosi oko 7000 tona godišnje (Stoepler, 1991). Kao najčešći izvori kontaminacije zemljišta teškim metalima navode se metalurška i metaloprerađivačka industrija, rudarstvo, postrojenja za tretman otpadnih voda, deponije, neadekvatne agrotehničke mere, kao i prekomerna upotreba mineralnih đubriva. Veliki problem prekomernog nakupljanja teških metala, posebno u zemljama u razvoju, su i neadekvatne legislative, kao i zakoni koji nisu jasno regulisani i koji propisuju mnogo veće maksimalno dozvoljene koncentracije (MDK vrednost) u poređenju sa svetskim i evropskim standardima. Stoga, dekontaminacija zagađenog zemljišta predstavlja jedan od globalnih izazova današnjice.

1.1. Karakteristike teških metala

Termin „teški metali“ označava heterogenu grupu elemenata različitih fizičko-hemijskih osobina, čija je osnovna karakteristika visoka specifična težina, najčešće veća od 5 g/cm^3 (Appenroth, 2010). Međutim, jasna definicija „teških metala“ još uvek nije u potpunosti razjašnjena, jer u grupu „teških metala“ spadaju i prelazni metali, metaloidi, kao i nemetali poput selena (Kabata-Pendias i Pendias, 2000). Ovi elementi su u prirodi prisutni u veoma niskim koncentracijama (mg/kg) pa se označavaju kao elementi u tragovima. Među njima, pojedini metali kao što su nikal (Ni), bakar (Cu), cink (Zn), gvožđe (Fe), mangan (Mn) i molibden (Mo) su neophodni biljkama kako bi završile svoj životni ciklus i definišu se kao esencijalni teški metali (Hänsch i Mendel, 2009). Ovi mikroelementi učestvuju kao konstituenti ili aktivatori enzima, imaju ulogu u esencijalnim metaboličkim procesima, kao što su fotosinteza, fiksacija azota, transkripcija DNK molekula i dr. (Greger i Landberg, 1999; Vamerali i sar., 2010). Međutim, iako su neophodni za normalno odvijanje životnog ciklusa biljaka, ovi elementi u povišenim koncentracijama pokazuju snažan toksični efekat. Sa druge strane, elementi poput kadmijuma (Cd), olova (Pb), žive (Hg), arsena (As) spadaju u grupu neesencijalnih teških metala i ne pokazuju nikakvu fiziološku, ni biohemijsku ulogu u metabolizmu biljaka, već i pri relativno niskim koncentracijama imaju toksičan efekat na žive sisteme (Lasat, 2002; Clemens, 2006). Toksični efekti ovih polutanata se ispoljavaju na različitim strukturnim i funkcionalnim nivoima biljaka i dovode do različitih morfoloških, anatomskih, fizioloških i biohemijskih promena (Marmioli i sar., 2011). Karakteristike teških metala kao što su nemogućnost biorazgradnje, dug poluživot, kao i visok stepen akumulacije u biljkama, predstavljaju veliki problem za životnu sredinu jer preko biljaka teški metali dospevaju u lance ishrane, a takođe i u podzemne i površinske vode (Pulford i Watson, 2003).

Povećano zagađenje životne sredine, povezano sa industrijskim razvojem i intenzivnom poljoprivrednom, uzrokuje neprekidno i povećano zakašeljavanje zemljišta. Kisela sredina, odnosno smanjena pH vrednost zemljišta omogućava nagomilavanje jona teških metala, usled čega metali prelaze u lako dostupne oblike, čime se povećava njihovo usvajanje od strane biljke (Quartacci i sar., 2006). Intenzivna primena fosfornih đubriva, koja se odlikuju relativno visokim sadržajem Cd, jedan je od uzroka deponovanja ovog metala u poljoprivrednim zemljištima, pa samim tim i u biljkama (Wuana i Okieimen, 2011; Pagani i sar., 2012).

Dosadašnja istraživanja su pokazala uticaj teških metala na odvijanje brojnih fiziološko-biohemijskih procesa: mineralnu ishranu, vodni režim, fotosintezu, disanje,

aktivnost enzima, što dalje uzrokuje promene u hemijskom sastavu biljaka kao i smanjenje organske produkcije (Pajević i sar., 2016).

Osnova toksičnosti teških metala ogleda se u njihovoj reakciji sa različitim hemijskim grupama. Naime, teški metali se označavaju kao „Luisove kiseline“ i imaju sposobnost da prime par elektrona iz kovalentne veze tako što reaguju sa „Luisovim bazama“ kao što su tiolna, hidroksilna, amino ili karboksilna grupa (Appenroth, 2010). Pojedini teški metali imaju sposobnost da istisnu/zamene neki neophodni element i time da dovedu do simptoma nedostatka tog elementa. Visoke koncentracije teških metala u biljnom tkivu dovode do oksidativnog stresa, tako što stimulišu formiranje slobodnih radikala i reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. Reactive oxygen species – ROS) (Dietz i sar., 1999). Nastanak reaktivnih kiseoničnih vrsta u prisustvu teških metala može biti direktan proces koji je uslovljen aktivnošću redoks aktivnih jona metala, poput jona Fe^{2+} i Cu^{2+} , pri čemu nastali radikali izazivaju oksidaciju gotovo svih molekula (Fenton i Haber-Weiss reakcija), ili indirektan proces gde usled poremećaja na nivou elektron transportnog lanca nastaju ROS molekuli. Takođe, prisustvo ovih polutanata u biljnom tkivu dovodi do lipidne peroksidacije ćelijskih membrana, čime se narušava njihova funkcionalnost i selektivnost pri transportu materija (Sharma i Dietz, 2009). Toksičnost teških metala može indukovati inhibiciju aktivnosti enzima, može uzrokovati zamenu esencijalnih kofaktora, ili dovesti do blokiranja funkcionalnih grupa proteina (Rodríguez-Serrano i sar., 2009).

1.1.1. Bio(fito)dostupnost teških metala u zemljištu

Biljke pre svega usvajaju teške metale iz zemljišta, dok se određene količine mogu usvajati i preko nadzemnih organa, odnosno iz vazduha. I pored činjenice da se metali nalaze u velikoj količini u zemljištu, njihovo usvajanje od strane biljke je u direktnoj korelaciji sa količinom dostupnih oblika metala u zemljištu (Chaney i sar., 2007). Da bi se izvršila remedijacija zemljišta, najpre je neophodno da se metali u zemljišnom matriksu nalaze u obliku koji je dostupan biljkama, što obuhvata nekoliko faza: oslobađanje metala iz čvrste faze, transport oslobođenog polutanta, njegovo vezivanje za koren, prolazak kroz ćelijsku membranu i ulazak u metaboličke procese u ćeliji (Kim i sar., 2015). Biodostupni oblici metala se u zemljištu mogu nalaziti u različitim hemijskim formama, kao što su metalni joni, rastvorljivi metalni kompleksi sa organskim helatima, kao i joni koji su adsorbovani za čestice zemljišta u

obliku neorganskih komponenti. Sa druge strane, katjoni metala mogu biti vezani i za organsku materiju zemljišta, pa se u rizosferi nalaze u formi karbonata ili silikata čime je limitirana njihova dostupnost biljkama (Marić, 2014). Na osnovu prisustva biodostupnih oblika u zemljišnom matriksu, teški metali se mogu definisati kao lako biodostupni metali, gde spadaju: Cd, Ni, Zn, As, Cu i Se; umereno biodostupni: Fe, Mn i Co, dok se u grupu slabo biodostupnih metala ubrajaju: Pb, Cr i U (Prasad, 2003). Pored navedenog, biodostupnost teških metala u zemljištu u velikoj meri zavisi od karakteristika zemljišnog rastvora, poput pH vrednosti, aeracije, vlažnosti, kao i od temperature zemljišta (Nagajyoti i sar., 2010). Limitirajući faktor za oslobađanje i vezivanje teških metala za ćelije korena je pH vrednost. Niske pH vrednosti povećavaju mobilnost katjona, poput: Cd, Pb, Zn i dr., pa su ovi metali lako dostupni u kiseloj sredini, dok za anjone, poput As i Se važi obrnuto, odnosno pokretljivost ovih elemenata je veća u alkalnoj sredini (Clemente i sar., 2010). Naime, u kiselom zemljištu dolazi do oslobađanja H^+ jona sa ćelija korena, što dovodi do desorpcije metalnih jona sa čestica zemljišta i njihovog otpuštanja u zemljišni rastvor (Singh i sar., 2015). Na taj način se povećava mogućnost usvajanja metalnih jona pomoću korena biljke. Sa druge strane, u alkalnom zemljištu metalni joni su u većoj meri imobilisani, te je utvrđeno da je mobilnost jona Cd^{2+} znatno smanjena pri pH vrednosti višoj od 6-7 (Trakal i sar., 2012). Ova činjenica ukazuje na to da je usvajanje kadmijuma iz zemljišta pre svega zavisno od količine biodostupnog metala u odnosu na ukupnu količinu metala.

1.1.2. Usvajanje i transport teških metala u biljkama

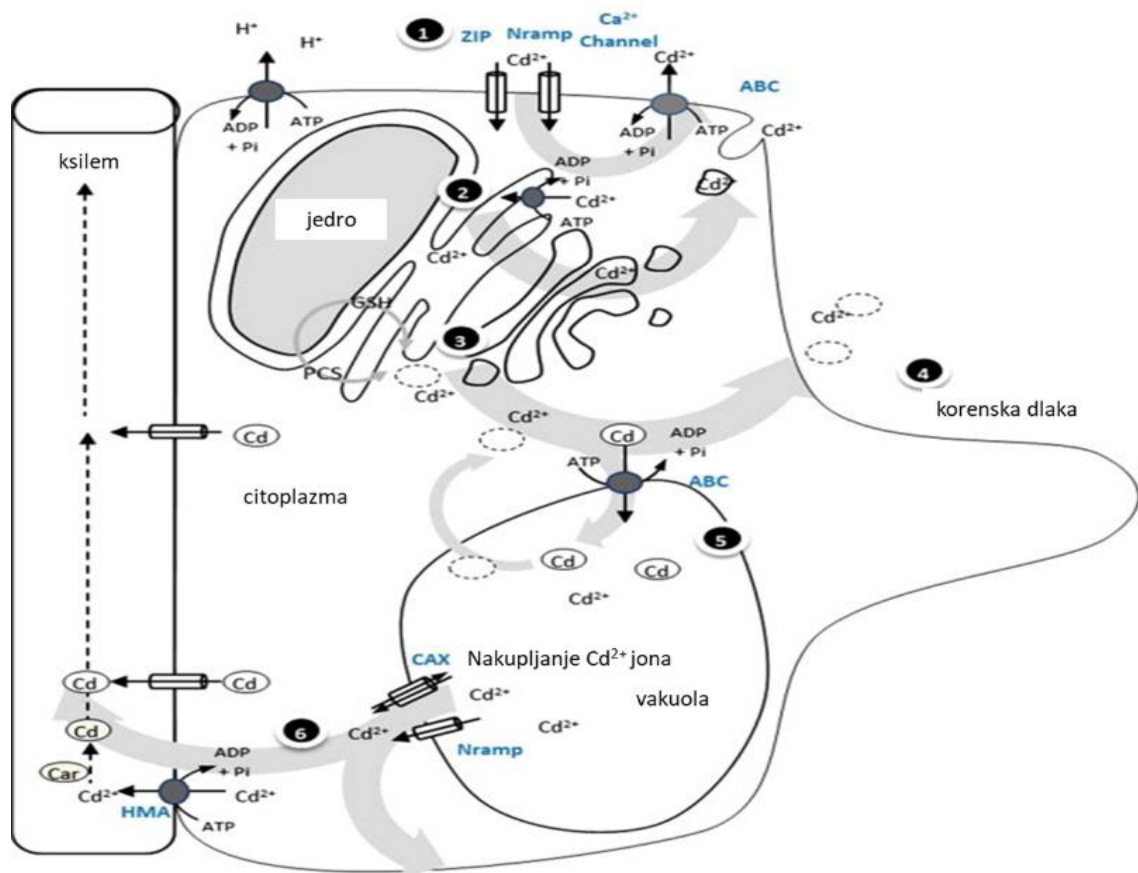
Poslednjih godina mehanizmi usvajanja, transporta i akumulacije teških metala su dobro proučeni. Primarnu ulogu u usvajanju teških metala iz zemljišta ima koren (Slika 1). Metali usvojeni iz zemljišnog rastvora mogu biti zadržani u korenu (vezani za ćelijske zidove), transportovani kroz apoplast korteksa do endodermisa, ili ući u ćelije korena (Nikolić, 2009). Naime, primarno mesto za vezivanje metala predstavlja ćelijski zid. Nakon adsorpcije jona metala ili metal-helatnih kompleksa na površinu korena, dolazi do njihovog transporta kroz ćelijsku membranu, što je omogućeno posredstvom nespecifičnih membranskih transportera koji su vezani za proteinske nosače na plazma membrani (Seregin i Kozhevnikova, 2008). Ovi transporteri poseduje ekstracelularni vezujući domen za koji se vezuju metali i na taj način omogućavaju povezivanje ekstracelularne sredine i intracelularnog medijuma. Međutim,

određena količina metala ostaje vezana za ćelijski zid zbog postojanja negativno naelektrisanih grupa, čime se katjoni metala zadržavaju i sprečen je njihov dalji transport i ulazak u citosol (Wang i sar., 2008). Takođe, ćelijski zid predstavlja fizičku i fiziološku barijeru za dalji transport metalnih jona, zbog postojanja velikog broja ugljenih hidrata koji su bogatih karboksilnim grupama, kao što su pektini i lignini. Na površini korena, joni Cd^{2+} mogu ostati vezani za karboksilne grupe, čime se smanjuje njihov ulazak u koren (Lasat, 2000).

Usvojeni metali se ulaskom u ćelije dalje mogu transportovati simplastom ili apoplastom. Simplastni put predstavlja ulazak jona kroz plazma membranu ćelije, uz mogućnost daljeg transporta plazmodezmama od ćelije do ćelije. Simplastno kretanje jona obavezno uključuje ulaz i izlaz kroz plazma membrane endodermalnih ćelija, što često inicira i aktivan transport, dok je apoplastni put transport jona kroz porozne zidove ćelija omogućen isključivo pasivnim usvajanjem jona (Oljača i sar., 2017). Transport Cd^{2+} jona kroz ćelijsku membranu vrši se pomoću dvovalentnih katjonskih kanala (proteinskih transportera) koji neselektivno transportuju i druge dvovalentne katjone, poput Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} (Vassilev i sar., 2002; Shahid i sar., 2016). Do sada je identifikovano nekoliko familija proteinskih transportera za teške metale, kao što su ZIP familija (eng. Zinc-regulated, iron-regulated transporter protein), koja prvenstveno predstavlja nosače za jone Zn^{2+} i Fe^{2+} , ABC familija transportera (eng. ATP-binding cassette transporters), zatim Nramp familija (eng. Natural resistance-associated macrophage) i dr. (Zhao i Chu, 2011). Ovi transporteri igraju važnu ulogu u prenosu različitih dvovalentnih jona, uključujući i jone Cd^{2+} koji se nesmetano mogu preneti u unutrašnjost ćelije (Seth i sar., 2012). Upravo ova neselektivnost membranskih transportera objašnjava ulazak neesencijalnih metala nasuprot koncentracijskom gradijentu, odnosno posredstvom aktivnog transporta jona (Ali i sar., 2013). Takođe, ovi transporteri imaju ulogu u održavanju homeostaze metala u citosolu, a istovremeno mogu biti uključeni i u procese detoksifikacije teških metala u ćeliji, tako što vrše njihovo premeštanje iz citosola u vakuolu (Salt i sar., 1993). Pored toga, proteinski transporteri mogu uticati na aktivaciju antioksidativnog sistema zaštite, a takođe mogu povećati produkciju kompatibilnih osmolita (Singh i sar., 2015).

Nakon što dospeju u koren, teški metali mogu biti imobilisani i zadržani na nivou korena, ili se preko ksilemskog soka mogu transportovati u nadzemne delove biljke gde se u najvećoj meri deponuju u vakuoli (Salt i sar., 1995). Kretanje ksilemskog soka, koji sadrži jone metala, od korena do nadzemnih delova biljaka izdanka i listova, označeno je kao translokacija metala i u velikoj meri je zavisno od intenziteta transpiracije (Raskin i Ensley, 2000).

Kadmijum se u ksilemskom soku transportuje u vidu slobodnih Cd^{2+} jona, ili u kompleksu vezan za organske ili aminokiseline (Cataldo i sar., 1988; Irtelli i Navari-Izzo, 2006). S obzirom da vakuole predstavljaju ćelijske organele sa niskom metaboličkom aktivnošću, sekvestracija teških metala u ovim organelama omogućava da se visoke koncentracije jona metala uklone iz citosola, čime se redukuje njihova interakcija u metaboličkim procesima (Sheoran i sar., 2009). Na taj način izolacija metala u vakuoli predstavlja jedanu od glavnih strategija biljaka da tolerišu prisustvo teških metala, posebno Cd^{2+} i Zn^{2+} (Bhargava i sar., 2012). Međutim, određena količina usvojenog Cd se zadržava u citosolu i posredstvom HMA transporterera (eng. Heavy Metal transporting ATPases) ulazi u ksilem (Slika 1). Studije novijeg datuma pokazuju da organske kiseline, poput malonske, oksalne i limunske imaju veliki značaj u transportu metala kroz ksilem, i doprinose njihovoj sekvestraciji u vakuolu (Magdiziak i sar., 2017).



Slika 1. Model transportnog puta kadmijuma iz zemljišta preko korenskih dlaka i dalji tok ksilemom do nadzemnih delova biljaka (Irfan i sar., 2013). 1. Usvajanje jona Cd iz zemljišnog rastvora u ćelije korena aktivnošću ZIP i Nramp transporterima i Ca^{2+} kanalima; 2-4. Uloga endoplazmatičnog retikuluma i Goldžijevog aparata u obrazovanju GSH-Cd kompleksa i mehanizmima detoksifikacije Cd izbacivanjem u zonu korenskih dlaka; 5. Sekvestracija Cd u vakuolu posredstvom ABC familije transporterera koja je lokalizovana na tonoplastu; 6. Aktivacija HMA transporterera i premeštanje Cd u ksilem.

1.2. Toksičnost kadmijuma – osobine i uticaj na životne procese biljaka

Kadmijum (Cd) je prelazni metal koji pripada IIb grupi periodnog sistema elemenata sa atomskim brojem 48. Cd je jedan od najšire rasprostranjenih teških metala u životnoj sredini, a pored olova i žive predstavlja jedan od najtoksičnijih elemenata. Nakupljanje Cd u zemljištu može biti uslovljeno atmosferskom depozicijom, pri čemu se kadmijum smatra jednim od najčešćih metala koji se nagomilavaju taloženjem iz vazduha (eng. runoff metali). Čestice čađi, prašine, izduvni gasovi motornih vozila mogu da sadrže Cd u tragovima, koje se emituju u vazduh, a zatim se padavinama u vidu kiše i snega ponovo deponuju na površinu puteva i spiraju se na okolno zemljište (Welikala i sar., 2018). Takođe, veliki broj antropogenih aktivnosti doprinosi povećanju sadržaja ovog metala u životnoj sredini. Kadmijum ima široku upotrebu u različitim aspektima ljudske delatnosti, koristi se u izradi u Ni/Cd baterija, u brodogradnji se upotrebljava za izradu prevlaka koje štite od korozije, ulazi u sastav komponenti električnih uređaja, različitih produkata rafinerija, fosfornih đubriva, deterdženata i dr. (Wuana i Okieimen, 2011). Povišene koncentracije ovog metala mogu izazvati ozbiljne posledice kod svih živih organizama. Kadmijum se u najvećoj meri akumulira u jetri, bubrezima, kostima, kao i u nervnom sistemu, dok hronično izlaganje visokim koncentracijama ovog metala može uzrokovati ozbiljne zdravstvene probleme kod ljudi. Toksičnost teških metala kod čoveka se ispoljava u vidu oštećenja kože, oboljenja koštanog sistema, bubrega, jetre, centralnog nervnog sistema, a smatra se da prisutnost teških metala u visokim koncentracijama ima i kancerogeni efekat (Yeung i Hsu, 2005). Poznat je primer trovanja kadmijumom u Japanu kod ljudi koji su jeli pirinač koji je bio zagađen toksičnom koncentracijom kadmijuma. Bolest je nazvana *Itai-itai* što u prevodu znači boli – boli. Osnovne fizičke manifestacije trovanja ovim teškim metalom su iskrivljenost kostiju i pogurena kičma, dok je visok procenat smrtnosti obolelih osoba registrovan kao posledica oštećenja bubrega (Nishijo i sar., 2017).

Fitotoksičnost kadmijuma zavisi od biljne vrste, a ispoljava se kada koncentracije ovog metala u biljnom tkivu dostignu vrednosti između 10 i 20 mg/kg suve materije (Kabata-Pendias i Pendias, 2000). Kadmijum se karakteriše dobrom mobilnošću, te se lako usvaja korenom i premešta u nadzemne delove biljaka, što mu omogućava brz ulazak u lanac ishrane preko sistema zemljište-voda-biljka (Liu i sar., 2011). Toksičnost kadmijuma se često zasniva na tzv. jonskoj mimikriji, pri čemu se joni Cd^{2+} usvajaju umesto Ca^{2+} ili Zn^{2+} i dovode do njihovog

nedostatka (Sandbichler i Höckner, 2016). Neki od efekata toksičnosti kadmijuma u biljnom tkivu su oštećenje meristemskih tkiva korena, usporen rast korena i izdanaka, hloroza, ubrzana senescencija i apscisija listova (Seregin i Kozhevnikova, 2008). Cd inhibira klijanje semena, uzrokuje lisnu hlorozu izazivajući nedostatak Fe, narušava vodni režim, izaziva poremećaje u usvajanju mnogobrojnih makro- i mikroelemenata, remeti funkcionisanje velikog broja enzima, dovodi do formiranja slobodnih radikala i izaziva oksidativni stres (Greger i Lindberg, 1986; Ahmad i sar., 2009; Ehsan i sar., 2014). Takođe, poznat je uticaj Cd na proces razmene gasova. Nakupljanje ovog metala u fotosintetički aktivnim ćelijama može dovesti do smanjenja intenziteta fotosinteze izazivajući strukturne promene hloroplasta, kao i do poremećaja u sintezi hlorofila, karotenoida i plastohinona, transporta elektrona, aktivnosti enzima Kalvinovog ciklusa (Nikolić, 2009). Takođe, kadmijum dovodi do promena u necikličnoj fosforilaciji i fotolizi vode, a zbog smanjene provodljivosti stoma i inhibicije aktivnosti enzima koji su uključeni u fiksaciju CO₂, redukuje se asimilacija ugljenika (Seregin i Ivanov, 2001). U literaturi se navodi da visoke koncentracije Cd utiču na mineralnu ishranu, čak i kod Cd-rezistentnih biljaka (npr. *Brassica juncea*). Naime, u listovima biljaka vrste *Brassica juncea* zapažen je pad sadržaja mikroelemenata poput Mn, Cu i Zn, čak i pri veoma niskim koncentracijama Cd (Salt i sar., 1995). Toksičnost kadmijuma pre svega je vezana za njegov visok afinitet ka tiolnoj grupi proteina, što može dovesti do promena u strukturi i funkcionisanju proteina (Irtelli i Navari-Izzo, 2006); poremećaja u ćelijskoj redoks homeostazi (Mishra i sar., 2006); kao i do hiperprodukcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (Romero-Puertas i sar., 2007). Visoke koncentracije ovog metala u ćeliji smanjuju mitotički indeks, čime se redukuje deoba ćelija i usporava se njihova proliferacija (Alagić i sar., 2013). Stres izazvan prisustvom visokih koncentracija Cd utiče na sintezu biljnih hormona, pri čemu može doći do pojačane sinteze etilena, abcisinske kiseline, salicilne kiseline ili jasmonata (Maksymiec i sar., 2007; Irfan i sar., 2013).

1.2.1. Uticaj kadmijuma na produkciju biomase

Generalno gledano, jedan od prvih vidljivih simptoma toksičnosti kadmijuma je smanjena produkcija biomase i redukovan rast biljaka, pre svega korena. Smanjena produkcija biomase u prisustvu kadmijuma kod različitih predstavnika roda *Salix* potvrđena je u velikom broju studija (Cosio i sar., 2006; Meers i sar., 2007; Yang i sar., 2015a). Luković i saradnici (2012) ukazuju da prisustvo Cd dovodi do smanjene produkcije biomase korena, listova i

izdanka u znatno većoj meri kod vrba, u odnosu na topole gajenje u istim uslovima. Slično navode Guo i saradnici (2015), koji naglašavaju da intenzivnije smanjenje biomase kod vrba u odnosu na topole, predstavlja rezultat veće akumulacije Cd kod vrsta u okviru roda *Salix*. Rezultati različitih studija pokazuju značajne razlike u pogledu uticaja Cd na morfološke karakteristike biljaka, zavisno od analiziranog genotipa, odnosno klona. Tako, Zacchini i saradnici (2009) navode značajan inhibitorni efekat Cd na dužinu korena kod različitih klonova *Salix alba* gajenih u hidroponima, u prisustvu 50 μM Cd. Suprotno tome, Coccoza i saradnici (2011) nisu utvrdili statistički značajan uticaj prisustva Cd na dužinu korena *S. alba*, klon SS5, pri istim eksperimentalnim uslovima. Aktivna površina korena, kao i dužina korena igraju značajnu ulogu u usvajanju mineralnih materija, te se promena dužine korena u uslovima povećanih koncentracija teških metala može koristiti kao jedan od bioindikatora prisustva Cd u podlozi (Vaculík i sar., 2012). Još jedan od vidljivih simptoma toksičnosti Cd je smanjena produkcija biomase nadzemnih delova biljaka, posebno listova. Kao rezultat dugoročnog izlaganje biljaka visokim koncentracijama Cd može doći do pojave hloroze ili nekroze listova, kao i do defolijacije (Tlustoš i sar., 2007). Cosio i koautori (2006) navode pojavu hloroze kao posledicu prisustva Cd u biljkama pri koncentracijama od 5, 10, 50, i 200 μM Cd u hranljivom rastvoru, dok su simptomi nekroze zabeleženi pri koncentracijama od 10 i 50 μM Cd. Smanjenje biomase biljaka, kao i redukovan rast korena, često su u vezi sa smanjenim usvajanjem neophodnih makro- i mikroelemenata, kao i sa padom fotosintetičke aktivnosti biljaka što je uslovljeno prisustvom teških metala u biljnoj ćeliji.

1.2.2. Uticaj kadmijuma na mineralnu ishranu

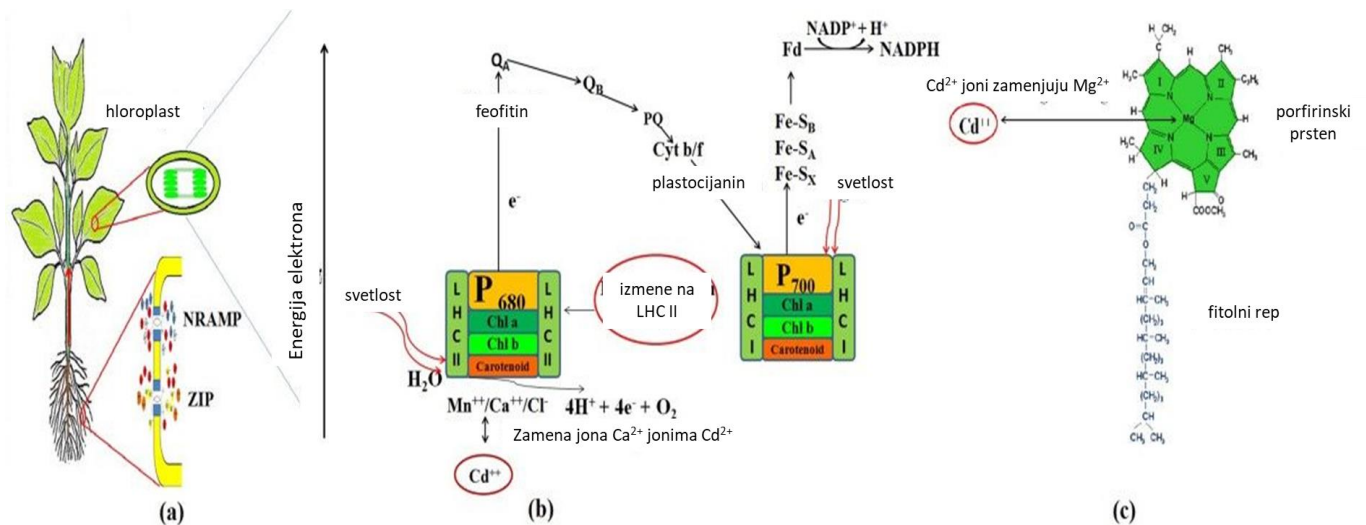
Brojna istraživanja su pokazala da povišene koncentracije teških metala mogu dovesti do promena u usvajanju biogenih elemenata koji su neophodni biljci kako bi neometano završila životni ciklus (Mattina i sar., 2003; Gomes i sar., 2013; Borišev i sar., 2016). Usvajanje Cd od strane korena biljke može dovesti do pojave deficijencije i poremećaja u balansu mineralnih elemenata u korenu i listovima (Vassilev i sar., 2005). Prisustvo Cd u visokim koncentracijama u zemljištu može dovesti do oštećenja korenskih dlaka i njihove smanjene propustljivosti za jone neophodnih elemenata, usled kompeticije sa jonima teških metala. Samim tim, smanjuje se i translokacija mineralnih elemenata u nadzemne delove što rezultira njihovim nedostatkom (Hagemeyer i Breckle, 2002). Visoke koncentracije Cd u biljnom tkivu

moгу dovesti do redukcije sadržaja K, Ca i Mg, što je registrovano kod paradajza i krastavca (Burzynski, 1988). Takođe, smanjenje sadržaja makroelemenata azota, fosfora i kalijuma u uslovima povišenih koncentracija Cd registrovano je i kod većeg broja drvenastih vrsta, poput breze (Gussarsson, 1994), bagrema (Župunski, 2017), topola (Kebert, 2014). Međutim, uticaj Cd na sadržaj makronutrijenata u velikoj meri zavisi od mnogobrojnih faktora: primenjene doze Cd, genotipske specifičnosti analizirane vrste, kao i od dužine trajanja izloženosti teškim metalima. Borišev (2010) naglašava negativan uticaj Cd na sadržaj makroelemenata N, P, K u različitim biljnim organima, u zavisnosti od analiziranog klona vrba. Takođe, Coccozza i saradnici (2011) su zabeležili signifikantan pad sadržaja fosfora kod biljaka topola gajenih u prisustvu Cd. Visoke koncentracije Cd utiču na metabolizam azota delujući na tiolne grupe proteina, a takođe i na promenu aktivnosti enzima nitrat-reduktaze (Burzynski, 1988). Pored toga, smanjenje asimilacije azota može indukovati i nedostatak sumpora u nadzemnim delovima biljaka (Vassilev i sar., 2002; Irfan i sar., 2013). Imajući u vidu da je uloga azota u fiziološkim procesima mnogostruka, nedostatak ovog elementa može dovesti do smanjenog rasta biljaka usled smanjenja sinteze hlorofila (Gomes i sar., 2013). Takođe, u literaturi je poznat antagonistički efekat Cd sa različitim mineralnim elementima (Borišev i sar., 2016). Kako autori navode, kod vrste *Salix viminalis* visoka akumulacija Cd u nadzemnim organima biljaka indukovala je smanjeno usvajanje Mg^{2+} i Fe^{2+} , što je uslovljeno kompeticijom dvovalentnih jona Cd sa ovim nutrijentima. Slično navode Mleczek i saradnici (2011), koji su utvrdili pozitivnu korelaciju između količine usvojenog Cd i količine Ca i Mg u zemljištu. Na nivou korena Cd može vršiti substituciju i drugih dvovalentnih katjona poput Zn^{2+} , izazivajući njihovo smanjeno usvajanje (Irfan i sar., 2013). Smanjeno usvajanje neophodnih makro- i mikronutrijenata od stane korena može biti praćeno njihovom smanjenom translokacijom u nadzemne organe, što se može manifestovati u vidu hloroze i nekroze listova. Jedan od načina transporta Cd kroz ćelijsku membranu omogućen je pomoću voltažno-zavisnih jonskih kanala za kalcijum. Naime, kadmijum može delovati na propustljivost ćelijskih membrana na taj način da joni kalcijuma (Ca^{2+}) mogu biti zamenjeni jonima Cd^{2+} , što može indukovati nedostatak ovog makronutrijenta (Rodríguez-Serrano i sar., 2009). Takođe, kadmijum može uticati na aktivnost enzima Ca-ATPaza, čime se remeti transport kalcijuma i menja se distribucija ovog elementa u biljnim tkivima. Takođe, postoje podaci da teški metali mogu i da podstiču usvajanje drugih jona. Na primer, poznat je sinergizam između jona Cd^{2+} i Cu^{2+} (Moraghan, 1993).

1.2.3. Uticaj kadmijuma na parametre fotosinteze i transpiracije

Očuvanje fotosintetičke aktivnosti biljaka izloženih prisustvu teških metala predstavlja imperativ za njihov nesmetan rast i razvoj. Visoka aktivnost fotosintetičkog aparata je ujedno i jedan od neophodnih uslova za uspešnu primenu biljaka u procesu fitoekstrakcije. S obzirom da je Cd izuzetno mobilan element, njegovo prisustvo u visokoj koncentraciji u listovima može dovesti do inhibicije različitih metaboličkih i fizioloških procesa kod biljaka. Prisustvo teških metala u ćeliji može indukovati promene u reakcionim centrima i antena pigmentima, uticati na transport elektrona i reakcije svetle faze fotosinteze (Shahid i sar., 2016). Promene u strukturi hloroplasta, kao posledica prisustva Cd u biljnom tkivu, zabeležene su kod vrste *Juncus effusus* koja je gajena u hidroponima pri tretmanima od 50 i 100 μM Cd (Najeeb i sar., 2011). U literaturi se posebno ističe uticaj Cd na aktivnost enzima Rubisco (ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza), pri čemu prisustvo Cd u listovima biljaka može usloviti smanjenje karboksilacije i regeneracije ovog enzima, čime se narušava efikasnost tamne faze fotosinteze (Guo i sar., 2015). Takođe, poznato je da Cd pokazuje inhibitorni efekat na aktivnost drugih enzima poput fosfoenolpiruvat karboksilaze, aldolaze, fruktozo-6-fosfokinaze, fruktozo-1,6-bisfosfataze, NADP^+ gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze i dr. (Sheoran i sar., 2009; Parmar i sar., 2013). Kadmijum pokazuje negativan uticaj na vodni balans i proces transpiracije, što je u bliskoj vezi sa promenama u građi i aktivnosti stominog aparata. Prisustvo jona kadmijuma u biljnom tkivu utiče na povećanje broja stoma, uz istovremeno smanjenje njihovih dimenzija (Lunáčková i sar., 2003). Visoka koncentracija Cd u biljnom tkivu može dovesti do povećanja koncentracije abcisinske kiseline u listovima, što uzrokuje povećanja difuznog otpora stoma i njihovo zatvaranje, usled čega dolazi do smanjenja asimilacije CO_2 (Pietrini i sar., 2010). Pored toga, prisustvo Cd može uzrokovati poremećaj u signalingu Ca^{2+} jona, što takođe utiče na regulaciju otvaranja i zatvaranja stoma (He i sar., 2011). Poznato je da Cd^{2+} ima sposobnost da istisne jone Mg^{2+} iz porfirinskog prstena hlorofila, čime se vrši substitucija jona Mg i narušava se struktura hlorofila, a kao rezultat toga može doći do postepene inhibicije fotosinteze (Slika 2). Kadmijum se lako vezuje za funkcionalne grupe mnogih enzima, strukturnih proteina ili ugljenih hidrata čime se ometa fotosintetička aktivnost biljaka (Pietrini i sar., 2005). Inhibitorno dejstvo Cd na biosintezu hlorofila, zajedno sa njihovom pojačanom degradacijom dovodi do smanjenja sadržaja fotosintetičkih pigmenata kod brojnih biljnih vrsta (Vassilev i sar., 2005; Ahmad i sar., 2009; Mohamed i sar., 2012). Negativan uticaj Cd na fotosintetičke parametre kod vrba i topola gajenih u uslovima povećanih

koncentracija ovog metala u podlozi zabeležen je u većem broju radova (Lunáčková i sar., 2003; Pajević i sar., 2009; Pietrini i sar., 2010; Nikolić i sar., 2015).



Slika 2. Uticaj kadmijuma (Cd) na fotosintetički aparat. (a) Usvajanje Cd preko korena i transport do listova zahvaljujući transporterima (NRAMP i ZIP familije transporterata); (b) Dejstvo Cd na fotosistem II (P680) i fotosistem I (P700); (c) substitucija jona Mg^{2+} jonima Cd^{2+} u molekulu hlorofila (Parmar i sar., 2013).

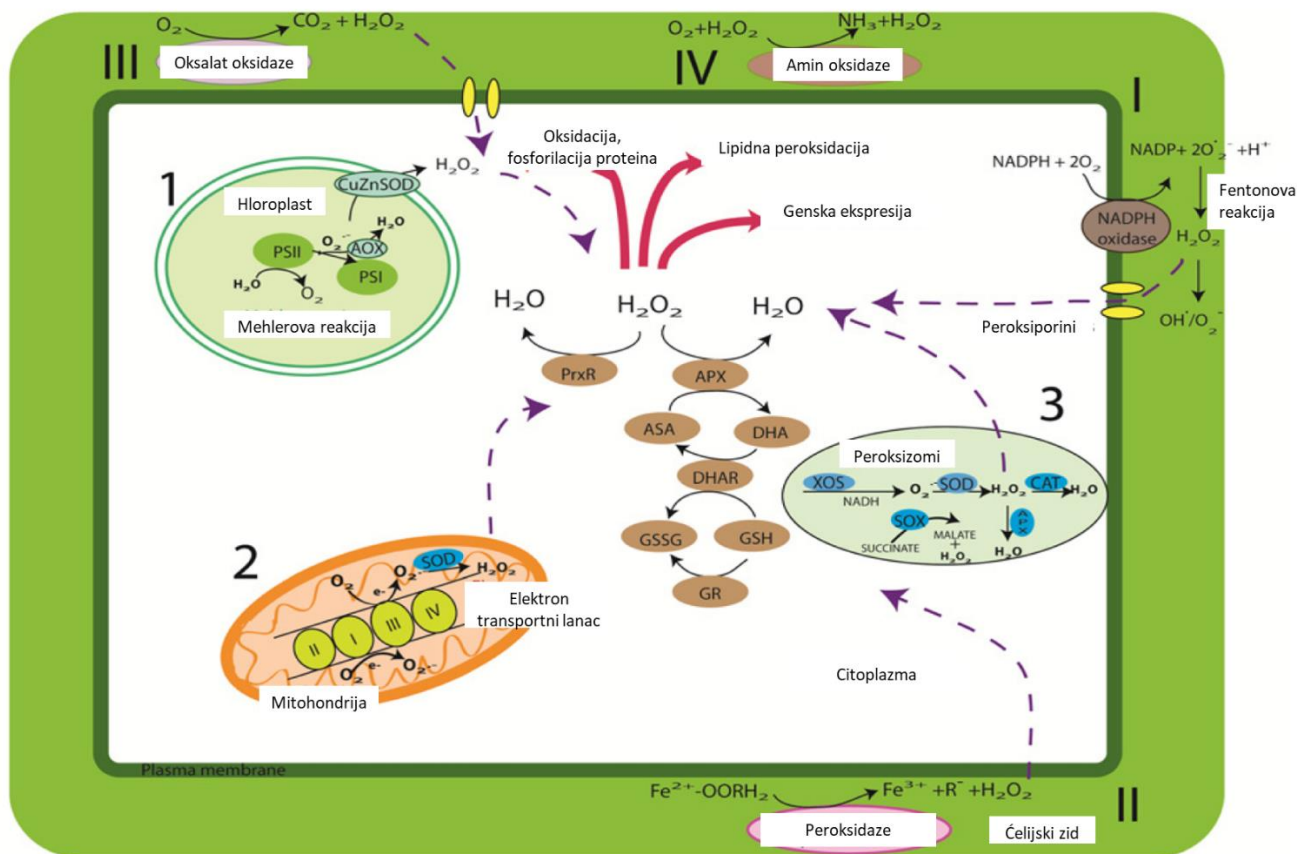
1.2.4. Uticaj kadmijuma na biohemijske pokazatelje

Obrazovanje reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) je normalan metabolički proces i odvija se tokom fotosinteze, respiracije, beta-oksidacije masnih kiselina, kao i tokom senescencije biljaka, dok prekomerna produkcija ROS nastaje kao rezultat dejstva različitih stresnih faktora na biljke (Vassilev i sar., 2002; Stikić i Jovanović, 2012). Kada su biljke izložene svetlosti, najveća količina ROS molekula se produkuje tokom Mehlerove reakcije u hloroplastima, kao i tokom transporta elektrona u peroksizomima, dok se u mraku ovi molekuli produkuju tokom ćelijske respiracije u mitohondrijama (Slika 3). Tokom transporta elektrona primarni akceptor je O_2 , koji se od 95-99% redukuje do vode, dok se preostalih 1-5% prevode u superoksid anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$). Ovaj molekul se prirodno produkuje tokom procesa fotosinteze u fotosistemu II (P680). Međutim, tokom prenosa elektrona duž FSII može doći do „curenja“ elektrona, usled čega dolazi do nakupljanja toksičnog superoksid anjon radikala i pojave oksidativnog stresa. U peroksizomima, glavni put nastanka $O_2^{\cdot-}$ je fotorespiracija, dok se H_2O_2 produkuje u enzimskim reakcijama. Mitohondrije predstavljaju glavnu energetska mašineriju u biljnoj ćeliji i u najvećoj meri doprinose produkciji ROS molekula. Produkcija ovih reaktivnih oblika kiseonika duž respiratornog lanca mitohondrija najčešće se dešava na

nivou kompleksa I (NADH: ubikinon oksidoreduktaza), kao i na nivou kompleks III (citohromski b/c₁ kompleks) (Asada, 2006; Del Rio i sar., 2006; Noctor i sar., 2007; Ma i sar., 2013).

Prisustvo teških metala u biljkama dovodi do oksidativnog stresa kod biljaka, što se manifestuje hiperprodukcijom reaktivnih kiseoničnih vrsta. Prekomerna količina ovih molekula u ćeliji pokazuje štetan efekat na aktivnost proteina, hlorofila, dovodi do peroksidacije lipida biomembrane, uzrokuje transformaciju DNK i ometa normalno odvijanje metaboličkih puteva (Hassan i sar., 2017). Kada mehanizmi odbrane biljaka od prekomerne koncentracije Cd u citosolu nisu u stanju da održe nivo slobodnih jona ovog metala ispod toksičnih vrednosti, može doći do disbalansa u produkciji i eliminaciji slobodnih radikala, kao i do njihovog nagomilavanja u ćeliji. S obzirom da je Cd redoks neaktivan molekul, on nema mogućnost direktne produkcije reaktivnih kiseoničnih molekula u Fentonovoj i Haber-Weiss-ovoj reakciji (Rodriguez-Serrano i sar., 2009). Međutim, Cd indirektno može da dovede do hiperprodukcije slobodnih radikala, poput singlet kiseonika (¹O₂), superoksida anjona (O^{2•-}), vodonik-peroksida (H₂O₂) ili hidroksi-radikala (OH[•]), što dovodi do ćelijskih oštećenja, najčešće na nivou mitohondrija i hloroplasta (Sandbichler i Höckner, 2016; Mahmud i sar., 2018) (Slika 3).

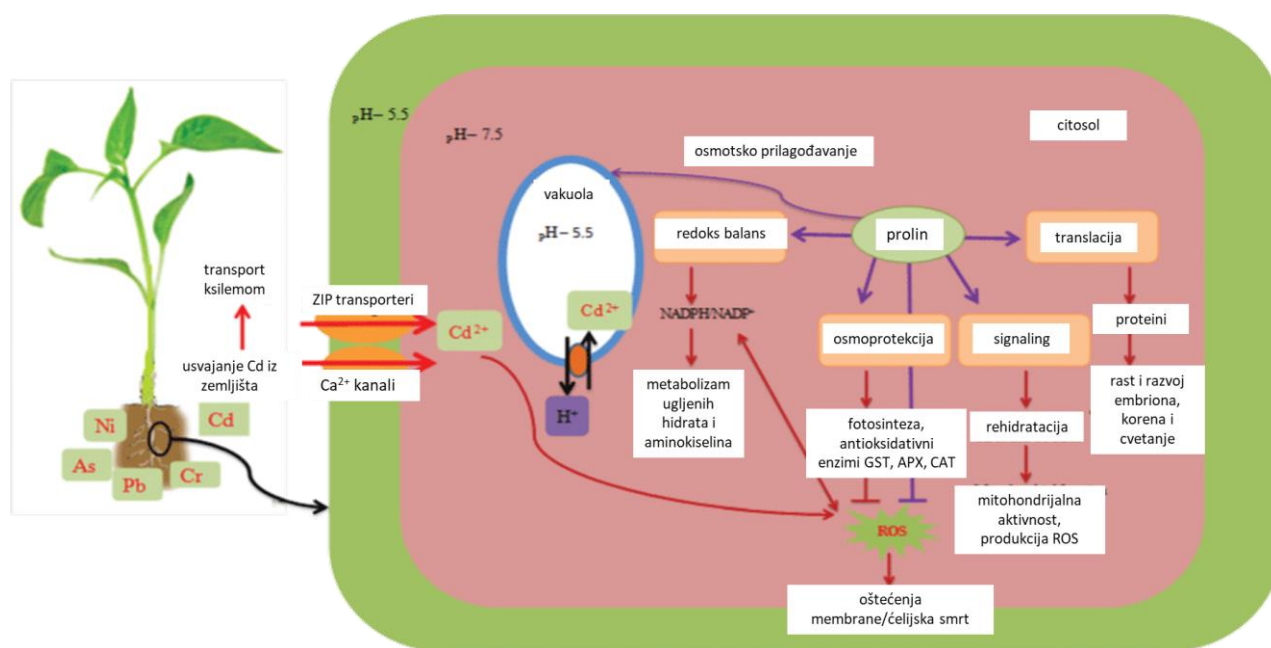
Da bi se odbranile od oksidativnog stresa koji je izazvan prisustvom teških metala, biljke imaju mogućnost aktiviranja različitih mehanizama odbrane, koji uključuju enzimski i neenzimski sistem zaštite. Generalno, antioksidanti se prevode u prooksidante koji su manje reaktivni, ili se oksiduju do netoksičnih oblika što je ključno u prilagođavanju biljaka na različite stresne faktore (Gill i Tuteja, 2010). Među antioksidativnim enzimima za neutralizaciju i uklanjanje reaktivnih kiseoničnih vrsta veliki značaj imaju enzimi kao što su: katalaza (CAT), askorbat-peroksidaza (APX), superoksid-dismutaza (SOD), gvajakol-peroksidaza (GPOD), glutation-S-transferaza (GST) i dr. Kao odgovor na akumulaciju Cd u biljnom tkivu može doći do promena (pojačana sinteza ili inhibicija) aktivnosti antioksidativnih enzima (Alayat i sar., 2014). Neenzimski sistem zaštite čine jedinjenja malih molekulskih masa poput prolina, glutationa, tiola, tokoferola, karotenoida i dr., čija je pojačana produkcija često uslovljena prisustvom teških metala u biljkama (Michalak, 2006). Metaboliti poput prolina, histidina, tiola, fitohelatina, amina i drugih, imaju nekoliko značajnih uloga u ćelijskom odgovoru na prisustvo teških metala. Oni prvenstveno utiču na vezivanje (helatiranje) metala, neutrališu štetno dejstvo slobodnih radikala i funkcionišu kao aktivatori signalnih puteva (Sharma i Dietz, 2006).



Slika 3. Biosinteza reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS), mehanizmi regulacije produkcije ovih molekula i aktivnost različitih antioksidativnih enzima u biljnoj ćeliji. 1. Fenton i Haber-Weiss reakcija ciklusa detoksifikacije $O_2^{\cdot -}$ i H_2O_2 aktivnošću alternativnih oksidaza (AOKS) u tilakoidima. Kod nekih biljaka moguća je zamena CuZnSOD (bakar-cink-superoksid-dismutaza) sa gvožđe-superoksid-dismutazom (FeSOD) u hloroplastima. H_2O_2 koji izlazi iz ovog ciklusa detoksifikuje se pomoću superoksid-dismutaze (SOD) i uključuje se u askorbat-glutation ciklus. Peroksiredoksin (PrxR) i glutation peroksidaza (GPx) su takođe su uključeni u neutralizaciju H_2O_2 . 2. U mitohondrijama, SOD i druge komponente askorbat-glutationa ciklusa indukuju proizvodnju vodonik-peroksida. 3. U peroksisomima, ROS molekuli se prihvataju od strane SOD, katalaza (CAT) i askorbat peroksidaza (Apx). Prekomerna proizvodnja i nagomilavanje H_2O_2 indukovano je (I) NADPH oksidazom, (II) peroksidazama ćelijskog zida, (III) oksalatnim oksidazama i (IV) amin oksidazama. Iako su putevi nastanka H_2O_2 u različitim ćelijskim organelama odvojeni jedni od drugih, ovaj molekul lako može difundovati kroz membrane, a antioksidanti poput glutationa i askorbinske kiseline se mogu lako transportovati između različitih delova ćelije (Ma i sar., 2013).

Akumulacija aminokiseline prolina jedan je odbrambenih mehanizama toksičnog delovanja Cd (Slika 4). Povećana sinteza prolina usled izloženosti biljaka povišenim koncentracijama teških metala registrovana je kod velikog broja biljnih vrsta (John i sar., 2008; Nikolić i sar., 2008; Alayat i sar., 2014). Istraživanja su pokazala da ovo jedinjenje ima brojne i veoma značajne uloge u biljnim ćelijama u uslovima stresa (Grill i sar., 1989; Pietrini i sar.,

2003; Chou i sar., 2012, Seth i sar., 2012). Pojačana sinteza prolina utiče na održavanje turgorovog pritiska usled vodnog deficita, koji može nastati kako posledica različitih stresnih faktora, poput prisustva jona teških metala u ćeliji (Sun i Hong, 2011). Istraživanja su pokazala da prolin predstavlja rezervoar ugljenika i azota, te po prestanku delovanja nepovoljnih faktora spoljašnje sredine ovi elementi mogu biti iskorišćeni za rast biljaka, dok se koncentracija prolina u biljnom tkivu snižava (Verbruggen i Hermans, 2008; John i sar., 2008). Uloga prolina u oksidativnom stresu ogleda se u njegovoj funkciji da vrši neutralizaciju ROS molekula pri visokim koncentracijama Cd u ćeliji, pri čemu biosinteza ove aminokiseline može imati ulogu u puferisanju pH vrednosti citosola i održavanju redoks homeostaze u ćeliji (Islam i sar., 2009; Baudh i sar., 2016). Pored toga, prolin u ćeliji funkcioniše kao molekulski šaperon koji vrši stabilizaciju proteina, tako što gradi složene strukture sa molekulima vode, čime se štiti struktura proteina i sprečava njihova denaturacija. Takođe, ovaj molekul ima ulogu u helatiranju metalnih jona kako u samoj ćeliji, tako i u ksilemskom soku (Sharma i Dietz, 2006).



Slika 4. Šematski prikaz usvajanja i transporta jona Cd²⁺ iz korena u nadzemne delove biljke pomoću ZIP familije transportera i Ca²⁺ kanala. Endogena sinteza prolina i uticaj na održavanje redoks balansa u ćeliji, prenos signala i aktivnost mehanizama detoksifikacije Cd i njegov dalji iz transport Cd iz citosola u vakuolu preko Cd²⁺/H⁺ antiport sistema (Singh i sar., 2015).

Glutation (GSH) je široko rasprostranjen redoks aktivni tripeptid (γ-Glu-Cys-Gly) koji ima ključnu ulogu u mehanizmima odbrane od prevelike produkcije slobodnih radikala i učestvuje u njihovoj neutralizaciji (Syta i sar., 2013). Ovaj molekul ima nekoliko uloga u odbrani biljaka od toksičnog dejstva Cd u ćeliji: predstavlja prekursor u sintezi fitohelatina,

učestvuje u askorbat-glutation ciklusu i predstavlja važnu komponentu u redoks balansu (Vassilev i sar., 2002; Maksymiec i sar., 2007). Vezivanjem glutaciona sa Cd^{2+} jonima obrazuje se GSH-Cd kompleks koji se smatra prvom linijom odbrane i sprečava Cd da uzrokuje dalja oštećenja u ćeliji (Sandbichler i Höckner, 2016).

Usled nakupljanja reaktivnih kiseoničnih vrsta može doći do oštećenja ćelijskih membrana, a posebno lipida u procesu lipidne peroksidacije, što za posledicu ima hiperprodukciju malondialdehida (MDA) koji može poslužiti kao bioindikator oksidativnog stresa (Hassan i sar., 2017).

1.2.5. Uticaj kadmijuma na gensku ekspresiju

Razumevanje uticaja teških metala na celokupan metabolizam biljaka najbolje se može izučiti na nivou genoma, te se sve veći broj studija bavi uticajem Cd na molekularnom nivou, kako bi se okarakterisali i bolje razumeli mehanizmi koji dovode do prilagođavanja biljaka na stresne uslove životne sredine. Do danas postoji relativno mali broj studija koje se bave ovim istraživanjima na topolama i vrbama (Konlechner i sar., 2013; Benyó i sar., 2016; Zou i sar., 2017). Prema navodima Yang i saradnika (2015a) kod vrba je registrovana mreža različitih transkripcionih faktora koji regulišu signalnu transdukciju i dovode do povećanja tolerantnosti biljaka na stres indukovani prisustvom Cd. Identifikacija gena čija je pojačana ekspresija uslovljena povećanim koncentracijama ovog metala je od fundamentalnog značaja za razumevanje molekularnih mehanizama koji dovode do povećanja otpornosti biljaka (Rao i sar., 2014). Do sada je poznato da je povećana sinteza enzima poput fitohelatin-sintaze, glutation-s-transferaze, kao i povećana aktivnost različitih transportera (ABC, ZIP i drugih familija), uslovljena pojačanom ekspresijom gena koji kodiraju ove proteina (Clemens, 2006; Parmar i sar., 2013; He i sar., 2015; Zou i sar., 2017). Smatra se da povećana ekspresija gena koji kodiraju transport metala igra ključnu ulogu u održavanju tolerantnosti biljaka prema teškim metalima (He i sar., 2013). S obzirom da visoke koncentracije Cd u biljnom tkivu mogu da dovedu do pojave oksidativnog stresa, utvrđeno je da regulacija ekspresije gena koji kodiraju enzime, koji učestvuju u oksidativnom odgovoru, ima značaj u procesu detoksifikacije teških metala (Agrawal i sar., 2002).

1.3. Fitoremedijacija

Kako je prisustvo teških metala u životnoj sredini u konstantnom porastu, u posljednje vreme se sve više radi na usavršavanju tehnika za prečišćavanje (remedijaciju) zemljišta. Klasične metode remedijacije zemljišta obuhvataju fizičke i hemijske metode uklanjanja metala iz podloge, ispiranje zemljišta, iskopavanje i ponovnu upotrebu zemljišta. Ove metode su dugotrajne, skupe, ali su često i neefikasne, čime je njihova upotreba limitirana (Vamerali i sar., 2010). Nasuprot klasičnim metodama, alternativa za dekontaminaciju zemljišta je upotreba zelene tehnologije koja se bazira na sposobnosti biljaka da uklanjaju polutantne iz podloge i označava se kao fitoremedijacija (Salt i sar., 1995). Termin fitoremedijacija potiče od grčkih reči *phyto* - biljka i latinske reči *remedium* - čistiti, obnoviti i predstavlja niz tehnika koje se zasnivaju na sposobnosti biljaka da u svojim organima nakupljaju velike količine polutanata (Pilon-Smits, 2005). Fitoremedijacija podrazumeva ekstrakciju hazardnih supstanci, poput teških metala, radionukleida, pesticida, polihlorovanih bifenola iz životne sredine i njihovo prevođenje u stabilne netoksične metabolite, čime se vrši dekonataminacija zemljišta i voda (Mahar i sar., 2016). Iako se fitoremedijacija često opisuje kao „nova“ tehnika, ova tvrdnja se može snažno opovrgnuti, s obzirom da proučavanja sposobnosti biljaka da usvajaju i akumuliraju teške metale datiraju oko 300 godina unazad (McCutcheon i Rock, 2001). Počeci istraživanja koja su pokazala da biljke imaju mogućnost da tolerišu prisustvo visokih koncentracija teških metala u zemljištu ustanovili su rudari, koji su uočili da biljke iz porodice Brassicaceae imaju sposobnost da rastu na području rudnika bakra. Andrea Cesalpino je još u XVI veku utvrdio da određene biljne vrste imaju sposobnost da opstaju na zemljištu koje se odlikuje visokim sadržajem Mg i Fe, koje su kasnije definisane kao serpentinske biljne zajednice (Stephenson i Black, 2014). Tokom XX veka razvoj nauke u ispitivanju biljaka koje se odlukuju sposobnošću da usvajaju, akumuliraju i tolerišu prisustvo različitih metala rapidno se intenziviralo. Međutim, osnovni principi upotrebe fitoremedijacije su tokom vremena ostali nepromenjeni, dok su se saznanja u ovoj oblasti intenzivno usavršavala. Tokom pedesetih godina prošlog veka istraživanja Margazzi i Vergano (1948) su pokazala da vrsta *Alyssum bertolonii* ima mogućnost da akumulira visok sadržaj nikla u svojim tkivima, a time i sposobnosti da vrši dekontaminaciju zagađenog zemljišta. Ovo je kasnije nametnulo potrebu za definisanjem biljaka koje se karakterišu osobinama pogodnim za proces fitoremedijacije. Termin *hiperakumulator* prvi put navode Brooks i saradnici (1977), čime su autori definisali biljke koje se odlikuju prisustvom Ni u koncentraciji većoj od 1000 mg/kg suve materije.

Kasnije, hiperakumulatori su okarakterisani kao vrste koje imaju sposobnost usvajanja i akumuliranja jednog ili više teških metala u koncentracijama višim od 100 puta u nadzemnim organima, u odnosu na neakumulatorske vrste, bez značajnih posledica po preživljavanje biljke (Lux i sar., 2004; Jensen i sar., 2009). Granice definisanja hiperakumulatora se razlikuju za određene teške metale. Hiperakumulatori Zn i Mn su vrste koje imaju sposobnost nakupljanja ovih metala u vrednostima iznad 10000 mg/kg; hiperakumulatori Ni, Pb, Cu i Co preko 1000 mg/kg (Reeves i Baker, 2000), a Cd iznad 100 mg/kg (Skrebsky i sar., 2008).

Biljke hiperakumulatori se odlikuju značajno visokom tolerantnošću na prisustvo teških metala u ćeliji, što ukazuje na specifične i snažno razvijene mehanizme detoksifikacije (Alkorta i sar., 2004). Hiperakumulacija metala se može okarakterisati kao ekofiziološka adaptacija biljaka da nesmetano rastu na zagađenom zemljištu. Takođe, u literaturi se navodi da biljke ovu osobinu koriste kao vid defanzivnog odgovora u borbi protiv patogena ili predatora (Bhargava i sar., 2012). Intenzivna istraživanja na polju fitoremedijacije su pokazala da veliki broj biljaka poseduje sposobnost akumulacije visokih koncentracija teških metala, pa se oko 450 vrsta definišu kao hiperakumulatori, što čini oko 0.2% ukupnog broja skrivenosemenica (McGrath i Zhao, 2003). Među hiperakumulatorskim vrstama posebno se ističu predstavnici iz familije Brassicaceae kao što su *Thlaspi* i *Brassica* (Prasad i Freitas, 2003; Ueno i sar., 2005). Na primer, vrsta *Brassica juncea* ima sposobnost akumuliranja visokih koncentracija kadmijuma u svojim tkivima, čak i uslovima niske koncentracije Cd od 0.1 mg/kg u zemljištu (Salt i sar., 1995). Prema navodima Mahar i saradnika (2016) vrsta *Datura stramonium* je definisana kao vrsta sa najvećim kapacitetom apsorpcije Cd u biljnom tkivu, dok je *Amaranthus paniculatus* definisana kao vrsta sa najvećim kapacitetom apsorpcije Cd po jedinici površine (68.04 g/ha). Iako mnoge zeljaste biljke spadaju u grupu hiperakumulatora, veliki broj ovih vrsta ima ograničen potencijal za usvajanje teških metala zbog male biomase i kratkog životnog ciklusa. Alternativa hiperakumulatorima su vrste velike organske produkcije, među kojima se posebno ističu drvenaste vrste.

Drvenaste vrste poseduju niz karakteristika pogodnih za proces fitoremedijacije, a to su snažno razvijeni korenovi, velika produkcija nadzemne biomase, visok intenzitet transpiracije kao i genetička varijabilnost (Robinson i sar., 2000; Capuana, 2011; Alagić i sar., 2013; Pajević i sar., 2016). Akumuliranje teških metala u korenu i nizak stepen translokacije u nadzemne delove biljaka su bitni činionici koji omogućavaju preživljavanje drveća na staništu koje se odlikuje visokim koncentracijama teških metala u podlozi (Tlustoš i sar., 2007). Uprkos niskoj akumulaciji teških metala u nadzemnim delovima, drvenaste vrste koje se odlikuje velikom

organskom produkcijom i brzim rastom, imaju mogućnost da usvoje i uklone znatno veće količine teških metala iz zemljišta, u odnosu na zeljaste hiperakumulatorske vrste. Uzevši u obzir činjenicu da drvenaste vrste naseljavaju industrijska i ruralna područja, ove vrste se mogu koristiti kao bioindikatori zagađenosti staništa teškim metalima, pri čemu se sadržaj ovih polutanata u biljnom tkivu može odrediti jednostavnim i ne toliko skupim metodama (Komives i Gullner, 2006). Prva istraživanja o mogućnosti upotrebe drvenastih vrsta u remedijaciji zemljišta zagađenog Cd datiraju iz 1991, kada su Huiyi i saradnici u svom istraživanju utvrdili da različite šumske drvenaste vrste poseduju sposobnost usvajanja i akumuliranja velikih količina teških metala u biljnom tkivu. Nekoliko godina kasnije, Landberg i Greger (1994) su utvrdili sposobnost akumulacije visokih koncentracija Cd kod vrba i predložili su ove vrste kao potencijalne kandidate za proces fitoremedijacije. Nakon toga, sproveden je veliki broj istraživanja sa ciljem da se utvrde vrste i klonovi vrba koji poseduju visoku efikasnost usvajanja i akumulacije teških metala (Landberg i Greger, 1996; Vysloužilová i sar., 2006; Marmioli i sar., 2011; Yang i sar., 2015a; Zárubová i sar., 2015).

Fitoremedijacija je metod koji obuhvata nekoliko tehnika kao što su fitoekstrakcija (fitoakumulacija), fitodegradacija, fitostabilizacija (fitoimobilizacija), fitovolatilizacija, fitofiltracija, rizodegradacija i fitodesalinizacija (Ali i sar., 2013). Osnovne karakteristike najčešće korištenih tehnika date su u Tabeli 1.

Tabela 1. Različite tehnike u procesu fitoremedijacije (Ali i sar., 2013.)

Tehnika	Opis tehnike	Mehanizam tehnike
<i>Fitoekstrakcija</i>	Akumulacija polutanata u nadzemnim delovima biljke i njihovo iznošenje iz zemljišta	Hiperakumulacija
<i>Fitostabilizacija</i>	Upotreba biljaka sa ciljem da se sadržaj kontaminata zadrži u rizosferi pomoću korena biljke, čime se ograničava mobilnost polutanta	Stvaranje kompleksa
<i>Fitovolatilizacija</i>	Ekstrakcija metala iz zemljišta uz pomoć biljaka i njihovo oslobađanje u atmosferu	Volatilizacija lišćem
<i>Fitofiltracija</i>	Prečišćavanje voda biljkama	Rizosferna akumulacija

Prilikom izbora odgovarajuće tehnike fitoremedijacije neophodno je uzeti u obzir što veći broj abiotičkih faktora, biologiju odabrane vrste kao i mogućnost njene manipulacije (Župunski i sar., 2018). Jedna od najčešće korištenih tehnika fitoremedijacije je fitoekstrakcija. Primenu ovu tehniku, u obliku u kom se i danas sprovodi, prvi navodi Chaney (1983). Fitoekstrakcija uključuje nekoliko faza: mobilizaciju teških metala u podlozi, usvajanje metala

pomoću korenovog sistema, njihovu translokaciju iz korena u nadzemne delove biljaka i sekvestraciju metala u biljnom tkivu (najčešće u vakuoli) (Raskin i Ensley, 2000; McGrath i Zhao, 2003; Clemens, 2006). Jedan od načina definisanja biljaka pogodnih za proces fitoremedijacije (preciznije fitoekstrakcije) može se ustanoviti na osnovu odnosa sadržaja metala u biljci i količine metala u zemljištu. Prema navodima Baker (1981) ukoliko je odnos koncentracije metala u nadzemnim delovima biljaka i zemljištu veći od 1, biljke se definišu kao akumulatori, a ukoliko je taj odnos manji od 1 biljke se definišu kao ekskluderi. Odnos metala u zemljištu i biljci se u novijim istraživanjima intenzivno koristi i označava se kao biokoncentracijski faktor (BCF) (Tózsér i sar., 2018). Pored toga, veliki broj istraživanja ukazuje na značaj transporta teških metala iz korena u nadzemne delove, što se označava kao translokacijski faktor (TF) (Zacchini sar., 2009; Kacálková i sar., 2015; Župunski i sar., 2016). Ukoliko je vrednost translokacijskog faktora veća od 1, biljka je pogodna za proces fitoekstrakcije, a ukoliko je vrednost TF manja od 1, to ukazuje da je mobilnost elementa ograničena na zonu korena, pa se ta vrsta može koristiti za proces fitostabilizacije (Kuzovkina i sar., 2004).

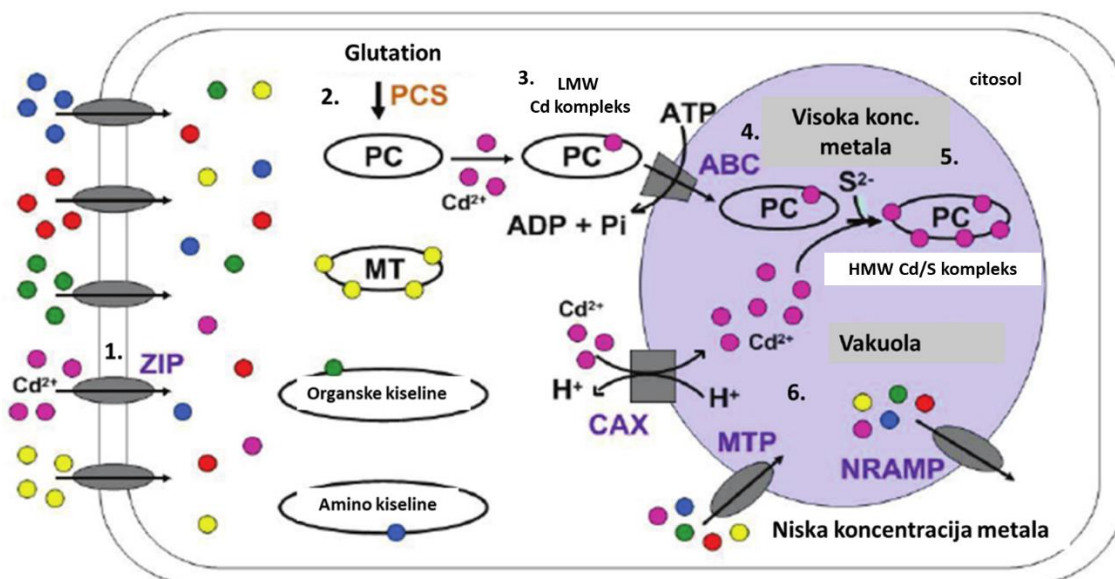
Uspešna fitoekstrakcija je omogućena zahvaljujući različitim strategijama biljaka, koje uključuju aktivaciju mehanizama tolerancije i detoksifikacije teških metala u biljnom tkivu. Ovo se postiže sekvestracijom i kompartmentalizacijom metala u različitim organelama, kao i drugim mehanizmima koji su uključeni u procese detoksifikacije metala, kao što su: vezivanje metala za ćelijski zid, helatiranje jona metala, kao i pojačana sinteza fitohelatina i metalotioneina (Pilon-Smits, 2005; Chen i sar., 2006).

1.4. Mehanizmi tolerancije i detoksifikacije biljaka na stres teškim metalima

Izloženost biljaka visokim koncentracijama teških metala često može dovesti do pojave fitotoksičnosti, međutim kod izvesnog broja biljnih vrsta simptomi toksičnosti se ne ispoljavaju čak ni pri relativno visokim koncentracijama teških metala u biljnom tkivu. Jedan od osnovnih razloga za to je postojanje različitih strategija odbrane koje su biljke razvile tokom evolucije. Sposobnost preživljavanja na staništima sa visokim koncentracijama teških metala u podlozi ostvaruje se različitim mehanizmi otpornosti biljaka, kao što su izbegavanje ili tolerancija. Prema reakciji biljaka na prisustvo teških metala u podlozi, biljke su svrstane u tri grupe (Bhargava i sar., 2012). Prvu kategoriju čine biljke *isključivači* (eng. excluders) – vrste koje izbegavaju usvajanje i nagomilavanje teških metala u organizmu. Kod ovih biljaka

koncentracija teških metala u nadzemnim organima je ispod kritičnog nivoa, pa se ove vrste mogu koristiti za stabilizaciju zemljišta, kao i za sprečavanje erozije, čime se izbegava dalje širenje zagađenja. Drugu grupu čine *akumulatori* – biljke koje usvajaju i akumuliraju značajne količine teških metala u nadzemni organima. Mehanizmi detoksifikacije metala kod ovih biljnih vrsta nisu aktivni na nivou korena, čime je omogućen visok nivo usvajanja i akumulacije teških metala. Pored navedenih kategorija postoje i *indikatori* – vrste kod kojih koncentracija teških metala u biljnom tkivu proporcionalno reflektuje njihovu koncentraciju u spoljašnjoj sredini.

Generalno gledano, mehanizmi izbegavanja stresa izazvanog teškim metalima uključuju niz procesa koji mogu dovesti do njihovog smanjenog usvajanja i akumuliranja, kako koncentracija ovih polutanata u biljci ne bi dostigla kritičan nivo koji bi izazvao oštećenja biljnog tkiva. Najznačajni mehanizmi izbegavanja stresa uključuju: zadržavanje jona metala u ćelijskom zidu, kao i izlučivanje helata i organskih kiselina, čime se ograničava usvajanje teških metala u zoni rizosfere (Hall, 2002; Cobbett i Goldsbrough, 2002). Sa druge strane mehanizmi tolerancije na stres teškim metalima odnose se na mehanizme koji omogućavaju preživljavanje biljaka u uslovima povećanog sadržaja teških metala u samoj biljci. To su genetski kontrolisani mehanizmi, koji su najčešće pod kontrolom većeg broja gena i predstavljaju evolutivne adaptacije biljaka (Zou i sar., 2017). Biljke su tokom vremena razvile snažnu mrežu mehanizma pomoću kojih održavaju jonsku homeostazu i regulišu usvajanje, transport, akumulaciju i detoksifikaciju teških metala (Stikić i Jovanović, 2012). Ovi mehanizmu uključuju metal transportere, koji su odgovorni za prenos i nakupljanje teških metala u ćeliji, različite vrste helatora, poput organskih i aminokiselina, aktivnost fitohelatina i metalotioneina, heat-shock proteine i šaperone koji učestvuju u transportu i distribuciji teških metala (Slika 5), a i sama promena propustljivosti i selektivnosti membrana utiče na tolerantnost biljaka na prisustvo ovih polutanata (Cobbett i Goldsbrough, 2002).



Slika 5. Mehanizmi detoksifikacije teških metala – vakuolarna sekvestracija. 1. Usvajanje jona teških metala aktivnošću ZIP familije proteina 2. Ulazak jona Cd^{2+} u citosol stimuliše glutation da dejstvom enzima fitohelatini-sintaze (PCS) sintetiše fitohelatine (PC) 3. Fitohelatini se vezuju za citosolni Cd i obrazuju niskomolekularni metal-helatni kompleks 4. Transport metal-helatnog kompleksa preko ABC transportera u vakuolu 5. Stvaranje helata sa različitim visokomolekularnim ligandima u citosolu, 6. Učešće različitih proteinskih familija u kompartmentalizaciji metala u vakuoli, 7. Učešće metalotioneina, organskih i aminokiselina u puferisanju teških metala u citosu i njihovo održavanje na niskom nivou (Yang i Chu, 2011).

Skraćenice: Cd – kadmijum; PC – fitohelatini; PCS – fitohelatin-sintaza; MT – metalotionini; LMW – niskomolekularni; HMW – visokomolekularni; ABC – ATP vezujući proteinski transporter; CAX – katjon/proton transporter na tonoplastu; NRAMP i MTP – različite proteinske familije za transport Cd jona.

Jedan od načina neutralizacije toksičnog dejstva teških metala ogleda se u obrazovanju metal-helatnih kompleksa u citoplazmi. Helatori imaju ulogu u detoksifikaciji teških metala, pri čemu ove supstance imaju sposobnost da puferišu citosolnu koncentraciju metala, čime se smanjuje aktivnost slobodnih jona metala i ublažava se toksično dejstvo ovih polutanata. Veliki broj jedinjenja ima sposobnost helatiranja teških metala, kao što su jedinjenja niske molekule mase poput organskih kiselina, aminokiselina, peptida, kao što su metalotioneini (MT) i fitohelatini (PC) (Clemens, 2006; Saraswat i Rai, 2011). Prisustvo određenih metala (Zn, Cu, Cd, Hg) u visokoj koncentraciji može indukovati i sintezu heat-shock proteina koji štite membrane od stresa indukovano ovim polutantima (Zou i sar., 2017). Posebnu grupu ovih proteina čine klasa šaperona čija se ekspresija znatno povećava u uslovima povišenih koncentracija teških metala, čime je utvrđena njihova uloga u mehanizmima mobilizacije i detoksikacije metala.

1.4.1. Uloga fitohelatina i metalotioneina u procesu fitoekstrakcije

Helatiranje metala pomoću odgovarajućih liganada predstavlja značajan mehanizam suočavanja biljaka sa stresom izazvanim prisustvom teških metala. Najznačajniji metal – vezujući ligandi su proteini i peptidi, odnosno fitohelatini i metalotioneini (Cobbett, 2000; Clemens, 2001).

Fitohelatini (PCs) čine familiju peptida izgrađenih iz ponavljajućih fragmenata dipeptida γ -Glu-Cys (glutaminska kiselina i cistein), pri čemu je terminalna aminokiselina glicin (Gly) Opšta formula fitohelatina je $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, gde se broj ponovljenih sekvenci (n) kreće najčešće od 2-5, a najviša vrednost ponovljenih nizova je 11 (Kubota i sar., 2000; Memon i Schröder, 2009). Fitohelatini su u strukturnom pogledu veoma slični glutationu (GSH) koji je tripeptid ($\gamma\text{-Glu-Cys-Gly}$), tako da se pretpostavilo da je glutation prekursor u biosintezi ovih molekula (Rauser, 1995). Glutacion služi kao supstrat za sintezu fitohelatina, što se odvija pomoću enzima fitohelatin-sintaze (PCs) ili γ -Glu-Cys dipeptidil-transpeptidaze (Xu i sar., 2017). Fitohelatin-sintaza predstavlja konstitutivni enzim koji se posttranslatorski aktivira u prisustvu jona teških metala, posebno jona Cd, Pb, Cu i dr. (Grill i sar., 1989). Fitohelatini su identifikovani kod velikog broja biljnih vrsta, a njihov sadržaj se znatno povećava u prisustvu teških metala poput Cd, Cu, Zn, Ni, i dr. (Cobbett, 2000). Iako pokazuju variranja u strukturnoj formi kod različitih biljnih vrsta, ovi peptidi pokazuju istu fiziološku ulogu. Memon i Schröder (2009) navode da mutant biljke vrste *Arabidopsis thaliana* usled nedostatka enzima fitohelatin-sintaze nemaju mogućnost sinteze fitohelatina i postaju hipersenzitivne na prisustvo kadmijuma i žive. Otkriće da se nivo fitohelatina znatno povećava u prisustvu teških metala, dovelo je do ekspanzije istraživanja o ulozi ovih jedinjenja, kao potencijalnih biomarkera tokom izloženosti biljaka visokim koncentracijama teških metala (Hall, 2002). Pojačana sinteza fitohelatina tokom izloženosti biljaka toksičnim koncentracijama teških metala utvrđena je u velikom broju studija (Rauser, 1999; Sun i sar., 2005; Mishra i sar., 2006; 2009), čime je potvrđena značajna uloga ovih molekula u mehanizmima detoksifikacije, posebno jona Cd. Prisustvo Cd^{2+} jona u ćeliji, aktivira enzim PCs da stvara helatne komplekse sa metalima. Nastali metal-helatni kompleks je netoksičan, stabilan kompleks koji se lako transportuje iz citoplazme u vakuolu, što naglašava značaj fitohelatina u mehanizmima detoksifikacije, posebno na nivou vakuolarne izolacije (Rauser, 1995; Clemens, 2006; Bhargava i sar., 2012). Pored toga, fitohelatini su bitni za održavanje homeostaze teških metala u biljnim ćelijama, pa tako imaju važnu ulogu u distribuciji i akumulaciji Cd, kao i drugih toksičnih elemenata, poput žive i arsena (Shah i Nongkynrih, 2007; Stikić i Jovanović, 2012). Takođe, pretpostavlja se da

imaju i ulogu antioksidanata u ćeliji (Rauser, 1995), kao i da učestvuju u metabolizmu gvožđa i sumpora (Cobbett, 2000).

Metalotioneini (MTs) su niskomolekularni, termo-stabilni peptidi bogati cisteinom, koji su inicijalno izolovani kao vezujući proteini za različite teške metale poput Cd, Zn i Cu (Hamer, 1986). Pretpostavlja se da ostaci cisteina (Cys) koji su visoko konzervirani duž sekvenci metalotioneina imaju ulogu u helaciji teških metala (Du i sar., 2012). Ovi molekuli su prvobitno identifikovani u animalnom tkivu, a zatim je njihovo prisustvo utvrđeno kod algi, gljiva i viših biljaka (Cobbett i Goldsbrough, 2002). Dok su fitohelatini enzimski sintetisani, prisustvo metalotioneina u ćeliji je genetski kodirano (Saraswat i Rai, 2011), a njihova aktivnost je zavisna od prisustva teških metala u ćeliji (Pagani i sar., 2012). Primarna uloga ovih molekula je vezivanje metala za tiolne grupe, helatiranje i imobilizacija teških metala (Antoniadis i sar., 2017). Samim tim, visoka ekspresija gena za MTs dovodi do porasta tolerantnosti biljaka na stres teškim metalima (Pagani i sar., 2012). Ekspresija gena za metalotioneine kod biljaka osim teškim metalima može biti uzrokovana različitim abiotičkim i biotičkim faktorima kao što su suša, UV radijacija, različiti patogeni. Ovi molekuli imaju značajnu ulogu u borbi protiv oksidativnog stresa, tako što učestvuju u prihvatanju i degradaciji slobodnih radikala. Naime slobodni radikali se vezuju za slobodne sulfhidrilne grupe, čime se vrši njihovo prevođenje u netoksične forme i na taj način se sprečavaju intracelularna oštećenja (Yang i Chu, 2011). Kod različitih biljnih vrsta registrovano je više od 50 metalotioneina, koji se mogu svrstati u 4 klase, na osnovu gena koji ih kodiraju, kao i broja i rasporeda cisteinskih ostataka (Cobbett i Goldsbrough, 2002). Pagani i saradnici (2009) su utvrdili da su klase 1, 2 i 3 zaslužne za detoksifikaciju Cd, dok klasa 4 ima ulogu u vezivanju Zn.

1.4.2. Vakuolarna sekvencija

Vakuole predstavljaju mesto akumulacije sekundarnih produkata metabolizma kao i metabolita koji se iz spoljašnje sredine unose u ćeliju. Nakupljanje kadmijuma u vakuoli predstavlja jednu od glavnih strategija obrane biljaka od stresa koji je indukovano prisustvom teških metala, što je identifikovano kod zeljastih i kod drvenastih vrsta (He i sar., 2013; Wu i sar., 2016). U ćelijama korena, mali deo Cd koji se usvaja iz zemljišta ostaje vezan za ćelijski zid, dok se najveći procenat usvojenog metala unosi u ćeliju i transportuje se do vakuola. Transport Cd u vakuolu je omogućen obrazovanjem kompleksa kadmijuma sa niskomolekularnim citosolnim proteinima. Zahvaljujući postojanju antiportnog sistema katjon/H⁺ jon (Slika 5), koji je lokalizovan na tonoplastu, Cd se unosi u vakuolu, dok se protoni

nakupljaju u citosolu. Najčešći transporter Cd^{2+} jona je familija proteina CAX (eng. CAtion eXchangers), koja je smeštena na tonoplastu i koja omogućava da se usvojeni Cd^{2+} katališe iz niskomolekularnog kompleksa (Slika 5) i sekvestira u vakuolu (Irfan i sar., 2013). Postojanje ovih transportera na tonoplastu dalje utiče na distribuciju i transport Cd od korena ka nadzemnim delovima (Korenkov i sar., 2007). Takođe, Wu i saradnici (2016) navode da se Cd u vakuoli u najvećoj meri vezuje za peptide bogate –SH grupom, kao i za organske kiseline koje predstavljaju ligande za Cd, čime se smanjuje toksičnost ovog metala.

1.4.3. Upotreba helatora u procesu fitoekstrakcije

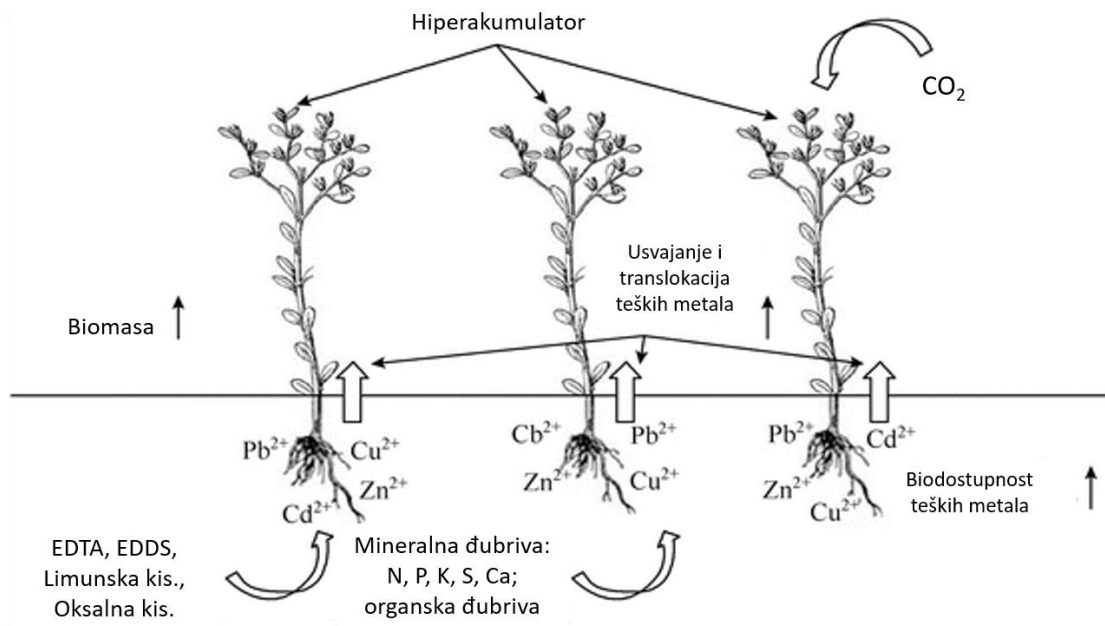
Iako postoje mnogobrojni podaci i istraživanja vezana za tehnike fitoremedijacije, ovaj metod se i dalje razvija, s obzirom na činjenicu da se procenat kontaminiranih područja sve više povećava. Smatra se da bi proces uklanjanja teških metala sa nekog područja trebalo da traje oko 5 do 10 godina, međutim upotreba drvenastih vrsta često ne zadovoljava navedene vremenske okvire (Vassilev i sar., 2002). I pored toga što se odlikuju nizom poželjnih karakteristika, uklanjanje Cd pomoću ovih vrsta predstavlja dugotrajan i spor proces. Nedavna studija Greger i Landberg (2015) je pokazala da je za smanjenje sadržaja Cd u zemljištu sa 0.7 mg/kg na 0.5 mg/kg Cd potrebno 12.5 godina, a da bi se sadržaj Cd u zemljištu smanjio sa 6.6 mg/kg na 0.8 mg/kg potrebno je čak 77 godina. Limitirajući faktor u izvlačenju metala iz zemljišta je ograničena biodostupnost metala. U cilju pobošanja efiksanosti biljaka u procesu prečišćavanja zemljišta, u novije vreme u sve većoj upotrebi su različiti hemijski agensi koji pospešuju mobilnost metala, a time i njihovo uklanjanje.

Novija klasifikacija fitoremedijacije deli ovaj metod u dve klase: 1. prirodna fitoremedijacija – tehnika koji se zasniva na upotrebi biljaka koje zahvaljujući svojim prirodnim karakteristikama imaju sposobnost da usvajaju metale iz podloge i 2. asistirana fitoremedijacija – metod koji se zasniva na izmenama karakteristika zemljišta kroz upotrebu helatora, pri čemu se na taj način pospešuje biodostupnost metala, a time i njihovo iznošenje iz zemljišta pomoću biljaka (Ali i sar., 2013). Dodavanje helatora u zemljište dovodi do formiranja metal-helatnih kompleksa koji su rastvorljivi u vodi, što dalje vodi do povećanja biodostupnosti metala u zemljišnom matriksu, te se oni mogu lako usvajati od strane korena biljke (Wenzel i sar., 2003). U helatore spada veliki broj organskih kiselina, među kojima značajno mesto zauzimaju limunska, jabučna, malatna, oksalatna, kao i ćilibarna kiselina (Huang i sar., 1998). Upotreba različitih kiselina dovodi do povećanje kiselosti rizosfere čime

se rastvaraju karbonati, a metali postaju biodostupni (Sheoran i sar., 2009). Naime, smanjenje pH vrednosti zemljišnog rastvora se postiže tako što vodonikovi (H^+) joni, zamenjuju katjone metala adsorbovane na česticama zemljišta, pri čemu dolazi do povećanja sadržaj toksičnih jona u zemljišnom rastvoru (Leštan i sar., 2008). Takođe, kisela sredina zemljišta ($pH < 6$) dodatno stimuliše stvaranje kompleksa teških metala sa organskim kiselinama (Salt i sar., 2002).

S obzirom na činjenicu da je uspešna fitoekstrakcija u velikoj meri ograničena biodostupnošću teških metala u podlozi, u sve većoj meri se koriste različiti sintetski i organski helatori kako bi se olakšala i unapredila mogućnost fitoekstrakcije teških metala iz zemljišta (Slika 6). Tokom poslednjih godina česta je upotreba različitih sintetskih helatora u koje se ubrajaju perzistentne aminopolikarboksilne kiseline među kojima je široku primenu našla EDTA (etilen-diamin-tetrasirćetna kisleina) koja je često korišćena u procesu asistiranu fitoekstrakcije (Hammer i sar., 2003; Meers i sar., 2005; Leštan i sar., 2008; Zhao i sar., 2011). Prema navodima Hernandez-Allica i saradnika (2007) aplikacija EDTA kao helatora može dovesti do smanjenja fitotoksičnosti uslovljene prisustvom teških metala, uz istovremeno povećanje usvajanja metala, posebno onih koji se odlikuju niskom biodostupnošću. Iako stimulišu usvajanje metala iz zemljišta, sintetski helatori su izuzetno perzistentni molekuli pa njihova upotreba može da dovede do ispiranja metala u podzemne vode, što dodatno doprinosi zagađenju ekosistema (Meers i sar., 2005; Melo i sar., 2008; Wuanna i sar., 2010). Takođe, prekomerna i nekontrolisana upotreba sintetskih helatora može imati toksičan efekat na biljke, a može štetno delovati i na brojnost i raznovrsnost rizosfernih mikroorganizama (Zhao i sar., 2011). Robinson i saradnici (2000) su utvrdili da primena EDTA dovodi do znatnog povećanja akumulacije Cd u nadzemnim organima biljaka, što dalje dovodi do nekroze i apscisije listova. Još jedan od limitirajućih faktora za upotrebu sintetskih helatora je njihova visoka cena, pa je njihova aplikacija na velikim zagađenim područjima ekonomski neisplativa (Wang i sar., 2006; Chaney i sar., 2007). U novije vreme sve veća pažnja se posvećuje biodegradabilnim sintetskim kiselinama kao što su EDDS (etilen-diamin-disirćetna kisleina) i NTA (nitrilo-sirćetna kiselina) (Chen i sar., 2003; Meers i sar., 2005; Quartacci i sar., 2006; Meers i sar., 2007) koje su predložene kao alternativa za EDTA. Pored toga, istraživanja su pokazala da se prirodne niskomolekularne organske kiseline, koje se odlikuju brзом razgradnjom, a samim tim i smanjenom fitotoksičnošću, sve više koriste u procesima dekontaminacije zemljišta (Gao i sar., 2010; Sun i Hong, 2011; Ehsan i sar., 2014; Hu i sar., 2016). Citrat, malat i oksalat su organske kiseline koje su uključene u različite procese detoksifikacije teških metala, kao što je transport

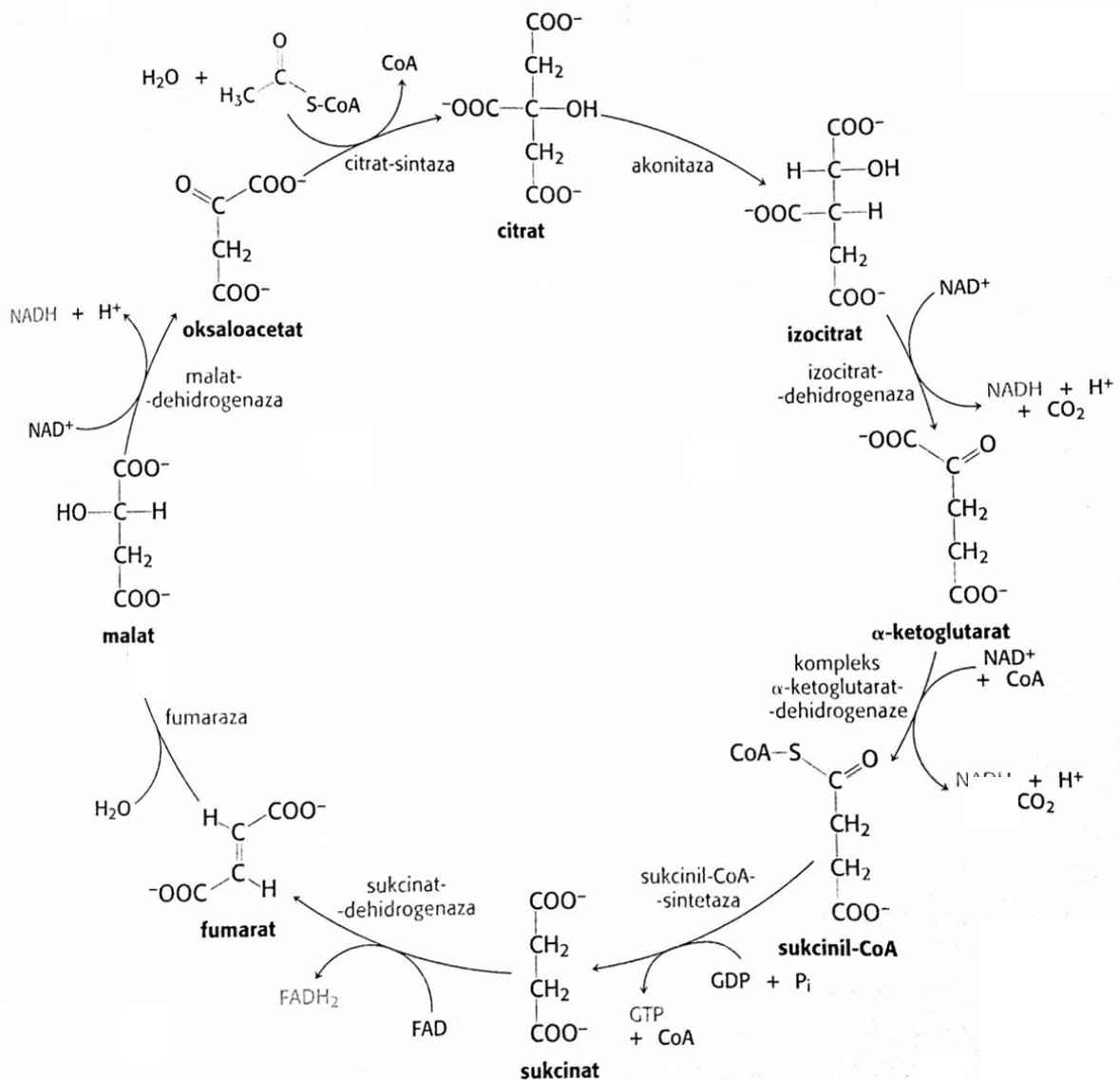
teških metala kroz ksilem ili vakuolarna izolacija (Rauser, 1995), čime značajno utiču na održavanje homeostaze u ćeliji. Ove niskomolekularne organske kiseline imaju centralnu ulogu u Krebsovom ciklusu, utiču na metabolizam fosfora, kao i na proces fotosinteze i respiracije (Guo i sar., 2017). Dodavanjem različitih prirodnih helatora u vidu niskomolekularnih organskih kiselina u zagađeno zemljište pospešuje se produkcija biomase, što je pored visoke akumulacije i tolerantnosti biljaka na prisustvo teških metala, jedna od ključnih strategija uspešne fitoekstrakcije (Evangelou i sar., 2007; Melo i sar., 2008). Takođe, istraživanja su pokazala da organske kiseline dospevaju u zemljište eksudacijom preko korenskih izlučevina, čime se dodatno pospešuje rastvorljivost mineralnih elemenata usled acidifikacije rizosfere, kao i stvaranje organo-mineralnih kompleksa (Meers i sar., 2008). Među korenskim izlučevinama značajno mesto zauzimaju limunska, oksalatna i malatna kiselina koje imaju značajnu ulogu na dostupnost teških metala u zemljištu (Moreno Pires i sar., 2007; Koo i sar., 2013).



Slika 6. Primena različitih helatora sintetičkih i organskih kiselina u procesu asistirane fitoremedijacije (Yang, 2018).

1.5. Upotreba limunske kiseline u procesu fitohelacije

Limunska kiselina ($C_6H_8O_7$) je slaba, organska, trikarboksilna kiselina, koja je prirodno prisutna u biljkama, dok u biohemijskim putevima zauzima važnu ulogu u Krebsovom ciklusu (ciklus limunske kiseline, eng. TCA - tricarboxylic acid). Ciklus limunske kiseline (Slika 7) predstavlja jedan od ključnih metaboličkih procesa aerobnog disanja. Krebsov ciklus je amfibiolički ciklus koji spaja puteve degradacije (katabolizma) ugljenih hidrata, masti i proteina, čime se vrši potpuna oksidacija supstrata do CO_2 i H_2O i biosinteze (anabolizma) molekula u vidu nastanka ATPa.



Slika 7. Krebsov ciklus (ciklus limunske kiseline) (Berg i sar., 2002).

Limunska kiselina, kao i druge niskomolekularne organske kiseline, pokazuje značajnu ulogu u mnogim biohemijskim putevima u biljkama, kao što su stvaranje energije, respiracija, transport katjona, sinteza aminokiselina, kao i detoksifikacija metala (Chaney i sar., 2007; Afshan i sar., 2015; Magdziak i sar., 2017). Tokom poslednjih godina, mnogobrojna istraživanja su ukazala na značaj limunske kiseline u mehanizmima tolerantnosti biljaka na stres indukovani prisustvom teških metala (Afshan i sar., 2015); soni stres (Sun i Hong, 2011); temperaturni stres (Hu i sar., 2016). Uspešnost organskih kiselina, uključujući i limunsku kiselinu, u procesu fitoekstrakcije ogleda se u njihovoj sposobnosti da obrazuju komplekse sa teškim metalima koji se lako transportuju do nadzemnih delova biljaka (Clemens, 2006). U literaturi se navodi da biljke hiperakumulatori često imaju neobično visok sadržaj malata i citrata u biljnom tkivu, dok izloženost teškim metalima može dodatno da pospeši produkciju ovih karboksilnih kiselina (Chaney i sar., 2007; Suoza i sar., 2013; Fernández i sar., 2014; Mnasri i sar., 2015). Studija Ueno i saradnika (2005) je pokazala snažno vezivanje ^{113}Cd za malat i citrat, što je dokazano upotrebom nuklearne magnetne rezonance kod vrste *Thlaspi caerulescens*. Takođe, Pence i saradnici (2000) su utvrdili da se kod biljaka *Thlaspi caerulescens* znatno povećava sinteza limunske kiseline usled povećanja sadržaja Cd u biljnom tkivu i formira se organo-metalni kompleks. Obrazovanje ovog kompleksa dovodi do smanjenja koncentracije slobodnih Cd^{2+} jona, jer se metalni joni imobilizuju u ovom kompleksu, pa i pored visoke akumulacije Cd u ćeliji ne dolazi do oštećenja ćelijskih struktura. Helatiranje metala sa slabim organskim kiselinama, njihov transport ksilemom i sekvestracija u vakuoli se smatra normalnim fiziološkim procesom kod hiperakumulatorskih vrsta, jer se na taj način štite subćelijske strukture od štetnih efekata slobodnih metalnih jona (Chaney i sar., 2007; Lux i sar., 2011). Takođe, formiranjem metalo-organskih kompleksa smanjuje se afinitet katjona za vezivanje sa negativno naelektrisanim komponentama ćelijskih zidova, čime je omogućena translokacija metala u nadzemne delove biljaka. Iako je ideja o postojanju zavisnosti između sadržaja niskomolekularnih organskih kiselina u biljkama i njihove sposobnosti da akumuliraju i tolerišu prisustvo teških metala relativno stara i datira još iz 1999 god. (Rauser, 1999), pitanje uticaja limunske kiseline na usvajanje teških metala je još uvek otvoreno, s obzirom na činjenicu da naučnici još uvek nisu usaglašeni po pitanju efikasnosti ovog helatora u procesu fitoekstrakcije (Kim i Lee, 2010). Dok određeni broj studija pokazuje pozitivan uticaj limunske kiseline na usvajanje teških metala iz podloge (Freitas i sar., 2013), drugi naglašavaju slabu efektivnost ovog helatora u procesu fitoekstrakcije (Meers i sar., 2005; Nascimento i Xing, 2006). Među organskim kiselinama, limunska kiselina se ističe kao dobar helator na povećanje

dostupnosti i mobilnosti metala iz tla (Quartacci i sar., 2006; Freitas i sar., 2013; Farid i sar., 2017). Poređenjem efikasnosti limunske kiseline sa drugim niskomolekularnim organskim helatorima (malat, oksalat, sukcinat) utvrđena je znatno veća efikasnost citrata u usvajanju teških metala, u odnosu na ostale navedene kiseline (Najeeb i sar., 2011). Takođe, Gao i saradnici (2003) su utvrdili da efekat helatora opada u smeru citrat > malat > acetat, pri čemu se efikasnost limunske kiseline povećava sa povećanjem njene koncentracije od 2 mM/kg do 15 mM/kg zemlje.

Limunska kiselina predstavlja jedan od najznačajnijih liganada za Cd i gradi kompleks sa kadmijumovim jonima čak i pri niskoj koncentraciji ovog metala u ćeliji (Wagner 1993). U literaturi se navode i kompleksi limunske kiseline sa drugim metalima, kao što je nikel-citratni kompleks, koji se često obrazuje kod Ni-hiperakumulatorskih vrsta (Chen i sar., 2004; Mnasri i sar., 2015). Huang i saradnici (1988) su analizirali uticaj dodavanja limunske kiseline na usvajanje uranijuma kod biljka iz roda Brassica (*B. juncea*, *B. narinosa*, *B. chinese*). Autori su utvrdili da dodatak limunske kiseline od 20 mmol/kg zemlje dovodi do povećanog usvajanja uranijama za čak 100 puta, u odnosu na biljke gajene bez ovog helatora. Uspešnost asistiranе fitohelacije limunskom kiselinom zavisi od niza faktora, pre svega od odabira biljne vrste, koncentracije teških metala u zemljištu, kao i od koncentracije aplikovane limunske kiseline (Kim i Lee, 2010). Prednost limunske kiseline u odnosu na sintetičke kiseline je njena visoka biodegradabilnost u zemljištu. Razgradnja limunske kiseline u zemljištu je pospešena dejstvom rizosfernih mikroorganizama, te se ona zadržava u zemljištu oko 7 do 10 dana (Freitas i sar., 2013), čime je sprečeno njeno ispiranje u dublje slojeve zemljišta. Pojedini autori ovu odliku limunske kiseline smatraju nepoželjnom, jer se čak 30% limunske kiseline u zemljištu razgradi već nakon 24 časa, pa efektivnost ovog helata može biti veoma ograničena (Ström i sar., 2001).

1.6. Efikasnost primene fitoremedijacije u praksi

Veliki broj naučnih studija nedvosmisleno potvrđuje da različite biljne vrste imaju sposobnost da uklone, metabolišu ili imobilišu širok spektar zagađivača, što je dokazano mnogobrojnim *in situ* i *ex situ* istraživanjima (Antoniadis i sar., 2017). Širok spektar mogućnosti primene fitoremedijacije, kako u šumskim ekosistemima, tako i na velikim poljoprivrednim površinama, ukazuju na značajan potencijal ove tehnike za dekontaminaciju zemljišta zagađenog teškim metalima. Nedavna studija Greger i Landberg (2015) ukazala je na značaj zasada vrba u uklanjanju Cd iz poljoprivrednog zemljišta, što doprinosi smanjenju

sadržaja ovog metala u zrnu pšenice koja je gajena na tom zemljištu. Međutim, komercijalna upotreba ove tehnike još uvek nije razvila svoj potpuni potencijal, s obzirom na nedostatak podataka o kompleksnosti sistema zemljište – biljke – rizosferna mikroflora. Fitoremedijacija se svrstava u zelene “eco-friendly” tehnike jer koristi prirodne resurse, odnosno biljke koje žive na određenom staništu, pa se životna sredina dodatno ne opterećuje (Lasat, 2002). Upotreba različitih alternativnih metoda remedijacije, poput fizičkih i hemijskih metoda (iskopavanje, uklanjanje zemljišta, hemijska inverzija) je izuzetno skupa i uzrokuje mnogobrojne ireverzibilne promene u kvalitetu zemljišta, što za posledicu ima narušavanje biološke raznovrsnosti. Prednost fitoremedijacije u odnosu na klasične metode remedijacije je u tome što se na ovaj način ne narušavaju fizičko-hemijske osobine zemljišta (Oljača i sar., 2017). Jedan od primarnih ciljeva fitoremedijacije je očuvanje životne sredine. Pored osnovnog cilja dekontaminacije zemljišta, fitoremedijacija doprinosi očuvanju strukture zemljišta, sprečava eroziju, a značajna prednost primene ove tehnike je njena niska cena u poređenju su konvencionalnim metodama remedijacije zemljišta (Wan i sar., 2016). Kontinuirano upravljanje zagađenim zemljištem omogućava njegovu dalju upotrebu za gajenje useva i različitih poljoprivrednih kultura. Sa druge strane, postoje izvesna ograničenja u upotrebi ove metode. Naime, teški metali se često u zemljištu nalaze u obliku koji je nedostupan za biljke pa se ne mogu ukloniti iz rizosfere, stoga je upotreba ove metode ograničena samo na određene klimatske zone i tipove zemljišta (Singh i sar., 2003). Pored toga, uspešnost fitoremedijacije zagađenih zemljišta može biti limitirana dužinom korenovog sistema, koja uglavnom ne prelazi 90 cm (Sheoran i sar., 2009). Osnovni problem nakon primene fitoremedijacije/fitoekstrakcije je odlaganje biljnog materijala koji sadrži visoke koncentracije polutanata, imajući u vidu da se zagađen biljni materijal ne sme koristiti za ishranu biljojeda. Sa druge strane, ostaci biljaka koje se odlikuju velikom produkcijom biomase, poput drvenastih vrsta, često se nakon procesa fitoremedijacije koriste kao biogorivo (Mleczek i sar., 2010). Prema navodima Evropske agencije za zaštitu prirode, EPA (eng. Environmental Protection Agency) nakon spaljivanja biljnog materija, teški metali ostaju čvrsto vezani u pepelu, čime se smanjuje mogućnost njihovog oslobađanja u životnu sredinu (EPA, 2005). Uspešnost fitoremedijacije često je zasnovana samo na rezultatima laboratorijskih istraživanja, što implicira potrebu ka utvrđivanju efikasnosti ove metode na dugoročnom planu, u prirodnim staništima. Takođe, bolje razumevanje kompleksnih mehanizama koji omogućavaju opstanak biljaka na zagađenom području jedan je od neophodnih uslova za uspešnu fitoremedijaciju. Pored toga, identifikacija gena koji su uključeni u održavanje homeostaze teških metala u ćeliji, zajedno sa

razumevanjem načina njihove ekspresije, znatno bi doprinela poboljšanju efikasnosti tehnika fitoremedijacije.

1.7. Novi trendovi u fitoremedijaciji

Kako dosadašnja istraživanja potvrđuju potencijal fitoremedijacije kao tehnike u dekontaminaciji zemljišta i voda, naučnici su saglasni po pitanju primene ove metode za sanaciju zagađenih područja. Međutim, većina dosadašnjih studija se zasniva na gajenju biljaka u laboratorijskim uslovima ili u staklarama, pa bi se rezultati dobijeni u polju mogli delimično razlikovati u odnosu na kontrolisane uslove. Mnogobrojni ekološki faktori poput temperature, suše, vlažnost zemljišta, neujednačene distribucije polutanata i drugi mogu remetiti uspešnost fitoremedijacije (Mahar i sar., 2016). Do sada su definisane mnogobrojne karakteristike biljaka koje su poželjne za proces fitoekstrakcije, pa novije studije koriste ova saznanja sa ciljem unapređivanja svojstava biljaka, uporebom različitih tehnika kulture tkiva, ili manipulacije genske ekspresije kod transgenih biljaka (Borišev i sar., 2018). Identifikacijom i transformacijom gena koji su odgovorni za toleranciju na stres teškim metalima mogu se dobiti „super biljke“ otporne na ove polutante (Mosa i sar., 2016). Ovakve biljke bi mogle posedovati mehanizme pomoću kojih bi se u rizosferi, putem korena, ekskretovali metal senzitivni ligandi ka specifičnim jonima metala koji su od interesa za proces fitoekstrakcije (Ali i sar., 2013). Upravo ovakve kompleksne interakcije, hemizam delovanja jona teških metala u rizosferi korena, ekspresija gena senzitivnih na prisustvo teških metala, kao i brojni fiziološki i genetski procesi mehanizmi biljaka koji doprinose hiperakumulaciji metala moraju biti studiozno proučene, a sve sa ciljem očuvanja biosfere.

1.8. Karakteristike roda *Salix* i njihova uloga u fitoremedijaciji

Potencijal upotrebe drvenastih biljaka u procesu fitoremedijacije zasniva se na brojnim osobinama ovih vrsta koje ih odlikuju dobrim kandidatima za proces fitoremedijacije (Landberg i Greger 2002a, Rosseli i sar., 2003). Dobro razvijen korenov sistem kod ovih vrsta omogućava izvlačenje polutanata iz dubljih slojeva zemljišta, što uz visoku organsku produkciju doprinosi efikasnoj dekontaminaciji zemljišta, u poređenju sa zeljastim vrstama (Komives i Gullner, 2006; Marmiroli i sar., 2011). Jedan od dokaza uspešnog preživljavanja drvenastih vrsta na zagađenom zemljištu, predstavlja samoniklo drveće koje uspešno raste na degradiranim područjima, kao i pored rudnika (Pulford i Watson, 2003). Među drvenastim

vrstama, široku primenu u fitoremedijaciji imaju predstavnici roda *Salix*. Nedavne studije potvrđuju efikasnost vrba u fitoremedijaciji, posebno u uklanjanju Zn i Cd iz kontaminiranog zemljišta (Cocozza i sar., 2011; Kacálková i sar., 2015; Yang i sar., 2015b; Tózsér i sar., 2018). Još neki od argumenata za upotreba vrba u sanaciji zemljišta koje je zagađeno teškim metalima je njihova smanjena uloga u trofičkim lancima, kao i mogućnost gajenja ovih vrsta na marginalnim zemljištima i plavnim područjima koja su često zagađena otpadnim vodama (Greger i Landberg, 1999).

Vrbe (*Salix* spp.) spadaju u familiju Salicaceae, a rod je dobio ime od keltskih reči *sal* i *lis* što u prevodu znači *blizu vode* i ukazuje na njihovu vezanost za vlažna područja (Oljača i sar., 2017). U svetu postoji oko 450 vrsta (Argus, 1997), dok je u Srbiji ovaj rod zastupljen sa oko 18 vrsta (Josifović, 1972). Predstavnici ovog roda su široko rasprostranjeni na severnoj hemisferi i smatraju se pionirskim vrstama. To su najčešće drvenaste vrste, ređe žbunaste, ali postoje i vrste koje su polegale i imaju patuljastu životnu formu. Vrbe se najčešće javljaju na vlažnim staništima i tolerišu povremeno plavljenje, naseljavaju doline reka i ritova što predstavlja adaptaciju ovih vrsta na nestabilne životne uslove. Rod *Salix* se odlikuje visokim potencijalom za vegetativno razmnožavanje, što omogućava obrazovanje velikog broja sorti i hibrida, te se ovaj rod karakteriše širokom genetičkom varijabilnošću. Ovo omogućava selekcionisanje i ciljano gajenje odabranih klonova pogodnih za razlitate tipove zemljišta, kao i uslove životne sredine (Zárubová i sar., 2015). Pored toga obrazovanje velikog broja novih izdanaka doprinosi visokoj produkciji biomase, u kratkom vremenskom periodu, koja se može koristiti u proizvodnji biogoriva (Hammer i sar., 2003; Bedell i sar., 2009). Još jedna odlika vrba je visok intenzitet transpiracije, koji je visoko pozitivno korelisan sa akumulacijom Cd u biljnom tkivu, što ukazuje da su vrbe pogodne za proces prečišćavanja zagađenih ekosistema (Ingwersen i Streck, 2005). Veliki broj istraživanja je pokazao da različite vrste ovog roda imaju potencijal u akumulaciji teških metala, međutim između različitih klonova su utvrđene značajne razlike u pogledu usvajanja i otpornosti prema toksičnom dejstvu teških metala (Landberg i Greger, 1996; Lunáčková i sar., 2003; Marmiroli i sar., 2011; Yang i sar., 2015a). Takođe, izražene razlike u koncentrisanju teških metala postoje i među različitim klonovima (Landberg i Greger, 2002a; Mleczek i sar., 2010). Vrbe su našle primenu i u procesu kratkih rotacionih kultura (eng. short rotation coppies) pri čemu se ove vrste često sade na poljoprivrednom zemljištu, koriste se za dobijanje biomase i bioenergije, dok se istovremeno vrši uklanjanje Cd iz podloge (Dickinson i Pulford, 2005). Studija Witters i saradnika (2009) je pokazala da primena vrba u kratkim rotacionim ciklusima gajenja na zemljištu koje je

kontaminirano teškim metalima može da dovede do smanjenja sadržaja metala, te se dato zemljište može koristiti za gajenje različitih poljoprivrednih kultura. Uzimajući u obzir sve navedene karakteristike, mnogobrojna istraživanja se sprovode u cilju identifikacije najotpornijih klonova vrba koja se mogu koristiti za prečišćavanje lokaliteta kontaminiranih teškim metalima.

1.8.1. Biologija analiziranih vrsta

Salix viminalis L. 1753. (košaračka vrba)

Košaračka vrba je žbunaste forme, ređe listopadno drvo, visine do 10 m. Vrsta je rasprostranjena na području srednje, zapadne, istočne Evrope i Azije i često je korišćena za proizvodnju korpi, po čemu je i dobila narodni naziv. Košaračka vrba raste na aluvijalnom humusu, svežem glinovitom zemljištu i na ilovači, dok slabo podnosi stajaću vodu. Izdanci ove vrste su dugi, šiboliki, vrlo elastični, gotovo bez bočnih izdanaka. Listovi su uski, lancetasti, dugi od 8 do 16 cm, nazubljeni. Naličje lista je beličasto i dlakavo. Biljka je dvodoma, cveta pre listanja (Oljača i sar., 2017). Ova vrste se vegetativno razmnožava reznicama i koristi se kao živa ograda za učvršćivanje obala i nasipa, a sadi se i kao dekorativna vrsta.

Salix matsudana Koidz. (kineska kovrdžava vrba)

Kineska kovrdžava vrba autohtono raste na području severoistočne Kine do Mandžurije i Koreje, a zbog svog atraktivnog izgleda često je gajena po parkovima kao dekorativna vrsta. *Salix matsudana* predstavlja listopadno drvo visine do 18 m. Grane su uspravne, žućkaste do maslinasto zelene, mlade su potpuno gole. Listovi su izduženi, usko lancetasti, zašiljeni, oštro nazubljeni, sa naličja beličasti, dlakavi, svetlozeleni, dužine od 4 do 10 cm. Biljka je dvodoma, cvetovi rese. Ženske rese oko 12 mm duge sa 2 nektarije (Vukićević, 1987).

Salix alba L. 1753. (bela vrba)

Bela vrba je rasprostranjena na području srednje i južne Evrope, Azije i severne Afrike. U Srbiji je to autohtona vrsta koja raste u rečnim dolinama, plavnim šumama, uz obalu reka na aluvijalnom tlu sa dosta vlage, slabije podnosi kisela zemljišta (Franjić i Škvoc, 2010). Bela vrba je drvenasta vrsta, visine oko 25-30 m sa granama povijenim na dole. Listovi su naizmenično raspoređeni, do 10 cm dugi, lancetasti, zašiljeni, po obodu sitno, žlezdasto testerasti, sa lica tamnozeleni i sjajni, na naličju dlakavi (Josifović, 1972). Biljka je dvodoma,

cvetovi su organizovani u rese, seme je pucajuća čaura (Oljača i sar., 2017). Kora bele vrbe je sivo do smeđe boje, kod mladih izdanaka bela. Kora ove vrste predstavlja prirodni izvor salicilne kiseline i njenih derivata, koji pokazuju lekovita svojstva, te se može koristiti u medicinske svrhe kao antipiretik. Bela vrba se odlikuje velikim brojem klonova i kultivara, pa se često koristi u šumarstvu i vrtlarstvu. Vrsta pokazuju i privredni značaj, pa se koristi u proizvodnji nameštaja, čačkalica, papira, kao i za izradu furnira, dok se kora može upotrebljavati za šavljenje kože (Josifović, 1972).

2. Cilj istraživanja

Osnovni cilj istraživanja bio je ispitivanje uticaja različitih koncentracija kadmijuma na morfološke, fiziološke i biohemijske osobine odabranih klonova vrba (*Salix viminalis* L. klon SV068, *Salix matsudana* Koidz klon SM4041 i *Salix alba* L. klon V-158/B-44) u uslovima bez, kao i sa dodatkom limunske kiseline, gajenih metodom zemljišnih kultura u polu-kontrolisanim uslovima. Utvrđivanjem potencijala različitih klonova vrba da usvajaju, akumuliraju, translociraju i tolerišu prisustvo kadmijuma mogao bi se identifikovati klon koji se odlikuje najpovoljnijim morfo-fiziološkim i biohemijskim karakteristikama pogodnim za dekontaminaciju zemljišta zagađenog kadmijumom. Takođe, istraživanje ima za cilj da pokaže efikasnost primene limunske kiseline kao potencijalnog helatora u asistiranoj fitoremedijaciji.

Da bi se postigao navedeni cilj istraživanje je obuhvatalo:

- Utvrđivanje akumulacije i distribucije Cd u zemljištu i u različitim biljnim organima (koren, izdanak, mladi i stari listovi). Na osnovu dobijenih parametara određen je bioakumulacijski faktor korena i nadzemnog dela biljke, kao i translokacijski faktor.
- Utvrđivanje uticaja Cd i limunske kiseline na morfometrijske parametre: visina i prečnik izdanka, masa i površina listova, broj listova, masa i zapremina korena. Na osnovu dobijenih parametara utvrđen je indeks tolerantnosti biljaka na prisustvo Cd u biljnom tkivu.
- Utvrđivanje uticaja Cd i limunske kiseline na mineralnu ishranu i distribuciju makronutrijenata u biljkama (sadržaj azota, fosfora i kalijuma).
- Utvrđivanje uticaja Cd i limunske kiseline na parametre razmene gasova: intenzitet fotosinteze, intenzitet transpiracije, stomatalna provodljivost, intercelularna koncentracija CO₂, efikasnost korišćenja vode, kao i na sadržaj fotosintetičkih pigmenata (sadržaj hlorofila *a*, hlorofila *b*, ukupnih hlorofila i karotenoida).
- Utvrđivanje uticaja Cd i limunske kiseline na sadržaj aminokiselina prolina i cisteina.
- Utvrđivanje uticaja Cd i limunske kiseline na aktivnost antioksidativnih enzima (katalaze, askorbat-peroksidaze, gvajakol-peroksidaze, glutation-s-transferaze). Takođe, utvrđen je uticaj primenjenih tretmana na intenzitet lipidne peroksidacije, sadržaj redukovano glutationa, produkciju ukupnih, neproteinskih i proteinskih tiola.

Rezultati dobijeni ovim analizama imaju za cilj da ukažu na efikasnost upotrebe limunske kiseline kao helatora u prisustvu kadmijuma u zemljištu. Na osnovu dobijenih

rezultata mogao bi se pouzdano definisati uticaj različitih koncentracija kadmijuma na efikasnost analiziranih klonova vrba u dekontaminaciji umereno zagađenih zemljišta. Takođe, dodavanje limunske kiseline u alkalno zemljište omogućava utvrđivanje potencijala ove ameliorativne mere u procesu asistiranog fitoremedijacije.

3. Materijal i metode

3.1. Odabir biljnog materijala i uslovi gajenja

Vrbe (*Salix* spp.) su gajene u polu-kontrolisanim uslovima u staklari Prirodno-matematičkog fakulteta, Departmana za biologiju i ekologiju (Slika 8). Klonovi korišćeni u eksperimentima su dobijeni selekcijom biljnog materijala koja je izvršena u Institutu za nizijsko šumarstvo i životnu sredinu u Novom Sadu. Gajenje biljaka je vršeno tokom dve sezone, pa je eksperiment podeljen na dve godine istraživanja (prvi i drugi eksperiment). Izbor klonova je prikazan u Tabeli 2.

Tabela 2. Odabrani klonovi vrba (<i>Salix</i> spp.) gajeni u polu-kontrolisanim uslovima u staklari.		
Prvi eksperiment		
Naziv biljne vrste	narodni naziv	oznaka klona
<i>Salix viminalis</i> L.	košaračka vrba	SV068
<i>Salix matsudana</i> Koidz.	kineska kovrdžava vrba	SM4041
<i>Salix alba</i> L.	bela vrba	V-158
Drugi eksperiment		
<i>Salix viminalis</i> L.	košaračka vrba	SV068
<i>Salix matsudana</i> Koidz.	kineska kovrdžava vrba	SM4041
<i>Salix alba</i> L.	bela vrba	B-44



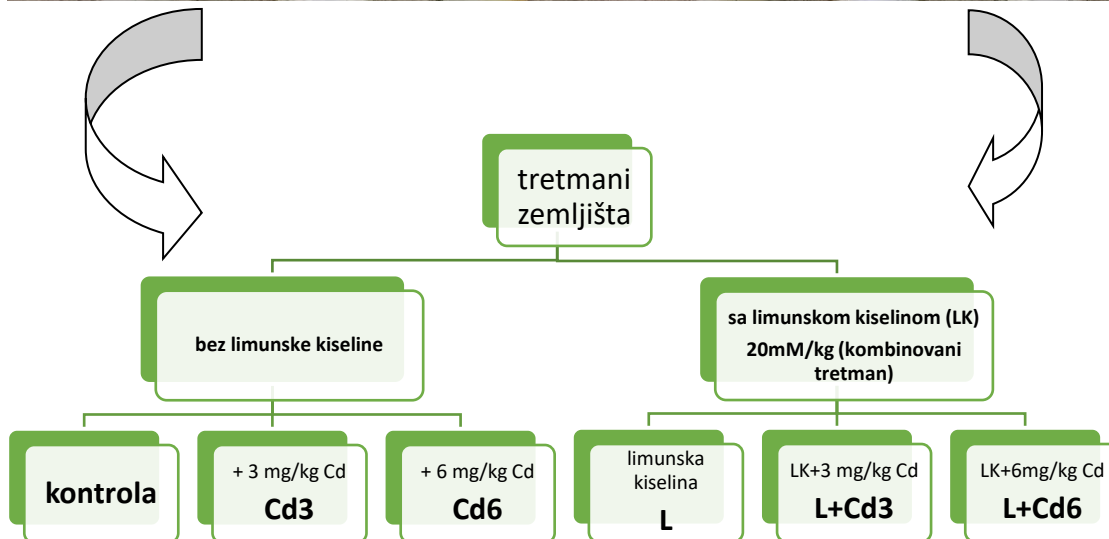
Slika 8. Prvi eksperiment zemljišnih kultura vrba u staklari.

3.2. Dizajn prvog eksperimenta

Odabrani klonovi vrba su gajeni metodom zemljišnih kultura. Tokom faze mirovanja biljaka (februar mesec), reznice vrba su posečene i deponovane u hladnjači do početka ogleda (april). Zemlja je za prvi, kao i za drugi eksperiment, obezbeđena iz rasadnika Instituta za nizijsko šumarstvo i životnu sredinu, lokalitet (45.3025°N 19.9385°E). Početkom aprila, zemlja je istretirana kadmijumom i limunskom kiselinom, a ovako pripremljen supstrat je ostavljen do početka ogleda. Kadmijum je dodat u koncentracijama koje odgovoraju maksimalno dozvoljenoj koncentraciji (MDK vrednost) i duploj vrednosti maksimalno dozvoljene koncentracije (2*MDK vrednost), prema važećem Pravilniku o količinama pesticida, metala, metaloida i drugih otrovnih supstancija, hemoterapeutika, anabolika i drugih supstancija koje se mogu nalaziti u namirnicama ("Sl. list SRJ", br. 5/92, 11/92 – ispr. i 32/2002 i "Sl. glasnik RS", br. 25/2010 – dr. pravilnik i 28/2011 – dr. pravilnik), što za kadmijum iznosi 3 mg/kg, odnosno 6 mg/kg zemljišta. Kadmijum je dodat u obliku nitratne soli $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, čiji je vodeni rastvor prskalicom raspršen po zemljištu. Nakon toga, zemljište je istretirano limunskom kiselinom, koja je dodata u koncentraciji od 20 mM/kg zemljišta. Limunska kiselina je dodata u vidu monohidrata molarne mase $M = 210.14 \text{ g/mol}$ u vodenom rastvoru i raspršena je po zemljištu. Tako pripremljen supstrat je homogenizovan i prenet u Mičerlihove sudove, pri čemu je u svaki sud dodato po 5 kg supstrata. Tretmani su obuhvatali sledeće varijante: kontrola i 2 doze nehelatiranim kadmijumom (Cd3 i Cd6); limunska kiselina i kombinovani tretmani (L+Cd3 i L+Cd6), te je na ovakav način formirano 6 različitih tretmana (Slika 9). U svaki Mičerlihov sud je postavljeno po 6 jednogodišnjih reznica vrba ujednačenih dimenzija. Pre samog postavljanja, reznice su ostavljene u vodi tokom 24 časa, a zatim su dezinfikovane potapanjem u 2% rastvor bakar-sulfata u trajanju od 15 minuta.

Nakon 14 dana izvršena je redukcija broja izdanaka, pri čemu je ostavljen po jedan izdanak na svakoj reznici, kako bi se obezbedila uniformnost i ujednačen rast biljaka. Tokom gajenja, biljke su redovno zalivane do nivoa optimalne humidnosti (60%), a temperatura u staklari se kretala u rasponu od 25 do 30°C, dok je osvetljenje zavisilo od spoljašnjih uslova.

Biljke su gajenje tokom 3 meseca, nakon čega su vršene analize morfo-fizioloških i biohemijskih parametara.



Slika 9. Šematski prikaz tretmana (biljke *S. viminalis* –90 dana gajenja).

3.3. Dizajn drugog eksperimenta

Kao i u prvom eksperimentu, odabrani klonovi vrba (Tabela 2) su obezbeđeni iz rasadnika Instituta za nizijsko šumarstvo i životnu sredinu. Dinamika gajenja vrba u polukontrolisanim uslovima (u staklari) se nije razlikovala u odnosu na prvi eksperiment. Tokom drugog eksperimenta supstrat za gajenje vrba, kao i aplikacija limunske kiseline su modifikovani u cilju utvrđivanja uticaja sukcesivne aplikacije limunske kiseline na usvajanje kadmijuma iz zemljišta. U drugom ekperimentu, supstrat za gajenje vrba je sadržao mešavinu zemljišta (korišteno je zemljište kao i u prvom ogledu) i treseta u zapreminskom odnosu 5:1, što odgovara masenom odnosu 2.5 kg zemlje i 0.5 kg treseta po svakom Mičerlihovom sudu. Kadmijum je dodat u obliku nitratne soli $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ i prskalicom je raspršen po supstratu koji je homogenizovan. Kadmijum je dodat u istim koncentracijama kao i tokom prve godine istraživanja, što odgovara koncentraciji od MDK (3 mg/kg zemljišta) i 2*MDK (6 mg/kg zemljišta). Stabilizacija supstrata je trajala 10 dana, nakon čega je u svaki Mičerlihov sud postavljeno po 6 reznica vrba. Tokom drugog eksperimenta limunska kiselina je dodata u 3 ponavljanja, nakon 30 dana gajenja biljaka, nakon 60 dana, i nakon 90 dana gajenja biljaka. Limunska kiselina je dodata u istoj količini kao i tokom prvog eksperimenta, odnosno 20 mmol/kg zemljišta, u vidu monohidrata molarne mase $M = 210.14 \text{ g/mol}$ u vodenom rastvoru i aplikovana je po zemljištu. Biljke su gajene u optimalnim uslovima svetlosti i temperature (25 do 30°C) i redovno su zalivane do optimalne vlažnosti zemljišta (Slika 10). Pojavom prvih resa je utvrđeno da se radi o ženskim biljkama. 7 dana nakon poslednjeg dodavanja limunske kiseline pristupilo se analizi različitih morfo-fizioloških i biohemijskih parametara.



Slika 10. Gajenje vrba tokom drugog eksperimenta u staklari.

3.4. Analize zemljišta

Fizičko-hemijski parametri zemljišta su određeni pre početka eksperimenta, odnosno pre postavljanja reznica. Analize su vršene u Laboratoriji za ispitivanje zemljišta, đubriva i biljnog materijala, odeljenja za agrohemiju, Poljoprivrednog fakulteta upotrebom standardnih metoda:

1. Određivanje sadržaja karbonata (CaCO_3) – volumetrijska metoda – JUS ISO 10693:2005.
2. Određivanje sadržaja humusa – Određivanje organskog ugljenika oksidacijom pomoću smeše kalijum-dihromat/sumporna kiselina. JUS ISO 14235: 2005
3. Određivanje mehaničkog sastava zemljišta (prosejavanje-sedimentacija) - određen pipet metodom, priprema uzoraka sa Na-pirofosfatom po Thun-u, (Laboratorija za zemljište i agroekologiju, Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, DM 8/1-3-004, L).
4. Određivanje sadržaja ukupnog azota – Određivanje ukupnog azota u zemljištu vršeno je modifikovanom semimikro-Kjeldahlovom metodom (Ubavić i Bogdanović, 2006).
5. Određivanje amonijum laktatnog P_2O_5 i K_2O - Određivanje lako pristupačnog fosfora i kalijuma u zemljištu je vršeno Al-metodom (Ubavić i Bogdanović, 2006).

3.4.1. Određivanje pH vrednosti zemljišta

Određivanje pH vrednost zemljišta je vršeno po metodi Vukanović i Bertić (1989). Suspenzija zemljišta je pravljena dodavanjem 10 g zemljišta u 25 ml dH₂O, odnosno u 25 ml 1 M KCl, a zatim je sadržaj mešan na automatskoj mućkalici tokom 30 minuta, nakon čega je pH vrednost izmerena pomoću pH metra (i330 WTW, Germany).

3.4.2. Određivanje biodostupnosti kadmijuma u zemljištu

Određivanje biodostupnosti Cd je vršeno u zemljišnom rastvoru prema metodi Takáč i sar. (2009). Zemljište je osušeno do potpunog gubitka vlage, homogeno izmešano i samleveno. Zemljišni rastvor je dobijen mešanjem 10 g zemljišta uz dodatak 10 ml 0.1 M CaCl₂ koji je zatim homogenizovan na automatskoj mućkalici tokom 1 časa. Dostupnost kadmijuma je određena upotrebom atomske apsorpcione spektrofotometrije (spektrofotometar model FSAAS240/GTA120/VGA77, proizvođača Varian).

3.5. Analize morfometrijskih parametara

Analize su vršene na po 6 biljaka svakog klona i tretmana, a obuhvatale su sledeće parametre:

1. Visina izdanka (cm) – merena od baze do vrha izdanka
2. Prečnik izdanka (cm) – meren je pri bazi izdanka upotrebom digitalnog nonijusa
3. Broj listova – izražen je kao ukupan broj listova po biljci (mladi + stari listovi)
4. Biomasa biljaka (g) – posebno je merena masa mladih listova (u mlade listove je ubrojano 7 potpuno formiranih najmlađih listova); masa starih listova koja je obuhvatala sve ostale listove; masa izdanka i masa korena. Masa biljnih organa je merena pomoću tehničke vage (model BJ610C, proizvođača Precisa).
5. Površina (cm²) mladih i starih listova je merena pomoću automatskog optičkog aparata za merenje površine "ADC Bioscientific Ltd. AM350" (Slika 11).
6. Zapremina korena (cm³) – određena je metodom po Pajević i sar. (2014).

Na osnovu dobijenih vrednosti biomase kontrolnih i i tretiranih biljaka izračunat je indeks tolerantnosti biljaka (TI) na prisustvo Cd u biljnom tkivu (Wilkins, 1978):

TI = biomasa biljaka u prisustvu Cd * 100/ biomasa kontrolnih biljaka.



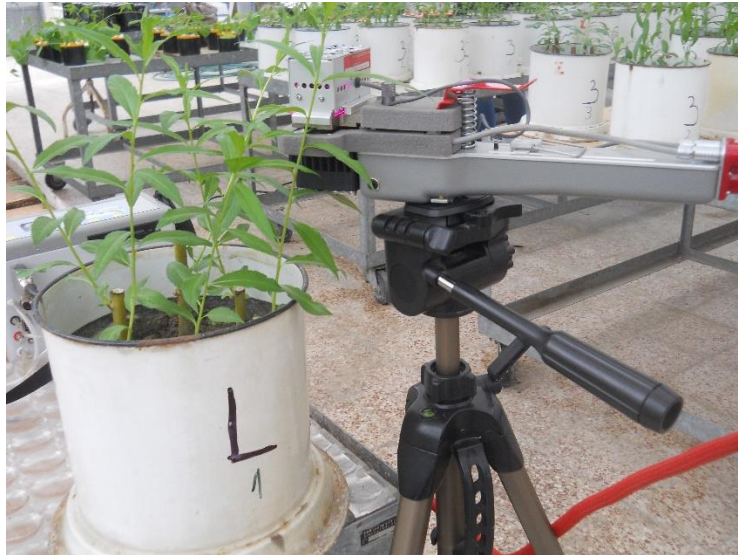
Slika 11. Merenje mase i površine listova biljaka.

3.6. Analize fizioloških parametara

3.6.1. Parametri razmene gasova

1. Intenzitet fotosinteze (A) ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
2. Intenzitet transpiracije (E) ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
3. Stomatalna provodljivost (gs) ($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
4. Intercelularna koncentracija CO_2 (c_i) ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)
5. Efikasnost korišćenja vode (WUE) ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$)

Analize parametara razmene gasova su vršene upotrebom aparata LCPro+, proizvođača ADC Bioscientific, UK (Slika 12). Merenje je vršeno na po tri biljke, svakog klona i tretmana, u tri tehnička ponavljanja. Analaze su vršene u prepodnevnim časovima 09-14 h, pri temperaturi od 25 do 30°C. Fotosintetički aktivna radijacija (FAR) je iznosila $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, dok je protok okolnog vazduha u komori lista iznosio $100 \mu\text{mol s}^{-1}$. Temperatura i vlažnost vazduha, kao i koncentracija CO_2 zavisili su od spoljašnjih uslova sredine. Efikasnost korišćenja vode (WUE), je izračunata kao odnos intenziteta fotosinteze i transpiracije (A/E) [$\mu\text{mol}/\text{mmol}$] (Zhang i sar., 2004).



Slika 12. Merenje fotosintetičkih parametara upotrebom aparata LCPro+ (*S. viminalis*, tretman limunska kiselina).

3.6.2. Određivanje sadržaja pigmenata hloroplasta

Sadržaj hlorofila *a*, *b* i karotenoida meren je na intaktnim listovima (mladim i starim) po metodi Wettstein-a (1957). Listovi su uzeti sa po 3 biljke od svakog klona i tretmana. Mladi listovi su činili uzorak koji je obuhvatao od 3. do 5. potpuno formiranog lista od vrha izdanka, dok su stari listovi izabrani pri sredini izdanka. Svaki uzorak je meren u odvagi od 0.2 g, a određivanje koncentracije pigmenata je vršeno u acetonskom ekstraktu, nakon čega je merena apsorbanca na spektrofotometru (model DU-65, proizvođača Beckman) na talasnim dužinama ($\lambda=440$ nm za karotenoide, $\lambda=644$ nm za hlorofil *b* i $\lambda=662$ nm za hlorofil *a*). Ukupni hlorofili su izračunati kao zbir koncentracije hlorofila *a+b*. Koncentracije fotosintetičkih pigmenata su izražene u mg/g sveže biljne materije.

3.6.3. Priprema matičnih rastvora

Za pripremu matičnih rastvora korišćeni su različiti biljni organi (mladi, stari listovi, izdanak i koren) kao i uzorci zemljišta. Sušenje uzoraka je vršeno tokom 2 dana na sobnoj temperaturi, a zatim tokom 24 časa u sušnici pri temperaturi od 70°C. Osušen biljni materijal je zatim korišten za pripremu matičnih rastvora suvim putem po metodi Pajević i sar. (2014). Biljni materijal je samleven i na analitičkoj vagi je izmereno po 0.3 g svakog biljnog organa, kao i po 1 g zemljišta. Uzorci su žareni u peći za žarenje tokom 3 časa, uz dodatak 33% H₂O₂ kako bi se obezbedila potpuna mineralizacija biljnog materijala. Nakon mineralizacije dodato je 10 ml 25% HCl i zagrevano do uparavanja polovine zapremine. Nakon toga, sadržaj je

profiltriran kroz filter papir i dekantovan u normalan sud od 50 ml i dopunjen dH₂O. Tako pripremljeni matični rastvori su korišćeni za analizu sadržaja mineralnih elemenata (K i P), kao i za određivanje sadržaja kadmijuma.

3.6.4. Određivanje sadržaja mineralnih elemenata (azot, fosfor, kalijum)

Za određivanje sadržaja ukupnog azota (N) korišćena je modifikovana Kjeldahl-a metoda (Nelson i Sommers, 1973). Razaranje organske materije je vršeno mokrim putem koncentrovanom H₂SO₄, nakon čega je vršena destilacija nastalog amonijum-sulfata uz dodatak NaOH. Količina predestilisanog azota je određena retitracijom sa hlorovodoničnom kiselinom, što se manifestuje promenom boje taširo indikatora iz crveno-ljubičaste u svetlo zelenu boju. Određivanje sadržaja fosfora (P) vršeno je iz matičnih rastvora primenom metode po Gericke i Kurmies (1952), koja se zasniva na sposobnosti ortofosforne kiseline da u reakciji sa amonijum-molibdatom i amonijum-vanadatom, uz dodatak azotne kiseline, nagradi heterokiselinski kompleks žute boje. Sadržaj fosfora je određen merenjem apsorbance na spektrofotometru (model DU-65, proizvođača Beckman) pri talasnoj dužini od $\lambda = 436$ nm. Određivanje sadržaja kalijuma (K) vršeno je direktno iz matičnih rastvora, upotrebom plamenfotometra (model PFP7 Plameni fotometar, proizvođača Jenway). Sadržaj mineralnih elemenata (N, P, K) izražen je u procentima (%).

3.6.5. Određivanje sadržaja kadmijuma (Cd) u biljnom tkivu

Određivanje sadržaja kadmijuma u različitim biljnim organima vrba, kao i u zemljištu, vršeno je upotrebom atomskim apsorpcionim spektrofotometrom sa plamenim atomizerom (model FSAAS240/GTA120/VGA77, proizvođača Varian) (Slika 13). Kadmijum je doveden u atomsko stanje u oksidujućem svetlo-plavom plamenu, upotrebom smeše vazduha i acetilena, a apsorbance je očitana na talasnoj dužini od $\lambda = 228.8$ nm (Kebert, 2014). Svi uzorci su analizirani u tri ponavljanja, a sadržaj kadmijuma je izražen u $\mu\text{g/g}$ suve biljne materije. Sadržaj Cd u zemljištu je meren pre i nakon završetka eksperimenta.



Slika 13. Atomiški apsorpcioni spektrofotometar sa plamenim atomizerom.

Na osnovu sadržaja Cd u biljnom tkivu i zemljištu izračunati su biokoncentracijski faktor (BKF) korena i nadzemnog dela biljke (Zayed i sar. 1998), kao i translokacijski faktor (TF) (Zacchini i sar. 2009). Vrednosti su izračunate prema formulama:

BKF korena = koncentracija Cd u korenu tretiranih biljaka / koncentracija Cd u zemljištu

BKF nadzemnog dela = koncentracija Cd u nadzemnom delu tretiranih biljaka / koncentracija Cd u zemljištu

TF = koncentracija Cd u nadzemnom delu biljke * 100 / koncentracija Cd u korenu

3.7. Analize biohemijskih parametara

3.7.1. Određivanje sadržaja slobodnog prolina

Sadržaj aminokiseline prolina meren je u mladim i starim listovima po metodi Bates i sar., (1973). Mereno je po 0.2 g svežeg biljnog materijala i macerirano je u avanu, uz dodatak 5 ml 3% sulfosalicilne kiseline. Sadržaj je centrifugiran tokom 10 minuta na 3.500 obrtaja/min a zatim je 3 ml supernatanta preneto u epruvetu, uz dodatak 2 ml kiselog ninhydrinskog reagensa i 2 ml koncentrovane sirćetne kiseline. Sadržaj je inkubiran tokom 15 min na 100°C, pri čemu se formira kompleks roze boje (Ruhemann-ov ljubičasti kompleks). Reakcija je prekinuta hlađenjem, a zatim je dodato 4 ml toluola i očitana je apsorbanca bojenog kompleksa na talasnoj dužini $\lambda = 520$ nm. Koncentracija slobodnog prolina je očitana sa standardne krive i izražena je u mg/g sveže mase.

3.7.2. Priprema biljnih ekstrakata za enzimske eseje

Biljni materijal (mladi i stari listvi) je maceriran u tečnom azotu i skladišten je na temperaturi od -74°C do početka analiza. Ekstrakcija biljnog materijala je vršena maceriranjem 0.2 g biljnog materijala u avanu na ledu uz dodatak 2 ml fosfatnog pufera (0.1 mol/l KH_2PO_4 ; pH 7.0 podešen sa KOH). U pufer za ekstrakciju je dodat 1 mM Na_2EDTA , i 1 mM fenil-metilo-sulfonil-fluorid (PMSF). Uzorci su centrifugirani na 4°C na 12.000 obrtaja/min u trajanju od 12 minuta. Dobijeni ekstrakti su dalje korišćeni za utvrđivanje sadržaja ukupnih proteina, aktivnosti različitih antioksidativnih enzima i komponenata antioksidativne zaštite.

3.7.3. Određivanje sadržaja ukupnih rastvorljivih proteina

Sadržaj proteina određen je po metodi Bradford (1976). Metod se zasniva na upotrebi Bradford-ov reagensa koji sa proteinima nagrađuje kompleks plave boje. Smeša 100 μl biljnog ekstrakta i 1 ml Bradford-ovog reagensa je inkubirana tokom 5 minuta na sobnoj temperaturi, čime je obezbeđeno razvijanje kompleksa plave boje. Intenzitet boje je određen spektrofotometrijski, očitavanjem apsorbance na $\lambda = 595 \text{ nm}$. Koncentracija proteina u uzorku je određena upotrebom stanadrne krive, a koncentracija proteina u uzorku je izražena u mg proteina /g sveže mase.

3.7.4. Određivanje aktivnosti enzima katalaze (CAT)

Aktivnost enzima katalaze određena je prema modifikovanoj metodi Aebi (1984), praćenjem promene apsorbance na talasnoj dužini od $\lambda = 240 \text{ nm}$. U reakciji je korišten 50 mM fosfatni pufer (KH_2PO_4 , pH 7.0) uz dodatak 33% vodonik-peroksida. Reakcija je započeta dodatkom 100 μl biljnog ekstrakta i meren je pad apsorbance tokom 3 minuta. Aktivnost CAT je izračunata upotrebom ekstencionog milimolarnog koeficijenta koji za katalazu iznosi (A_{240} , $\epsilon = 0.0436 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) i izražena je u jedinicama (U - units) po jedinici količine ukupnih proteina. Jedinica (U) predstavlja količinu enzima koja razgradi 1 μM H_2O_2 tokom 1 minuta.

3.7.5. Određivanje aktivnosti enzima gvajakol-peroksidaze (GPOD)

Aktivnost enzima GPOD određena je po metodi Simon i sar. (1974) praćenjem povećanja apsorbance tokom 3 minuta na talasnoj dužini od $\lambda = 436 \text{ nm}$. Gvajakol-peroksidaza je enzim koji katališe proces oksido-redukcije gde se u prisustvu gvajakola, kao supstrata, neutrališe H_2O_2 do vode, a nagrađuje se žuto-smeđi kompleks u vidu tetragvajakola. Reakciona

smeša je sadržavala 100 µl biljnog ekstrakta, 3 ml 0.1 M fosfatnog pufera (KH₂PO₄, pH 7.0) i 50 µl rastvora gvajakola. Reakcija je započeta dodatkom 50 µl 12.3 mM vodonik-peroksida (H₂O₂). Aktivnost enzima GPOD je izražena je u jedinicama (U - units) po jedinici količine ukupnih proteina.

3.7.6. Određivanje aktivnosti enzima askorbat-peroksidaze (APX)

Aktivnost enzima APX određena je po metodi Nakano i Asada (1981) merenjem smanjenja apsorbance tokom 3 minuta na talasnoj dužini od $\lambda = 290$ nm. Reakciona smeša je sadržavala 25 µl biljnog ekstrakta, 1 ml 0.05 M fosfatnog pufera (KH₂PO₄, pH 7.0) i 50 µl askorbata. Reakcija je započeta dodatkom 50 µl 33% H₂O₂ koji se redukuje do vode, dok se askorbat oksiduje dejstvom enzima askorbat-peroksidaze. Aktivnost enzima APX je izražena u jedinicama enzima (U - units) po jedinici količine ukupnih proteina.

3.7.7. Određivanje aktivnosti enzima glutation-s-transferaze (GST)

Aktivnost enzima GST je određena po metodi Habig i sar. (1974) merenjem promene apsorbance na talasnoj dužini od $\lambda=340$ nm. Tokom reakcije dolazi do formiranja kompleksa redukovanog GSH i CDNB (1-hloro, 2,4-dinitrobenzen) što se prati smanjenjem apsorbance tokom 3 minuta. Reakciona smeša je sadržavala 0.1 M fosfatni pufer (KH₂PO₄, pH 6.5), 3.6 mM redukovani GSH i 1 mM CDNB. Reakcija je započeta dodatkom 50 µl biljnog ekstrakta. Aktivnost GST enzima je izražena u jedinicama enzima (U - units) po jedinici količine ukupnih proteina.

3.7.8. Određivanje sadržaja redukovanog glutationa (GSH)

Sadržaj redukovanog glutationa određen je po metodi Kapetanović i Mielal (1979). Određivanje sadržaja glutationa vršeno je merenjem 0.5 g svežeg biljnog materijala, koji je maceriran na ledu, uz dodatak 5 ml 5% sulfosalicilne kiseline, a zatim je sadržaj centrifugiran na 3000 obrt/min tokom 10 minuta. 200 µl biljnog ekstrakta preneto u staklene epruvete uz dodatak 2 ml Ellman-ovog reagensa (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoeva kiselina – DTNB u fosfatnom puferu). Apsorbanca formiranog bojenog kompleksa je očitana na talasnoj dužini od $\lambda = 412$ nm. Sadržaj GSH izražen je u mol/mg sveže biljne materije.

3.7.9. Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije (sadržaj MDA)

Intenzitet lipidne peroksidacije određen je po metodi Devasagayam i sar. (2003), praćenjem produkcije malondialdehida (MDA), koji nastaje kao krajnji produkt razgradnje membranskih lipida ćelije. Reagens smeša (2.25 ml) (20% TCA – trihlorsirćetne kiseline i 0.5% TBA – tiobarbituratne kiseline) uz dodatak 250 μ l biljnog ekstrakta je inkubirana tokom 20 min pri temperaturi od 95°C. Nakon inkubacije sadržaj je centrifugiran tokom 10 minuta na 3000 obrt/min i očitana je apsorbanca na talasnoj dužini od $\lambda = 532$ nm. Intenzitet lipidne peroksidacije i izražen je u nmol MDA ekvivalenata/mg proteina.

3.7.10. Određivanje sadržaja vodonik-peroksida (H_2O_2)

Određivanje sadržaja vodonik-peroksida (H_2O_2) je vršeno po metodi Sergiev i sar. (1997). 0.2 g svežeg biljnog materijala je homogenizovano na ledu sa 2 ml 0.1% TCA (trihlorsirćetna kiselina), a zatim je homogenat centrifugiran na 12.000 obrt/min tokom 15 min. Nakon toga, 1 ml supernatanta je kvantitativno prenet u reakcionu smešu rastvora koji je sadržavao 1 ml 10 mmol fosfatnog pufera (KH_2PO_4 , pH 7.0) i 2 ml 1 M kalijum jodida (KI). Apsorbanca rastvora je očitana na talasnoj dužini $\lambda = 390$ nm, a koncentracija H_2O_2 je očitana sa standardne krive. Sadržaj vodonik-peroksida je izražen u μ mol H_2O_2 /g svežeg biljnog materijala.

3.7.11. Određivanje sadržaja aminokiseline cisteina

Sadržaj aminokiseline cisteina određen je spektrofotometrijski po metodi Giatonde (1967). Svež biljni materijal (0.5 g) je homogenizovan na ledu uz dodatak 5% perhlorne kiseline ($HClO_4$) i centrifugiran je na 10.000 obrt/min tokom 10 min pri temperature od 4°C. Sadržaj cisteina je određen u supernatantu (1 ml) uz dodatak 2 ml kiselog ninhidrinskog reagensa. Apsorbanca je očitana na spektrofotometru na talasnoj dužini od $\lambda = 560$ nm. Sadržaj cisteina je očitana sa standardne krive i izražen u nmol/ml uzorka.

3.7.12. Određivanje sadržaja ukupnih (UT), neproteinskih tiola (NPT) i proteinskih tiola (PT)

Sadržaj ukupnih tiola, kao i neproteinskih tiola određen je prema metodi Sedlak i Lindsay (1968) koja se zasniva na upotrebi Ellman-ovog reagensa. Ekstrakcija svežeg biljnog materijala (0.5 g) vršena je uz dodatak 5% sulfosalicilne kiseline i sadržaj je centrifugiran na 3000 obrt/min tokom 10 minuta. 250 μ l supernatanta je pomešano sa 750 μ l TRIS pufera (pH 8.2) uz dodatak 50 μ l 0.01mol DTNB (rastvor 5-5'-ditiobis-2-nitrobenzoeve kiseline) i 3.95 ml

apsolutnog metanola. Reakciona smeša je inkubirana na sobnoj temperaturi od 25 °C tokom 15 min do razvijanja boje (kompleks braon boje). Apsorbanca je merena na talasnoj dužini od $\lambda = 412 \text{ nm}$.

Sadržaj neproteinskih tiola je određen upotrebom 1.25 ml biljnog ekstrakta uz dodatak 1 ml dH₂O i 250 μl 50% TCA (trihlorsirćetna kiselina). Sadržaj je inkubiran tokom 15 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugiran tokom 15 minuta na 10.000 obrt/min. Nakon čega je supernatant pomešan sa 0.4 M Tris puferom (pH 8.9), uz dodatak 0.1 ml DTNB. Reakciona smeša je inkubirana tokom 5 minuta na sobnoj temperaturi, a apsorbanca je očitana na talasnoj dužini od $\lambda = 412 \text{ nm}$.

Proteinski tioli (PT) su izračunati na osnovu odnosa ukupnih (UT) i neproteinskih tiola (NPT). Sadržaj je izražen u $\mu\text{mol/g}$ sveže mase.

3.8. Statistička obrada podataka

Dobijeni podaci su statistički obrađeni upotrebom programa Microsoft Excel i DSAASTAT (verzija 1.101.). Rezultati su prikazani tabelarno i grafički. Na graficima, podaci su prikazani u vidu srednje vrednosti \pm standardna devijacija. Srednje vrednosti između klonova i tretmana analizirani su pomoću dvofaktorijalne analize varijanse (two way ANOVA), a razlike između dobijenih vrednosti posmatranih parametara poređene su Fisherovim post-hoc testom za nivo značajnosti od 95% ($p < 0.05$). Srednje vrednosti koje se statistički ne razlikuju za posmatrani nivo značajnosti označene su istim slovom. Vrednosti u tabelama koje su označene boldovanim slovima ukazuju na signifikantne razlike u odnosu na pripadajuću kontrolu - kontrolni tretman, odnosno tretman limunskom kiselinom.

U okviru deskriptivnih statističkih analiza vršeno je poređenje međusobne zavisnosti različitih parametara u okviru svake analizirane vrste. Poređenje je vršeno analizom Pearsonovog testa korelacija za nivo značajnosti od 95% ($p < 0.05$) pomoću statističkog paketa STATISTICA 13.1. Analiza je izvršena na rezultatima dobijenim u drugoj godini, i u okviru svake vrste analizirani su podaci mladih listova: masa i površina listova, akumulacija Cd, intenzitet fotosinteze (A), intenzitet transpiracije (E), efikasnost korišćenja vode (WUE), provodljivost stoma (gs), koncentracija hlorofila *a*, hlorofila *b*, ukupnih hlorofila, karotenoida, sadržaj prolina, sadržaj rastvorljivih proteina, aktivnost enzima askorbat-peroksidaze (APX), glutation-s-transferaze (GST), gvajakol-peroksidaze (GPOD), produkcija malondialdehida (MDA), sadržaj ukupnih tiola (UT), neproteinskih tiola (NPT), proteinskih tiola (PT), sadržaj cisteina, kao i sadržaj vodonik-peroksida (H₂O₂). Pored toga, analiza dobijenih podataka je

izvršena i pomoću multivarijantne analize glavnih komponenti (eng. principal component analysis – PCA analiza) uz pomoću statističkog programskog paketa R. Na osnovu matrica varijansi dobijenih pomoću PCA analize utvrđena je povezanost između analiziranih varijabli.

4. Rezultati

4.1. Karakteristike zemljišta

Na osnovu analize fizičko-hemijskih parametara zemljišta utvrđeno je da je izabrano zemljište tipa fluvisol, dok po teksturi pripada klasi peskovitog tipa (Tabela 3). Sadržaj kalcijum-karbonata je iznosio 10.89% (prvi eksperiment), odnosno 8% (drugi eksperiment), što pokazuje da je u pitanju umereno do jako karbonatno zemljište. Merenjem pH vrednosti zemljišta je utvrđeno da je u pitanju slabo alkalno zemljište. Aktivna kiselost, merena u dH₂O, u analiziranom zemljištu je iznosila 8.16, odnosno 7.8, dok je supstituciona kiselost, merena u rastvoru KCl, iznosila 7.62 u prvom, odnosno 7.88 u drugom eksperimentu. Procenat humusa u zemljištu bez dodatka treseta (prvi eksperiment) je iznosio 2.29%. Dodatak treseta u drugom eksperimentu je uticao na znatno povećanje sadržaja humusa (4.59%). Visok procenat humusa je pokazao da je zemljište bilo bogato organskom materijom. Sadržaj ukupnog azota je pokazao da je zemljište u prvom eksperimentu bilo srednje obezbeđeno azotom, dok je u drugom eksperimentu utvrđena dobra snabdevenost ovim elementom. Sadržaj lako pristupačnog fosfora je pokazao da je zemljište bilo slabo obezbeđeno ovim elementom, dok je obezbeđenost zemljišta lako dostupnim kalijumom bila slaba do umerena.

Tabela 3. Osnovne fizičko-hemijske karakteristike zemljišta.

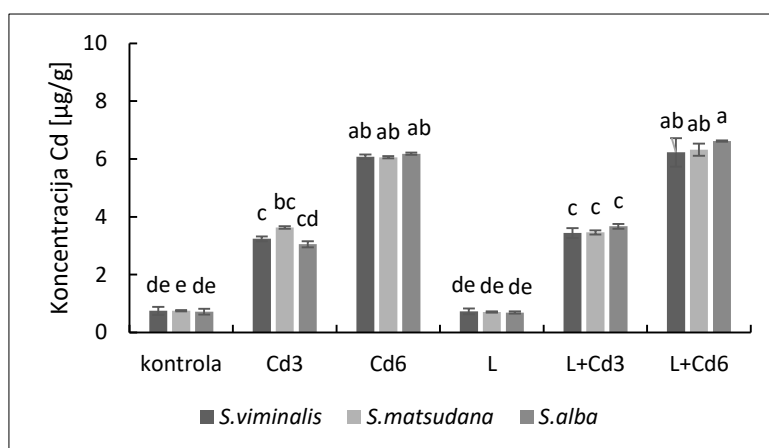
Tip zemljišta	pH		CaCO ₃ %	Humus %	Ukupan N %	AL-P ₂ O ₅ mg/100g	AL-K ₂ O mg/100g
	u KCl	u dH ₂ O					
peskovita ilovača							
Prvi eksperiment	7.62	8.16	10.89	2.29	0.15	5.69	12.56
Drugi eksperiment	7.18	7.88	8.01	4.59	0.23	6.51	13.08

Pre početka postavljanja eksperimenta, u zemljištu je utvrđen ukupni sadržaj kadmijuma (Cd), kao i biodostupnost Cd u zemljišnom rastvoru (Tabela 4). Prisustvo Cd u zemljištu je utvrđeno i nakon završetka ogleda (Slike 14 i 15). Nakon prvog eksperimenta nije zabeležena statistički značajna razlika u koncentraciji preostalog Cd između zemljišta na kojima su gajeni različiti klonovi vrba (Slika 14). Nasuprot tome, u drugom eksperimentu, na tretmanu L+Cd6 je utvrđena statistički značajna razlika u sadržaju Cd koji je preostao u zemljištu, u zavisnosti od klona koji je u njemu gajen (Slika 15). Sadržaj preostalog Cd u zemljištu se kretao u rastućem nizu *S. viminalis* < *S. matsudana* < *S. alba*, što je iznosilo: 6.82 µg/g, 6,96 µg/g i 7.38 µg/g Cd.

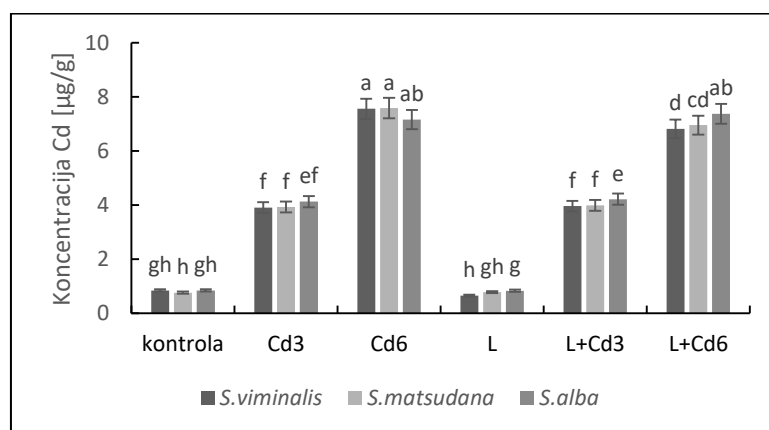
Tabela 4. Koncentracija kadmijuma (Cd) u zemljištu pre početka postavljanja eksperimenta i biodostupnost Cd u zemljišnom rastvoru.

Tretman	prvi eksperiment		drugi eksperiment	
	Postignuta koncentracija Cd [mg/kg]	Biodostupnost Cd u zemljištu	Postignuta koncentracija Cd [mg/kg]	Biodostupnost Cd u zemljištu
kontrola	0.79	nd*	0.86	nd*
Cd3	3.75	0.21	4.69	0.22
Cd6	6.25	0.26	8.35	0.23
L	0.78	nd*	0.89	nd*
L+Cd3	3.65	0.35	4.26	0.36
L+Cd6	6.39	0.46	8.29	0.45

nd* (eng. not detected) - biodostupnost Cd nije utvrđena u kontrolnom zemljištu.



Slika 14. Sadržaj kadmijuma u zemljištu nakon završetka prvog eksperimenta.

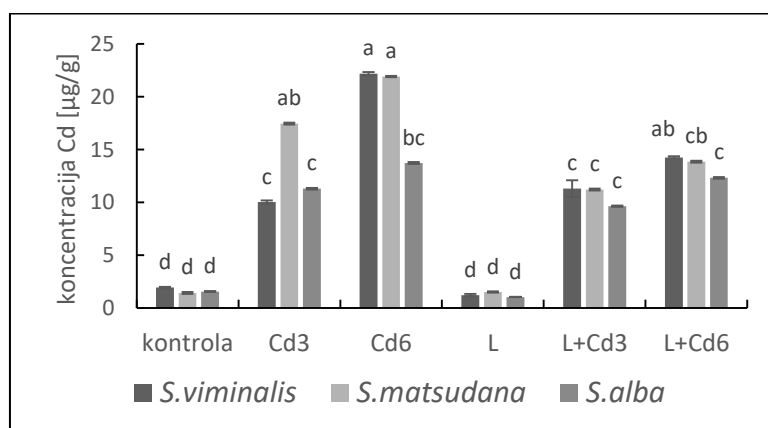


Slika 15. Sadržaj kadmijuma u zemljištu nakon završetka drugog eksperimenta.

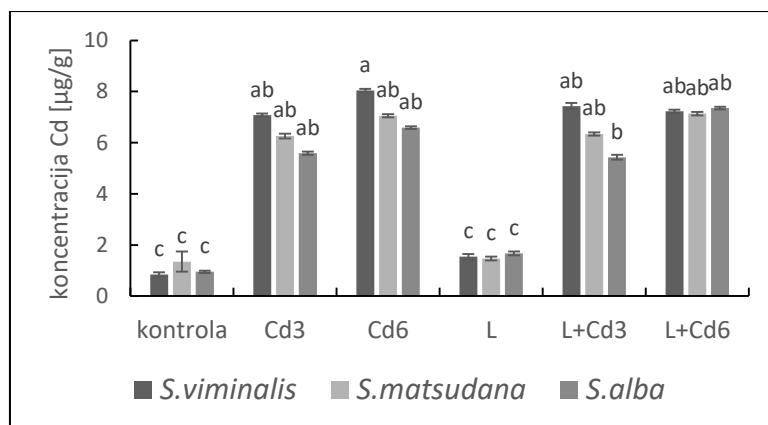
4.2. Prvi eksperiment

4.2.1. Akumulacija Cd, parametri fitoremedijacije (biokoncentracijski i translokacijski faktor)

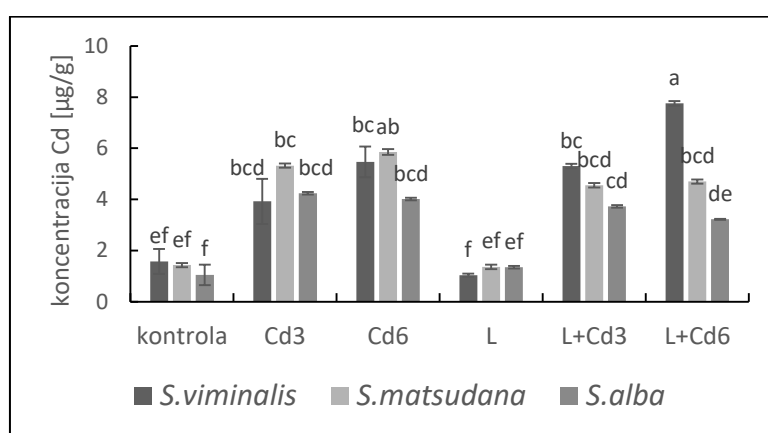
Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj Cd u suvoj masi različitih biljnih organa predstavljen je grafički: mladi listovi (Slika 16), stari listovi (Slika 17), izdanak (Slika 18) i koren (Slika 19). Distribucija kadmijuma u biljnom tkivu je pokazala varijabilnost u zavisnosti od analiziranog klona i primenjenog tretmana. Povećanje koncentracije Cd u zemljištu na 6 mg/kg je dovelo do statistički značajnog povećanja sadržaja ovog metala u mladim listovima i korenu, u odnosu na sadržaj ovog metala u biljkama gajenim na tretmanu Cd3. Nasuprot tome, u starim listovima i izdanku nije zabeleženo linearno povećanje sadržaja Cd usled povećanja njegovog sadržaja u zemljištu. Najveća koncentracija kadmijuma je zabeležena u mladim listovima (*S. viminalis* 22.2 i *S. matsudana* 21.93 mg/kg Cd na tretmanu Cd6), dok je najmanji sadržaj ovog metala registrovan u izdanku. Dodatak limunske kiseline nije značajno uticao na usvajanje jona kadmijuma, te u većini slučajeva nisu utvrđene statistički značajne razlike između tretmana sa i bez dodatka limunske kiseline. Izuzetak su mladi listovi vrste *S. matsudana*, gde su zabeležene statistički značajno veće koncentracije Cd na tretmanu nehelatiranim Cd (Cd3 i Cd6), u odnosu na kombinovani tretman. Na tretmanu L+Cd3 je utvrđeno smanjenje sadržaja Cd za 36% u odnosu na tretman Cd3, dok je na tretmanu L+Cd6 smanjenje u sadržaju Cd iznosilo 37%, u odnosu na tretman Cd6. Nasuprot tome, aplikacija limunske kiseline je imala pozitivan efekat na sadržaj Cd u izdanku *S. viminalis*, pa je na tretmanu L+Cd6 zabeleženo povećanje za 42% u odnosu na koncentraciju Cd na tretmanu Cd6 (Slika 18).



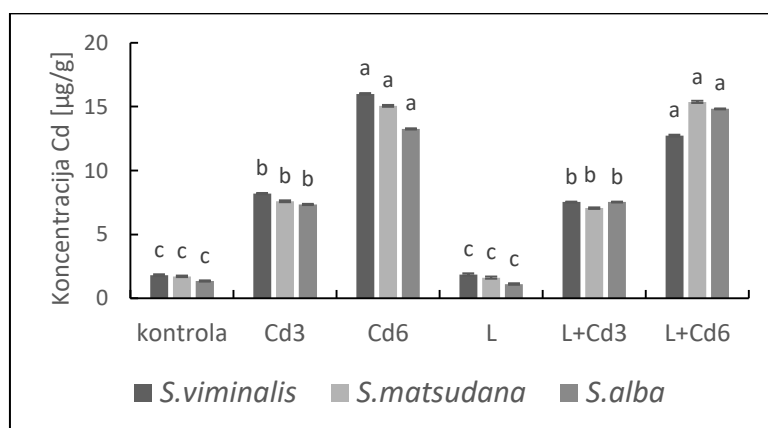
Slika 16. Akumulacija kadmijuma u mladim listovima vrba (*Salix* spp.).



Slika 17. Akumulacija kadmijuma u starim listovima vrba (*Salix* spp.).



Slika 18. Akumulacija kadmijuma u izdanku vrba (*Salix* spp.).



Slika 19. Akumulacija kadmijuma u korenu vrba (*Salix* spp.).

Sposobnost odabranih klonova da akumuliraju Cd u različitim biljnim organima predstavljena je u vidu biokoncentracijskih faktora (BKF) korena i nadzemnog dela biljke (Tabela 5). Dvofaktorijalna analiza varijanse je pokazala statistički značajne razlike u biokoncentracijskom faktoru između primenjenih tretmana i klonova. Trend povećanja BKF korena sa povećanjem sadržaja Cd u zemljištu je utvrđen na svim tretmanima, sa izuzetkom

kod *S. viminalis* na tretmanima nehelatiranim Cd (Tabela 5). Signifikantno povećanje BKF korena usled aplikacije limunske kiseline je utvrđeno kod *S. viminalis*, gde je na tretmanu L+Cd6 zabeležen porast vrednosti BKF korena za 20% u poređenju sa tretmanom Cd6 (Tabela 5). Nasuprot tome, BKF nadzemnog dela biljke je pokazao suprotan trend, odnosno sa povećanjem sadržaja Cd u zemljištu uočeno je smanjenje vrednosti ovog parametra. Međutim, dodatak limunske kiseline je uticao na vrednosti BKF nadzemnog dela pri većoj primenjenoj dozi Cd u zemljištu, tako da je na tretmanu L+Cd6 zabeležena statistički značajno veća vrednost ovog faktora, u odnosu na isti tretman bez limunske kiseline (Tabela 5).

Tabela 5. Uticaj primenjenih tretmana na biokoncentracijske faktore (BKF) korena i nadzemnog dela u analiziranim klonovima vrba (*Salix* spp.)

tretman/klon	BKF korena			BKF nadzemnih delova		
	<i>S. viminalis</i>	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>	<i>S. viminalis</i>	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>
Cd3	2.19±0.03d	2.04±0.01d	2.05±0.24d	7.03±0.17a	6.38±0.09b	5.11±0.08d
Cd6	2.04±0.08d	2.43±0.01abc	2.22±0.01cd	4.69±0.16e	4.05±0.04f	3.45±0.02g
L+Cd3	2.18±0.16d	1.62±0.02e	2.14±0.16bc	5.85±0.01c	6.27±0.05b	6.96±0.01a
L+Cd6	2.63±0.26a	2.46±0.08ab	2.40±0.04cd	5.62±0.12c	5.75±0.15c	3.95±0.08f
ANOVA	p vrednost			p vrednost		
tretman (T)	*			**		
klon (K)	ns			**		
T x K	**			**		

Vrednosti u tabeli predstavljaju srednje vrednosti±standardna devijacija. Razlike između srednjih vrednosti analiziranih parametara vršene su Fisher-ovim post-hoc testom za nivo značajnosti $p < 0.05$ i označene su slovnim oznakama. Vrednosti označene istim slovom u okviru jednog analiziranog parametra se statistički ne razlikuju za postmatrani nivo značajnosti.

* Statistički značajna razlika za $p < 0.05$

** Statistički značajna razlika za $p < 0.01$

^{ns} Ne postoji statistički značajna razlika

Transport jona kadmijuma iz korena u nadzemne organe odabranih klonova vrba je predstavljen u vidu translokacijskog faktora (Tf) (Tabela 6). Kombinovani tretman nižom dozom Cd (L+Cd3) je indukovao signifikantno smanjenje Tf kod *S. matsudana* u poređenju sa tretmanom nehelatiranim Cd (tretman Cd3), što nije zabeleženo kod *S. viminalis* i *S. alba*. Nasuprot tome, pri većoj primenjenoj dozi Cd (tretman L+Cd6) je utvrđeno da je aplikacija limunske kiseline doprinela statistički značajnom povećanju translokacijskog faktora jedino kod *S. viminalis* u poređenju sa tretmanom Cd6.

Tabela 6. Uticaj primenjenih tretmana na translokacijski faktor (Tf) u analiziranim klonovima vrba (*Salix* spp.).

tretman/klon	<i>S. viminalis</i>	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>
Cd3	219±3.26d	204±1.63d	205±24.49d
Cd6	204±8.14d	243±1.63abc	222.33±12.25cd
L+Cd3	218±16.32d	162±2.44e	240±16.32bc
L+Cd6	263.66±26.3a	246.33±8.65ab	214±4.08d
ANOVA	p vrednost		
tretman (T)	*		
klon (K)	ns		
K x T	**		

Vrednosti u tabeli predstavljaju srednje vrednosti±standardna devijacija. Razlike između srednjih vrednosti analiziranih parametara vršene su Fisher-ovim post-hoc testom za nivo značajnosti $p<0.05$ i označene su slovnim oznakama. Vrednosti označene istim slovom u okviru jednog analiziranog parametra se statistički ne razlikuju za postmatrani nivo značajnosti.

* Statistički značajna razlika za $p<0.05$

** Statistički značajna razlika za $p<0.01$

^{ns} Ne postoji statistički značajna razlika

4.2.2. Morfometrijski parametri i indeks tolerancije

Uticaj prisustva Cd i limunske kiseline na morfometrijske parametre odabranih klonova vrba je prikazan u Tabeli 7. Varijabilnost posmatranih karaktera je zavisila od odabranog klona, primenjene koncentracije kadmijuma, kao i od uslova gajenja vrba (prisustvo limunske kiseline). Tretmani kadmijumom su doveli do blagog smanjenja parametara rasta biljaka (mase mladih i starih listova, mase korena i izdanka) u odnosu na kontrolne biljke. Veći stepen smanjenja analiziranih parametara je zabeležen kod biljaka gajenih na tretmanu Cd6 u odnosu na tretman Cd3. U većini slučajeva dodatak limunske kiseline nije pokazao značajan efekat na morfometrijske karakteristike u poređenju sa odgovarajućim tretmanom bez dodatka ovog helatora (Tabela 7). Primena kombinovanih tretmana je pokazala sličan trend kao i primena tretmana nehelatiranim Cd, te je na tretmanima L+Cd3 i L+Cd6 utvrđeno blago do signifikantno smanjenje parametara rasta i biomase biljaka u odnosu na tretman L. Kod vrste *S. viminalis* kombinovani tretmani su uzrokovali promene u broju, biomasi listova i izdanka, kao i površini listova, dok se visina izdanka, masa i zapremina korena nisu signifikantno razlikovali u odnosu na pripadajuću kontrolu (tretman L). Kod vrste *S. alba* primenjeni tretmani su uticali na većinu posmatranih morfometrijskih parametara, te je kod ove vrste zabeleženo signifikantno smanjenje broja listova, mase i površine starih listova, mase i visine izdanka, kao i mase i zapremine korena (Tabela 7). Suprotno tome, kod *S. matsudana* primena kombinovanih tretmana je dovela do signifikantno smanjenje mase mladih listova, kao i zapremene korena što je zabeleženo na tretmanu L+Cd6 u odnosu na tretman L (Tabela 7).

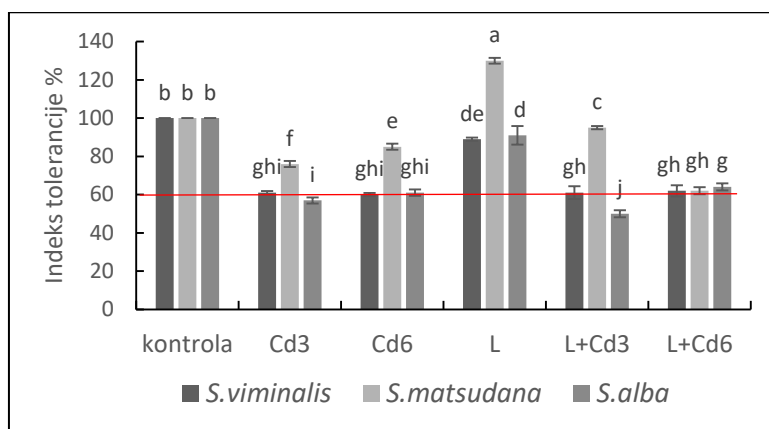
Tabela 7. Uticaj primenjenih tretmana na morfometrijske parametre analiziranih klonova vrba (*Salix* spp.).

	masa mladih listova (g)			masa starih listova (g)		
	<i>S. viminalis</i>	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>	<i>S. viminalis</i>	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>
kontrola	2.5±0.2a	1±0.5efg	1.1±0.15d-g	6.0±0.5ab	4.6±0.5a-d	6.3±0.2ab
Cd3	1.9±0.1b	1.1±0.1c-g	0.7±0.1g	4.0±0.4b-e	3.3±0.5de	3.4±0.3de
Cd6	1.7±0.1bc	0.9±0.2fg	1.0±0.1efg	3.8±0.3cde	2.9±0.2de	5.0±1.0a-d
L	2.9±0.1a	1.34±0.6c-g	1.6±0.1cf	6.6±1.1a	3.7±0.6de	6.5±1.6a
L+Cd3	1.8±0.2b	0.8±0.1fg	0.9±0.3fg	3.8±0.7cde	2.9±0.5de	3.7±0.6de
L+Cd6	1.6±0.3bcd	1.1±0.1dg	1.0±0.1efg	3.6±0.8de	3.6±0.3de	3.8±0.5cde
	površina mladih listova (cm ²)			površina starih listova (cm ²)		
kontrola	170.9±6.5ab	74.2±4.1ef	83.2±7.8c-f	452.6±113ab	358.4±53bcd	446.6±45.9ab
Cd3	138.7±7.3abc	88.1±8.8c-f	62.2±4.7f	313.7±24.8cd	326.8±63.4cd	236.3±26.9ef
Cd6	132.9±3.6a-d	76.3±12.1def	69.2±7.8f	303.8±26.1cd	172.9±18.7f	362.9±42.1bc
L	190.7±9.6a	181.3±17.4a	88.9±2.8c-f	526.7±34.5a	295.1±52.1cde	445.7±40.1ab
L+Cd3	135.2±11.0a-d	82.4±8.8c-f	68.3±5.8f	282.2±53.2c-f	250.2±15.9def	274.2±22.1c-f
L+Cd6	118.8±44.2b-f	83.7±9.8c-f	68.5±4.5f	277.8±48.2c-f	263.9±32.4c-f	285.9±17.cde
	masa izdanka (g)			masa korena (g)		
kontrola	5.0±0.5bcd	4.7±0.3b-e	5.2±0.2abc	2.7±0.6c-f	3.5±0.4a	3.4±0.2ab
Cd3	3.2±0.2c-f	3.7±0.6b-f	2.8±0.1def	1.9±0.2ghi	2.1±0.1f-i	1.8±0.2hi
Cd6	2.9±0.2def	1.8±0.2f	3.7±0.7b-f	2.5±0.2d-g	1.7±0.2hi	1.7±0.2hi
L	5.8±0.8ab	3.6±0.6c-f	6.2±1.5a	2.7±0.3b-f	2.1±0.2f-i	3.2±0.2abc
L+Cd3	2.8±0.5ef	2.5±0.3f	2.9±0.4def	2.8±0.2b-e	1.8±0.11ghi	2.5±0.2d-g
L+Cd6	2.6±0.5ef	2.9±0.2def	3.6±0.2c-f	2.9±0.1a-d	1.5±0.2i	2.3±0.1e-h
	visina izdanka (cm)			prečnik izdanka (cm ²)		
kontrola	72.8±1.5b-e	83.9±4.8abc	85.6±6.3ab	3.7±0.6a-d	4.1±0.3a	3.8±0.1abc
Cd3	58.5±1.7fgh	66.4±2.6e-h	73.9±2.7b-e	3.5±0.1a-e	3.4±0.3a-f	3.1±0.2d-g
Cd6	58.2±3.2gh	70.3±5.2c-g	73.3±4.5c-g	3.5±0.1a-f	2.9±0.2efg	3.1±0.23d-g
L	80.7±1.9a-d	76.3±3.9b-e	93.0±5.2a	3.4±0.4a-f	3.3±0.7b-f	3.9±0.2ab
L+Cd3	72.4±2.7b-f	69.2±3.5d-g	67.9±2d-h	3.5±0.4a-e	3.4±0.15a-f	3.3±0.15a-f
L+Cd6	54.3±2.7h	70.8±5.2c-f	70.7±2.3c-g	2.4±0.7g	2.7±0.6fg	3.5±0.3a-e
	broj listova			zapremina korena (cm ³)		
kontrola	39±1cde	37±2def	48±1a	2.2±0.4a-d	2.5±0.2ab	2.5±0.1ab
Cd3	37±3def	37±2def	43±3b	1.7±0.4ef	1.7±0.1def	1.5±0.2f
Cd6	35±2fg	30±2i	43±2b	2.4±0.2ab	1.5±0.2f	1.6±0.2ef
L	42±1a	34±2fgh	47±2a	2±0.4b-e	2±0.2b-e	2.6±0.2a
L+Cd3	36±1g	31±1hi	41±1bcd	1.8±0.2c-f	1.7±0.2ef	2.1±0.2b-e
L+Cd6	33±1ghi	34±2fgh	40±1bcd	2.3±0.2abc	1.5±0.2f	1.9±0.2c-f

Vrednosti u tabeli predstavljaju srednje vrednosti±standardna devijacija. Razlike između srednjih vrednosti analiziranih parametara vršene su Fisher-ovim post-hoc testom za nivo značajnosti $p<0.05$ i označene su slovnim oznakama. Vrednosti označene istim slovom u okviru jednog analiziranog parametra se statistički ne razlikuju za postmatrani nivo značajnosti, dok vrednosti koje su označene boldovanim slovima ukazuju na signifikantne razlike u odnosu na pripadajuću kontrolu (kontrola, odnosno tretman L).

Analizom uticaja primenjenih tretmana na indeks tolerancije (TI), utvrđena je statistički značajna razlika u sposobnosti analiziranih klonova da tolerišu prisustvo Cd (Slika 20). Kod vrste *S. alba* na tretmanu Cd3 i L+Cd3 zabeležene vrednosti TI su bile manje od 60, što se smatra graničnom vrednošću da bi se vrsta (klon) smatrala otpornom na primenjenu dozu Cd. Pored toga, primena kombinovanog tretmana L+Cd3 nije uticala na promenu tolerantnost biljaka *S. viminalis* i *S. alba*, te na ovom tretmanu nije utvrđena razlika u vrednosti indeksa tolerancije u odnosu na tretman Cd3. Međutim, kod *S. matsudana* je utvrđeno signifikantno povećanje TI na tretmanu L+Cd3 u odnosu na tretman Cd3. Takođe, kod ove vrste je zabeleženo signifikantno povećanje TI koje prati trend povećanja sadržaja Cd u biljnom tkivu

(Slika 20). Pored toga, kod ove vrste je utvrđeno da je primena limunske kiseline (tretman L) pozitivno uticala na vrednost TI u odnosu na kontrolu. Sličan trend je zabeležen i na tretmanu L+Cd3, dok je na tretmanu L+Cd6 (TI = 62) utvrđen suprotan efekat, odnosno došlo je do pada vrednosti TI u odnosu na tretman Cd6 (TI = 85).



Slika 20. Uticaj primenjenih tretmana na indeks tolerancije (TI) u analiziranim klonovima vrba (*Salix* spp.). (vrednost 60 predstavlja kritičan nivo za definisanje stepena tolerancije na prisustvo Cd u biljnom tkivu).

4.2.3. Mineralna ishrana

Sadržaj makronutrijenata azota (N), fosfora (P) i kalijuma (K) u različitim biljnim organima (mladi, stari listovi, koren i izdanak) pod uticajem tretmana Cd i LK prikazan je u Tabelama 8-10. Sadržaj azota je pokazao variranja u zavisnosti od posmatranog organa, primenjenog tretmana kao i analizirane vrste. Najveći sadržaj azota je zabeležen u mladim listovima vrste *S. matsudana* na tretmanu Cd3 (5.7%), sa trendom smanjenja sadržaja u starim listovima, korenu i izdanku. U većini slučajeva primenjeni tretmani nisu imali signifikantan uticaj na sadržaj azota u odnosu na kontrolni tretman (Tabela 8). Međutim, tretmani Cd3 i L+Cd3 su pokazali blago stimulatívno dejstvo na sadržaj azota u biljnom tkivu u odnosu na kontrolu. U mladim listovima *S. alba* na tretmanu L+Cd3 je utvrđeno povećanje sadržaja azota za čak 46% u odnosu na tretman L, dok je u korenu *S. matsudana* na tretmanu Cd3 zabeleženo povećanje od 14% u odnosu na kontrolu. Nasuprot tome, primena kombinovanih tretmana je dovela do signifikantnog smanjenje sadržaja azota u starim listovima *S. viminalis* i *S. matsudana* na L+Cd3 i/ili L+Cd6 u poređenju sa tretmanom L.

Tabela 8. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj azota (N) u različitim biljnim organima analiziranih klonova vrba (*Salix* spp.).

	mladi listovi (N%)			stari listovi (N%)		
	<i>S. viminalis</i>	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>	<i>S. viminalis</i>	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>
kontrola	4.3±0.2bcd	5.2±0.9abc	4.5±0.1a-d	3.5±0.7c-f	3.8±0.1abc	3.9±0.1ab
Cd3	4.4±0.3bcd	5.7±0.9a	5.1±0.2ab	3.3±0.5f	3.8±0.2abc	3.6±0.7b-f
Cd6	4.1±0.4d	5.5±0.1abc	4.8±0.2a-d	3.5±0.12c-f	3.8±0.6abc	4.1±0.2a
L	4.6±0.5a-d	4.7±0.4a-d	3.2±0.7e	3.9±0.3ab	3.8±0.05a-d	3.8±0.4abc
L+Cd3	4.7±0.1a-d	4.7±0.5a-d	4.7±0.1a-d	3.5±0.1def	3.6±0.1b-e	3.8±0.9abc
L+Cd6	4.3±0.1cd	4.6±0.3a-d	3.3±0.1de	3.3±0.1f	3.37±0.1ef	3.7±0.4b-e
	izdanak (N%)			koren (N%)		
kontrola	1.1±0.1def	1.3±0.1a-e	1.1±0.2c-f	1.4±0.2bcd	1.4±0.3bcd	1.3±0.3de
Cd3	1.0±0.1ef	1.3±0.7a-e	1.4±0.3a-e	1.3±0.3de	1.6±0.3a	1.3±0.4de
Cd6	0.9±0.1f	1.4±0.5abc	1.3±0.3a-e	1.4±0.3bcd	1.5±0.3abc	1.3±0.6de
L	0.8±0.1f	1.4±0.2a-d	0.9±0.2f	1.4±0.1bcd	1.6±0.04a	1.3±0.4de
L+Cd3	1.1±0.1b-f	1.5±0.2a	0.8±0.2f	1.4±0.01bcd	1.4±0.3bcd	1.3±0.3de
L+Cd6	1.1±0.5b-f	1.3±0.2a-e	1.4±0.3a-e	1.3±0.2de	1.5±0.3abc	1.3±0.2de

Vrednosti u tabeli predstavljaju srednje vrednosti±standardna devijacija. Razlike između srednjih vrednosti analiziranih parametara vršene su Fisher-ovim post-hoc testom za nivo značajnosti $p < 0.05$ i označene su slovnim oznakama. Vrednosti označene istim slovom u okviru jednog analiziranog parametra se statistički ne razlikuju za postmatrani nivo značajnosti, dok vrednosti koje su označene boldovanim slovim ukazuju na signifikantne razlike u odnosu na pripadajuću kontrolu (kontrola, odnosno tretman L).

Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj fosfora je prikazan u Tabeli 9. Kod vrste *S. matsudana* nisu zabeležene promene sadržaja fosfora pod uticajem tretmana Cd, kao ni pod uticajem kombinovanih tretmana, u poređenju sa kontrolnim biljkama (Tabela 9). Signifikantan pad sadržaja fosfora je zabeležen u mladim listovima, kao i u izdancima vrste *S. alba* koja je gajena na kombinovanim tretmanima L+Cd3 i L+Cd6 u odnosu na pripadajuću kontrolu (tretman L). Kod vrste *S. viminalis* registrovano je statistički značajno smanjenje sadržaja fosfora u starim listovima (tretmani Cd3 i Cd6) i korenu (tretmani Cd3 i Cd6, L+Cd3 i L+Cd6) u odnosu na pripadajuću kontrolu, što nije zabeleženo kod ostalih ispitivanih klonova.

Tabela 9. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj fosfora (P) u različitim biljnim organima analiziranih klonova vrba (*Salix* spp.).

	mladi listovi (P%)			stari listovi (P%)		
	<i>S. viminalis</i>	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>	<i>S. viminalis</i>	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>
kontrola	0.33±0.02ab	0.31±0.03abc	0.34±0.02ab	0.31±0.01a	0.11±0.01bc	0.14±0.02bc
Cd3	0.36±0.02a	0.33±0.02ab	0.31±0.01ab	0.15±0.02bc	0.11±0.01bc	0.14±0.01bc
Cd6	0.34±0.02ab	0.25±0.02cd	0.32±0.02ab	0.06±0.01c	0.07±0.02c	0.13±0.02bc
L	0.37±0.01a	0.31±0.02abc	0.36±0.01a	0.14±0.01bc	0.14±0.02bc	0.14±0.02bc
L+Cd3	0.31±0.2abc	0.32±0.02ab	0.27±0.01bc	0.06±0.01c	0.07±0.01c	0.13±0.01bc
L+Cd6	0.34±0.02ab	0.33±0.02ab	0.24±0.02d	0.11±0.01bc	0.15±0.02bc	0.06±0.01c
	izdanak (P%)			koren (P%)		
kontrola	0.07±0.01cd	0.13±0.01a	0.12±0.01ab	0.11±0.01a-d	0.03±0.01e	0.14±0.02ab
Cd3	0.06±0.03cd	0.13±0.01a	0.06±0.01cd	0.04±0.01e	0.03±0.02e	0.08±0.02b-e
Cd6	0.05±0.01d	0.08±0.01a-d	0.05±0.01d	0.05±0.01e	0.05±0.01e	0.08±0.01b-e
L	0.06±0.02cd	0.06±0.01cd	0.1±0.01abc	0.15±0.01a	0.05±0.01e	0.04±0.01e
L+Cd3	0.09±0.02a-d	0.06±0.01cd	0.05±0.01d	0.08±0.01b-e	0.02±0.01e	0.05±0.01e
L+Cd6	0.06±0.01cd	0.06±0.01cd	0.06±0.02cd	0.03±0.01e	0.02±0.1e	0.07±0.1cde

Vrednosti u tabeli predstavljaju srednje vrednosti±standardna devijacija. Razlike između srednjih vrednosti analiziranih parametara vršene su Fisher-ovim post-hoc testom za nivo značajnosti $p < 0.05$ i označene su slovnim oznakama. Vrednosti označene istim slovom u okviru jednog analiziranog parametra se statistički ne razlikuju za postmatrani nivo značajnosti, dok vrednosti koje su označene boldovanim slovim ukazuju na signifikantne razlike u odnosu na pripadajuću kontrolu (kontrola, odnosno tretman L).

Sadržaj kalijuma je pokazao opadajući trend u smeru: mladi listovi > stari listovi > izdanak > koren (Tabela 10). Primena tretman Cd3 nije signifikantno uticala na sadržaj kalijuma u biljnom tkivu u poređenju sa kontrolnim biljkama, sa izuzetkom kod *S. matsudana*, gde je utvrđeno signifikantno smanjenje sadržaja kalijuma u korenu ove vrste. Takođe, oba primenjena tretmana kadmijumom (Cd3 i Cd6) su dovela do značajnog smanjenja sadržaja kalijuma (34%) u korenu ove vrste u poređenju sa kontrolom. Aplikacija limunske kiseline je uticala na signifikantno povećanje sadržaja kalijuma u mladim listovima *S. alba*, u odnosu na kontrolni tretman (Tabela 10). Takođe, primena kombinovanih tretmana (L+Cd3 i L+Cd6) uzrokovala je blago povećanje sadržaja kalijuma, u poređenju sa odgovarajućim tretmanima bez ovog helatora (Cd3 i Cd6), ali u većini slučajeva zabeležene razlike nisu bile statistički značajne (Tabela 10).

Tabela 10. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj kalijuma (K) u različitim biljnim organima analiziranih klonova vrba (*Salix* spp.).

	mladi listovi (K%)			stari listovi (K%)		
	<i>S. viminalis</i>	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>	<i>S. viminalis</i>	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>
kontrola	4.22±0.1bcd	4.25±0.07bc	3.69±0.11c-f	3.07±0.03b-f	3.81±0.03a	3.14±0.02a-f
Cd3	3.7±0.06c-f	3.91±0.04b-f	3.52±0.08ef	2.75±0.07efg	3.72±0.01ab	3.36±0.09a-e
Cd6	3.52±0.03ef	4.31±0.06b	3.38±0.14f	2.95±0.03c-g	3.59±0.04a-d	2.29±0.12g
L	4.09±0.11b-e	4.24±0.08bc	5.2±0.06a	3.12±0.02b-f	3.52±0.04a-d	3.60±0.03ab
L+Cd3	4.31±0.06b	3.67±0.18c-f	3.85±0.07b-f	2.90±0.05d-g	3.72±0.09ab	3.06±0.03b-f
L+Cd6	3.75±0.08b-f	3.65±0.08def	3.64±0.14def	2.58±0.04fg	3.54±0.07a-d	3.47±0.06a-d
	izdanak (K%)			koren (K%)		
kontrola	0.92±0.07cde	0.95±0.03b-e	1.06±0.02abc	0.92±0.02bc	1.41±0.13a	0.92±0.04bc
Cd3	0.83±0.02e	0.94±0.03b-e	0.94±0.02b-e	0.96±0.05b	0.93±0.02bc	0.89±0.04bc
Cd6	0.99±0.1bcd	0.89±0.03de	0.89±0.03de	0.73±0.04cd	0.90±0.03bc	0.81±0.1bcd
L	0.94±0.02b-e	1.17±0.12a	1.21±0.03a	0.81±0.1bcd	0.96±0.03b	0.9±0.04bc
L+Cd3	0.9±0.04de	0.85±0.03de	1.09±0.04ab	0.62±0.04d	0.85±0.08bc	0.91±0.03bc
L+Cd6	0.90±0.04de	0.95±0.03b-e	0.95±0.02b-e	0.75±0.1bcd	0.91±0.04bc	0.93±0.16bc

Vrednosti u tabeli predstavljaju srednje vrednosti±standardna devijacija. Razlike između srednjih vrednosti analiziranih parametara vršene su Fisher-ovim post-hoc testom za nivo značajnosti $p<0.05$ i označene su slovnim oznakama. Vrednosti označene istim slovom u okviru jednog analiziranog parametra se statistički ne razlikuju za postmatrani nivo značajnosti, dok vrednosti koje su označene boldovanim slovima ukazuju na signifikantne razlike u odnosu na pripadajuću kontrolu (kontrola, odnosno tretman L).

4.2.4. Sadržaj fotosintetičkih pigmenta

Koncentracija fotosintetičkih pigmenta (hlorofil *a*, *b*, ukupnih hlorofila i karotenoida) je varirala u zavisnosti od primenjenog tretmana, analiziranih klonova i starosti listova (Tabela 11). U mladim listovima tretmani Cd3 i L+Cd3 su doveli do blagog pada sadržaja hlorofila *a* kod svih analiziranih vrsta. Međutim, tretman Cd6 je doveo do statistički značajnog smanjenja sadržaja hlorofila *a* samo kod vrste *S. alba* (26%), dok je tretman L+Cd6 uzrokovao statistički značajno smanjenje sadržaja ovog pigmenta kod *S. alba* (34.5%), kao i kod *S. matsudana* (18.5%). Uticaj Cd na sadržaj hlorofila *a* bio je jače izražen u starim listovima, tako je na tretmanu Cd6 zabeleženo smanjenje sadržaja hlorofila *a* za 30% kod vrste *S. viminalis*, 46.8%

kod *S. matsudana* i 23.2% kod *S. alba*, u odnosu na kontrolu. Takođe, trend smanjenja sadržaja hlorofila *b*, kao i ukupnih hlorofila zabeležen je u listovima biljaka gajenih na tretmanima Cd i limunskom kiselinom, pri čemu je stepen smanjenja bio veći u starim, u odnosu na mlade listove. Tretman Cd6 je doveo do signifikantnog pada sadržaja karotenoida u mladim listovima svih analiziranih klonova, a najveći procenat smanjenja je zabeležen kod vrste *S. alba* (37.2%). Primena limunske kiseline u kombinaciji sa Cd pokazala je varijabilan uticaj na sadržaj pigmentata u zavisnosti od doze Cd, starosti listova i analiziranog klona (Tabela 11). U mladim listovima najveći procenat smanjenja ukupnih hlorofila je zabeležen kod vrste *S. alba* gajene na kombinovanom tretmanu L+Cd6. Istovremeno, u starim listovima, kombinovani tretmani L+Cd3 i/ili L+Cd6 nisu doveli do signifikantne promene sadržaja hlorofila *a* u odnosu na tretman L, dok je značajno smanjenje sadržaja hlorofila *b* zabeleženo kod *S. matsudana* i *S. alba*, a karotenoida kod *S. viminalis* i *S. alba*.

Tabela 11. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj pigmentata hloroplasta (hlorofil a, b, a+b i karotenoida) u mladim i starim listovima analiziranih klonova vrba (*Salix* spp.).

tretman/klon	mladi listovi			stari listovi		
	hlorofil a (mg/g sveže mase)			hlorofil a (mg/g sveže mase)		
kontrola	<i>S. viminalis</i>	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>	<i>S. viminalis</i>	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>
kontrola	2.04±0.13a	2.01±0.14a	1.85±0.13ab	2.72±0.32a	2.52±0.5ab	2.24±0.2b-e
Cd3	1.83±0.0ab	1.82±0.2abc	1.60±0.2bcd	2.48±0.3abc	2.13±0.14b-g	1.80±0.3fg
Cd6	1.76±0.1abc	1.77±0.1abc	1.36±0.11d	1.9±0.02efg	1.34±0.4h	1.72±0.56gh
L	1.83±0.06ab	1.95±0.17a	1.51±0.14cd	2.34±0.2a-d	2.27±0.08b-e	2.20±0.04b-f
L+Cd3	1.57±0.1bcd	1.77±0.2abc	1.79±0.14ab	1.89±0.26efg	2.25±0.02b-e	2.16±0.2b-f
L+Cd6	1.51±0.1bcd	1.59±0.2bcd	0.99±0.11e	2.08±0.21c-g	2.13±0.06b-g	1.77±0.1fgh
	hlorofil b (mg/g sveže mase)			hlorofil b (mg/g sveže mase)		
kontrola	0.77±0.1abc	0.80±0.11a	0.64±0.06b-e	0.99±0.1a	0.99±0.04a	0.72±0.1bcd
Cd3	0.68±0.03a-d	0.78±0.02ab	0.60±0.08de	0.83±0.1abc	0.75±0.2bcd	0.65±0.09de
Cd6	0.61±0.05de	0.78±0.03ab	0.58±0.01de	0.82±0.1abc	0.76±0.2bcd	0.54±0.01e
L	0.64±0.09b-e	0.72±0.08a-d	0.72±0.12a-d	0.86±0.1abc	0.96±0.09a	0.86±0.1abc
L+Cd3	0.51±0.06e	0.72±0.02a-d	0.59±0.2de	0.59±0.2de	0.88±0.1abc	0.70±0.1cde
L+Cd6	0.63±0.0cde	0.68±0.11a-d	0.35±0.08f	0.66±0.04de	0.70±0.1cde	0.71±0.1cde
	hlorofil a+b (mg/g sveže mase)			hlorofil a+b (mg/g sveže mase)		
kontrola	2.51±0.21a-e	2.80±0.13ab	1.95±0.14g	3.72±0.15a	3.52±0.22ab	2.96±0.1cde
Cd3	2.37±0.06b-g	2.55±0.22a-d	2.21±0.23d-g	3.32±0.1abc	2.10±0.23f	2.46±0.14ef
Cd6	2.81±0.13ab	2.61±0.16a-d	2.49±0.15a-e	2.91±0.1cde	2.90±0.2cde	2.26±0.12f
L	2.22±0.13d-g	2.67±0.2abc	2.11±0.22efg	3.2±0.23abc	3.21±0.2abc	2.91±0.2cde
L+Cd3	2.02±0.22fg	2.32±0.16d-g	2.52±0.23a-e	2.61±0.14def	3.16±0.1bcd	2.87±0.2cde
L+Cd6	2.46±0.08a-e	2.45±0.33a-f	1.34±0.19h	2.48±0.23ef	2.83±0.2cde	2.64±0.2def
	karotenoidi (mg/g sveže mase)			karotenoidi (mg/g sveže mase)		
kontrola	0.41±0.03a	0.36±0.1abc	0.35±0.05a-d	0.49±0.15ab	0.41±0.08b-f	0.33±0.1efg
Cd3	0.38±0.04ab	0.31±0.02c-f	0.30±0.02c-f	0.40±0.06b-f	0.31±0.08fg	0.35±0.1d-g
Cd6	0.33±0.04b-f	0.30±0.02def	0.22±0.04g	0.55±0.16a	0.47±0.1abc	0.44±0.1a-d
L	0.29±0.01def	0.35±0.03a-e	0.28±0.04fg	0.48±0.1abc	0.41±0.04b-f	0.40±0.06b-f
L+Cd3	0.30±0.03c-f	0.29±0.01def	0.31±0.04cf	0.38±0.2c-g	0.39±0.07b-g	0.40±0.11b-f
L+Cd6	0.38±0.01ab	0.31±0.04c-f	0.32±b-f	0.46±0.1a-d	0.43±0.04b-e	0.29±0.08g

Vrednosti u tabeli predstavljaju srednje vrednosti±standardna devijacija. Razlike između srednjih vrednosti analiziranih parametara vršene su Fisher-ovim post-hoc testom za nivo značajnosti $p<0.05$ i označene su slovnim oznakama. Vrednosti označene istim slovom u okviru jednog analiziranog parametra se statistički ne razlikuju za postmatrani nivo značajnosti, dok vrednosti koje su označene boldovanim slovom ukazuju na signifikantne razlike u odnosu na pripadajuću kontrolu (kontrola, odnosno tretman L).

4.2.5. Parametri razmene gasova

Uticaj primenjenih tretmana na parametre razmene gasova je prikazan u Tabeli 12. Primenjeni tretmani se doveli do signifikantnog smanjenja intenziteta fotosinteze u odnosu na kontrolne biljke, što je zabeleženo kod svih ispitivanih klonova vrba (Tabela 12). Rezultati su pokazali da sa povećanjem sadržaja Cd u zemljištu dolazi do linearnog smanjenja intenziteta fotosinteze. Na tretmanu Cd6 je zabeležen pad intenziteta fotosinteze za 64% kod vrste *S. viminalis*, 44% kod *S. matsudana*, a kod *S. alba* 33% u poređenju sa kontrolnim biljkama. Dodatak limunske kiseline uz veću primenjenu dozu Cd (tretman L+Cd6) je ublažio negativne efekte Cd na intezitet fotosinteze, tako da je kod vrste *S. viminalis* utvrđen pad intenziteta fotosinteze za 43.3% u poređenju sa tretmanom L, kod *S. matsudana* 13%, dok kod vrste *S. alba* nije zabeležen ovaj trend i smanjenje intenziteta fotosinteze je iznosilo 46% (Tabela 12). Slično tome, rezultati su pokazali da intenzitet transpiracije prati trend pada intenziteta fotosinteze, pa je sa povećanjem koncentracije kadmijuma utvrđeno smanjeno odavanje vode. Na tretmanu Cd6 je zabeležen pad intenziteta transpiracije za 48.6% kod vrste *S. viminalis*; 27% kod *S. matsudana* i 17.3% kod vrste *S. alba* u poređenju sa kontrolnim biljkama. Takođe, protok gasova kroz stome (gs) je pokazao trend smanjenja sa povećanjem sadržaja ovog metala u zemljištu. Najveći procenat redukcije stomatalne provodljivosti u iznosu od čak 79% je zabeležen na tretmanu Cd6 kod vrste *S. viminalis*, što je u direktnoj vezi sa smanjenim intenzitetom fotosinteze na ovom tretmanu. Dodatak limunske kiseline je uslovio blagi pad kod većine posmatranih parametara razmene gasova, u odnosu na odgovarajući tretman bez dodatka ovog helatora. Međutim, aplikacija limunske kiseline uz veću dozu Cd (tretman L+Cd6) uticala je na povećanje intenziteta fotosinteze kod svih analiziranih klonova u poređenju sa tretmanom Cd6. Isti trend je zabeležen i u efikasnosti korišćenja vode kod *S. viminalis* i *S. matsudana*. Intercelularna koncentracija ugljen-dioksida je pokazala fluktuacije u zavisnosti od primenjenog tretmana i posmatranog klona.

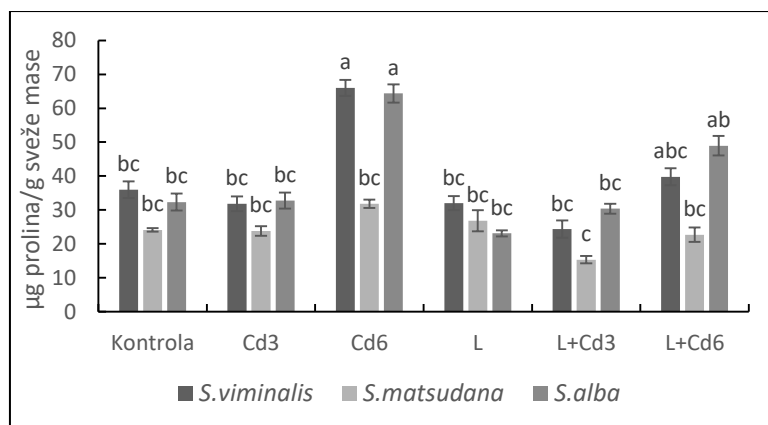
Tabela 12. Uticaj primenjenih tretmana na parametre razmene gasova u analiziranim klonovima vrba (*Salix* spp.).

tretman/klon	intenzitet fotosinteze (A) ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)			intenzitet transpiracije (E) ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)		
	<i>S. viminalis</i>	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>	<i>S. viminalis</i>	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>
kontrola	19.99±0.23a	15.36±0.2bc	16.02±0.1b	2.57±0.04def	2.82±0.04ab	2.83±0.12ab
Cd3	14.95±0.27c	10.52±0.11g	14.13±0.4d	2.24±0.14h	2.51±0.05ef	2.76±0.1abc
Cd6	7.19±0.51k	8.59±0.23ij	10.68±0.5g	1.32±0.03l	2.06±0.02i	2.34±0.01gh
L	13.89±0.31ef	12.99±0.19f	15.1±0.9c	2.46±0.03fg	2.89±0.08a	2.74±0.12bc
L+Cd3	9.50±0.8h	9.32±0.12hi	13.26±0.4ef	1.81±0.11k	2.64±0.1cde	2.68±0.1bcd
L+Cd6	7.87±0.37jk	11.32±0.19g	8.2±0.23j	1.16±0.08m	1.88±0.02jk	1.97±0.04ij
efikasnost korišćenja vode (WUE) ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)/ ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)			stomatalna provodljivost (gs) ($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)			
kontrola	7.76±0.14a	5.43±0.1cde	5.67±0.2cd	0.43±0.07a	0.31±0.05b-f	0.36±0.07ab
Cd3	6.71±0.59b	4.18±0.03g	5.11±0.1def	0.33±0.04a-d	0.24±0.04d-g	0.25±0c-g
Cd6	5.47±0.5cde	4.17±0.07g	4.56±0.2fg	0.09±0.01hi	0.21±0.04fg	0.24±0.1d-g
L	5.63±0.05cd	4.49±0.12fg	5.51±0.2cde	0.16±0.01ghi	0.35±0.1abc	0.19±0.03gh
L+Cd3	5.29±0.68de	3.52±0.08h	4.93±0.08ef	0.22±0.04efg	0.32±0.06b-e	0.15±0.1ghi
L+Cd6	6.79±0.46b	6.02±0.44c	4.14±0.1gh	0.08±0.01i	0.15±0.04ghi	0.20±0.02g
intercelularna koncentracija CO ₂ (ci) ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)						
kontrola	206.6±6.1fgh	207.3±3.6fgh	189.6±1.6ij			
Cd3	227±4.32cd	237.6±4.2ab	203±2.82gh			
Cd6	238.3±3.8a	228±1.4bc	180.6±5.4j			
L	213±4.5ef	217.3±1.7de	198.6±0.5hi			
L+Cd3	204±3.2fgh	210.3±3.9efg	213±3.1ef			
L+Cd6	204.6±5.2fgh	186.3±6.8j	200±1.6h			

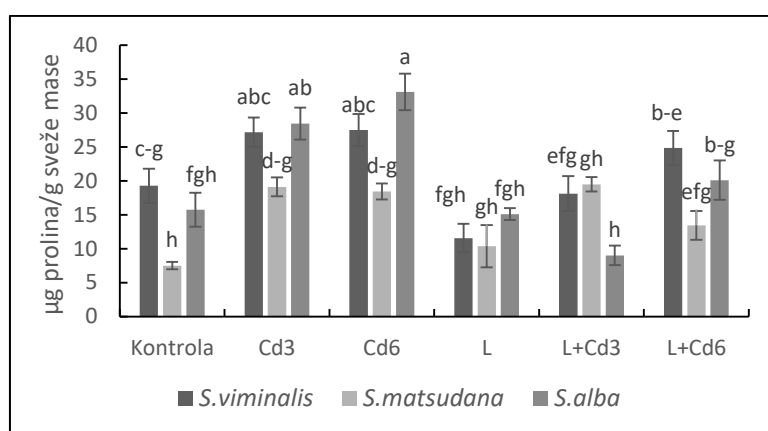
Vrednosti u tabeli predstavljaju srednje vrednosti±standardna devijacija. Razlike između srednjih vrednosti analiziranih parametara vršene su Fisher-ovim post-hoc testom za nivo značajnosti $p < 0.05$ i označene su slovnim oznakama. Vrednosti označene istim slovom u okviru jednog analiziranog parametra se statistički ne razlikuju za postmatrani nivo značajnosti, dok vrednosti koje su označene boldovanim slovima ukazuju na signifikantne razlike u odnosu na pripadajuću kontrolu (kontrola, odnosno tretman L).

4.2.6. Sadržaj prolina

Analiza sadržaja prolina ukazuje na znatno veću akumulaciju ove aminokiseline u mladim, u odnosu na stare listove (Slike 21 i 22). Najveća produkcija ove aminokiseline je zabeležena u mladim listovima kod vrste *S. viminalis* (65.9 $\mu\text{g/g}$) i kod vrste *S. alba* (64.4 $\mu\text{g/g}$) na tretmanu Cd6, a isti trend je zabeležen i u starim listovima (27.5 $\mu\text{g/g}$, odnosno 33.1 $\mu\text{g/g}$). Tretman Cd6 je doveo do signifikantnog povećanja akumulacije prolina u mladim listovima *S. viminalis* i *S. alba* (45.5%, odnosno 49.8%) u poređenju sa kontrolnim biljkama, dok ovaj trend nije zabeležen kod vrste *S. matsudana* (Slika 21). Primena limunske kiseline u kombinovanim tretmanima doprinela je smanjenju akumulacije prolina u odnosu na isti tretman nehelatiranim Cd, što je utvrđeno u mladim i starim listovima (Slike 21 i 22). Najveći procenat smanjenja sadržaja prolina je zabeležen kod *S. viminalis* na tretmanu L+Cd6 (39%) u odnosu na tretman Cd6 (Slika 21), dok je u starim listovima isti procenat smanjenja zabeležen kod *S. alba* (Slika 22).



Slika 21. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj prolina u mladim listovima analiziranih klonova vrba (*Salix* spp.).

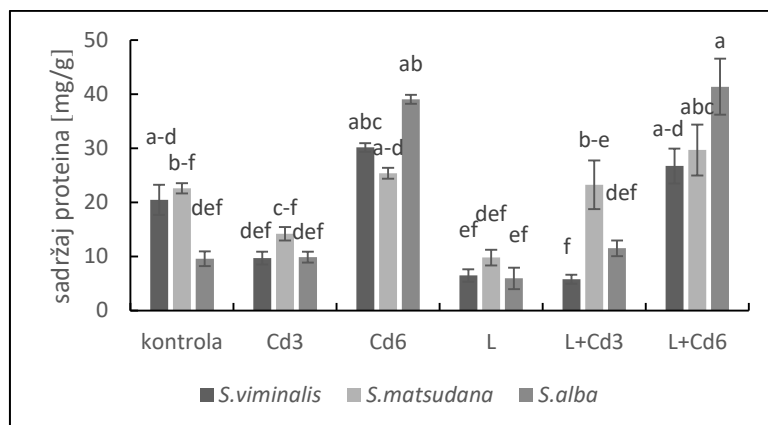


Slika 22. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj prolina u starim listovima analiziranih klonova vrba (*Salix* spp.).

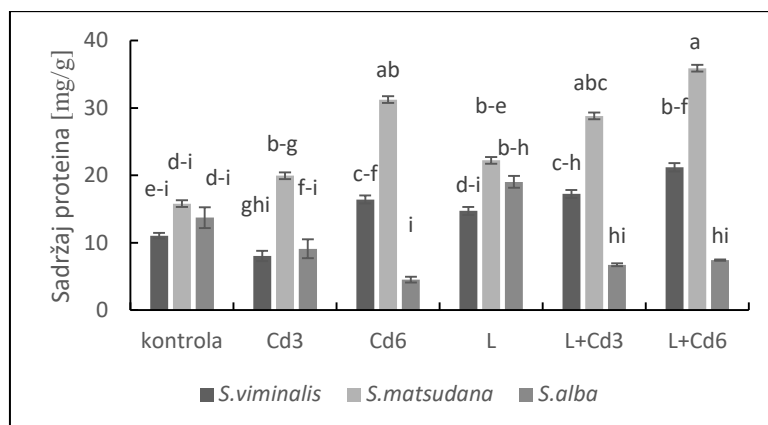
4.2.7. Sadržaj ukupnih rastvorljivih proteina

Koncentracija ukupnih rastvorljivih proteina je pokazala statistički značajna variranja u zavisnosti od analiziranog genotipa, primenjenog tretmana, koncentracije Cd, kao i od starosti listova (Slike 23 i 24). U mladim listovima, tretman Cd3 nije doveo do statistički značajnih promena u sadržaju proteina u odnosu na kontrolni tretman, dok je trend povećanja koncentracije ukupnih rastvorljivih proteina utvrđen na tretmanu Cd6 (Slika 23). Povećanje sadržaja proteina sa trendom povećanja akumulacije Cd u biljnom tkivu registrovano je i u starim listovima kod vrste *S. matsudana*, što je zabeleženo na tretmanima bez, kao i na tretmanima sa limunskom kiselinom (Slika 24). Nasuprot tome, u starim listovima *S. viminalis* i *S. alba* nisu registrovane signifikantne promene sadržaja proteina između tretiranih i kontrolnih biljaka (Slika 23). Najveći sadržaj proteina u mladim listovima je registrovan na tretmanu L+Cd6 kod vrste *S. alba* (41.39 mg/g), što je 7 puta veća vrednost u odnosu na tretman

L, dok je u starim listovima najveći sadržaj proteina zabeležen na istom tretmanu, ali kod vrste *S. matsudana* (35.87 mg/g).



Slika 23. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj ukupnih rastvorljivih proteina u mladim listovima analiziranih klonova vrba (*Salix* spp.).



Slika 24. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj ukupnih rastvorljivih proteina u starim listovima analiziranih klonova vrba (*Salix* spp.).

4.2.8. Antioksidativni sistem zaštite

Uticaj povišenih koncentracija kadmijuma u uslovima sa i bez dodatka limunske kiseline na aktivnost antioksidativnih enzima askorbat-peroksidaze (APX), katalaze (CAT) i gvajakol-peroksidaze (GPOD) je prikazan u Tabeli 13. Analizom varijanse dvofaktorijalnog ogleda utvrđene su statistički značajne razlike u aktivnosti APX kod biljaka izloženih kadmijumu, pri čemu su dobijene razlike zavisile od analiziranog klona, primenjenog tretmana, kao i od starosti listova (Tabela 13). Dodatak limunske kiseline nije uticao na promenu aktivnosti APX u mladim listovima biljaka, u odnosu na odgovarajući tretman kadmijuma bez ovog helatora. Izuzetak je vrsta *S. alba* kod koje je zabeleženo povećanje aktivnosti enzima APX pri tretmanu L+Cd6 za 30% u mladim listovima, dok je u starim listovima aktivnost ovog

enzima bila čak 4 puta veća u poređenju sa tretmanom Cd6. Linearno povećanje aktivnosti enzima katalaze je utvrđeno sa povećanjem sadržaja Cd, što je zabeleženo kako u mladim, tako i u starim listovima (Tabela 13). Najveća aktivnost ovog enzima je zabeležena na tretmanu L+Cd6 kod vrste *S. viminalis* u mladim listovima (0.97 U/mg proteina), dok je u starim listovima najveća aktivnost CAT konstatovana na tretmanu Cd6 kod vrste *S. matsudana* (1.19 U/mg proteina). Statistički značajne razlike u aktivnosti katalaze su registrovane kako između klonova, tako i između različitih tretmana i starosti listova. U mladim listovima *S. matsudana* i *S. alba* je zabeleženo signifikantno povećanje aktivnosti CAT na tretmanu L+Cd6 u odnosu na tretman Cd6 (Tabela 13). Nasuprot tome, u starim listovima je utvrđeno smanjenje aktivnosti CAT na tretmanu L+Cd6 u poređenju sa tretmanom Cd6 (28% *S. matsudana* i 46% *S. alba*). Slično ostalim enzimima, aktivnost gvajakol-peroksidaze (GPOD) je pokazala trend uvećanja aktivnosti sa povećanjem koncentracije kadmijuma u biljnom tkivu (Tabela 13). Dodatak limunske kiseline pri većoj dozi Cd (tretman L+Cd6) indukovao je statistički značajno smanjenje aktivnosti GPOD u mladim listovima *Salix matsudana* za 40% u odnosu na isti tretman bez ovog helatora, što nije registrovano kod ostalih analiziranih vrsta (Tabela 13). Uticaj prisustva limunske kiseline na aktivnost GPOD je utvrđen i u starim listovima vrste *S. alba*, gde je zabeleženo povećanje aktivnosti ovog enzima pri tretmanu L+Cd6 za 3 puta u odnosu na tretman Cd6.

Tabela 13. Uticaj primenjenih tretmana na aktivnost antioksidativnih enzima u analiziranim klonovima vrba (*Salix* spp.).

tretman/klon	mladi listovi			stari listovi		
	aktivnost askorbat-peroksidaze (APX) (U/mg proteina)					
	<i>S. viminalis</i>	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>	<i>S. viminalis</i>	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>
kontrola	0.12±0.02c	0.06±0.01c	0.01±0.01c	0.12±0.04ef	0.30±0.01f	0.11±0.02ef
Cd3	0.12±0.03c	0.44±0.04b	0.44±0.09b	0.34±0.06b-f	0.31±0.19c-f	0.14±0.06ef
Cd6	0.53±0.15b	0.81±0.18a	0.51±0.12b	0.39±0.14b-e	0.31±0.03c-f	0.25±0.2c-f
L	0.09±0.01c	0.07±0.01c	0.01±0.01c	0.15±0.04ef	0.24±0.11c-f	0.2±0.04def
L+Cd3	0.16±0.05c	0.52±0.23b	0.45±0.02b	0.57±0.19bc	0.47±0.14b-e	0.4±0.04b-e
L+Cd6	0.56±0.05b	0.83±0.19a	0.82±0.25a	0.33±0.10c-f	0.5±0.12bcd	0.96±0.23a
aktivnost katalaze (CAT) (U/mg proteina)						
kontrola	0.02±0.01f	0.08±0.02f	0.02±0.01f	0.14±0.1fgh	0.04±0.01gh	0.01±0.01h
Cd3	0.38±0.02d	0.29±0.02de	0.12±0.04ef	0.27±0.01def	0.44±0.05cd	0.52±0.01c
Cd6	0.86±0.05ab	0.63±0.2c	0.38±0.04d	0.48±0.06c	1.19±0.33a	0.76±0.13b
L	0.26±0.02de	0.15±0.06ef	0.16±0.04ef	0.24±0.03d-g	0.25±0.02def	0.2±0.04efg
L+Cd3	0.60±0.04c	0.16±0.04ef	0.28±0.05de	0.33±0.01c-f	0.5±0.02c	0.26±0.0def
L+Cd6	0.97±0.13a	0.83±0.19ab	0.78±0.09bc	0.49±0.19c	0.86±0.01b	0.41±0.1cde
aktivnost gvajakol-peroksidaze (GPOD) (U/mg proteina)						
kontrola	0.09±0.02def	0.14±0.03def	0.04±0.03ef	0.11±0.04def	0.12±0.03def	0.04±0.02ef
Cd3	0.23±0.03c-f	0.56±0.09ab	0.14±0.01de	0.16±0.03cde	0.15±0.09c-f	0.04±0.01ef
Cd6	0.65±0.23ab	0.73±0.03a	0.26±0.12cd	0.24±0.05cd	0.47±0.03a	0.17±0.0cde
L	0.04±0.02ef	0.05±0.04ef	0.04±0.01ef	0.01±0.01f	0.09±0.03ef	0.18±0.0cde
L+Cd3	0.18±0.04def	0.31±0.05cd	0.25±0.03c-f	0.16±0.04cde	0.15±0.05c-f	0.3±0.03bc
L+Cd6	0.74±0.01a	0.44±0.02bc	0.3±0.02cd	0.29±0.01bc	0.44±0.02ab	0.52±0.02a

Vrednosti u tabeli predstavljaju srednje vrednosti±standardna devijacija. Razlike između srednjih vrednosti analiziranih parametara vršene su Fisher-ovim post-hoc testom za nivo značajnosti $p<0.05$ i označene su slovnim oznakama. Vrednosti označene istim slovom u okviru jednog analiziranog parametra se statistički ne razlikuju za postmatrani nivo značajnosti, dok vrednosti koje su označene boldovanim slovima ukazuju na signifikantne razlike u odnosu na pripadajuću kontrolu (kontrola, odnosno tretman L).

Uticaj primenjenih tretmana na peroksidaciju lipida praćen je preko produkcije malondialdehida (MDA) u mladim i starim listovima (Tabela 14). Statistički značajno uvećanje sadržaja MDA pri tretmanu Cd3 je zabeleženo kod *S. matsudana* i *S. alba*, sa izuzetkom u mladim listovima *S. viminalis*, odnosno u starim listovima *S. alba*, dok je tretman Cd6 indukovao povećanje sadržaja MDA kod svih analiziranih klonova u poređenju sa kontrolnim biljkama (Tabela 14). Dodatak limuske kiseline pri tretmanu L+Cd6 indukovao je pad sadržaja MDA u odnosu na njegov sadržaj kod biljaka gajenih na tretmanu nehelatiranim kadmijumom (tretman Cd6), što je zabeleženo kod svih analiziranih klonova, bez obzira na starost listova. U mladim listovima procenat smanjenja se kretao u opsegu od 4 do 31%, dok je u starim listovima registrovano smanjenje od 16 do 34% (Tabela 14). Primenjeni tretmani Cd3 i Cd6 su indukovali povećanje sadržaja redukovanog glutaciona (GSH) kod svih analiziranih klonova, bez obzira na starost listova (Tabela 14). U mladim listovima sadržaj GSH je bio 2 puta veći kod *S. viminalis*, 6 puta kod *S. matsudana*, a kod *S. alba* 5 puta veći na tretmanu Cd6 u odnosu na kontrolne biljke. Dodatak limunske kiseline pri većoj primenjoj dozi kadmijuma (L+Cd6) je uzrokovao statistički značajno uvećanje sadržaja GSH u mladim listovima vrba, u odnosu

na biljke gajene na tretmanu bez aplicirane limunske kiseline (Cd6 tretman). U starim listovima ovaj trend je zabeležen jedino kod vrste *S. alba*, dok je kod *S. viminalis* registrovano smanjenje sadržaja GSH, a kod vrste *S. matsudana* nije bilo statistički značajnih promena na kombinovanom tretmanu L+Cd6 u odnosu na tretman Cd6.

Tabela 14. Uticaj primenjenih tretmana na intenzitet lipidne peroksidacije (MDA sadržaj) i sadržaj redukovanog glutation (GSH) u analiziranim klonovima vrba (*Salix* spp.).

tretman/klon	mladi listovi			stari listovi		
	sadržaj malondialdehida (nmol MDA/mg proteina)					
	<i>S. viminalis</i>	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>	<i>S. viminalis</i>	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>
kontrola	49.8±2.2d-g	25.6±2.6ijk	12.9±0.3k	39.8±2.5e	29.1±7.1ef	22.3±7.8fg
Cd3	52.03±1.3c-f	49.1±5.3d-g	52.3±6.7c-f	75.2±2.2c	58.7±1.3d	29.4±2.2ef
Cd6	69.5±4.6ab	79.8±3.9a	62.4±3.4bcd	126.9±5.1a	92.8±5.6b	65.7±3.6cd
L	34.6±0.21g-j	36.2±3.3g-j	22.5±2.1jk	34.9±4.1ef	33.6±7.9ef	14.6±1.9g
L+Cd3	42.7±2.5fgh	38.5±1.4f-i	31.9±3.1hij	56.4±5.7d	37.9±2.9e	23.7±1.7fg
L+Cd6	66.7±2.2abc	58.4±3.9b-e	43.2±3.6e-h	96.6±14.8b	60.8±4.4d	55.3±5.6d
sadržaj redukovanog glutationa (GSH) (mol/mg sveže mase)						
kontrola	17.0±5.1e	26.5±2.9e	31.4±1.6e	81.3±5.0e	24.9±0.6ij	35.2±3.1hij
Cd3	30.1±4.5e	34.1±2.1e	63.5±6.2d	111.6±10.4d	55.8±8.9fg	67.8±3.6ef
Cd6	60.5±4.3d	153.0±7.3b	121.9±20.8c	187.6±9.1b	132.2±2.5c	176.4±8.3b
L	17.2±1.4e	36.6±8.5e	16.5±3.6e	69.1±3.7ef	20.5±0.9j	32.2±2.9hij
L+Cd3	28.6±1.9e	56.3±2.9d	26.8±5.3e	75.5±4.0e	40.2±4.5ghi	45.2±2.7gh
L+Cd6	221.3±27.1a	208.5±19.5a	171.6±24.3b	115.3±13.2d	124.1±22cd	236.5±21.1a

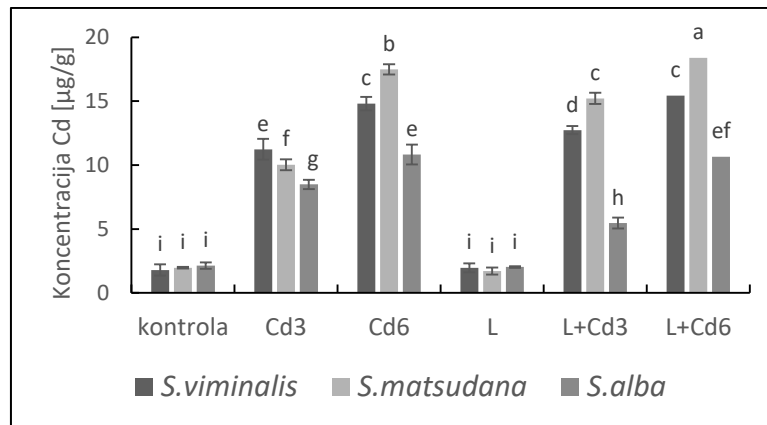
Vrednosti u tabeli predstavljaju srednje vrednosti±standardna devijacija. Razlike između srednjih vrednosti analiziranih parametara vršene su Fisher-ovim post-hoc testom za nivo značajnosti $p<0.05$ i označene su slovnim oznakama. Vrednosti označene istim slovom u okviru jednog analiziranog parametra se statistički ne razlikuju za postmatrani nivo značajnosti, dok vrednosti koje su označene boldovanim slovom ukazuju na signifikantne razlike u odnosu na pripadajuću kontrolu (kontrola, odnosno tretman L).

4.3. Drugi eksperiment

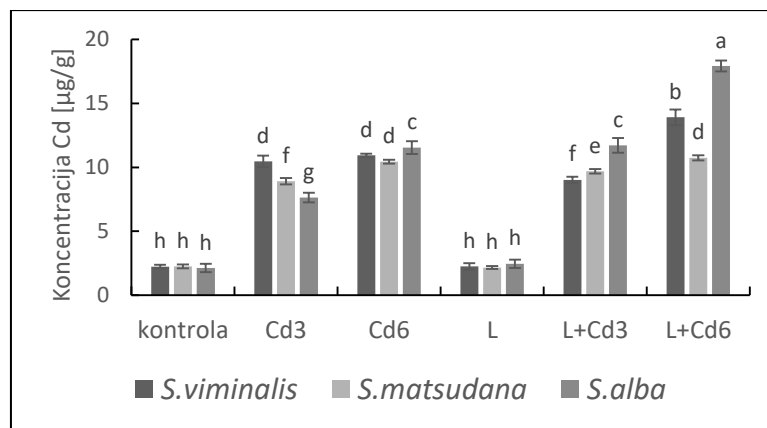
4.3.1. Akumulacija Cd, parametri fitoremedijacije (biokoncentracijski i translokacijski faktor)

Akumulacija kadmijuma u suvoj masi različitih biljnih organa predstavljena je grafički: mladi listovi (Slika 25), stari listovi (Slika 26), izdanak (Slika 27) i koren (Slika 28). Sadržaj kadmijuma u biljnom tkivu varirao je u zavisnosti od odabranog klona, primenjene koncentracije kadmijuma, kao i od prisustva limunske kiseline. Na osnovu distribucije Cd u biljnom tkivu je utvrđeno da je najveći sadržaj ovog metala zabeležen u korenu na tretmanu L+Cd6. Akumulacija Cd je iznosila 25.73 $\mu\text{g/g}$ kod vrste *S. viminalis*; kod vrste *S. matsudana* 23.26 $\mu\text{g/g}$; dok je kod vrste *S. alba* sadržaj Cd na ovom tretmanu iznosio 25.29 $\mu\text{g/g}$. Primena limunske kiseline je imala najveći uticaj na sadržaj Cd u korenu vrste *S. matsudana*, pa je na tretmanu L+Cd6 koncentracija Cd bila za 52% veća u odnosu na tretman Cd6 (Slika 28). Takođe, kod ove vrste je zabeležena najveća akumulacija Cd u mladim listovima, u poređenju sa ostalim analiziranim klonovima vrba (Slika 25). Akumulacija Cd na tretmanu L+Cd6 u mladim listovima *S. matsudana* je bila 18.39 $\mu\text{g/g}$ Cd, što je statistički značajno veće u odnosu

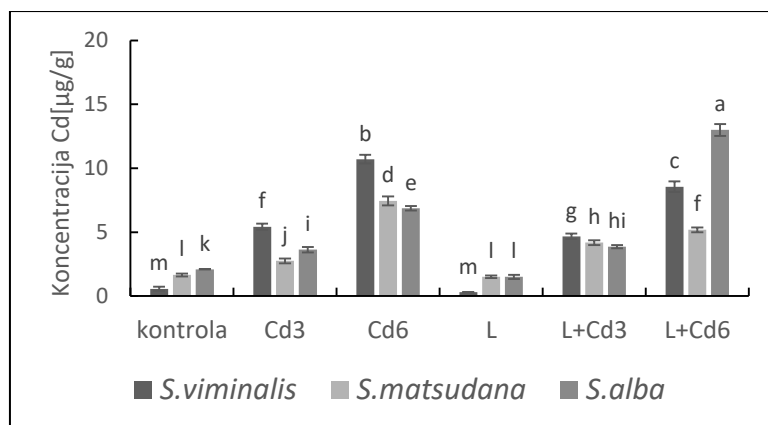
na sadržaj Cd pri tretmanu Cd6 (17.48 µg/g Cd). Pozitivan uticaj aplikacije limunske kiseline na sadržaj Cd u biljnom tkivu je utvrđen i u starim listovima (Slika 26). Ovaj trend je zabeležen kod vrste *S. viminalis* pa je na tretmanu L+Cd6 zabeleženo povećanje za 27% u odnosu na tretman Cd6, dok je u starim listovima *S. alba*, utvrđeno povećanje akumulacije Cd za 52%. Sličan trend registrovan je i u izdancima *S. alba* gde je zabeleženo povećanje od skoro 100% u odnosu na tretman Cd6 (Slika 27), dok je kod ostalih ispitivanih klonova tretman L+Cd6 doveo do signifikantnog smanjenja akumulacije Cd u poređenju sa tretmanom Cd6.



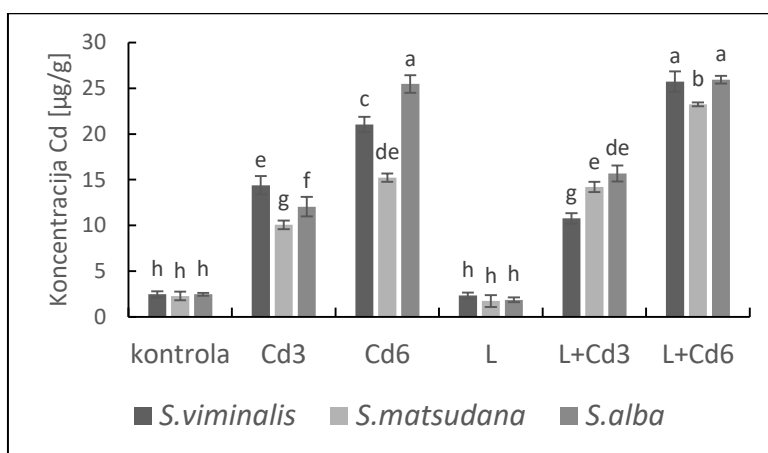
Slika 25. Akumulacija kadmijuma u mladim listovima vrba (*Salix* spp.).



Slika 26. Akumulacija kadmijuma u starim listovima vrba (*Salix* spp.).



Slika 27. Akumulacija kadmijuma u izdanku vrba (*Salix* spp.).



Slika 28. Akumulacija kadmijuma u korenu vrba (*Salix* spp.).

Vrednosti biokoncentracijskih faktora su pokazale da sa povećanjem koncentracije Cd u zemljištu dolazi do povećanja akumulacije ovog metala u korenu, dok je u nadzemnom delu utvrđen suprotan efekat (Tabela 15). Vrednost BKF nadzemnog dela je pokazala trend smanjenja usled primene veće doze kadmijuma (tretman Cd6), u odnosu na tretman nižom dozom kadmijuma (Cd3) (Tabela 15). Izuzetak je vrsta *S. viminalis* gde je registrovano signifikantno povećanje BKF u nadzemnom delu biljaka gajenih na tretmanu Cd6, u poređenju sa tretmanom Cd3. Aplikacija limunske kiseline je indukovala statistički značajno povećanje vrednosti BKF korena pri većoj primenjenoj dozi Cd (tretman L+Cd6) u odnosu na tretman Cd6, što je zabeleženo kod klonova *S. matsudana* i *S. alba*, dok ovaj trend nije utvrđen kod *S. viminalis* (Tabela 15). Suprotno tome, kod svih analiziranih klonova je zabeležen signifikantan pad BKF nadzemnog dela biljke na tretmanu L+Cd6 u odnosu na Cd6 (Tabela 15).

Tabela 15. Uticaj primenjenih tretmana na biokoncentracijske faktore (BKF) korena i nadzemnog dela analiziranih klonova vrba (*Salix* spp.).

klon/tretman	BKF korena			BKF nadzemnih delova		
	<i>S. viminalis</i>	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>	<i>S. viminalis</i>	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>
Cd3	2.95±0.2d	2.04±0.4h	2.34±0.2f	5.52±0.2bc	5.68±0.4ab	3.95±0.7f
Cd6	3.1±0.2c	2.18±0.2g	3.45±0.4b	5.86±0.3a	4.53±0.8e	4.56±0.3e
L+Cd3	2.18±0.1g	2.86±0.2e	2.87±0.1de	5.35±0.1c	5.08±0.3d	3.96±0.5f
L+Cd6	3.08±0.3c	3.06±0.4c	3.63±0.4a	5.54±0.2bc	3.32±0.4g	3.1±0.7h
ANOVA	p vrednost			p vrednost		
tretman (T)	**			**		
klon (K)	**			**		
K x T	**			**		

Vrednosti u tabeli predstavljaju srednje vrednosti±standardna devijacija. Razlike između srednjih vrednosti analiziranih parametara vršene su Fisher-ovim post-hoc testom za nivo značajnosti $p<0.05$ i označene su slovnim oznakama. Vrednosti označene istim slovom u okviru jednog analiziranog parametra se statistički ne razlikuju za postmatrani nivo značajnosti.

*Statistički značajna razlika za $p<0.05$

** Statistički značajna razlika za $p<0.01$

^{ns} Ne postoji statistički značajna razlika

Translokacija Cd iz korena u nadzemne delove biljke (Tf) je pokazala zavisnost od primenjenog tretmana, kao i od odabranog klona (Tabela 16). Statistički značajno povećanje Tf usled primene limunske kiseline je zabeleženo kod *S. viminalis*, što je utvrđeno na oba primenjena tretmana Cd. Kombinovani tretman L+Cd3 je indukovao povećanje Tf za 31%, dok je na tretmanu L+Cd6 utvrđeno povećanje za 18%. Slično tome, signifikantan porast Tf je zabeležen i kod vrste *S. alba*, te je na tretmanu L+Cd6 utvrđeno povećanje Tf za 17% u odnosu na tretman Cd6 (Tabela 16). Suprotno tome, kod *S. matsudana* kombinovani tretmani su indukovali signifikantno smanjenje Tf u odnosu na tretmane nehelatiranim Cd (Tabela 16).

Tabela 16. Uticaj primenjenih tretmana na translokacijski faktor (Tf) analiziranih klonova vrba (*Salix* spp.).

klon/tretman	translokacijski faktor (Tf)		
	<i>S. viminalis</i>	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>
Cd3	186.66±3.21e	212±8.88c	164±4.58g
Cd6	147±2h	233.33±5.13b	114±2j
L+Cd3	245.66±3.05a	203.66±2.51d	163±5.19g
L+Cd6	173.66±5.03f	146.33±3.05h	133.33±1.15i
ANOVA	p vrednost		
tretman (T)	**		
klon (K)	**		
T x K	**		

Vrednosti u tabeli predstavljaju srednje vrednosti±standardna devijacija. Razlike između srednjih vrednosti analiziranih parametara vršene su Fisher-ovim post-hoc testom za nivo značajnosti $p<0.05$ i označene su slovnim oznakama. Vrednosti označene istim slovom u okviru jednog analiziranog parametra se statistički ne razlikuju za postmatrani nivo značajnosti.

*Statistički značajna razlika za $p<0.05$

** Statistički značajna razlika za $p<0.01$

^{ns} Ne postoji statistički značajna razlika

4.3.2. Morfometrijski parametri i indeks tolerancije

Uticaj primenjenih tretmana na rast i produkciju biomase odabranih klonova vrba je prikazan u Tabeli 17. Primenjeni tretmani nisu doveli do značajnih vidljivih promena, tako da na biljkama nisu uočeni simptomi hloroze i nekroze. Usled primene tretmana Cd3 i Cd6 utvrđena je tendencija smanjenja posmatranih morfometrijskih parametara, ali u većini slučajeva (broj listova, masa mladih listova, prečnik izdanka, masa i zapremina korena) zabeležena smanjenja nisu bila signifikantna (Tabela 17). Tretman Cd6 je doveo do signifikantnog smanjenja površine starih listova za 48% kod vrste *S. viminalis*; za 50% kod *S. matsudana*; dok je kod vrste *S. alba* registrovan najveći procenat smanjenja za 65% u odnosu na kontrolu. Pored toga, primena tretmana Cd6 je uticala na površinu mladih listova, te je signifikantno smanjenje ovog parametra zabeleženo kod *S. viminalis* i *S. alba* (31%, odnosno 51% u poređenju sa kontrolom). Takođe, tretmani kadmijumom (Cd3 i Cd6) su pokazali negativan uticaj na visinu i masu izdanka (Tabela 17). Najveći procenat smanjenja je zabeležen kod vrste *S. matsudana* pri tretmanu Cd6 (21% visina izdanka; 58.5% masa izdanka) u poređenju sa kontrolnim biljkama. Primenjeni tretmani Cd3 i Cd6 nisu značajno uticali na masu korena, sa izuzetkom kod *S. alba* gde je utvrđeno signifikantno smanjenje mase korena kod biljaka koje su gajene na tretmanu Cd6, u poređenju sa kontrolom (Tabela 17). Dodatak limunske kiseline u kombinovanim tretmanima L+Cd3 i L+Cd6 je ublažio negativno dejstvo Cd, te kod većine posmatranih morfometrijskih parametara nisu utvrđene značajne razlike u odnosu na pripadajuću kontrolu (Tabela 17). Međutim kod vrste *S. alba* ovo nije bio slučaj, te je kod ove vrste na tretmanu L+Cd6 utvrđeno signifikantno smanjenje većine posmatranih morfometrijskih parametara (Tabela 17). Takođe, tretmani (L+Cd3 i L+Cd6) su doveli do signifikantnog smanjenja mase starih listova kod svih analiziranih klonova u poređenju sa tretmanom L.

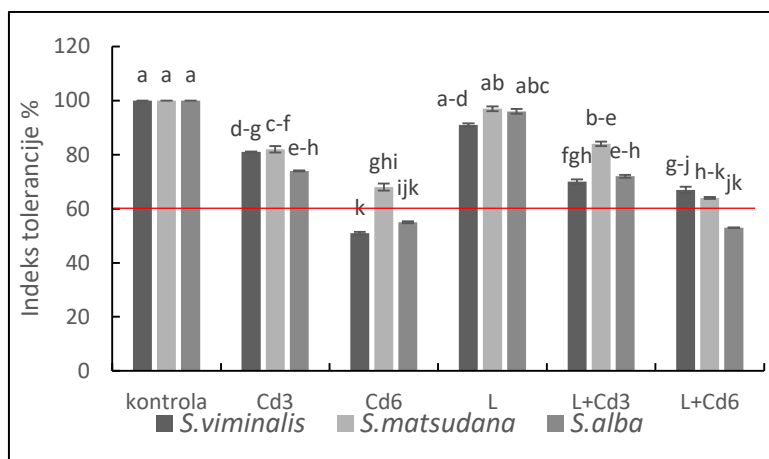
Tabela 17. Uticaj primenjenih tretmana na morfometrijske parametre analiziranih klonova vrba (*Salix* spp.).

	masa mladih listova (g)			masa starih listova (g)		
	<i>S. viminalis</i>	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>	<i>S. viminalis</i>	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>
kontrola	1.6±0.3a	0.9±0.2c-g	1.4±0.1ab	2.5±0.4c-f	3.3±0.3abc	2.7±0.8b-f
Cd3	1.4±0.1ab	1.0±0.2c-f	1.2±0.2bcd	2.6±0.3b-f	3.1±0.6a-d	1.9±0.6efg
Cd6	1.3±0.1ab	0.8±0.12e-h	1.2±0.3bcd	2.1±0.2efg	2.3±0.1def	1.8±0.4fg
L	1.4±0.2ab	0.9±0.1d-h	1.4±0.3ab	3.5±0.7ab	3.9±1.6a	3.5±0.1ab
L+Cd3	1.4±0.1ab	0.7±0.1fgh	1.0±0.1cde	2.5±0.2c-f	2.8±0.8b-e	1.8±0.3efg
L+Cd6	1.15±0.1b	0.7±0.14gh	0.6±0.1h	2.1±0.8efg	2.1±0.7efg	1.3±0.4g
	površina mladih listova (cm ²)			površina starih listova (cm ²)		
kontrola	137.2±33.4a	76.7±13.1c-g	95.6±5.8bcd	283.9±1.2a	300.1±29.9a	283.4±9.4a
Cd3	109.4±17.8b	77.1±12.5c-f	88.2±8.1b-e	195.8±24.1bc	194.2±28.8bc	143.8±23.4cd
Cd6	95.0±5.2bcd	66.4±11.3efg	41.5±4.3h	149.8±25.2cd	148.8±22.4cd	99.8±15.4d
L	96.2±16bcd	72.6±6.0d-g	86.6±19.6b-f	195.8±6.1bc	275.4±29.5a	206.2±28.8bc
L+Cd3	97.3±2.8bc	56.6±16.7gh	70.3±6.2efg	194.7±26.1cd	259.6±26.8ab	158.1±26.1cd
L+Cd6	74.8±1.9c-f	63.7±14.4fgh	72.9±12.9d-g	149.1±7.8cd	194.7±23.7bc	139.9±19.1cd
	masa izdanka (g)			masa korena (g)		
kontrola	3.2±0.2b	4.1±0.6a	3.2±0.3b	5.8±0.3ab	3.8±0.5bcd	4.8±1.6ab
Cd3	2.2±0.1cde	1.8±0.1ef	2.1±0.1def	4.4±0.8abc	3.6±0.6bcd	4±1.2a-d
Cd6	1.9±0.1def	1.7±0.1ef	1.3±0.1f	4.3±0.3abc	3.5±1.8bcd	2.3±0.1d
L	2.9±0.1bc	2.9±0.2bc	2.6±0.1bcd	4.1±1.6a-d	4.1±0.5a-d	4.4±1.1abc
L+Cd3	2.6±0.3bcd	2.6±0.2bcd	2.1±0.2def	2.7±0.3cd	3.8±1.3bcd	3.6±1.2bcd
L+Cd6	2.3±0.1cde	2.5±0.1b-e	1.8±0.3ef	3.4±0.6bcd	2.6±1.1cd	3±0.6bcd
	visina izdanka (cm)			prečnik izdanka (cm ²)		
kontrola	45.5±2.5cde	69±13.7a	43±6.5de	3.9±0.5abc	3.7±0.2bcd	4.0±0.4abc
Cd3	39.2±1.6ef	62.3±6.6f	39.3±7.1ef	4.2±0.3ab	3.5±0.1cde	3.6±0.3b-e
Cd6	38.7±1.5ef	54.3±4.0bc	40.4±2.9ef	3.6±0.4bcd	2.9±0.2f	3.6±0.2cde
L	42.3±5.2def	60.5±7.5ab	50.8±2.5cd	3.7±0.2bcd	3.9±0.2abc	4.3±0.4a
L+Cd3	40±0.5ef	50±3cd	40±3ef	3.7±0.2bcd	3.3±0.3def	3.8±0.4a-d
L+Cd6	33.5±1.7f	46.3±5.1cde	33.2±5.1f	3.6±0.4bcd	3.3±0.2def	3.1±0.3ef
	broj listova			zapremina korena (cm ³)		
kontrola	18±2.8ef	27±2.6ab	19±2.1ef	5.3±0.6ab	3.5±0.5bcd	5±1.3abc
Cd3	17±0.5ef	26±4.6b	18±2ef	5.7±0.6a	4±0.5a-d	4.3±1.1a-d
Cd6	18±1.5ef	25±2.8bc	15±2.8f	4.7±0.3abc	4±1.7a-d	2.7±0.2d
L	20±2.1def	31±4.7a	21±1cde	4.3±1.1a-d	4.7±1.5abc	4.6±1.3abc
L+Cd3	20±2def	28±2.3ab	17±3.8ef	3.3±0.6cd	3.8±0.9a-d	3.9±1.2a-d
L+Cd6	17±2ef	24±1.1bcd	16±1.7f	3.7±0.6bcd	2.5±0.5d	3.8±1.1a-d

Vrednosti u tabeli predstavljaju srednje vrednosti±standardna devijacija. Razlike između srednjih vrednosti analiziranih parametara vršene su Fisher-ovim post-hoc testom za nivo značajnosti p<0.05 i označene su slovnim oznakama. Vrednosti označene istim slovom u okviru jednog analiziranog parametra se statistički ne razlikuju za postmatrani nivo značajnosti, dok vrednosti koje su označene boldovanim slovima ukazuju na signifikantne razlike u odnosu na pripadajuću kontrolu (kontrola, odnosno tretman L).

Analiza indeksa tolerancije biljaka na prisustvo Cd u biljnom tkivu je pokazala signifikantne razlike u zavisnosti od analiziranog klona i primenjenog tretmana (Slika 29). Povećanje sadržaja Cd u zemljištu (tretmani Cd3 i Cd6) je uticalo na smanjenje indeksa tolerancije kod svih analiziranih klonova (Slika 29). Na tretmanu Cd6 kod vrste *S. viminalis* je utvrđeno smanjenje tolerantnosti biljaka za 48%, kod *S. alba* za 45%, dok se vrsta *S. matsudana* pokazala kao najtolerantnija na prisustvo kadmijuma, te se indeks tolerancije ove vrste smanjio za 32% u odnosu na kontrolne biljke. Dodatak limunske kiseline je ublažio toksične efekte kadmijuma, te je utvrđeno statistički značajno povećanje indeksa tolerantnosti kod vrste *S. viminalis* na tretmanu L+Cd6 u odnosu na tretman Cd6 (22%), dok kod ostalih analiziranih

vrsta nisu utvrđene signifikantne razlike između kombinovanih i tretmana nehelatiranim Cd (Slika 29). Među analiziranim vrstama, najmanji indeks tolerancije je utvrđen kod vrste *S. alba* na tretmanu Cd6 i L+Cd6, gde su zabeležene vrednosti bile manje od 60, čime se ova vrsta definiše kao umereno tolerantna na prisustvo Cd.



Slika 29. Uticaj primenjenih tretmana na indeks tolerancije (Ti) u analiziranim klonovima vrba (*Salix* spp.). (vrednost 60 predstavlja kritičan nivo za definisanje stepena tolerancije na prisustvo Cd u biljnom tkivu).

4.3.3. Mineralna ishrana

Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj neophodnih makroelemenata azota, fosfora i kalijuma u različitim organima analiziranih klonova vrba je prikazan u Tabelama 18-20. Tretmani kadmijumom su usloveli smanjenje sadržaja makronutrijenata u najvećoj meri u mladim i starim listovima, zatim u korenu, dok je najmanji uticaj Cd registrovan u izdancima. Međutim, tretman Cd3 je indukovao povećanje sadržaja azota u mladim listovima *S. viminalis* i *S. alba* za oko 5% u odnosu na kontrolu (Tabela 18). Što se tiče sadržaja fosfora, najveći procenat smanjenja ovog elementa je zabeležen u starim listovima na tretmanu Cd6 i kretao se u rasponu od 26% kod *S. matsudana*, 42% kod *S. alba*, dok je najveći procenat smanjenja od 45% utvrđen u starim listovima *S. viminalis* (Tabela 19). Sadržaj kalijuma u biljnom tkivu je pokazao variranja u zavisnosti od analiziranog klona, organa i primenjenog tretmana (Tabela 20). Tretman Cd6 je indukovao značajno smanjenje sadržaja kalijuma u nadzemnim organima *S. matsudana*, starim listovima i izdanku kod *S. alba*, dok je kod *S. viminalis* pad sadržaja kalijuma utvrđen u korenu (Tabela 20). Tendencija povećanja sadržaja azota utvrđena je na kombinovanim tretmanima L+Cd3 i L+Cd6 u poređenju sa istim tretmanom nehelatiranim Cd (Tabela 18). Suprotno tome, primena kombinovanih tretmana nije dovela do signifikantnih promena sadržaja fosfora u poređenju sa istim tretmanom nehelatiranim Cd. Izuzetak su mladi

listovi *S.mtasudana* gde je utvrđen signifikantan porast sadržaja fosfora na tretmanu L+Cd6 u odnosu na tretman Cd6 (Tabela 19). Ovakav trend je najmanje bio izražen u pogledu sadržaja kalijuma, te je na tretmanu L+Cd6 u mladim listovima svih analiziranih klonova, u izdanku vrste *S. matsudana*, kao i u korenu *S. alba* utvrđeno statistički značajno manje kalijuma, u poređenju sa sadržajem ovog makronutrijenta u biljkama gajenim na tretmanu Cd6 (Tabela 20).

Tabela 18. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj azota (N) u različitim biljnim organima analiziranih klonova vrba (*Salix* spp.).

	mladi listovi (N%)			stari listovi (N%)		
	<i>S. viminalis</i>	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>	<i>S. viminalis</i>	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>
Kontrola	3.81±0.05ef	4.81±0.09a	4.57±0.01b	3.83±0.04b	3.70±0.02c	4.0±0.05a
Cd3	4.02±0.02d	4.50±0.05bc	4.78±0.09a	3.59±0.12def	3.56±0.02efg	3.94±0.2a
Cd6	3.76±0.05f	4.02±0.04d	4.44±0.02c	3.53±0.04f-h	3.63±0.02cde	3.57±0.1d-g
L	4.06±0.02d	4.76±0.06a	4.69±0.04a	3.62±0.04c-f	3.70±0.02c	3.48±0.02ghi
L+Cd3	3.89±0.04e	4.52±0.08bc	4.53±0.03bc	3.67±0.05cd	3.55±0.03efg	3.43±0.04hi
L+Cd6	3.81±0.04ef	4.52±0.02bc	4.48±0.12bc	3.30±0.04j	3.52±0.08f-i	3.42±0.06i
	izdanak (N%)			koren (N%)		
Kontrola	1.46±0.02de	1.36±0.05fg	1.50±0.05d	2.72±0.01a	1.14±0.02e	1.81±0.13c
Cd3	1.4±0.03ef	1.11±0.02j	1.3±0.03ghi	2.7±0.1a	1.10±0.03e	1.70±0.05c
Cd6	1.25±0.05hi	1.09±0.03j	1.22±0.06i	1.73±0.03c	1.11±0.01e	1.4±0.2d
L	1.78±0.05b	1.62±0.05c	1.21±0.03i	2.74±0.02a	1.74±0.05c	1.47±0.03d
L+Cd3	1.31±0.03ghi	1.93±0.03a	0.92±0.06k	2.09±0.02b	2.02±0.05b	1.37±0.1d
L+Cd6	1.36±0.01fg	1.79±0.01b	1.05±0.01j	1.67±0.07c	2.16±0.01b	1.13±0.07e

Vrednosti u tabeli predstavljaju srednje vrednosti±standardna devijacija. Razlike između srednjih vrednosti analiziranih parametara vršene se Fisher-ovim post-hoc testom za nivo značajnosti $p<0.05$ i označene su slovom oznakama. Vrednosti označene istim slovom u okviru jednog analiziranog parametra se statistički ne razlikuju za postmatrani nivo značajnosti, dok vrednosti koje su označene boldovanim slovima ukazuju na signifikantne razlike u odnosu na pripadajuću kontrolu (kontrola, odnosno tretman L).

Tabela 19. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj fosfora (P) u različitim biljnim organima analiziranih klonova vrba (*Salix* spp.).

	mladi listovi (P%)			stari listovi (P%)		
	<i>S. viminalis</i>	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>	<i>S. viminalis</i>	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>
Kontrola	0.95±0.02a	0.23±0.03j	0.93±0.01abc	0.20±0.02b	0.19±0.01bc	0.19±0.03bc
Cd3	0.74±0.07fg	0.16±0.02jk	0.84±0.05de	0.14±0.01f-h	0.16±0.01ef	0.14±0.1fgh
Cd6	0.63±0.03hi	0.15±0.02k	0.88±0.02a-d	0.11±0.01i	0.14±0.01fgh	0.11±0.01i
L	0.92±0.01abc	0.95±0.02a	0.94±0.02ab	0.24±0.01a	0.14±0.01fgh	0.18±0.01bc
L+Cd3	0.77±0.02ef	0.8±0.04a-d	0.87±0.01bcd	0.17±0.01cd	0.14±0.01fgh	0.15±0.01ef
L+Cd6	0.55±0.02i	0.68±0.07gh	0.86±0.01cd	0.13±0.01f-i	0.12±0.01ghi	0.14±0.1fgh
	izdanak (P%)			koren (P%)		
Kontrola	0.12±0a	0.07±0bc	0.09±0ab	0.09±0bc	0.09±0bc	0.12±0a
Cd3	0.09±0ab	0.10±0ab	0.09±0ab	0.09±0bc	0.07±0de	0.09±0bc
Cd6	0.09±0a	0.09±0ab	0.09±0ab	0.08±0cd	0.07±0de	0.08±0cd
L	0.09±0ab	0.09±0ab	0.12±0a	0.12±0a	0.09±0bc	0.11±0a
L+Cd3	0.08±0abc	0.09±0ab	0.11±0ab	0.09±0bc	0.09±0bc	0.09±0bc
L+Cd6	0.11±0ab	0.04±0c	0.12±0a	0.09±0bc	0.07±0de	0.09±0bc

Vrednosti u tabeli predstavljaju srednje vrednosti±standardna devijacija. Razlike između srednjih vrednosti analiziranih parametara vršene su Fisher-ovim post-hoc testom za nivo značajnosti $p<0.05$ i označene su slovnim oznakama. Vrednosti označene istim slovom u okviru jednog analiziranog parametra se statistički ne razlikuju za postmatrani nivo značajnosti, dok vrednosti koje su označene boldovanim slovima ukazuju na signifikantne razlike u odnosu na pripadajuću kontrolu (kontrola, odnosno tretman L).

Tabela 20. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj kalijuma (K) u različitim biljnim organima analiziranih klonova vrba (*Salix* spp.).

	mladi listovi (K%)			stari listovi (K%)		
	<i>S. viminalis</i>	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>	<i>S. viminalis</i>	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>
Kontrola	1.08±0.03ef	2.49±0.12a	1.11±0.09ef	1.18±0.05g-j	4.08±0.06a	1.71±0.18f
Cd3	1.05±0.03fg	1.56±0.06b	1.12±0.01ef	1.05±0.03hij	3.73±0.16bc	1.15±0.03g-j
Cd6	1.10±0.06ef	1.27±0.04cd	1.15±0.01ef	1.05±0.03ij	2.53±0.16e	1.30±0.04g
L	1.17±0.03de	1.28±0.04cd	1.61±0.01b	1.23±0.02gh	3.91±0.04ab	1.22±0.05g-j
L+Cd3	0.94±0.03gh	1.36±0.09c	1.19±0.03de	1.06±0.03hij	3.70±0.1c	1.18±0.04g-j
L+Cd6	0.90±0.05h	1.12±0.07ef	0.94±0.03gh	1.02±0.02j	3.47±0.13d	1.08±0.03gij
	izdanak (K%)			koren (K%)		
Kontrola	0.5±0.02def	0.65±0.04a	0.43±0.02fgh	0.34±0.02def	0.32±0.02e-i	0.37±0.02cd
Cd3	0.5±0.05def	0.59±0.01abc	0.36±0.03hi	0.29±0.1g-k	0.31±0.01f-j	0.34±0.01def
Cd6	0.48±0.01ef	0.56±0.03b-d	0.35±0.02i	0.28±0.2h-k	0.26±0.01j	0.3±0.01cde
L	0.52±0.05cde	0.55±0.03b-e	0.44±0.02fg	0.35±0.02def	0.6±0.03a	0.35±0.01def
L+Cd3	0.53±0.03b-e	0.60±0.06ab	0.44±0.03fg	0.32±0.01e-h	0.51±0.01b	0.34±0.01def
L+Cd6	0.58±0.05bc	0.48±0.02ef	0.38±0.02ghi	0.26±0.01jk	0.40±0.04c	0.27±0.01ijk

Vrednosti u tabeli predstavljaju srednje vrednosti±standardna devijacija. Razlike između srednjih vrednosti analiziranih parametara vršene su Fisher-ovim post-hoc testom za nivo značajnosti $p<0.05$ i označene su slovnim oznakama. Vrednosti označene istim slovom u okviru jednog analiziranog parametra se statistički ne razlikuju za postmatrani nivo značajnosti, dok vrednosti koje su označene boldovanim slovima ukazuju na signifikantne razlike u odnosu na pripadajuću kontrolu (kontrola, odnosno tretman L).

4.3.4. Sadržaj fotosintetičkih pigmenata

Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj pigmenata hloroplasta (hlorofil *a*, *b*, *a+b* i karotenoida) u mladim i starim listovima odabranih klonova vrba (*Salix* spp.) je prikazan u Tabeli 21. Tretman nižom dozom kadmijuma (Cd3) imao je blago stimulatívno dejstvo na sadržaj hlorofila *a* kod *S. viminalis* i *S. alba*, pa su na ovom tretmanu zabeležena povećanja od 21%, odnosno 17% u poređenju sa kontrolnim biljkama. Nasuprot tome, tretman Cd6 je doveo do pada sadržaja hlorofila *a* i *b*, ukupnih hlorofila i karotenoida, međutim, smanjenja uglavnom nisu bila statistički značajna (Tabela 21). Statistički signifikantno smanjenje hlorofila *a* na tretmanu Cd6 je utvrđeno kod *S. matsudana* (37% u mladim i 33% u starim listovima). Isti tretman je doveo i do značajnog pada sadržaja hlorofila *b* kod *S. viminalis* (60% u mladim i 40% u starim listovima) u odnosu na kontrolu. Najmanji uticaj primenjenih tretmana je registrovan kod *S. alba*, gde nisu utvrđene statistički značajne promene sadržaja fotosintetičkih pigmenata (Tabela 21). Među analiziranim klonovima, najveća koncentracija hlorofila *a* je zabeležena u mladim listovima *S. viminalis* (5.5 mg/g sveže mase), što je registrovano na tretmanu L. Aplikacija limunske kiseline je pokazala stimulatívni efekat i kod ostalih analiziranih klonova, pa je na tretmanu L zabeleženo povećanje sadržaja hlorofila *a*, *b*, kao i ukupnih hlorofila u odnosu na kontrolu, bez obzira na starost listova (Tabela 21). Dodatak limunske kiseline je uticao na sadržaj fotosintetičkih pigmenata i u uslovima prisustva Cd, pa je zabeležen porast sadržaja hlorofila *a* i *b* na kombinovanim tretmanima L+Cd3 i L+Cd6, u

odnosu na odgovarajući tretman bez limunske kiseline. Ovaj trend je u većoj meri bio izražen kod mladih listova, pri čemu je kod vrste *S. viminalis* zabeleženo povećanje sadržaja hlorofila *a* od 2.2 puta na tretmanu L+Cd6 u odnosu na tretman Cd6, dok je sadržaj hlorofila *b* bio 1.83 puta veći (Tabela 21).

Tabela 21. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj pigmenata hloroplasta (hlorofil *a*, *b*, *a+b* i karotenoida) u mladim i starim listovima analiziranih klonova vrba (*Salix* spp.).

tretman/klon	mladi listovi			stari listovi		
	hlorofil <i>a</i> (mg/g sveže mase)			hlorofil <i>a</i> (mg/g sveže mase)		
	<i>S. viminalis</i>	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>	<i>S. viminalis</i>	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>
Kontrola	2.3±0.1def	3.8±0.1bc	2.4±0.1def	3.1±0.1b-e	3.5±0.2bcd	2.5±0.3c-f
Cd3	2.8±0.2c-f	3.1±0.2b-e	2.8±0.3b-f	2.4±0.2ef	3.2±0.3b-e	2.3±0.2ef
Cd6	1.7±0.1f	2.4±0.1def	1.8±0.4ef	2.3±0.1ef	2.4±0.3ef	2.4±0.8def
L	5.5±0.2a	4.1±0.6b	2.6±0.2c-f	4.8±0.5a	3.8±0.1ab	3.0±0.1b-e
L+Cd3	4.1±0.4b	3.2±0.4bcd	2.7±0.1c-f	2.6±0.3c-f	3.4±0.1b-e	2.4±0.2def
L+Cd6	3.8±0.1bc	2.9±0.4b-f	2.2±0.2def	3.6±0.1bc	2.3±0.1ef	1.5±0.1f
	hlorofil <i>b</i> (mg/g sveže mase)			hlorofil <i>b</i> (mg/g sveže mase)		
Kontrola	1.5±0.0ab	1.3±0.2bcd	0.9±0.1c-f	1.2±0.1bcd	1.1±0.1b--e	0.8±0.1cde
Cd3	1.3±0.1bcd	1.0±0.1c-f	0.9±0.1c-f	0.4±0.1f	1.1±0.2b-e	0.7±0.1ef
Cd6	0.6±0.1f	0.9±0.1c-f	0.9±0.2c-f	0.7±0.1ef	1.1±0.2b-e	0.9±0.3b-e
L	1.8±0.3a	1.4±0.2bcd	0.9±0.1c-f	1.6±0.2a	1.3±0.1ab	1.2±0.1bc
L+Cd3	1.3±0.1abc	1.2±0.3b-e	0.9±0.2c-f	1.3±0.2ab	1.1±0.1b-e	1.0±0.1b-e
L+Cd6	1.1±0.1b-e	1.1±0.1b-e	0.8±0.2ef	1.3±0.2ab	0.9±0.1b-e	0.8±0.1cde
	hlorofil <i>a+b</i> (mg/g sveže mase)			hlorofil <i>a+b</i> (mg/g sveže mase)		
Kontrola	3.8±0.2b-f	5.1±0.3bc	3.3±0.1def	4.5±0.1bc	4.5±0.2bc	3.4±0.5c-f
Cd3	4.1±0.1b-e	4.3±0.7b-e	3.8±0.2b-f	2.8±0.2ef	4.3±0.4bcd	2.9±0.2def
Cd6	2.4±0.1f	3.5±0.3c-f	2.6±0.2ef	3.8±0.1b-e	3.5±0.5c-f	3.4±1.1c-f
L	7.3±0.2a	5.4±0.8def	3.5±0.2c-f	6.4±0.1a	5.1±0.1ab	4.2±0.3bcd
L+Cd3	5.5±0.5b	4.2±0.5b-e	3.6±0.3c-f	3.8±0.6b-e	4.4±0.1bc	3.4±0.3c-f
L+Cd6	4.9±0.1bcd	3.8±0.5b-f	3.2±0.2ef	4.9±0.3b	3.3±0.1c-f	2.3±0.1f
	karotenoidi (mg/g sveže mase)			karotenoidi (mg/g sveže mase)		
Kontrola	1.3±0.1abc	1.2±0.1a-d	0.7±0.1efg	1.0±0.1bcd	1.1±0.2bcd	0.8±0.3cde
Cd3	1.4±0.2ab	1.0±0.1b-f	0.8±0.1d-g	1.3±0.2ab	1.0±0.3b-e	0.7±0.2de
Cd6	0.9±0.1c-f	0.9±0.2c-g	0.5±0.1g	1.1±0.1bcd	1.1±0.3bcd	0.8±0.1cde
L	1.5±0.1a	1.2±0.1a-d	0.8±0.1d-g	1.2±0.5abc	1.1±0.1bcd	0.9±0.1b-e
L+Cd3	1.2±0.1a-d	1.0±0.1b-f	0.8±0.1d-g	1.5±0.3a	1.0±0.1bcd	0.7±0.2de
L+Cd6	1.1±0.1a-e	0.8±0.1d-g	0.72±0.02fg	1.1±0.1bcd	0.8±0.1cde	0.6±0.1e

Vrednosti u tabeli predstavljaju srednje vrednosti±standardna devijacija. Razlike između srednjih vrednosti analiziranih parametara vršene su Fisher-ovim post-hoc testom za nivo značajnosti $p<0.05$ i označene su slovnim oznakama. Vrednosti označene istim slovom u okviru jednog analiziranog parametra se statistički ne razlikuju za postmatrani nivo značajnosti, dok vrednosti koje su označene boldovanim slovima ukazuju na signifikantne razlike u odnosu na pripadajuću kontrolu (kontrola, odnosno tretman L).

4.3.5. Parametri razmene gasova

Intenzitet fotosinteze je pokazao opadajući trend sa povećanjem koncentracije Cd u biljnom tkivu (Tabela 22). Tretman većom dozom kadmijuma (Cd6) je indukovao smanjenje intenziteta fotosinteze za 63% kod *S. viminalis*, 35.4% kod *S. matsudana* i 32.9% kod vrste *S. alba*. Dodatak limunske kiseline je imao stimulatívni uticaj na intenzitet fotosinteze, te je kod

S. viminalis i *S. matsudana* gajenih na tretmanu limunskom kiselinom utvrđeno povećanje ovog parametra, u odnosu na kontrolne biljke (Tabela 22). Slično tome, aplikacija limunske kiseline uz manju dozu kadmijuma (tretman L+Cd3) je uticala na povećanje intenziteta fotosinteze kod *S. viminalis* i *S. matsudana* za oko 30%, u odnosu na tretman Cd3, dok ovaj trend nije zabeležen kod *S. alba*. Na tretmanu L+Cd6 isti obrazac je utvrđen jedino kod *S. viminalis*, gde je utvrđeno povećanje za 23% u odnosu na tretman Cd6. Intenzitet transpiracije je pokazao opadajući trend sa povećanjem koncentracije Cd kod svih analiziranih klonova (Tabela 22). Primena kombinovanog tretmana limunske kiseline i veće doze kadmijuma (L+Cd6) je indukovala statistički značajno povećanje intenziteta transpiracije u odnosu na tretman Cd6 što je utvrđeno kod *S. viminalis*, dok je kod *S. alba* zabeležen suprotan obrazac, odnosno na tretmanu L+Cd6 je zabeležen signifikantan pad intenziteta transpiracije (32.25%) u odnosu na tretman Cd6 (Tabela 22). Kada je u pitanju efikasnost korišćenja vode (WUE) utvrđeno je da su vrednosti ovog parametra bile statistički značajno veće na kombinovanim tretmanima u poređenju sa odgovarajućim tretmanom bez limunske kiseline (Tabela 22). Najveći procenat povećanja (46%) je zabeležen na tretmanu L+Cd3 kod vrste *S. matsudana*. Oba tretmana Cd su uslovia statistički značajno smanjenje stomatalne provodljivosti (gs) kod svih analiziranih klonova u odnosu na kontrolne biljke (Tabela 22). Primena kombinovanog tretmana limunske kiseline i veće koncentracije Cd (tretman L+Cd6) značajno je povećala stomatalnu provodljivost kod *S. viminalis* i *S. matsudana*, pa je vrednost gs parametra bila duplo veća na ovom tretmanu u poređenju sa tretmanom Cd. Intercelularna koncentracija CO₂ je pokazala varijabilnost u zavisnosti od analiziranog klona i primenjenog tretmana (Tabela 22). Pod uticajem tretmana Cd3 i Cd6 kod biljaka *S. viminalis* je utvrđeno statistički značajno povećanje ci parametra, dok je kod ostalih klonova utvrđen pad ci vrednosti. Primena kombinovanih tretmana je indukovala porast intercelularne koncentracije CO₂ u poređenju sa odgovarajućim tretmanom nehelatiranim Cd (Tabela 22). Ovakav obrazac nije utvrđen na tretmanu L+Cd6 kod *S. viminalis*, što je korelisano sa povećanjem intenziteta fotosinteze na ovom tretmanu u poređenju sa vrednostima dobijenim na tretmanu Cd6.

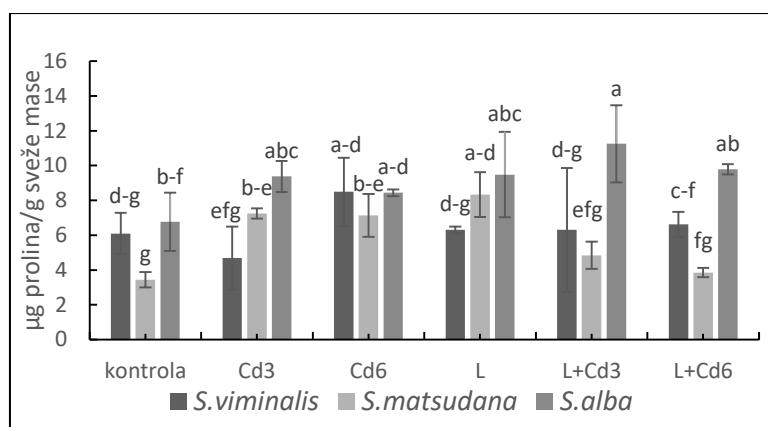
Tabela 22. Uticaj primenjenih tretmana na parametre razmene gasova u analiziranim klonovima vrba (*Salix* spp.).

	intenzitet fotosinteze (A) ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)			intenzitet transpiracije (E) ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)		
	<i>S. viminalis</i>	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>	<i>S. viminalis</i>	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>
Kontrola	18.5±0.7bc	16.4±1.2d	14.8±0.7e	1.5±0.1c	1.2±0.1de	1.8±0.1a
Cd3	8.7±0.6hi	13.9±0.5e	13.7±0.7e	1.2±0.2de	1.3±0.1d	1.8±0.1a
Cd6	8.2±0.6i	10.6±0.5fg	10.5±0.2fg	1.1±0.2fg	1.0±0.1hi	1.6±0.2b
L	19.3±1.2ab	20.6±2.1a	13.8±0.4e	1.5±0.1c	1.2±0.1de	1.4±0.1c
L+Cd3	11.3±0.9fg	17.8±1.3cd	11.8±0.3f	1.2±0.1de	1.1±0.2fg	1.2±0.1de
L+Cd6	10.1±0.4gh	9.9±0.7gh	10.6±0.5fg	1.2±0.1de	0.98±0.01i	1.1±0.1fg
efikasnost korišćenja vode (WUE) ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)/ ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)			stomatalna provodljivost (gs) ($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)			
kontrola	12.6±0.9b	13.7±2.6b	7.8±0.5f	0.7±0.1b	0.4±0.1cd	0.7±0.1b
Cd3	7.42±0.46fg	10.9±0.4c	7.4±0.3fg	0.5±0.1c	0.2±0.1ef	0.3±0.1def
Cd6	7.3±0.6fg	10.2±0.3cd	6.3±0.2g	0.2±0.1ef	0.2±0.1ef	0.2±0.1ef
L	12.7±0.7b	17.2±1.7a	9.5±0.5cde	0.5±0.1cd	1.3±0.3a	0.7±0.1b
L+Cd3	9.4±0.7de	15.9±0.9a	9.8±0.3cde	0.3±0.1def	0.4±0.1cd	0.4±0.1cd
L+Cd6	8.6±0.3e	10.1±0.6cd	9.8±0.4cde	0.4±0.1cd	0.4±0.2cd	0.3±0.1def
intercelularna koncentracija CO ₂ (ci) ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)						
kontrola	272.3±4.9ij	306.3±9.5ef	303±1.5ef			
Cd3	318.6±7.0cd	236.3±6jk	280±4.7hi			
Cd6	327.3±5.6bc	257.3±5.2k	297±0.6fg			
L	346.6±11.1a	277.4±10.0hi	273.6±4.0ij			
L+Cd3	334±9.71b	287.2±12.gh	334.3±5.8b			
L+Cd6	276.6±4.0hi	263±12.7jk	312±2.1de			

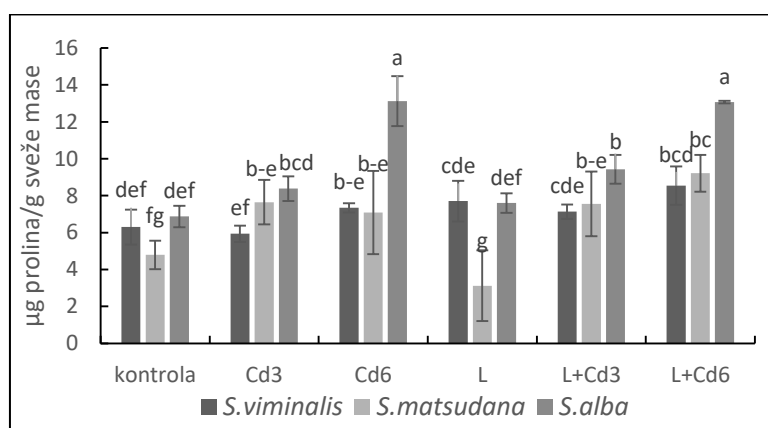
Vrednosti u tabeli predstavljaju srednje vrednosti±standardna devijacija. Razlike između srednjih vrednosti analiziranih parametara vršene su Fisher-ovim post-hoc testom za nivo značajnosti $p<0.05$ i označene su slovnim oznakama. Vrednosti označene istim slovom u okviru jednog analiziranog parametra se statistički ne razlikuju za postmatrani nivo značajnosti, dok vrednosti koje su označene boldovanim slovima ukazuju na signifikantne razlike u odnosu na pripadajuću kontrolu (kontrola, odnosno tretman L).

4.3.6. Sadržaj prolina

Sadržaj slobodnog prolina je varirao u zavisnosti od primenjenog tretmana (doze Cd i prisustva limunske kiseline), odabranog klona i starosti listova (Slike 30 i 31). Među analiziranim klonovima, najveći sadržaj prolina je zabeležen kod vrste *S. alba*. Primljeni tretmani su uticali na blagi porast sadržaja ove aminokiseline, međutim u mladim listovima ova povećanja nisu bila signifikantna u poređenju sa vrednostima dobijenim u kontrolnim biljkama. Nasuprot tome, tretmani Cd6 i L+Cd6 su indukovali signifikantno povećanje koncentracije prolina za čak 50% u odnosu na kontrolu, što je utvrđeno u starim listovima *S. alba*. Aplikacija limunske kiseline nije značajno uticala na akumulaciju prolina u odnosu na isti tretman bez ovog helatora. Izuzetak su mladi listovi *S. matsudana* gde je utvrđeno signifikantno smanjenje akumulacije prolina na tretmanu L+Cd6, u odnosu na Cd6 (Slika 30).



Slika 30. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj prolina u mladim listovima analiziranih klonova vrba (*Salix* spp.).

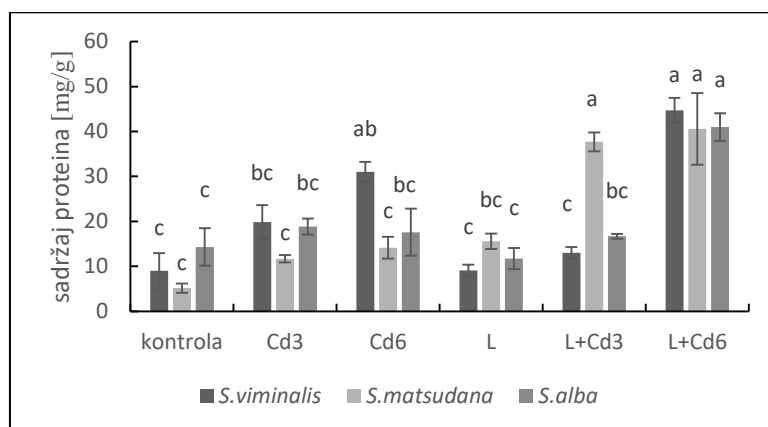


Slika 31. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj prolina u starim listovima analiziranih klonova vrba (*Salix* spp.).

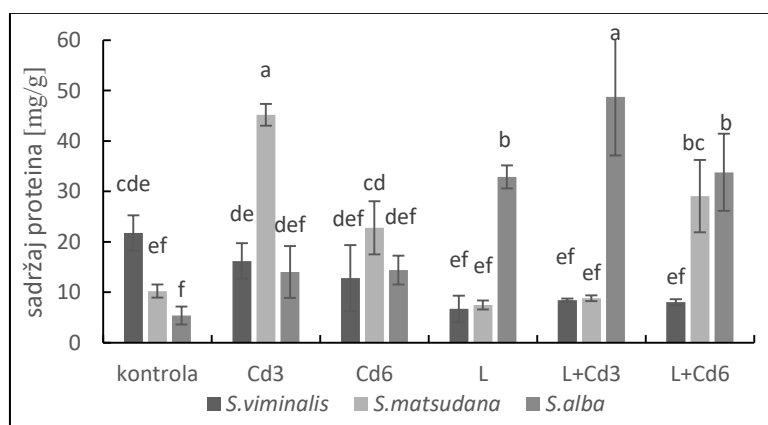
4.3.7. Sadržaj ukupnih rastvorljivih proteina

Sadržaj ukupnih rastvorljivih proteina je pokazao značajne fluktuacije u zavisnosti od vrste, primenjenog tretmana, kao i od starosti listova (Slike 32 i 33). U mladim listovima vrba je utvrđeno povećanje sadržaja proteina sa povećanjem doze Cd (Slika 32), dok ovaj trend nije zabeležen u starim listovima (Slika 33). Međutim, utvrđene vrednosti u mladim listovima nisu bile statistički značajno veće u odnosu na kontrolu, izuzev na tretmanu Cd6 kod vrste *S. viminalis* (Slika 32). U starim listovima signifikantno povećanje sadržaja proteina je zabeleženo na tretmanu Cd3 kod *S. matsudana* (Slika 33). Dodatak limunske kiseline pri tretmanu L+Cd6 je pokazao pozitivan efekat na sadržaj proteina što se manifestovalo signifikantnim povećanjem njihove koncentracije u mladim listovima *S. matsudana* i *S. alba*. U starim listovima, najveći sadržaj proteina je registrovan pri tretmanu L+Cd3 kod vrste *S. alba* (48.71 mg/g sveže mase). Takođe, kod ove vrste je zabeležen najveći porast sadržaja

ukupnih rastvorljivih proteina na tretmanima sa limunskom kiselinom u odnosu na iste tretmane bez ovog helatora (Slika 33). Nasuprot tome, u starim listovima *S. viminalis* nije zabeležena statistički značajna razlika u sadržaju proteina usled primene kombinovanih tretmana.



Slika 32. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj ukupnih rastvorljivih proteina u mladim listovima analiziranih klonova vrba (*Salix* spp.).



Slika 33. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj ukupnih rastvorljivih proteina u starim listovima analiziranih klonova vrba (*Salix* spp.).

4.3.8. Antioksidativni sistem zaštite

Uticaj povišenih koncentracija kadmijuma, kao i prisustva limunske kiseline na aktivnost različitih antioksidativnih enzima u mladim i starim listovima ispitivanih klonova vrba je prikazan u Tabeli 23. Statistički značajno povećanje aktivnosti askorbat-peroksidaze je zabeleženo u mladim i starim listovima *S. viminalis* i *S. alba* na tretmanu Cd6 u odnosu na kontrolne biljke. Najveća aktivnost enzima APX je zabeležena u starim listovima *S. alba* (4.09 U/mg proteina), što je registrovano na tretmanu Cd6, a zabeležena vrednost je bila čak 7.4 puta veća u odnosu na kontrolu (Tabela 23). Primena kombinovanog tretmana L+Cd6 je dovela do

povećanja aktivnosti enzima APX u mladim listovima *S. viminalis* i *S. matsudana* u poređenju sa tretmanom L, dok u starim listovima nisu utvrđene statistički značajne razlike u aktivnosti APX između tretiranih biljaka (L+Cd3 i L+Cd6) i pripadajuće kontrole (tretman L). Međutim, primena limunske kiseline je uticala na signifikantno smanjenje aktivnosti APX u starim listovima, u odnosu na tretman nehelatiranim Cd (Tabela 23). Ovaj trend je utvrđen pri tretmanu L+Cd6 u odnosu na Cd6, a aktivnost APX je bila 5.6 puta manja kod vrste *S. viminalis*, dok je kod vrste *S. alba* aktivnost APX bila 5.1 puta manja u odnosu na tretman Cd6. Aktivnost enzima glutation-s-transferaze (GST) je bila statistički značajno povećana u uslovima povišenih koncentracija kadmijuma (Tabela 23). U mladim listovima *S. alba* na tretmanu Cd6 je utvrđeno povećanje aktivnosti GST enzima za 10 puta u odnosu na kontrolne biljke, dok je u starim listovima aktivnost ovog enzima bila čak 20 puta veća. Statistički značajno povećanje aktivnosti enzima GST je utvrđeno i kod *S. viminalis* na tretmanu Cd6 u poređenju sa kontrolom, bez obzira na starost listova (Tabela 23). Suprotno tome, kod *S. matsudana* primena tretmana Cd3 i Cd6 nije značajno uticala na promenu aktivnosti GST enzima u odnosu na kontrolu (Tabela 23). Dodatak limunske kiseline je uzrokovao variranja u aktivnosti enzima GST u zavisnosti od primenjenog tretmana, klona, kao i od starosti listova (Tabela 23). Kod vrste *S. matsudana* na tretmanu L+Cd6 je utvrđeno statistički značajno povećanje aktivnosti ovog enzima u odnosu na tretman Cd6, što je zabeleženo kako u mladim, tako i u starim listovima. Nasuprot tome, kod klonova *S. viminalis* i *S. alba* pri tretmanu L+Cd6 je utvrđeno smanjenje aktivnosti ovog enzima za 42.3% i 47% u mladim listovima, odnosno 79.4% i 40% u starim listovima. Dvofaktorijskom analizom varijanse utvrđene su statistički značajne razlike u aktivnosti enzima gvajakol-peroksidaze (GPOD) između posmatranih tretmana i klonova (Tabela 23). Najveća aktivnost GPOD u mladim listovima je zabeležena na kombinovanim tretmanima (L+Cd3 i L+Cd) kod *S. matsudana*, dok je u starim listovima najveća aktivnost ovog enzima zabeležena kod *S. alba* pri tretmanu Cd6. Dodatak limunske kiseline uz veću primenjenu dozu Cd je pokazao različit efekat na aktivnost GPOD u zavisnosti od analiziranog klona (Tabela 23). U mladim listovima *S. viminalis* je utvrđeno signifikantno smanjenje aktivnosti ovog enzima na tretmanu L+Cd6 u odnosu na Cd6, kod *S. alba* povećanje, dok kod *S. matsudana* nisu utvrđene signifikantne promene u aktivnosti GPOD između posmatranih tretmana (Tabela 23). Međutim, u starim listovima je zabeležen drugačiji odgovor biljaka, tretman L+Cd6 je doveo do signifikantnog smanjenja aktivnosti enzima GPOD kod *S. matsudana* i *S. alba*, dok kod *S. viminalis* nisu utvrđene statistički značajne promene aktivnosti enzima u odnosu na tretmanu Cd6 (Tabela 23).

Tabela 23. Uticaj primenjenih tretmana na aktivnost antioksidativnih enzima u analiziranim klonovima vrba (*Salix* spp.).

tretman/klon	mladi listovi			stari listovi		
	aktivnost askorbat-peroksidaze (APX) (U/mg proteina)					
	<i>S. viminalis</i>	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>	<i>S. viminalis</i>	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>
Kontrola	0.63±0.1d-g	0.38±0.11fg	0.38±0.1fg	0.50±0.2de	0.4±0.01e	0.8±0.3cde
Cd3	0.62±0.3d-g	0.22±0.19g	2.4±0.2ab	0.52±0.4de	1.35±0.1b-e	1.7±0.7bcd
Cd6	1.34±0.8c	0.49±0.2efg	2.83±1.12a	2.37±0.27bc	1.39±0.9b-e	4.09±2.28a
L	0.37±0.48fg	0.18±0.01g	0.7±0.2d-g	0.65±0.2de	1.08±0.2b-e	0.9±0.6cde
L+Cd3	0.29±0.1g	0.5±0.16d-g	0.29±0.1g	0.36±0.1de	1.39±0.9b-e	1.7±0.7bcd
L+Cd6	1.81±0.5bc	1.16±0.2c-f	1.3±0.5cde	0.42±0.1de	2.52±0.24b	0.8±0.3cde
aktivnost glutation-s-transferaze (GST) (U/mg proteina)						
Kontrola	3.8±0.7de	1.9±0.6e	3.8±0.1de	8.7±1.1ef	0.5±0.1f	1.9±0.2f
Cd3	10.2±0.2cde	2.4±0.1e	20.1±1.5b	6.2±3.5ef	2.7±0.3ef	5.3±3.2ef
Cd6	22.2±0.1b	6.7±0.5de	38.7±0.2a	19.4±3.2cd	4.3±0.6ef	42.2±8.8b
L	1.9±0.3e	5.4±0.2de	6.7±0.3de	4.3±0.6ef	2.5±0.6ef	1.9±0.2f
L+Cd3	3.8±0.6de	6.4±0.1de	8.3±0.4de	1.4±0.3f	13.1±1.1de	5.1±1.2ef
L+Cd6	12.8±0.2bcd	19.1±0.2bc	20.5±0.1b	4.0±1.8ef	64.6±9.6a	25.3±1.2c
aktivnost gvajakol-peroksidaze (GPOD) (U/mg proteina)						
Kontrola	0.3±0.3fg	0.2±0.1fg	0.1±0.1g	0.4±0.24gh	0.2±0.1h	0.4±0.14gh
Cd3	0.9±0.5cde	0.1±0.1g	0.5±0.1efg	1.8±0.14b-e	0.2±0.13h	0.9±0.2d-h
Cd6	1.4±0.1abc	1.6±0.2ab	0.3±0.2fg	2.3±0.72bc	2.6±0.6b	3.7±0.17a
L	0.4±0.1efg	0.8±0.4c-f	0.3±0.1fg	0.7±0.25e-h	0.4±0.2gh	0.4±0.01gh
L+Cd3	0.7±0.3def	1.9±0.5a	1.2±0.2bcd	1.6±0.65b-f	0.3±0.1h	0.7±0.3fgh
L+Cd6	0.7±0.4def	1.8±0.4a	1.2±0.5bcd	1.9±0.3bcd	1.4±0.2c-g	1.8±0.3bcd

Vrednosti u tabeli predstavljaju srednje vrednosti±standardna devijacija. Razlike između srednjih vrednosti analiziranih parametara vršene su Fisher-ovim post-hoc testom za nivo značajnosti $p < 0.05$ i označene su slovnim oznakama. Vrednosti označene istim slovom u okviru jednog analiziranog parametra se statistički ne razlikuju za postmatrani nivo značajnosti, dok vrednosti koje su označene boldovanim slovima ukazuju na signifikantne razlike u odnosu na pripadajuću kontrolu (kontrola, odnosno tretman L).

Peroksidacija lipida je praćena preko produkcije malondialdehida (sadržaj MDA) i predstavljena je u Tabeli 24. Primena tretmana niže doze Cd (Cd3) nije značajno uticala na promenu sadržaja MDA u poređenju sa kontrolnim biljkama. Izuzetak je vrsta *S. matsudana* gde je u starim listovima zabeleženo signifikantno povećanje sadržaja MDA na tretmanu Cd3 u odnosu na kontrolne biljke (Tabela 24). Sa druge strane, izloženost biljaka višoj dozi Cd (tretman Cd6) dovela je do povećanja produkcije MDA u odnosu na kontrolne biljke, koje je u pojedinim slučajevima bilo signifikantno (Tabela 24). Najveći sadržaj MDA je registrovan na tretmanu Cd6 kod *S. matsudana*, 84.8 nmol/mg proteina u mladim listovima, odnosno 108 nmol/mg proteina. Nasuprot tome, u starim listovima ostalih analiziranih klonova nisu utvrđene statistički značajne razlike u sadržaju MDA između kontrolnih i biljaka gajenih na tretmanima Cd3 i Cd6 (Tabela 24). Na kombinovanim tretmanima (L+Cd3 i L+Cd6) je utvrđen blagi porast sadržaja MDA sa povećanjem doze Cd, međutim utvrđene vrednosti se nisu statistički značajno razlikovale u odnosu na kontrolu (Tabela 24). Takođe, primena kombinovanog tretmana L+Cd6 je značajno uticala na smanjenje sadržaja MDA u odnosu na tretman Cd6, što je utvrđeno u mladim listovima *S. matsudana* i *S. alba*, dok je u starim listovima ovaj obrazac zabeležen samo kod vrste *S. matsudana* (Tabela 24).

Tabela 24. Uticaj primenjenih tretmana na intenzitet lipidne peroksidacije (MDA sadržaj) u analiziranim klonovima vrba (*Salix* spp.).

tretman/klon	mladi listovi			stari listovi		
	Sadržaj malondialdehida (nmol MDA/mg proteina)					
	<i>S. viminalis</i>	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>	<i>S. viminalis</i>	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>
kontrola	9.5±3.1cd	13.2±4.6cd	5.2±2.4d	5.9±1.9ef	3.8±0.5f	14.6±1.8c-f
Cd3	14.3±0.9cd	28.9±5.6bc	18.4±1.6cd	16.5±7.7b-f	37.4±22.2bc	10.4±2.7def
Cd6	20.2±7.6cd	84.8±40.7a	45.0±17.6b	29.3±9.2b-e	108±29.8a	10.9±2.7def
L	3.9±1.8d	4.6±0.8d	9.3±2.1cd	9.3±1.6def	6.8±1.7ef	26.6±7.5b-f
L+Cd3	13.7±5.6cd	4.8±0.4d	9.8±0.7cd	18.4±3.8b-f	9.7±2.4def	29.4±6.3b-e
L+Cd6	19.7±11.7cd	6.7±1.4cd	11.8±1.2cd	31±1.5bcd	14.8±4.1c-f	29.4±2.9b-e

Vrednosti u tabeli predstavljaju srednje vrednosti±standardna devijacija. Razlike između srednjih vrednosti analiziranih parametara vršene su Fisher-ovim post-hoc testom za nivo značajnosti $p < 0.05$ i označene su slovnim oznakama. Vrednosti označene istim slovom u okviru jednog analiziranog parametra se statistički ne razlikuju za postmatrani nivo značajnosti, dok vrednosti koje su označene boldovanim slovima ukazuju na signifikantne razlike u odnosu na pripadajuću kontrolu (kontrola, odnosno tretman L).

Sadržaj ukupnih (UT), neproteinskih (NPT) i proteinskih tiola (PT) je pokazao variranje u zavisnosti od analiziranog klona, primenjenog tretmana, kao i od starosti listova (Tabela 25). U mladim listovima najveći sadržaj ukupnih tiola je zabeležen na tretmanu Cd6 kod vrste *S. alba*, što je bilo 4 puta veće u odnosu na kontrolne biljke (Tabela 25). Dodatak limunske kiseline pri većoj primenjenoj dozi Cd (tretman L+Cd6) uticao je na sadržaj ukupnih tiola u zavisnosti od analiziranog klona i starosti listova (Tabela 25). U mladim listovima *S. viminalis* i *S. matsudana* nisu utvrđene signifikantne razlike u sadržaju ukupnih tiola između kombinovanog tretmana L+Cd6 i tretmana Cd6, dok je kod *S. alba* utvrđeno signifikantno smanjenje od 72.5% na tretmanu L+Cd6. Suprotno tome, u starim listovima *S. viminalis* i *S. alba* je utvrđeno značajno povećanje UT na tretmanu L+Cd6, što nije bilo zabeleženo kod *S. matsudana* (Tabela 25). Takođe, u starim listovima svih analiziranih klonova je utvrđeno signifikantno povećanje sadržaja NPT u poređenju sa istim tretmanom bez limunske kiseline (tretman Cd6) (Tabela 25). Kada je u pitanju sadržaj proteinskih tiola (PT), njihova najveća koncentracija u mladim listovima je registrovana kod *S. alba* na tretmanu Cd6 (3.1 $\mu\text{mol/g}$ sveže mase), dok je u starim listovima najveća vrednost ovog parametra zabeležena na tretmanu L+Cd6 kod *S. viminalis* (3.2 $\mu\text{mol/g}$ sveže mase). Utvrđene vrednosti su se značajno razlikovale u odnosu na sadržaj PT kod kontrolnih biljka (Tabela 25). Takođe, signifikantno povećanje sadržaja PT je utvrđeno u starim listovima *S. alba* na tretmanu L+Cd6 (Tabela 25), dok kod ostalih analiziranih klonova i primenjenih tretmana nisu utvrđene značajne promene, u poređenju sa kontrolnim biljkama.

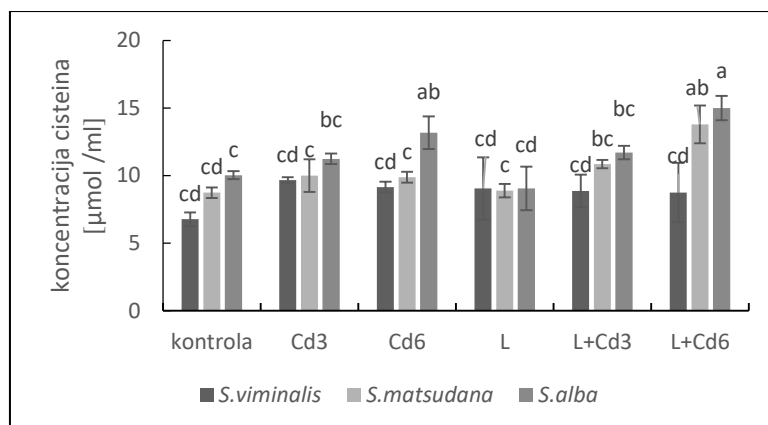
Tabela 25. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj tiola u analiziranim klonovima vrba (*Salix* spp.)

tretman/klon	mladi listovi			stari listovi		
	sadržaj ukupnih tiola ($\mu\text{mol/g}$ sveže mase)					
	<i>S. viminalis</i>	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>	<i>S. viminalis</i>	<i>S. matsudana</i>	<i>S. alba</i>
kontrola	1.0±0.2cd	1.0±0.2d	1.1±0.1d	1.4±0.4de	1.4±0.2de	1.0±0.1e
Cd3	1.3±0.1d	1.8±0.8bcd	2.3±0.9b	1.2±0.2e	2.3±1.2bcd	1.0±0.1e
Cd6	1.7±0.5bcd	1.2±0.1d	4.0±0.8a	1.4±0.3de	1.5±0.1cde	1.1±0.1e
L	0.9±0.1d	0.9±0.1d	1.2±0.1d	1.1±0.2e	1.6±0.1cde	0.8±0.1e
L+Cd3	0.9±0.1d	1.3±0.7cd	1.2±0.1d	2.6±0.7b	2.3±0.8bcd	0.9±0.1e
L+Cd6	2.2±0.8bc	1.2±0.4d	1.1±0.1d	4.1±0.6a	1.3±0.4de	2.4±0.8bc
sadržaj neproteinskih tiola ($\mu\text{mol/g}$ sveže mase)						
Kontrola	0.9±0.1a	0.5±0.1f	0.8±0.1ab	0.7±0.1fgh	0.6±0.1hij	0.9±0.1ab
Cd3	0.8±0.1abc	0.8±0.2ab	0.6±0.1def	0.6±0.1ghi	0.5±0.1j	0.8±0.1bc
Cd6	0.8±0.1ab	0.3±0.1g	0.8±0.2ab	0.5±0.1ij	0.5±0.1jk	0.7±0.1efg
L	0.6±0.1ef	0.6±0.1ef	0.9±0.1a	0.7±0.1fgh	0.4±0.1k	0.6±0.1hij
L+Cd3	0.8±0.1ab	0.3±0.1g	0.9±0.1a	0.7±0.1def	0.7±0.1def	0.8±0.1cde
L+Cd6	1.0±0.1a	0.7±0.1cde	0.9±0.1a	0.8±0.1cd	0.8±0.1c-f	1.0±0.1a
sadržaj proteinskih tiola ($\mu\text{mol/g}$ sveže mase)						
Kontrola	0.4±0.2cd	0.5±0.2cd	0.4±0.1cd	0.7±0.5d-h	0.8±0.1c-h	0.1±0.1gh
Cd3	0.2±0.1d	1.1±0.8bcd	1.7±0.8b	0.5±0.2e-h	1.8±1.1bc	0.1±0.1gh
Cd6	0.8±0.4bcd	0.8±0.2bcd	3.1±0.9a	0.9±0.3c-h	1.1±0.1b-g	0.1±0.1gh
L	0.3±0.1cd	0.3±0.1cd	0.2±0.1d	1.9±0.6b-f	1.2±0.1b-f	0.3±0.1fgh
L+Cd3	0.19±0.1d	0.95±0.69bcd	0.23±0.06d	0.3±0.1fgh	1.5±0.8b-e	0.1±0.1h
L+Cd6	1.24±0.7bc	0.51±0.2cd	0.14±0.09d	3.2±0.6a	0.6±0.4e-h	1.4±0.8bcd

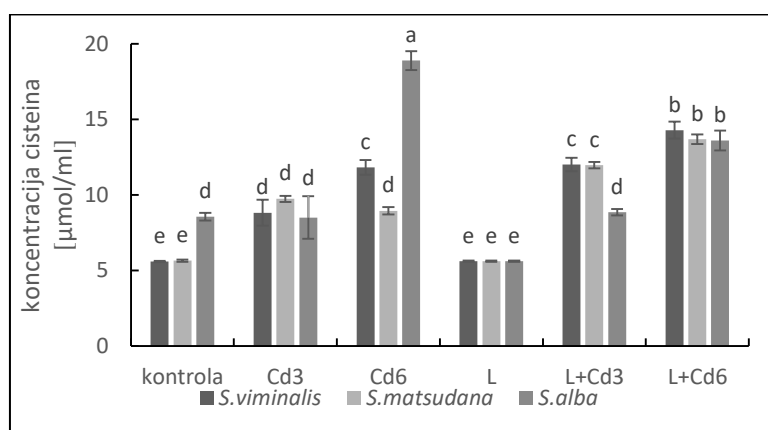
Vrednosti u tabeli predstavljaju srednje vrednosti±standardna devijacija. Razlike između srednjih vrednosti analiziranih parametara vršene su Fisher-ovim post-hoc testom za nivo značajnosti $p<0.05$ i označene su slovnim oznakama. Vrednosti označene istim slovom u okviru jednog analiziranog parametra se statistički ne razlikuju za postmatrani nivo značajnosti, dok vrednosti koje su označene boldovanim slovom ukazuju na signifikantne razlike u odnosu na pripadajuću kontrolu (kontrola, odnosno tretman L).

4.3.9. Sadržaj aminokiseline cisteina

Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj aminokiseline cisteina u mladim i starim listovima je prikazan na Slikama 34 i 35. Pod uticajem tretmana Cd3 i Cd6 u mladim listovima *S. viminalis* i *S. matsudana* nisu utvrđene signifikantne promene u akumulaciji cisteina u odnosu na kontrolu (Slika 34), dok je kod vrste *S. alba* utvrđeno linearno povećanje akumulacije cisteina sa povećanjem sadržaja Cd u biljnom tkivu. Najveća akumulacija cisteina je zabeležena u mladim listovima *S. alba* (15 $\mu\text{mol/ml}$) na tretmanu L+Cd6, a zabeležena vrednost je bila statistički značajno veća vrednost u odnosu na pripadajuću kontrolu (tretman L) (Slika 34). Kada je u pitanju koncentracija cisteina u starim listovima, najveća akumulacija ove aminokiseline je utvrđena kod istog klona (vrsta *S. alba*) na tretmanu Cd6, a zabeležena vrednost je bila za čak 50% veća u odnosu na kontrolu. Takođe, na tretmanu Cd6 su utvrđene statistički značajne razlike u sadržaju cisteina između klonova i kretale su se u opadajućem smeru *S. alba* > *S. viminalis* > *S. matsudana*. Nasuprot tome, na tretmanu L+Cd6 razlike u sadržaju cisteina između klonova nisu utvrđene.



Slika 34. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj cisteina u mladim listovima analiziranih klonova vrba (*Salix* spp.).

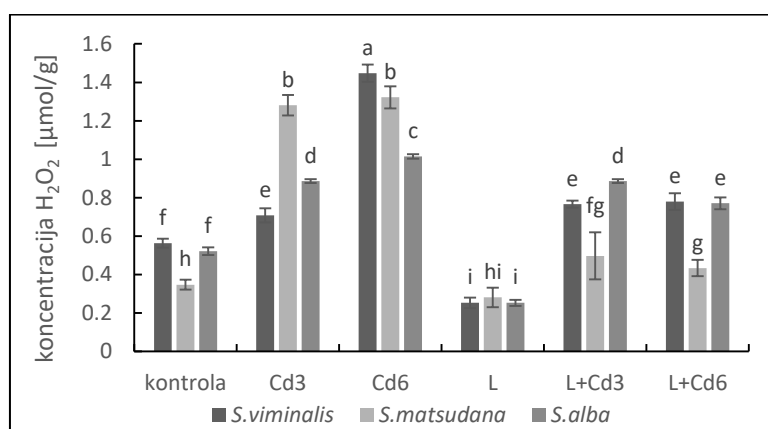


Slika 35. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj cisteina u starim listovima analiziranih klonova vrba (*Salix* spp.).

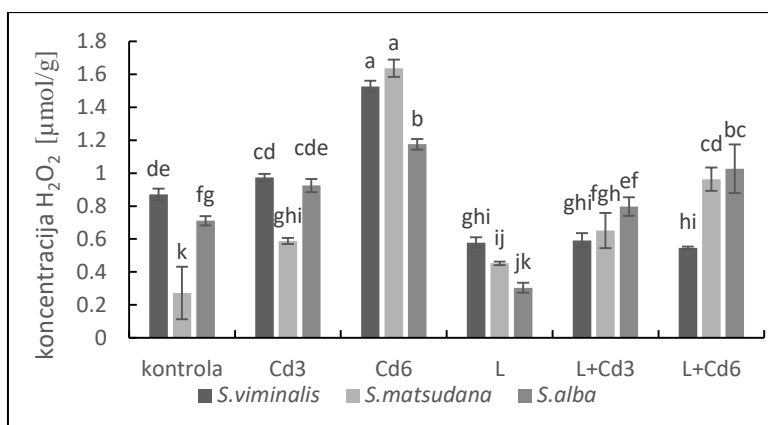
4.3.10. Sadržaj vodonik peroksida

Sadržaj vodonik peroksida (H_2O_2) je pokazao linearnu zavisnost od primenjene doze Cd, tako da je sa porastom sadržaja Cd sa MDK na $2*MDK$ vrednost u zemljištu, zapažen trend povećanja koncentracije vodonik peroksida u listovima, bez obzira na njihovu starost (Slike 36 i 37). Izuzetak je vrsta *S. matsudana* gde se produkcija H_2O_2 u mladim listovima nije statistički značajno razlikovala na tretmanu Cd6, u odnosu na tretman Cd3 (koncentracija H_2O_2 u mladim listovima je bila $1.28 \mu\text{mol/g}$ na tretmanu Cd3, odnosno $1.32 \mu\text{mol/g}$ na tretmanu Cd6). Najveći sadržaj H_2O_2 u mladim listovima je registrovan na tretmanu Cd6 kod vrste *S. viminalis*, gde je zabeležena koncentracija vodonik peroksida bila 2.6 puta veća u odnosu na kontrolu. U starim listovima najveći sadržaj H_2O_2 je zabeležen na tretmanu L+Cd6 kod vrste *S. matsudana*, $1.63 \mu\text{mol/g}$ sveže mase, a utvrđena vrednost je bila 6 puta veća u odnosu na kontrolni tretman.

Dodatak limunske kiseline pri većoj dozi Cd (tretman L+Cd6) doveo je do statistički značajnog smanjenja sadržaja H_2O_2 u odnosu na tretman Cd6, bez obzira na starost listova. U mladim listovima na tretmanu L+Cd6 je utvrđen procenat smanjenja za 46.53% kod *S. viminalis*, 67.43% kod *S. matsudana* i 23.77% kod *S. alba* (Slika 36). Pored toga, signifikantan pad u koncentraciji vodonik peroksida je utvrđen u starim listovima *S. viminalis*, gde je zabeleženo smanjenje za 64.48%, kao i kod *S. matsudana* za 41.11%, dok kod *S. alba* nije utvrđena signifikantna razlika između akumulacije vodonik peroksida između Cd6 i L+Cd6 tretmana (Slika 37).



Slika 36. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj vodonik peroksida (H_2O_2) u mladim listovima analiziranih klonova vrba (*Salix* spp.).

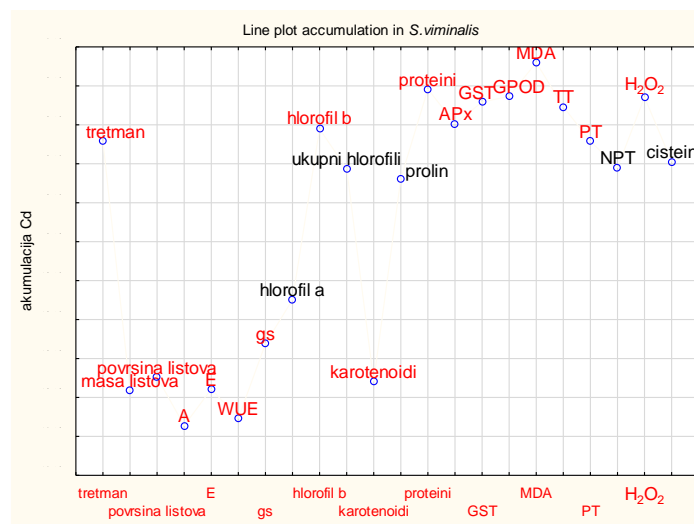


Slika 37. Uticaj primenjenih tretmana na sadržaj vodonik peroksida (H_2O_2) u starim listovima analiziranih klonova vrba (*Salix* spp.).

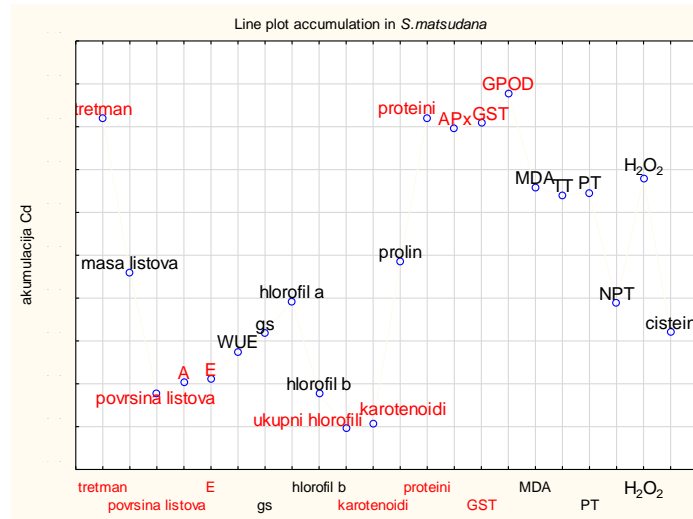
4.4. Korelacije

Korelacije između analiziranih parametara (različitih morfoloških i fiziološko-biohemijskih karaktera) i akumulacije Cd u mladim listovima kod svakog analiziranog klona su prikazane u vidu matrica korelacije i date su u prilogu (tabele P1, P2 i P3). Na osnovu

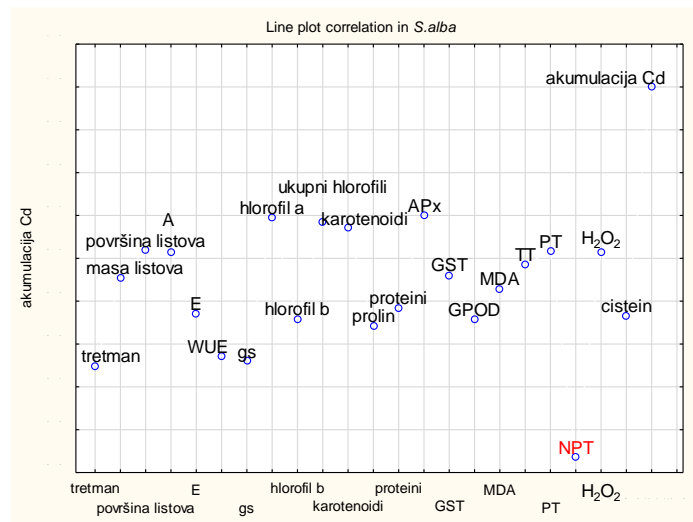
Pearson-ovog koeficijenta korelacije utvrđena je međusobna zavisnost između različitih karaktera, koja je bila specifična za svaki analizirani klon. Na Slikama 39–40 u vidu linijskog plota je prikazana zavisnost analiziranih parametara i akumulacije Cd u mladim listovima. Vrednosti koje su označene crvenom bojom ukazuju na statistički značajnu korelaciju za nivo značajnosti $p < 0.05$. Rezultati Pearson-ovog koeficijanta korelacije su pokazali da kod analiziranih klonova *S. viminalis* i *S. matsudana* postoji jaka pozitivna korelacija između primenjenih tretmana i akumulacije Cd, što nije utvrđeno kod *S. alba*. Akumulacija Cd u mladim listovima je pokazala signifikantnu pozitivnu korelaciju sa antioksidativnim enzimima odbrane (APX, GST, GPOD). Na osnovu vrednosti Pearson-ovog koeficijenta korelacije je utvrđeno da je sadržaj Cd u mladim listovima *S. viminalis* visoko pozitivno korelisan sa produkcijom H_2O_2 , sadržajem MDA, ukupnih i proteinskih tiola, kao i sadržajem proteina. Takođe, visoka negativna korelacija je utvrđena između akumulacije Cd i biomase i površine listova, kao i parametra razmene gasova i sadržaja fotosintetičkih pigmenata (Slika 38). Kod analiziranog klona vrste *S. matsudana* utvrđena je jaka negativna korelacija između sadržaja Cd i površine listova, intenziteta fotosinteze i transpiracije, kao i sadržaja ukupnih hlorofila i karotenoida (Slika 39). Nasuprot tome, kod analiziranog klona *S. alba* sadržaj Cd u mladim listovima je pokazao značajnu korelaciju jedino sa sadržajem neproteinskih tiola, dok ostali analizirani parametri nisu direktno korelirani sa koncentracijom Cd u mladim listovima.



Slika 38. Korelacije između analiziranih morfoloških i fiziološko-biohemijskih parametara, i akumulacije Cd u mladim listovima *S. viminalis*.



Slika 39. Korelacije između analiziranih morfoloških i fiziološko-biohemijskih parametara, i akumulacije Cd u mladim listovima *S. matsudana*.

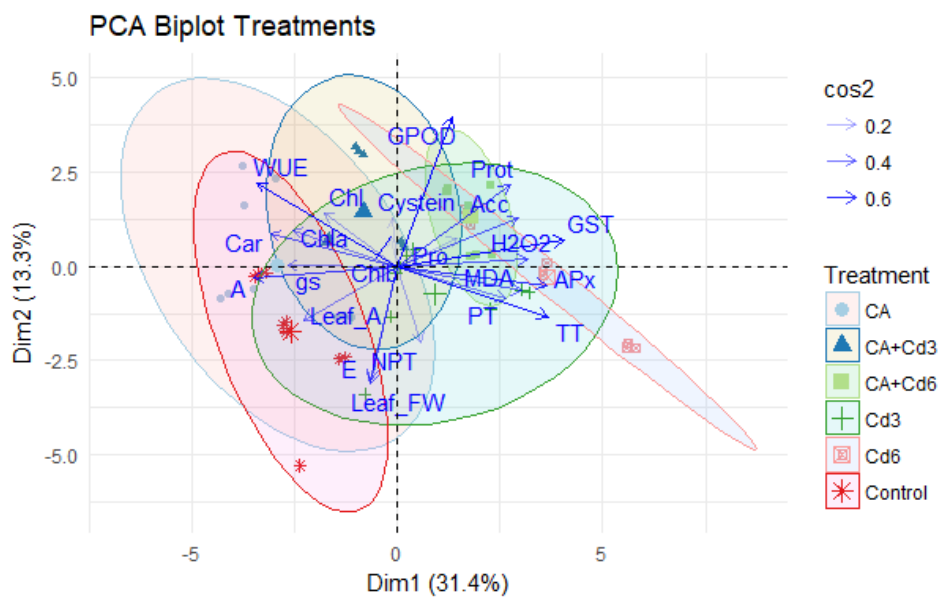


Slika 40. Korelacije između analiziranih morfoloških i fiziološko-biohemijskih, i akumulacije Cd u mladim listovima *S. alba*.

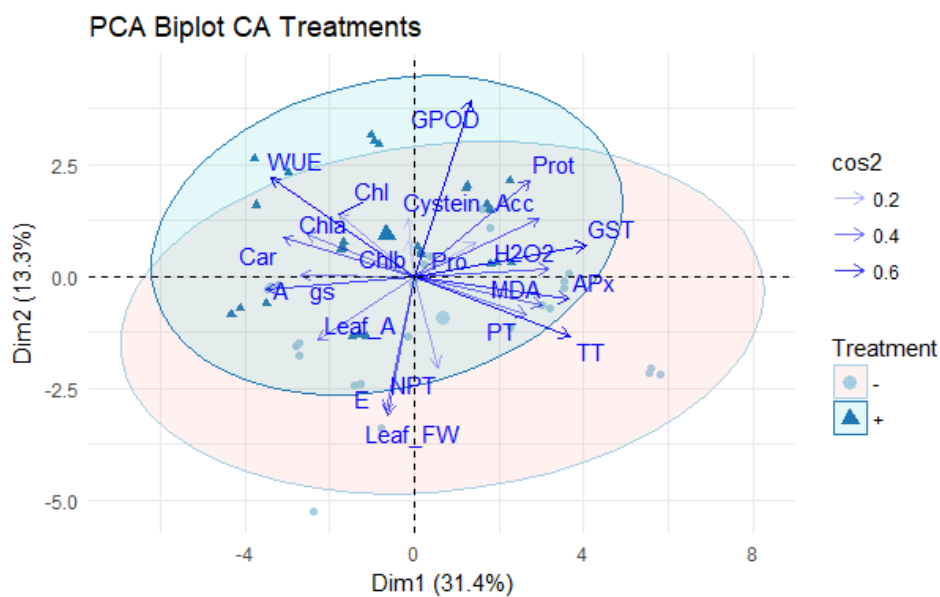
4.5. Analiza glavnih komponenti (PCA)

Varijabilnost između primenjenih tretmana, prisustva limunske kiseline, kao i između analiziranih klonova je utvrđena pomoću analize glavnih komponenti (PCA analiza) i predstavljena je na Slikama 41-43 u vidu bi-plotova. Analizirani bi-plotovi su zasnovani na matricama korelacije, te se na osnovu dobijenih podataka može utvrditi doprinos pojedinačnih karaktera u ukupnoj varijabilnosti. Na osnovu dobijenih bi-plotova je utvrđeno da je doprinos prve glavne komponente iznosio 31.4% u ukupnoj varijabilnosti analiziranih karaktera. U prvoj dimenziji najveći doprinos imaju biohemijski parametri poput ukupnih tiola, askorbat-peroksidaze i glutation-s-transferaze (Slika 41). Pored toga, druga glavna komponenta

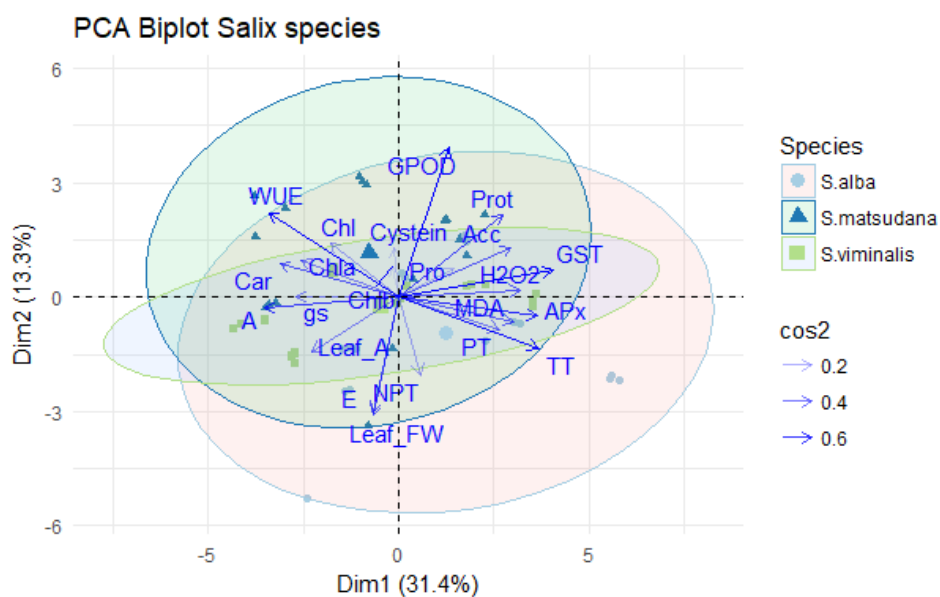
pokazuje doprinos u iznosu od 13.3% u kumulativnoj varijabilnosti, gde najveći značaj imaju masa listova, transpiracija, kao i aktivnost gvajakol-peroksidaze. Kada je u pitanju razdvajanje na osnovu primenjenih tretmana, na Slici 41 jasno se uočava razdvajanje između kontrolnog i tretmana Cd6, dok se tretman Cd3 preklapa sa pomenutim tretmanima. Na Slici 42 je prikazana raspodela analiziranih karaktera u zavisnosti od primenjenih tretmana (nehelatiran Cd i kombinovani tretman sa limunskom kiselinom). Na osnovu raspodele analiziranih karaktera u prve dve komponente uočava se preklapanje analiziranih karaktera, što ukazuje na sličan odgovor biljaka bez obzira na prisustvo, odnosno odsustvo LK. Raspodela analiziranih vrsta u prostoru prve dve ose pokazuje preklapanje u većini analiziranih parametara (Slika 43). Međutim, poređenjem vrsta uočava se da *S. viminalis* pokazuje najmanji stepen variranja u poređenju sa ostale dve analizirane vrste, dok je najveći stepen varijabilnosti utvrđen kod *S. alba*.



Slika 41. Bi-plot radvavanja morfoloških i fiziološko-biohemijskih parametara analiziranih klonova vrba (*Salix* spp.) na osnovu primenjenih tretmana.



Slika 42. Bi-plot radvajanja morfoloških i fiziološko-biohemijskih parametara analiziranih klonova vrba (*Salix* spp.) poređenjem tretmana bez (-) i tretmana sa limunskom kiselinom (+).



Slika 43. Bi-plot razdvajanja klonova vrba (*Salix* spp.) na osnovu analiziranih morfo-fizioloških i biohemijskih parametara.

5. Diskusija

5.1. Kadmijum u zemljištu

Tokom poslednjih decenija svest o kvalitetu zemljišta i prisustvu potencijalnih zagađivača se znatno povećala širom sveta, pa i u Srbiji, te se sve veći broj istraživača bavi ovim problemom (Alagić i sar., 2013; Mihailović i sar., 2015). Zvanični izveštaji Agencije za zaštitu životne sredine navode da je u Srbiji identifikovan veliki broj lokaliteta, uglavnom u okolini deponija, fabrika i hemijskih postrojenja, pa i u urbanim sredinama, koji se odlikuju prekoračenjem dozvoljenih koncentracija teških metala prema važećem pravilniku (Vidojević i sar., 2013).

Prisustvo visokih koncentracija teških metala u zemljištu pokazuje negativan efekat na rizosfernu mikrofloru i može dovesti do smanjenja njihove brojnosti i aktivnosti (Ali i sar., 2013), što posledično utiče na kvalitet i sastav zemljišta. Za razliku od organskih polutanata, teški metali u zemljištu ne podležu mikrobnoj, kao ni hemijskoj degradaciji, pa se u rizosferi zadržavaju veoma dugo (Wuana i Okieimen, 2011). Uticaj ovih opasnih polutanata na biljke ne zavisi samo od ukupne količine metala u zemljištu, već i od hemijske forme u kojoj je prisutan, kao i od karakteristika zemljišta. Veliki broj edafskih faktora poput pH vrednosti, prisustva organske materije, kapaciteta izmene katjona i dr. utiče na dinamiku usvajanja teških metala iz zemljišta (Clemens, 2006; Chaney i sar., 2007; Welikala i sar., 2018). Limitirajući faktor u usvajanju teških metala, a naročito kadmijuma, predstavlja visoka pH vrednost, što se naglašava u velikom broju studija (Prasad, 2003; Quartacci i sar., 2006; Antoniadis i sar., 2017).

Rezultati ovog rada su pokazali da je dostupnost jona kadmijuma u zemljištu tipa fluvisol (zemljište alkalnog tipa) u velikoj meri smanjena, čime je mogućnost dekontaminacije zemljišta, kao i mogućnost fitoekstrakcije teških metala u ovakvom zemljištu veoma ograničena. Prema navodima Vidojević i saradnika (2013) zemljište alkalne pH reakcije je dominantan tip zemljišta na području Vojvodine. Takođe, ovakav tip zemljišta se odlikuje visokim procentom karbonata (visoka pH vrednost), što dodatno smanjuje mogućnost uklanjanja teških metala (Kirkham, 2006). Prema navodima Meers i saradnika (2007) sposobnost vrste *S. viminalis* da usvaja Cd i Zn u kiselom zemljištu ($\text{pH} < 6$) znatno je veća u odnosu na mogućnost uklanjanja ovih metala iz zemljišta alkalnog tipa ($\text{pH} > 6$). Nedavna studija Zhang i koautora (2017) ukazuje da dostupnost jona Cd znatno opada sa povećanjem pH vrednosti zemljišta iznad 5.

U ovom radu je utvrđeno da primena treseta doprinosi delimičnom zakišeljavanju zemljišta, smanjenju sadržaja karbonata, povećanju sadržaja organske materije, kao i povećanju sadržaja makroelemenata (azota, kalijuma i fosfora) u zemljištu, dok je dodatak limunske kiseline doveo do blagog pada pH vrednosti zemljišta. Istraživanje Evangelou i saradnika (2007) je pokazalo da aplikacija limunske kiseline u zemljište koje se odlikuje povećanim sadržajem teških metala ima mogućnost da snizi pH vrednost za oko 0.5 do 1 jedinice pH vrednosti. Tokom poslednjih decenija sproveden je veliki broj istraživanja koja naglašavaju pozitivan efekat primene limunske kiseline u remedijaciji zagađenog zemljišta (Li i sar., 2014; Arsenov i sar., 2017; Zhang i sar., 2017). Takođe, dodatak treseta koji se odlikuje niskom pH vrednošću (pH vrednost je oko 3.5) može uticati na biodostupnost katjona metala i doprineti njihovom uklanjanju iz zemljišta (Trevisan i sar., 2010). Stanislawska-Glubiak i saradnici (2012) su zabeležili povećano usvajanje Cd i Pb usled dodavanja treseta u peskovito zemljište, u odnosu na isti tretman bez treseta. Autori naglašavaju da primena treseta utiče na sorpciju jona ovih metala u peskovitom zemljištu, čime se povećava njihovo usvajanje od strane ćelija korena. Slično tome zabeležili su i Welikala i saradnici (2018), koji su analizirali uticaj različitih suplemenata na biodostupnost i mobilnost jona metala u zemljištu, pri čemu su utvrdili da dodatak treseta može pozitivno uticati na navedene parametre. Pored toga, primena treseta u zagađenom zemljištu predstavlja dodatni izvor organske materije, kao i neophodnih makronutrijenata čime se poboljšava kvalitet zemljišta, a time i uspešniji rast i razvoj biljaka (Stanislawska-Glubiak i sar., 2012; Salam i sar., 2016).

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da je u kontrolnom zemljištu koncentracija Cd iznosila oko 1 mg/kg zemljišta. Prisustvo kadmijuma u kontrolnom zemljištu se može objasniti činjenicom da je ovaj metal prirodno prisutan u litosferi, te se raspadom matične stene teški metali mogu nakupljati i u rastresitom sloju zemljišta (Kabata-Pendias i Pendias, 2000). Navedeni autori naglašavaju da koncentracija Cd koja je prirodno prisutna u rizosferi zavisi od tipa zemljišta i u proseku se kreće od 0.6 do 1.1 mg/kg zemljišta. Slično navode Irfan i saradnici (2013), koji ističu da se prisustvo Cd u koncentraciji od 0-1 mg/kg smatra nezagađenim zemljištem, koncentracija Cd od 1-3mg/kg ukazuju na blago zagađenje, dok prisustvo Cd u zemljištu preko 3 mg/kg ukazuje na visok stepen zagađenje zemljišta. U nedavnoj studiji, Mihailović i saradnici (2015) su pokazali da u urbanom zemljištu u regionu grada Novog Sada koncentracija teških metala poput As, Ni i Pb prevazilazi maksimalno dozvoljene vrednosti, prema važećim legislativama, što nameće potrebu za odabirom vrsta koje bi se mogle koristiti u remedijaciji zagađenog zemljišta.

5.2. Uticaj kadmijuma i limunske kiseline na akumulaciju i distribuciju kadmijuma u biljnom tkivu

Upotreba brzorastućih drvenastih formi, posebno vrsta iz familije Salicaceae našla je široku primenu u dekontaminaciji zemljišta zagađenog teškim metalima (Landberg i Greger, 1999; Robinson i sar., 2000; Meers i sar., 2007; Pajević i sar., 2016). Prema navodima Pulford i saradnika (2002) od 20 analiziranih vrsta iz roda *Salix*, 11 vrsta je pokazalo visoku efikasnost u uklanjanju metala poput Cd, Ni, Cu i Zn iz zemljišta, uz istovremenu visoku produkciju biomase, čime se naglašava uspešnost ovih vrsta u akumulaciji i otpornosti prema toksičnom dejstvu različitih metala. Takođe, Zhivotovsky i saradnici (2011) naglašavaju da različite vrste u okviru roda *Salix* pokazuju visoku uspešnost u dekontaminaciji zemljišta zagađenog olovom, kao i visok stepen translokacije ovog metala u nadzemne organe. Imajući u vidu da različite vrste, kao i klonovi vrba pokazuju visoku varijabilnost u kapacitetu usvajanja i akumulacije teških metala, na osnovu brojnih literaturnih navoda utvrđeno je da uklanjanje metala iz životne sredine direktno zavisi od odabira vrste i klona vrba (Kuzovkina i sar., 2004; Dos Santos Utmazian i sar., 2007; Yang i sar., 2015a). Mleczek i saradnici (2017) su utvrdili značajne razlike u pogledu efikasnosti usvajanja i akumulacije teških metala kod različitih klonova vrste *S. viminalis*. Utvrđene razlike između najvišeg i najnižeg sadržaja metala bile su 84% za sadržaj Cd; 90% Cu; 167% Hg; 190% Pb i 36% Zn. Među vrbama, vrsta *Salix viminalis* se ističe kao izuzetno pogodna za proces fitoekstrakcije i pokazuje mogućnost akumulacije Cd koja odgovara vrednostima hiperakumulatorskih vrsta (Hammer i sar., 2003). Pored toga, Greger i Landberg (1999) su utvrdili da se ova vrsta odlikuje visokim procentom translokacije Cd od korena ka nadzemnim delovima, pri čemu procenat translokacije kod pojedinih klonova može iznositi čak 72% ukupno usvojenog kadmijuma. Pored toga, veliki broj studija je pokazao da se vrbe odlikuju efikasnijom translokacijom Cd iz korena u nadzemne organe, u odnosu na topole, a samim tim pokazuju visoku uspešnost u fitoekstrakciji (Dos Santos Utmazian i sar., 2007; Zacchini i sar., 2009; Pietrini i sar., 2010). Nasuprot tome, pojedini literaturni izvori navode da se kod vrba velika količina usvojenih metala, posebno Cd, zadržava na nivou korena, dok je translokacija u nadzemne organe smanjena, pa se vrste ovog roda mogu koristiti za fitostabilizaciju zagađenih zemljišta (Meers i sar., 2003; Rosseli i sar., 2003). Ova činjenica često predstavlja limitirajući faktor za upotrebu drvenastih vrsta u procesu fitoekstrakcije, što nameće potrebu za skriningom vrsta i klonova koji se karakterišu sposobnošću visoke translokacije u nadzemne organe.

Rezultati prvog eksperimenta ovog istraživanja su pokazali da je među analiziranim klonovima vrba najveći sadržaj usvojenog Cd zabeležen u mladim listovima *S. viminalis* i *S. matsudana* na tretmanu Cd6. U listovima, Cd predstavlja veoma toksičan element jer pokazuje snažno negativno dejstvo na veliki broj fizioloških procesa i dovodi do oštećenja membrane tilakoida, ometa fotosintezu, utiče na aktivnost enzima (El-Shintinawy, 1999; Pietrini i sar., 2003). Rezultati ove studije su pokazali da akumulacija Cd zavisi i od starosti listova, tako je veći procenat Cd utvrđen u mlađim u odnosu na starije listove. Slično navode Salt i saradnici (1995), koji su zabeležili najveći procenat ukupno usvojenog Cd u najmlađim listovima, što je utvrđeno kod hiperakumulatorske vrste *Brassica juncea*. Ovakva distribucija Cd u listovima može se objasniti većim intenzitetom transpiracije mladih listova, u odnosu na stare, jer intenzitet odavanja vode ovim putem opada sa starošću listova (Cosio i sar., 2006). Nasuprot ovim rezultatima, u drugom eksperimentu najveća količina usvojenog Cd je registrovana u korenu *S. viminalis* i *S. alba* na kombinovanom tretmanu limunske kiseline i veće doze Cd (tretman L+Cd6). Generalno, sadržaj Cd u korenu bio je znatno veći tokom drugog eksperimenta, u poređenju sa rezultatima dobijenim tokom prvog eksperimenta. Ovakvi rezultati se mogu objasniti primenom ameliorativnih mera u vidu dodatka treseta i sukcesivne aplikacije limunske kiseline koje su doprinele povećanom usvajanju, ali i zadržavanju Cd na nivou korena. Aplikacija limunske kiseline dovodi do obrazovanja organo-metalnog kompleksa čime se povećava procenat biodostupne forme Cd u zemljišnom rastvoru, kao i njegovo usvajanje od strane korena (Kim i Lee, 2010). Sa druge strane, zadržavanje kadmijuma na nivou korena dovodi se u vezu sa apoplastnim vezivanjem Cd za zidove ćelija korenskih dlaka, čime je smanjena translokacija metala u nadzemne organe (Adeniji i sar., 2010).

Rezultati ove studije su pokazali da je varijabilnost u usvajanju Cd zavisna od genotipa, primenjene doze kadmijuma, kao i karakteristika zemljišta na kome su biljke gajene. U prvom eksperimentu dodatak limunske kiseline nije značajno uticao na povećanje akumulacije Cd u biljkama, dok je helatiranje kadmijuma limunskom kiselinom tokom drugog eksperimenta značajno doprinelo povećanju akumulacije Cd u biljnom tkivu. Iako postoji veliki broj studija koje ukazuju na pozitivan uticaj limunske kiseline u procesu asistirane fitoekstrakcije (Najeeb i sar., 2011; Ehsan i sar., 2014; Afhsan i sar., 2015), u literaturi postoje i istraživanja koja daju oprečne rezultate. Prema navodima Shamshad i saradnika (2018) dodatak limunske kiseline nije uticao na povećanje akumulacije Cd kod graška, dok je kod vrste *Brassica juncea* utvrđena slaba efikasnost ovog helatora na usvajanje Cd, Cr, Cu, Pb i Zn (Quartacci i sar., 2006). Takođe, Hassan i koautori (2016) navode da aplikacija limunske kiseline nije doprinela povećanom

usvajanju Cd kod vrste *Corchorus olitorius*, dok je usvajanje Cd uz primenu limunske kiseline bilo značajno veće kod vrste *Poa pratensis* u odnosu na isti tretman bez ovog helatora (Wang i sar., 2017). Jedan od mogućih razloga za uspešnu primenu limunske kiseline kao helatora je njena uloga u aktivaciji ATPaza na plazma membrani ćelija korena, koje utiču na povećanje mobilnosti jona Cd kroz apoplast i simplast (Najeeb i sar., 2011). Pored toga, organske kiseline u rizosferi deluju tako što pospešuju usvajanje metala i već na nivou korena heliraju slobodne metalne jone u citosolu, čime povećavaju stopu difuzije ovih kompleksa u vakuolu i sprečavaju negativan uticaj metala na metabolizam ćelije (Chen i sar., 2006; Irtelli i Navari-Izzo, 2006).

Mogućnost nakupljanja određenog metala u različitim biljnim tkivima može se izraziti pomoću biokoncentracijskog faktora, koji pokazuje sposobnost biljke da akumulira dati metal u određenom tkivu. Najčešće korišćeni faktori su biokoncentracijski faktor korena (BKF korena) i nadzemnog dela biljke (BKF nadzemnog dela), koji pokazuju da li se usvojeni metal zadržava na nivou korena ili se translocira u nadzemne organe (Mattina i sar., 2003). Usvajanje metala i njihova distribucija u biljnim organima zavisi od mnogobrojnih faktora, izbora biljne vrste, količine metala u podlozi, kao i od fizičko-hemijskih karakteristika zemljišta (Nascimento i sar., 2006). Rezultati ove studije su pokazali da sa povećanjem sadržaja Cd u zemljištu dolazi do povećanja BKF korena, a isti trend je utvrđen i na kobinovanim tretmanima sa limunskom kiselinom (sa izuzetkom kod *S. viminalis* u prvom eksperimentu). Tokom prvog eksperimenta, najveća vrednost BKF korena je zabeležena na tretmanu L+Cd6 kod *S. viminalis* (2.63), dok je tokom drugog eksperimenta registrovana na istom tretmanu, ali kod *S. alba* (3.63). Slično rezultatima dobijenim u ovom radu, Melo i saradnici (2008) su zabeležili nižu akumulaciju metala u uslovima pojedinačne primene helata u odnosu na sukcesivnu aplikaciju limunske kiseline. Autori su utvrdili da se akumulacija Cd u biljkama ljubičastog pasulja (*Stizolobium aterrimum*), povećala za 32% na tretmanima gde je limunska kiselina dodata 3 puta, u odnosu na pojedinačan tretman ovom kiselinom. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da sukcesivna aplikacija ublažava negativan efekat degradacije limunske kiseline u zemljištu, čime se dodatno povećava njena efikasnost u procesu fitoremedijacije. Poređenjem vrednosti biokoncentracijskog faktora korena i nadzemnih organa, u ovom radu je utvrđeno povećanje sadržaja Cd u nadzemnim organima svih analiziranih klonova, u odnosu na BKF korena. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa istraživanjem Kacálková i saradnika (2015), gde su autori zabeležili vrednosti BKF korena u opsegu od 0.35 do 3.8, odnosno BKF listova od 3.97 do 15.4 kod vrsta *Salix rubens* i *Salix x smithiana* koje su gajene u prisustvu niske koncentracije Cd od 1.5 mg/kg zemljišta. Slično tome, Tözser i saradnici (2018) naglašavaju

visoku vrednost BKF u listovima *S. viminalis* kod biljaka gajenih u zemljištu koje je umereno zagađeno kadmijumom. Nasuprot tome, niska stopa translokacije i zadržavanje Cd na nivou korena registrovani su kod biljaka *S. alba* koje su gajene tokom 112 dana u zemljištu koje je sadržavalo 2.9 mg/kg Cd (Bedel i sar., 2009). Navedeni autori su zabeležili vrednost BKF korena od 3.38, dok je u listovima vrednost BKF iznosila 0.42. Različiti literaturni navodi pokazuju da distribucija Cd u biljnom tkivu direktno zavisi od analizirane vrste, odnosno klona vrba (Cocozza i sar., 2011; Yang i sar., 2015a).

Raspodela Cd u biljnom tkivu predstavlja indirektan pokazatelj aktivacije mehanizama odbrane na povećan sadržaj metala u biljkama. Smanjena mobilnost Cd u nadzemne organe i njegovo zadržavanje na nivou korena, omogućava da se štite fotosintetički organi, čime se postiže očuvanje visoke produkcije nadzemne biomase biljaka (Han i sar., 2013). Sa druge strane, visoka mobilnost teških metala i njihovo premeštanje u nadzemne organe (izdanci i listovi) ima ključnu ulogu u odabiru vrsta za proces fitoekstrakcije (Pulford i Watson, 2003; Tózsér i sar., 2018). Uzevši u obzir činjenicu da apscisija listova može dovesti do vraćanja metala u zemljište, nakupljanje metala u izdancima i granama predstavlja jedan od selektivnih kriterijuma pri izboru vrste za proces fitoekstrakcije (Antoniadis i sar., 2017). Rezultati ovog istraživanja su pokazali da je distribucija Cd u različitim biljnim organima zavisila od odabira klona, kao i od primenjenog tretmana. Na osnovu distribucije Cd u biljnom tkivu, utvrđeno je da je najmanji sadržaj ovog metala akumuliran u izdancima. Nasuprot dobijenim rezultatima, Kacálková i saradnici (2015) su zabeležili da se sadržaj Cd u različitim vrstama iz roda *Salix* kretao u opadajućem nizu list > izdanak > koren. Autori su utvrdili da se 82–97% od ukupno usvojenog Cd translociralo u nadzemne biljne organe.

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da je primena kombinovanih tretmana na mobilnost Cd zavisila od primenjene doze kadmijuma i analiziranog klona. Najveći stepen povećanja translokacijskog faktora usled primene kombinovanog tretmana (Cd+LK) utvrđen je kod *S. viminalis*. Slično tome, u istraživanju Mnasri i saradnika (2015) primena limunske kiseline je dovela do povećanja sadržaja Cd i Ni u nadzemnom delu biljaka, što je zabeleženo kod halofitne vrste *Sesuvium portulacastrum*. Zajedno sa povećanjem sadržaja metala u nadzemnom delu, utvrđeno je i povećanje koncentracije citrata, odnosno njegovo smanjenje u korenu. Ove rezultate autori objašnjavaju ulogom limunske kiseline u transportu metala Cd i Ni od korena ka nadzemnim delovima, te povećanje koncentracije ove karboksilne kiseline u ksilemskom soku doprinosi premeštanju ovih metala u nadzemne delove biljaka. Suprotno tome, u drugom eksperimentu ovog istraživanja utvrđeno je da aplikacija limunske kiseline

nije dovela do povećanja translokacije Cd iz korena u nadzemne organe kod vrste *S. matsudana*. Ovako dobijeni rezultati su bili pozitivno korelisani sa povećanjem biokoncentracijskog faktora u korenu ove vrste na kombinovanom tretmanu, u odnosu na tretman nehelatiranim Cd. Visoka akumulacija Cd i njegovo zadržavanje na nivou korena može se objasniti visokim stepenom vakuolarne sekvestracije u ćelijama korena, čime je sprečeno njegovo dalje premeštanje u nadzemne organe biljaka (Antoniadis i sar., 2017).

5.3. Uticaj kadmijuma i limunske kiseline na produkciju biomase i tolerantnost analiziranih klonova vrba

Visoka produkcija nadzemne biomase vrba, kao i njihova visoka tolerantnost na povišen sadržaj metala u zemljištu, predstavlja osnovu efikasnosti ovih vrsta u procesu remedijacije zemljišta (Magdizak i sar., 2017). S obzirom da se vrbe odlikuju intenzivnim rastom, posebno tokom prve 2-3 godine gajenja, tokom ovog vremenskog perioda uspostavlja se realan potencijal vrsta, odnosno klonova, za proces fitoekstrakcije (Zhivotovsky i sar., 2011). U poređenju sa hiperakumulatorskim vrstama, vrbe se odlikuju nešto nižim stepenom akumulacije, ali velikom produkcijom biomase (Greger i Landberg, 2015; Salam i sar., 2016). Na osnovu rezultata dosadašnjih istraživanja, vrste iz roda *Salix* se generalno smatraju rezistentnim na prisustvo niskih koncentracija Cd u biljnom tkivu (Landberg i Greger, 2002b; Dos Santos Utmazian i sar., 2007). Međutim, u literaturi se navodi da postoji direktna negativna korelacija između produkcije biomase i akumulacije Cd u biljkama (Marmirolli i sar., 2011). Toksične koncentracije ovog metala u biljnom tkivu vrba pokazuju inhibitorno dejstvo na produkciju biomase, dovode do smanjenja dužine izdanka i korena, kao i smanjenja površine listova (Robinson i sar., 2000; Zacchini i sar., 2009; Luković i sar., 2012; Nikolić i sar., 2015; Salam i sar., 2016). Usporen rast biljaka je u vezi sa uticajem Cd na metabolizam biljaka. Naime, kadmijum dovodi do smanjenog usvajanja neophodnih makroelemenata, utiče na aktivnost antioksidativnih enzima, uzrokuje redukciju sinteze hlorofila, što posledično dovodi do smanjenja rasta i produkcije biomase biljaka (Han i sar., 2013).

Rezultati ove studije su pokazali varijabilnost posmatranih morfoloških karaktera u zavisnosti od odabranog klona, primenjene koncentracije kadmijuma, kao i od uslova gajenja vrba, odnosno prisustva limunske kiseline. Primenjeni tretmani nisu doveli do pojave vidljivih simptoma toksičnosti, poput hloroze i nekroze, što potvrđuje rezistentnost odabranih klonova na primenjene koncentracije Cd. Sa povećanjem koncentracije Cd u zemljištu utvrđen je trend smanjenja analiziranih morfometrijskih parametara. Poredeći rezultate dvogodišnjeg

eksperimenta utvrđena je veća produkcija mase korena u uslovima dodatka treseta i sukcesivne aplikacije limunske kiseline. Pored toga, u drugom eksperimentu nisu zabeležene signifikantne razlike u masi korena između primenjenih tretmana i kontrole, dok je tokom prvog eksperimenta zabeleženo značajno smanjenje mase korena kod *S. matsudana* i *S. alba* pri obe primenjene doze Cd. Ovi rezultati sugerišu da je aplikacija treseta i sukcesivna primena limunske kiseline doprinela efikasnijem rastu biljaka u zemljištu kontaminiranom Cd. Primena treseta predstavlja dodatni izvor organske materije što stimuliše produkciju biomase biljaka izloženih dejstvu kadmijuma. Slične rezultate su zabeležili Stanisławska-Glubiak i saradnici (2012), koji su utvrdili povećanje mase izdanka za 20% kod biljaka *S. viminalis* koje su gajene na zemljištu u koje je dodat treset, u poređenju sa biljakama gajenim u zemljištu bez dodatka treseta. Takođe, autori su zabeležili signifikantno povećanje mase izdanka biljaka koje su gajene na tretmanu Cd+Pb+treset u odnosu na isti tretman bez treseta.

U novije vreme sve veći broj istraživanja ukazuje na stimulativnu ulogu limunske kiseline na rast biljaka u prisustvu povišenih koncentracija različitih metala poput Cd, Pb, Cr i dr. (Freitas i sar., 2013; Ehsan i sar., 2014; Afshan i sar., 2015). U skladu sa prethodnim studijama, rezultati ovog istraživanja su pokazali pozitivan uticaj primene limunske kiseline na biomasu izdanka, mladih i starih listova. Jedan od mogućih razloga za to je povećana sekvencijacija teških metala u vakuoli, u uslovima prisustva limunske kiseline. Samim tim negativno dejstvo prisustva jona teških metala u biljnom tkivu je ublaženo, što je direktno povezano sa povećanjem biomase biljaka. Farid i saradnici (2017) navode da primena ove organske kiseline kao helatora dovodi do značajnog ublažavanja toksičnosti indukovane visokom akumulacijom metala, što doprinosi održavanju visoke produkcije biomase i u uslovima povećanih koncentracija metala. Autori su utvrdili značajno povećanje mase korena, izdanka i listova na kombinovanim tretmanima Cr i limunske kiseline, u odnosu na tretmane Cr bez dodatka ovog helatora. Dobijeni rezultati su pozitivno korelisani sa prethodnim studijama (Evangelou i sar., 2007; Melo i sar., 2008) koje naglašavaju pozitivnu ulogu limunske kiseline na bioprodukciju, kao i smanjenu fitotoksičnost ovog helatora u odnosu na sintetske helatore koji se mogu koristiti u procesu asistiranе fitohelacije. Slično navode Gao i saradnici (2010) koji su utvrdili povećanje biomase korena, izdanka i listova u prisustvu 50 mg/kg Cd uz dodatak limunske kiseline od 20 mM, što je registrovano kod biljaka krompira. Prisustvo limunske kiseline potencijalno uzrokuje biohemijsku transformaciju metala i prevodi ih u manje toksične oblike (metal-helatni kompleks), čime je omogućen nesmetan rasta biljaka

i u uslovima umereno povećanih koncentracija metala u zemljištu/biljkama (Najeeb i sar., 2011).

Pored svega navedenog, važno je naglasiti činjenicu da primenjena doza ovog helatora ima značajnu ulogu na njegovo dejstvo na biljke. U literaturi se navodi da niske koncentracije ovog helatora mogu imati stimulatívno dejstvo na usvajanje metala iz zemljišta, dok povećanje doze ovog helatora može uzrokovati pojavu fitotoksičnih efekata na biljkama, usled povećanog usvajanja i akumulacije teških metala u biljnom tkivu (Farid i sar., 2017). Rezultati dobijeni u ovom istraživanju su pokazali da sukcesivna aplikacija limunske kiseline nije značajno uticala na promenu analiziranih morfometrijskih parametara odabranih klonova vrba u poređenju sa tretmanima bez limunske kiseline. Suprotno rezultatima prikazanim u ovom radu, Aderholt i saradnici (2017) su utvrdili da primena limunske kiseline od 40 mM/kg zemljišta može dovesti do pojave hlorotičnih listova, kao i nekroze tkiva, što je primećeno na biljkama *Panicum virgatum* koje su bile izložene dejstvu Cd i limunske kiseline. Slično tome Evangelou i koautori (2006) su utvrdili značajnu redukciju biomase biljaka duvana gajenim na tretmanu limunske kiseline od 125 mM/kg zemljišta u kombinaciji sa povišenim koncentracijama Pb i Cu u zemljištu. Autori navode da je primenjena doza limunske kiseline indukovala smanjenje pH vrednosti zemljišta na 4, što je doprinelo povećanom usvajanju jona teških metala, a što se negativno odrazilo na rast biljaka i produkciju biomase.

Tolerantnost biljaka na povišene koncentracije teških metala predstavlja neophodan preduslov za očuvanje fizioloških i metaboličkih procesa biljaka, kao i za njihovu upotrebu u fitoremedijaciji (Pietrini i sar., 2003; Marmirolli i sar., 2011). Za ispitivanje tolerantnosti biljaka prema teškim metalima koriste se parametri produkcije rasta biljaka: biomasa listova, izdanka, masa i dužina korena, na osnovu kojih je moguće utvrditi adaptabilnost biljaka na izmenjene uslove životne sredine (Wilkins, 1978). Otpornost biljaka na povišene koncentracije teških metala najpre se ogleda u smanjenju štetnih efekata na morfološke osobine biljaka, pre svega na nivou korena, kao što su, dužina, zapremina i masa korena (Hakmaoui i sar., 2007). Na nivou korena, tolerantnost biljaka se zasniva na selektivnosti ćelijske membrane da propušta jone metala i da omogući njihov prolazak i dalji transport ksilemom. Rezultati ove studije su pokazali da su obe primenjene doze Cd (tretmani Cd3 i Cd6) dovele do značajne redukcije mase i zapremine korena kod *S. matsudana* i *S. alba*, što nije utvrđeno kod *S. viminalis*. Dobijeni rezultati su pozitivno korelisani sa rezultatima istraživanja Zacchini i saradnika (2009), koji su utvrdili značajnu redukciju dužine korena kod *S. alba*, koja je gajena metodom vodenih kultura pri koncentraciji od 50 μ M Cd.

Rezultati ovog istraživanja su pokazali negativan uticaj obe primenjene doze Cd na površinu starih listova kod svih analiziranih klonova. Međutim, aplikacija limunske kiseline u drugom eksperimentu je imala stimulatívno dejstvo na rast biljaka, tako da i pri povećanim koncentracijama Cd nije utvrđena značajna promena u površini starih listova kod biljaka gajenih na kombinovanim tretmanima (L+Cd3 i L+Cd6) u odnosu na tretman L. Slično ovim rezultatima, Kim i Lee (2010) navode da primena limunske kiseline od 10 mM/kg zemljišta nije dovela do smanjenja rasta biljaka *Echinochloa crus-gali*, uz istovremeno povećanje akumulacije Cd, dok je primena sintetskih helatora u vidu EDTA uzrokovala signifikantnu redukciju u rastu biljaka.

Do sada je potvrđeno da vrbe pokazuju visoku efikasnost u remedijaciji umereno zagađenih zemljišta (Rosseli i sar., 2003, Kuzovkina i sar., 2004; Jensen i sar., 2009; Kacálková i sar., 2015; Tózsér i sar., 2018). Međutim, odabir vrste u okviru roda *Salix*, izbor klona, pa čak i pol biljke mogu uticati na sposobnost biljaka da ekstrahuju metale iz zemljišta (Magdiziak i sar., 2017). Lux i saradnici (2004) navode da se vrste koje pokazuju indeks tolerancije (TI) ≥ 60 mogu okarakterisati kao visoko tolerantne vrste. Rezultati ovog rada su pokazali da među analiziranim vrstama, postoji značajna varijabilnost u tolerantnosti biljaka na stres kadmijumom. Na osnovu vrednosti indeksa tolerancije utvrđeno je da *S. matsudana* pokazuje najveću tolerantnost na stres kadmijumom, dok je najmanja vrednost TI registrovana kod vrste *S. alba* (Slike 20 i 29). Visoka tolerantnost različitih klonova vrste *S. matsudana* na prisustvo Cd u zemljištu je utvrđena u većem broju istraživanja (Dos Santos Utmazian i sar., 2007; Yang i sar., 2015b). Na osnovu dobijenih vrednosti za indeks tolerancije proističe da se vrste *S. matsudana* i *S. viminalis* mogu definisati kao visoko tolerantne vrste, dok se indeks tolerancije kod *S. alba* kretao u rasponu od 50 do 64, te se ova vrsta karakteriše kao umereno do visoko tolerantna vrsta. Različita tolerantnost biljaka na stres Cd može se utvrditi kako između različitih vrsta, tako i na nivou različitih klonova (Mleczeck i sar., 2017). Landberg i Greger (2002a) su zabeležili signifikantne razlike u tolerantnosti različitih klonova vrste *S. viminalis* na prisustvo povećanih koncentracija kadmijuma, te je kod Cd senzitivnih klonova zabeležena vrednost TI od 15 do 25, dok se kod rezistentnih klonova tolerantnost kretala u rasponu od 71 do 82. Vassilev i saradnici (2005) su poredili tolerantnost različitih klonova *S. viminalis* i *S. alba* koje su gajili metodom vodenih kultura u prisustvu različitih koncentracija Cd, pri čemu je utvrđena veća tolerantnost kod *S. alba* u poređenju sa analiziranim klonom vrste *S. viminalis*, što je suprotno od rezultata koji su dobijeni u ovoj studiji.

Dodatak limunske kiseline pokazao je varijabilan uticaj na indeks tolerancije u zavisnosti od analiziranog klona i primenjenog tretmana. Kod vrsta *S. viminalis* i *S. alba* povećanje tolerantnosti biljaka je zabeleženo na tretmanu L+Cd6, dok je aplikacija limunske kiseline pri tretmanu L+Cd3 uticala na povećanje tolerantnosti kod vrste *S. matsudana*, što je i potvrđeno tokom drugog eksperimenta. U literaturi se navodi da organske kiseline mogu uticati na povećanje tolerantnosti biljaka na prisustvo Cd helatiranjem ovog metala, odnosno obrazovanjem organo-metalnih kompleksa, preko kojih se vrši premeštanje metalnih jona iz citosola u vakuolu, a time se umanjuje negativan uticaj ovih polutanata na fundamentalne fiziološke procese u biljkama (Fernández i sar., 2014; Guo i sar., 2017). Sa druge strane, dodatak različitih helatora u cilju pospešivanja akumulacije teških metala u biljkama, može posledično dovesti do smanjenja rasta biljaka, te adekvatna upotreba ovih jedinjenja predstavlja jedan od preduslova za njihovu efikasnu upotrebu.

5.4. Uticaj kadmijuma i limunske kiseline na sadržaj neophodnih makroelementa azot (N), fosfor (P) kalijum (K)

Kadmijum ispoljava toksično dejstvo na metabolizam biljaka tako što dovodi do redukcije u usvajanju makronutrijenata, uzrokuje značajne promene u metabolizmu azota i sumpora, što posledično dovodi do disbalansa različitih fiziološko-biohemijskih puteva (Gomes i sar., 2013; Mahmud i sar., 2018). Rezultati ove studije su pokazali blago smanjenje parametara rasta kod biljaka gajenih na tretmanu Cd6, što se može dovesti u vezu sa smanjenjem sadržaja neophodnih makroelemenata, N, P i K koje je registrovano kod ovih biljaka. Do sada je dobro poznato da prisustvo kadmijuma u biljnom tkivu može da inhibira usvajanje neophodnih makronutrijenata, što dalje utiče na rast i razvoj biljaka (Salt i sar., 1998). Kadmijum u biljnom tkivu utiče na sadržaj makro i mikronutrijenata, jer stupa u kompeticiju sa različitim biogenim elementima (K, Ca, Mg, Fe) za vezivanje za proteinske nosače na membrani ćelije, što može da dovede do smanjenog usvajanja neophodnih elemenata (Lunáčková i sar., 2003). U ovom radu je utvrđena tendencija povećanja sadržaja azota u mladim listovima biljaka gajenih na tretmanu Cd3, sa izuzetkom kod *S. matsudana* u drugom eksperimentu, gde je zabeležen signifikantan pad sadržaja azota na tretmanu Cd3 u odnosu na kontrolu. Ovakav trend povećanja sadržaja azota pri niskoj koncentraciji Cd u biljnom tkivu navodi i Kebert (2014), koji je zabeležio povećanje sadržaja azota kod biljaka topola gajenih u zemljištu koje je sadržavalo 3 mg/kg Cd. Jedan od potencijalnih objašnjenja za ovakav rezultat je dodatak Cd u vidu nitratnih soli. Ove soli su lako rastvorljive, pa u zemljištu mogu

predstavljati dodatni izvor NO_3^- jona, što potencijalno može uticati na povećanje sadržaja azota u biljnom tkivu, čak i pri umerenom zagađenju zemljišta. U prilog tome, Irfan i saradnici (2013) su utvrdili da dobra obezbeđenost zemljišta nitratnim solima dovodi do povećanja sadržaja dostupnog oblika N, čime je pospešeno njegovo usvajanje od strane korena biljke, i u slovima prisustva Cd u zemljištu. Samim tim, adekvatna mineralna ishrana biljaka može doprineti povećanju tolerantnosti biljaka na prisustvo Cd. Slično navode Gomes i saradnici (2013) koji su ustanovili porast sadržaja azota u biljkama *Pfaffia glomerata* koje su gajene tokom 20 dana na tretmanu Cd od 15, 25, 45 i 90 $\mu\text{M/L}$. Nasuprot tome, tretman Cd6 je doveo do smanjenja sadržaja N, P, i K u mladim listovima svih analiziranih klonova. Negativan uticaj prisustva kadmijuma u biljnom tkivu na ukupan sadržaj mineralnih elemenata K, Mg, Ca i Fe zabeležen je i kod vrste *Juncus effusus* koja je gajena u prisustvu 50 i 100 μM Cd (Najeeb i sar., 2011). Suprotno rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji, Gomes i koautori (2013) su utvrdili povećanje sadržaja fosfora kod biljaka *Pfaffia glomerata* gajenih u prisustvu povećanih koncentracija Cd, a kao moguće objašnjenje autori navode ulogu fosfora u sintezi antioksidativnih enzima zaštite (posebno enzima superoksid-dismutaze i peroksidaza) koji se pojačano aktiviraju usled stresa indukovanog prisustvom Cd u biljnom tkivu. Takođe, fosfor je uključen u sintezu glutationa koji funkcioniše kao prekursor u sintezi fitohelatina (Sarwar i sar., 2010), a važan je konstituent visokoenergetskih jedinjenja poput ATPa.

Rezultati dobijeni u ovom radu su pokazali da je aplikacija limunske kiseline imala stimulativan uticaj na sadržaj makroelemenata u biljkama, te je dodavanje ovog helatora umanjilo negativan uticaj Cd na sadržaj azota, fosfora i kalijuma. Limunska kiselina povećava dostupnost hranljivih materija iz zemljišta tako što vrši helatiranje neorganskih komponenti zemljišnog matriksa koje se vezuju za fosfor, čime je olakšano njegovo usvajanje korenom (Mattina i sar., 2003). Signifikantno povećanje sadržaja makroelemenata je u najvećoj meri zabeleženo u korenu i starim listovima na kombinovanim tretmanima (L+Cd3 i L+Cd6) u odnosu na odgovarajući tretman nehelatiranim Cd. Sličan trend zabeležili su Aderholt i saradnici (2017), koji su utvrdili povećanje sadržaja fosfora kod biljaka *Panicum virgatum* koje su gajene metodom zemljišnih kultura na kombinovanom tretmanu olova i limunske kiseline. U ovom radu tretmani kadmijumom, kao i limunskom kiselinom su pokazali najmanji uticaj na sadržaj makroelemenata u izdanku biljaka. Ovako dobijeni rezultati su verovatno posledica najmanje akumulacije Cd u izdanku, u odnosu na ostale biljne organe, te se sadržaj N, P, K nije značajno razlikovao kod tretiranih biljaka u odnosu na kontrolu.

5.5. Uticaj kadmijuma i limunske kiseline na sadržaj fotosintetičkih pigmenata

U literaturi je dobro poznato da stres teškim metalima dovodi do mnogobrojnih promena na nivou hloroplasta i u velikoj meri utiče na smanjenu sintezu i pojačanu razgradnju pigmenata hloroplasta (Vassilev i sar., 2002). Samim tim, smatra se da promena sadržaja fotosintetičkih pigmenata u prisustvu povišenih koncentracija teških metala može poslužiti kao pokazatelj otpornosti određenog genotipa prema ovim polutantima (Krupa i sar., 1993). Uticaj teških metala na strukturu hloroplasta jedan je od ključnih mehanizama za razumevanje dejstva ovih polutanata na fiziološke procese kod biljaka, jer ove organele imaju ključno ulogu u procesu fotosinteze (Hakmaoui i sar., 2007). Promene u strukturi hloroplasta uslovljene prisustvom povećanih koncentracija teških metala dovode do narušavanja strukture membrana tilakoida, što se može manifestovati smanjenm veličinom i brojem hloroplasta, kao i smanjenim sadržajem fotosintetičkih pigmenata (He i sar., 2013). Veliki broj literaturnih izvora ukazuje na toksičan efekat različitih doza Cd na sadržaj fotosintetičkih pigmenata kod različitih vrsta vrba (Lunáčková i sar., 2003; Hakmaoui i sar., 2007; Nikolić i sar., 2015).

U ovoj studiji je zabeležen pad sadržaja pigmenata sa trendom povećanja sadržaja Cd u biljnom tkivu. Aplikacija Cd od 3 mg/kg (MDK vrednost) nije statistički značajno uticala na sadržaj hlorofila *a* u odnosu na kontrolne biljke, dok je u drugom eksperimentu tretman Cd3 delovao stimulatивно na sadržaj hlorofila *a*, što je utvrđeno kod *S. viminalis* i *S. alba*. Pietrini i saradnici (2010) navode da neke vrste vrba i topola tolerišu prisustvo Cd u milimolarnim koncentracijama u listovima, što se verovatno zasniva na aktivaciji mehanizama odbrane. Pored toga, usvojeni Cd gradi komplekse sa organskim ili aminokiselinama i vrši njegovo premeštanje u vakuolu, čime se minimizira štetan efekat prisustva Cd na fotosintetičku aktivnost biljaka. U ovom radu je zabeleženo da je dodatak helatora doprineo povećanju sadržaja fotosintetičkih pigmenata u odnosu na tretmane bez limunske kiseline. Ovaj trend je zabeležen u drugom eksperimentu, gde je sukcesivna aplikacija limunske kiseline pozitivno uticala na sadržaj hlorofila *a* i *b* u odnosu na kontrolne biljke. Dobijeni rezultati su pokazali najveći uticaj limunske kiseline na sadržaj pigmenata kod vrste *S. viminalis* u poređenju sa ostalim analiziranim klonovima. Pozitivna uloga limunske kiseline na sadržaj pigmenata hloroplasta u prisustvu povišenih koncentracija Cd je registrovana kod vrste *Brassica napus* (Ehsan i sar., 2014). Shamshad i saradnici (2018) navode da je dodatak limunske kiseline kod biljaka graška gajenih u prisutvu Cd uzrokovao smanjenje sadržaja pigmenata hloroplasta u mladim listovima, dok je u starim listovima dodatak limunske kiseline imao stimulatívni efekat na sadržaj pigmenata. Pozitivan uticaj limunske kiseline na koncentraciju pigmenata

hloroplasta utvrđen je i kod biljaka suncokreta gajenih u prisustvu povišenih koncentracija hroma (Farid i sar., 2017). Međutim, u literaturi nedostaju podaci o uticaju limunske kiseline na sadržaj fotosintetičkih pigmenta drvenastih vrsta izloženih povećanim koncentracijama Cd.

Među hloroplastnim pigmentima, karotenoidi imaju značajnu protektivnu ulogu u stresnim uslovima i učestvuju u zaštiti fotosistema tako što uklanjaju kiseonične vrste nastale tokom ekscitacije hlorofila. Rezultati ovog istraživanja su pokazali tendenciju pada sadržaja karotenoida na tretmanima kadmijumom, dok aplikacija limunske kiseline u prvom ekperimentu nije značajno uticala na promenu sadržaja ovih pigmenta. Međutim, sukcesivna aplikacija limunske kiseline uz dodatak treseta je uticala na blago povećanje sadržaja karotenoida na tretmanu L+Cd6 u odnosu na Cd6 tretman, što je registrovano u mladim listovima vrsta *S. viminalis* i *S. alba*. Ovaj trend nije utvrđen u mladim listovima *S. matsudana*, što je verovatno rezultat signifikantno veće akumulacije Cd na kombinovanom tretmanu L+Cd6 u odnosu na tretman Cd6. Sintaza nisko-molekularnih komponenti poput karotenoida može biti indukovana pojačanom sintezom ROS formi, koje dovode do pojave oksidativnog stresa u prisustvu teških metala (Sytar i sar., 2013). Poznato je da karotenoidi mogu funkcionisati kao prihvaćajući ROS molekula što ukazuje na njihov značaj u borbi protiv slobodnih radikala čime se naglašava njihova antioksidativna uloga u ćeliji (Hassan i sar., 2017). Pozitivan uticaj niskih doza limunske kiseline na povećanje sadržaja karotenoida za 37% utvrđen je kod biljaka *Boehmeria nivea* gajenih metodom vodenih kultura u prisustvu kadmijuma (Li i sar., 2014).

5.6. Uticaj kadmijuma i limunske kiseline na parametre razmene gasova

Negativan uticaj kadmijuma na intenzitet fotosinteze, stomatalnu provodljivost, kao i na efikasnost transpiracije dokumentovan je u velikom broju studija (Pajević i sar., 2009; Pietrini i sar., 2010; Sytar i sar., 2013; Nikolić i sar., 2015; Župunski i sar., 2016). Visok sadržaj ovog metala u nadzemnim organima, posebno u listovima, dovodi do inhibicije biosinteze hlorofila i karotenoida, smanjuje asimilaciju ugljendioksida, a što posledično uzrokuje usporen rast biljaka i smanjenje produkcije biomase (Shahid i sar., 2016). Rezultati ove studije pokazuju značajno smanjenje parametara razmene gasova, intenziteta fotosinteze i transpiracije, kao i efikasnosti korišćenja vode u uslovima povišenih koncentracija Cd. U radu je utvrđeno linearno smanjenje intenziteta fotosinteze sa povećanjem sadržaja Cd u zemljištu. Inhibitorni efekat veće primenjene doze Cd (tretman Cd6) na intenzitet fotosinteze najjače je bio izražen kod *S. viminalis*, dok je najmanji procenat smanjenja zabeležen kod vrste *S. alba*, što je utvrđeno

tokom oba eksperimenta. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa istraživanjima Lunáčková i saradnici (2003) koji naglašavaju inhibični efekat prisustva Cd (vrbe su gajene tokom 21 dana u vodenim kulturama na tretmanu 10 μ M Cd) na neto fotosintezu kod vrste *S. viminalis*. Istovremeno, navedeni tretman nije značajno uticao na promenu intenziteta fotosinteze kod vrste *S. alba* u odnosu na kontrolu. Povišene koncentracije Cd u biljnom tkivu utiču na smanjenje difuzije CO₂ kroz stome, a redukcija asimilacije CO₂ dalje vodi do pada neto fotosinteze (Pietrini i sar., 2010). Smanjenje asimilacije CO₂ je direktnoj vezi sa padom stomatalne provodljivosti koja je najjače bila izražena na tretmanu Cd6 kod vrste *S. viminalis*. Slične rezultate su zabeležili He i saradnici (2011), koji navode smanjenje provodljivosti gasova kroz stome usled prisustva Cd, kao i inhibiciju fotosinteze, što je utvrđeno kod biljaka topola (*Populus x canescens*). Smanjenje stomatalne provodljivosti u uslovima povišenih koncentracija Cd, zajedno sa promenama intercelularne koncentracije CO₂, ukazuje na ulogu stominog aparata u smanjenju intenziteta fotosinteze (Gill i sar., 2012). U prisustvu Cd u biljnom tkivu dolazi do indukcije zatvaranja stoma pod dejstvom abscisinske kiseline, što može dovesti do smanjenja neto fotosinteze (Salt i sar., 1995). Pored toga, usled zatvaranja stoma i redukcije neto asimilacije CO₂ dolazi do povećanja intercelularne koncentracije ugljen-dioksida (ci), što je potvrđeno u ovom radu. Takođe, toksične koncentracije Cd mogu indirektno uticati na neto fotosintezu, jer mogu dovesti do substitucije neophodnih elemenata poput Fe, Mg, Mn i Zn koji su važni kofaktori enzima, a čije je smanjeno usvajanje posledica povećanog usvajanja jona kadmijuma (Pietrini i sar., 2010). Poređenjem uticaja Cd na intenzitet fotosinteze (A) utvrđeno je da je najmanji stepen redukcije intenziteta fotosinteze zabeležen kod vrste *S. alba* u odnosu na ostale analizirane vrste. Sa druge strane, na osnovu indeksa tolerantnosti ova vrsta se pokazala kao najmanje tolerantna na prisutvo Cd u poređenju sa ostalim analiziranim vrstama. Jedno od mogućih objašnjenja za ovakav rezultat je distribucija Cd u biljnom tkivu listova. Kako Pietrini i saradnici (2010) navode, kod ove vrste usvojeni Cd se pretežno zadržava oko glavnog nerva, čime je fotosintetičko tkivo u velikoj meri zaštićeno od štetnog delovanja ovog metala. Efikasnost korišćenja vode ukazuje na zavisnost vodnog balansa od asimilacije CO₂ i predstavlja bitan pokazatelj aklimatizacije biljaka na promenjene uslove životne sredine, te je od velikog značaja za odabir genotipova pogodnih za proces fitoekstrakcije.

Primena helatora u vidu limunske kiseline u kontaminiranom zemljištu može uticati na efikasnost korišćenja vode, dovesti do povećanog usvajanje nutrijenata, što stimulatивно deluje na rast biljaka, dok se procesi fotosinteze i transpiracije održavaju na visokom nivou

(Ehsan i sar., 2014). Poređenjem fotosintetičke aktivnosti biljaka tokom prvog i drugog eksperimenta utvrđen je veći intenzitet fotosinteze u drugom eksperimentu, što može biti u vezi sa sukcesivnom aplikacijom LK i sa dodatkom treseta. Ovo se može objasniti činjenicom da je tokom drugog eksperimenta najveći sadržaj Cd registrovan u korenu, dok je u prvom eksperimentu najveći sadržaj ovog metala detektovan u mladim listovima. Iz ovoga se može zaključiti da su primena treseta i sukcesivna aplikacija LK dovele do smanjenja fitotoksičnosti Cd na fotosintetičke organe, čime je obezbeđena visoka fotosintetička aktivnost biljaka. Pozitivan uticaj primene treseta na intenzitet fotosinteze je utvrđen kod biljaka *S. viminalis* gajenih u zemljištu koje sadrži povećan sadržaj Cd i Pb (Stanisławska-Glubiak i sar., 2012). Autori navode da je intenzitet fotosinteze u biljkama koje su gajene u zemljištu koje je sadržavalo treset u kombinaciji sa povećanim koncentracijama Cd i Pb bio znatno veći u poređenju sa fotosintetičkom aktivnošću biljaka gajenim u kontaminiranom zemljištu bez dodatka treseta. Održavanje intenziteta fotosinteze na visokom nivou direktno utiče na visoku produkciju biomase biljaka, što doprinosi efikasnijoj fitoekstrakciji. U drugom eksperimentu je zabeleženo statistički značajno povećanje neto fotosinteze, kao i povećanje stomatalne provodljivosti kod biljaka *S. matsudana* gajenih na tretmanu limunskom kiselinom, u odnosu na kontrolni tretman. U prilog tome, istraživanje Guo i saradnika (2017) je ukazalo na značaj organskih kiselina na otvaranje stoma, regulaciju transporta K⁺ jona i održavanje citosolne pH vrednosti kod biljaka iz roda *Miscanthus*, koje su gajene u prisustvu povišenih koncentracija Cd u zemljištu.

5.7. Uticaj kadmijuma i limunske kiseline na akumulaciju aminokiseline prolina

Akumulacija aminokiseline prolina predstavlja jedan od značajnih indikatora izloženosti biljaka različitim abiotičkim faktorima, poput vodnog deficita ili visokih koncentracija teških metala (Bauddh i sar., 2016). Prolin je heterociklična aminokiselina čija je sinteza genetski kontrolisana, a pojačana ekspresija gena koji dovode do hiperprodukcije ove aminokiseline smatra se mehanizmom detoksifikacije teških metala (Xu i sar., 2009). Visoka produkcija ove aminokiseline smatra se aktivnim odgovorom odbrane biljaka na promenjene uslove životne sredine i pokazuje niz pozitivnih efekata na metabolizam biljke (Sharma i Dietz, 2006). Najpre, prolin ima ulogu da stabilizuje osmotske uslove u ćeliji i smatra se kompatibilnim osmolitom koji štiti subcelularne strukture i makromolekule u nepovoljnim uslovima životne sredine (Ahmad i sar., 2012). Veliki broj studija ukazuje na značaj prolina kao osmoprotektanta u uslovima prisustva toksičnih koncentracija teških metala u ćeliji

(Verbruggen i Hermans, 2008; Irfan i sar., 2013; Xie i sar., 2014). Takođe, prolin sprečava denaturaciju enzima (Sharma i Dietz, 2009), utiče na acidifikaciju citosola, štiti integritet ćelijskih membrana od prekomerne produkcije slobodnih radikala (Xu i sar., 2009). Povećana sinteza ove aminokiseline predstavlja aktivaciju neenzimskog sistema odbrane i ima ulogu u prihvatanju singlet kiseonika, čime se smanjuje efekat oksidativnog stresa koji nastaje kao posledica toksičnih koncentracija teških metala (Sharma i Dietz, 2009). Samim tim, akumulacija ove aminokiseline se smatra korisnim markerom za procenu tolerantnosti biljaka na prisustvo teških metala (Nikolić i sar., 2008; Xie i sar., 2014).

Rezultati ovog istraživanja su pokazali varijabilnost u sadržaju prolina u zavisnosti od primenjenog tretmana, starosti listova, kao i od analiziranog genotipa. Generalno gledano, koncentracija ove aminokiseline je bila znatno veća u mladim u odnosu na stare listove. Prema navodima Verbruggen i Hermans (2008) biosinteza prolina se pre svega vrši u apikalnom meristemu i mladim listovima, gde dolazi do nakupljanja ove aminokiseline, dok je u starim listovima produkcija prolina ograničena samo na pojedine delove lista (nervatura lista, dlake i dr.). Kao što je napred navedeno, prolin ima ulogu antioksidanta u ćeliji i vrši zaštitu ćelije od slobodnih radikala (Alayat i sar., 2014), te je pojačana sinteza prolina u mladim listovima direktno uslovljena većom akumulacijom Cd u mladim u odnosu na stare listove. He i saradnici (2011) su zabeležili relativno malu produkciju prolina od 2 do 2.5 mg/g suve mase kod vrste *Populus x canescens* na tretmanu 50 μ M Cd, što ukazuje na slabu efikasnost prolina u reakcijama odbrane od oksidativnog stresa kod ovih biljaka. Povećanje sadržaja prolina sa porastom koncentracije Cd (2.5, 25, 50, 75 i 100 μ M) u hranljivom medijumu je registrovano kod biljaka pšenice (*Triticum durum*) koje su gajene tokom 14 dana (Alayat i sar., 2014). Rezultati prikazani u ovom radu su u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima, tako da je potvrđeno da sa porastom sadržaja Cd u biljnom tkivu dolazi do pojačane sinteze aminokiseline prolina. Prema navodima Xu i saradnika (2009) hiperprodukcija slobodnog prolina ima ulogu da neutrališe toksične efekte Cd, tako što utiče na povećanje produkcije glutaciona i dovodi do promena u aktivnosti antioksidativnih enzima.

Dobijeni rezultati u ovom radu ukazuju na značaj primene limunske kiseline na biosintezu prolina. Naime, kod biljaka gajenih na tretmanima L+Cd3 i L+Cd6 utvrđeno je smanjenje sinteze ove aminokiseline u odnosu na odgovarajući tretman nehelatiranim Cd. Takođe, u mladim listovima *S. matsudana* pri sukcesivnoj aplikaciji LK uz dodatak treseta utvrđeno je signifikantno smanjenje produkcije ove aminokiseline. Među analiziranim klonovima, najveća produkcija prolina je registrovana kod vrste *S. alba*. Visoka produkcija ove

aminokiseline ukazuje na smanjenu tolerantnost ove vrste na primenjene tretmane, što je utvrđeno i na osnovu vrednosti indeksa tolerancije, koji pokazuje najmanju vrednost u poređenju sa ostalim aniziranim vrstama. Kada je u pitanju uticaj limunske kiseline na produkciju prolina, signifikantno smanjenje ovog osmolita je utvrđeno i u studiji Hassan i saradnika (2016). Autori su zabeležili smanjenje sinteze prolina kod biljaka sleza koje su bile izložene kombinovanom tretmanu Cd+LK u odnosu na tretman nehelatiranim Cd, čime sugerišu protektivnu ulogu LK u prevenciji oksidativnog stresa, odnosno toksičnog dejstva Cd.

5.8. Uticaj kadmijuma i limunske kiseline na sadržaj ukupnih proteina

Promena sadržaja ukupnih rastvorljivih proteina smatra se indikatorom oksidativnog stresa. Prisustvo teških metala u biljnoj ćeliji često je negativno korelisano sa sadržajem ukupnih rastvorljivih proteina u ćeliji (Shakoor i sar., 2014). Značajno smanjenje sadržaja proteina utvrđeno je kod biljaka graška gajenih tokom 15 dana na tretmanu 50 μM CdCl₂ (Romero-Puertas i sar., 2007). Sličan trend smanjenja ukupnih rastvorljivih proteina registrovan je i kod biljaka *Brassica napus*, gajenih na tretmanima 10 i 50 μM Cd (Ehsan i sar., 2014). Smanjenje sadržaja rastvorljivih proteina kod biljaka izloženih povećanim koncentracijama teških metala može biti rezultat povećanja aktivnosti proteaza, kao i različitih posttranslatorskih modifikacija koje dovode do strukturnih promena proteina što indukuje njihovu denaturaciju, a time i pad ukupne količine proteina (Hassan i sar., 2017). Nasuprot tome, određene studije pokazuju povećanje sadržaja ukupnih rastvorljivih proteina u prisustvu teških metala, što se objašnjava povećanom sintezom proteina stresa, poput enzima koji imaju ulogu u sintezi glutaciona, fitohelatina ili heat-shock proteina (Mishra i sar., 2006).

Rezultati ove studije su pokazali da koncentracija rastvorljivih proteina statistički značajno varira u zavisnosti od ispitivanog genotipa vrba, primenjenog tretmana, kao i od starosti listova. Povećana koncentracija Cd, kao i dodatak limunske kiseline su pokazali veći uticaj na promenu sadržaja rastvorljivih proteina u mladim, u odnosu na stare listove, gde je registrovano njihovo povećanje u odnosu na kontrolu. Slično tome, Ouyang i saradnici (2017) su utvrdili porast sadržaja proteina kod biljaka *S. babylonica* izloženih tretmanima 50 i 100 μM Cd tokom 28 dana. U literaturi se navodi da Cd ima visok afinitet ka tiolnim grupama proteina, te povećanje koncentracije ovog metala u biljnom tkivu utiče na pojačanu sintezu metal-vezujućih proteina poput glutaciona i fitohelatina, što posledično dovodi do uvećanja sadržaja ukupnih proteina u biljkama (Xu i sar., 2009). Takođe, povećana sinteza i aktivnost različitih antioksidativnih enzima koji su uključeni u mehanizme odbrane od stresa, može da dovede do

porasta ukupnih rastvorljivih proteina (Wu i sar., 2016). Podaci dobijeni u ovom istraživanju su pokazali da je primena limunske kiseline u zemljištu koje sadrži 2*MDK dozu Cd (tretman L+Cd6) doprinela povećanju sadržaja ukupnih rastvorljivih proteina u poređenju sa njihovim sadržajem u biljkama na tretmanu Cd6. Rezultati ovog rada su u saglasnosti sa većim brojem studija koji naglašavaju stimulativan uticaj ovog helatora na sadržaj rastvorljivih proteina u uslovima povećanih koncentracija teških metala. Afshan i koautori (2015) navode da je primena limunske kiseline dovela do signifikantnog povećanja sadržaja proteina u korenu i listovima kod vrste *Brassica napus* koja je gajena na tretmanima 100 i 500 μM Cr, u odnosu na isti tretman bez limunske kiseline. Ovakav trend je zabeležen i kod biljaka *Brassica napus* koje su gajene na tretmanima 10 i 50 μM Cd (Ehsan i sar., 2014), kao i kod biljaka gajenim na tretmanima 50 i 100 μM Cu (Zaheer i sar., 2015). Autori ističu da je ovakav sadržaj ukupnih rastvorljivih proteina uslovljen promenama aktivnosti i sadržaja enzimskih i neenzimskih komponenti antioksidativnog sistema zaštite, koje štite ćeliju od oksidativnih oštećenja u uslovima stresa.

5.9. Uticaj kadmijuma i limunske kiseline na produkciju enzimskih i neenzimskih komponenti antioksidativnog sistema zaštite

Toksičnost teških metala može se ispoljiti kroz promenu u redoks homeostazi u ćeliji i dovesti do disbalansa između stvaranja slobodnih radikala i njihove neutralizacije pomoću komponenti antioksidativnog sistema zaštite (Mittler i sar., 2011). Hiperprodukcija reaktivnih kiseoničnih vrsta (O^{2-} , OH^{\bullet} i H_2O_2) često se javlja kao odgovor biljaka na indukovani oksidativni stres, a čije nakupljanje biljke pokušavaju da eliminišu aktiviranjem odbrambenih mehanizama zaštite (Suzuki i sar., 2012). Novije studije su pokazale da je produkcija ROS molekula i njihovo uklanjanje aktivnošću antioksidativnog sistema zaštite pre svega zavisno od dužine trajanja tretmana i koncentracije Cd kojoj su biljke izložene (Pérez-Chaca i sar., 2014, Shahid i sar., 2017, Ouyang i sar., 2017). Niske koncentracije ROS molekula u biljnom tkivu imaju ulogu signalnih molekula i utiču na fiziološko-biohemijski odgovor biljaka na prisustvo teških metala. Suprotno tome, visoka produkcija ovih molekula dovodi do oksidativnih oštećenja makromolekula i promena u strukturi ćelija, što dalje inhibira rast i razvoj biljaka, a može imati i letalan efekat (Gill i Tuteja, 2010). Hiperprodukcija slobodnih radikala inicira seriju kaskadnih reakcija antioksidativnog sistema odbrane od stresa čime se vrši prihvatanje i neutralizacija nastalih ROS vrsta (Mittler i sar., 2011, Hossain i sar., 2015). Ovo podrazumeva pojačanu biosintezu i aktivaciju različitih enzima i neenzimskih komponenti

koje utiču na regulaciju efluksa K^+ jona, kao i na aktivnost elektron-transportnog lanca (Farid i sar., 2017).

Među slobodnim radikalima, vodonik-peroksid (H_2O_2) zauzima centralnu ulogu u signalnoj transdukciji tokom izloženosti biljaka stresnim uslovima (Cho i Seo, 2005). Da bi se vodonik-peroksid mogao koristiti kao signalni molekul neophodno je da se njegova koncentracija u ćeliji održava na netoksičnom nivou, što se obezbeđuje balansom između njegove produkcije i eliminacije (Hossain i sar., 2015). Visoka produkcija vodonik peroksida jedan je od pokazatelja oksidativnih oštećenja ćelijskih struktura usled stresa indukovano prisustvom teških metala u ćeliji. Ovaj molekul predstavlja supstrat za brojne oksidativne reakcije, lako se transportuje kroz membrane i ima mogućnost oksidacije tiolne grupe (-SH), DNK molekula i lipida (Romero-Puertas i sar., 2007). Do povećane produkcije H_2O_2 može doći u uslovima smanjene asimilacije CO_2 pri čemu se elektroni umesto na primarni akceptor $NADP^+$ prenose na alternativne akceptore, poput O_2 . S obzirom da u hlorofilima postoji velika količina O_2 , direktnom interakcijom kiseonika sa ekscitiranim hlorofilima stvara se H_2O_2 u PSII.

U ovoj studiji zabeleženo je signifikantno povećanje sadržaja H_2O_2 u mladim i starim listovima biljaka izloženih Cd. Kod vrste *S. matsudana* registrovana je znatna produkcija ovog reaktivnog produkta, što je u direktnoj vezi sa povećanom peroksidacijom lipida na plazma membrani. Visoka produkcija MDA predstavlja direktan indikator oksidativnog oštećenja ćelije usled visoke koncentracije Cd u biljnoj ćeliji (Li i sar., 2014). Slično navode i Ouyang i sar., (2017) koji su utvrdili porast sadržaja vodonik-peroksida kod biljaka vrste *S. babylonica* koji prati trend povećanja koncentracija Cd sa 10, na 50 do 100 μM $CdCl_2$ u hranljivom medijumu. Autori navode da je visoka produkcija ovog molekula direktna posledica oštećenja integriteta ćelijske membrane, što je u vezi sa pojačanom peroksidacijom lipida u prisustvu kadmijuma. Takođe, visoka produkcija peroksida usled visoke akumulacije Cd^{2+} jona u ćeliji u velikoj meri zavisi od aktivnosti NADPH-oksidaze koja inicira aktivaciju jasmonat signalnog puta, što utiče na tolerantnost biljaka na stresne uslove (Maksymiec i Krupa, 2006). Visoka produkcija H_2O_2 kao rezultat dugotrajne izloženosti biljaka teškim metalima može dovesti i do promena u aktivnosti antioksidativnih enzima. He i sar., (2011) su utvrdili značajno povećanje sadržaja H_2O_2 kod topole (*Populus x canescens*) koja je gajena u prisustvu 50 μM $CdSO_4$, uz istovremenu inhibiciju aktivnosti enzima katalaze. S obzirom da Cd nije redoks aktivan metal, smatra se da produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta predstavlja indirektan proces, do koga dolazi promenom u aktivnosti antioksidativnih enzima (Shamshad i sar., 2018). Takođe, Chou

i saradnici (2012) su pokazali da produkcija vodonik-peroksida utiče na aktivaciju heat-shock proteina i dovodi do pojačane aktivacije enzima askorbat-peroksidaze i glutation reduktaze, čime se podstiče povećanje tolerantnosti biljaka pirinča na stres indukovani prisustvom Cd.

Rezultati ove studije su pokazali da je primena limunske kiseline doprinela smanjenju koncentracije H₂O₂ molekula u biljnom tkivu, u odnosu na isti tretman nehelatiranim kadmijumom. Slično dobijenim rezultatima navode i Shamshad i sar. (2018), koji su utvrdili blago smanjenje sadržaja H₂O₂ u mladim listovima graška izloženih kombinovanom tretmanu Cd+LK, dok u starim listovima nije zabeležena značajna promena u produkciji vodonik-peroksida u odnosu na tretman bez limunske kiseline. Takođe, kod biljaka *Brassica napus* koje su gajene na tretmanima povećanih koncentracija bakra (50 i 100 µM Cu) u kombinaciji sa limunskom kiselinom od 2.5 mM zabeležena je redukcija sadržaja vodonik-peroksida, u poređenju sa istim tretmanom bez limunske kiseline (Zaheer i sar., 2015).

Oksidativna degradacija lipida na nivou ćelijske membrane predstavlja biohemijski marker prisustva toksičnih koncentracija teških metala u ćeliji (Wahsha i sar., 2011). Oštećenje ćelijske membrane koje nastaje degradacijom lipida može se pratiti na osnovu sadržaja malondialdehida (MDA) kao krajnjeg produkta lipidne peroksidacije, te se sadržaj ovog produkta može smatrati indikatorom oksidativnog stresa (Shakoor i sar., 2014). To potvrđuju i brojna istraživanja na različitim vrstama vrba, koja ukazuju da visoke koncentracije teških metala indukuju povećanje sadržaja MDA (Landberg i Greger, 2002b, Wahsha i sar., 2011, Arsenov i sar., 2017). Rezultati dobijeni u ovoj studiji su pokazali znatno povećanje sadržaja MDA sa porastom sadržaja Cd u biljnom tkivu. Takođe, tretman većom dozom Cd⁶ uslovio je značajne razlike u produkciji MDA među analiziranim klonovima, pri čemu je najveća produkcija MDA registrovana kod vrste *S. matsudana*. Dobijeni podaci pokazuju da se kod različitih vrsta, odnosno klonova, kao odgovor na povećan sadržaj Cd u biljnom tkivu mogu aktivirati različiti mehanizmi odbrane, odnosno da odabrani klonovi imaju drugačiji fiziološki odgovor na prisustvo teških metala. Gao i saradnici (2010) su pokazali da sadržaj MDA nije u korelaciji sa akumulacijom Cd, što je registrovano kod biljaka *Solanum nigrum* koje su gajene u prisustvu 50 µM Cd u zemljištu tokom 10 nedelja. Ovakav rezultat navedeni autori objašnjavaju aktivnošću različitih antioksidativnih enzima zaštite, čime se smanjuje toksičnost teških metala, a što za posledicu može imati smanjenu produkciju MDA. Varijabilnost u produkciji malondialdehida u listovima analiziranih klonova vrba pri tretmanu Cd⁶ jasno naglašava negativan uticaj Cd na različite biohemijske puteve i pokazuje varijabilnost u fiziološkom odgovoru ćelije na stresne uslove. Poznato je da inhibicija fotosinteze u uslovima

povećanih koncentracija teških metala dovodi do produkcije ROS vrsta, a akumulacija ovih molekula inicira peroksidaciju lipida (Hernández-Allica i sar., 2007). Kako je u ovom radu zabeležen pad intenziteta fotosinteze na tretmanu Cd6, to ukazuje na zavisnost produkcije MDA od intenziteta fotosinteze. Aplikacija LK uz veću dozu Cd (tretman L+Cd6) je uticala na smanjenje produkcije MDA u odnosu na tretman nehelatiranim Cd6. Rezultati većeg broja studija naglašavaju uticaj LK u prevenciji oksidativnog stresa biljaka, što se manifestuje smanjenom produkcijom vodonik-peroksida i malondialdehida (Farid i sar., 2015). Tendencija povećanja sadržaja MDA sa porastom koncentracije Cd detektovana je i u listovima vrste *Boehmeria nivea* dok je aplikacija LK dovela do smanjenja lipidne peroksidacije što je registrovano redukcijom sadržaja MDA na kombinovanom tretmanu Cd+LK, u odnosu na tretman bez limunske kiseline (Li i sar., 2014).

Neutralizacija oštećenja ćelije usled visoke produkcije ROS vrsta dovodi do aktiviranja mehanizama odbrane koji uključuju veliki broj antioksidativnih enzima poput CAT, APX, SOD, GPOD i drugih (Pietrini i sar., 2003, Sytar i sar., 2013, Pérez-Chaca i sar., 2014). Pored antioksidativnih enzima, važnu ulogu u mehanizmima zaštite od oksidativnog stresa preuzima i redukovani glutation (GSH) čija se koncentracija znatno povećava sa povećanjem sadržaja teških metala, što dovodi do povećanja intracelularnog antioksidativnog kapaciteta (Mourato i sar., 2012, He i sar., 2015). Guo i saradnici (2017) navode da je tolerantnost biljaka na prisustvo Cd pozitivno korelisana sa antioksidativnim kapacitetom biljaka, te prisustvo teških metala u biljnom tkivu dovodi do pojačane produkcije velikog broja antioksidanata poput glutaciona, tiola, karotenoida i dr. Dobijeni podaci u ovom istraživanju su pokazali da je tretman većom dozom (Cd6) uzrokovao znatno veće promene u aktivnosti antioksidativnih enzima, u odnosu na tretman nižom dozom Cd (Cd3). Kod većine analiziranih biohemijjskih parametara tretman Cd3 nije doveo do signifikantnih razlika u poređenju sa kontrolom. Ovakvi rezultati ukazuju da odabrani klonovi vrba tolerišu prisustvo niskih koncentracija Cd u biljnom tkivu, dok se biohemijjski mehanizmi zaštite aktiviraju tek pri većim dozama Cd (tretman Cd6). Nasuprot tome, Gao i saradnici (2010) navode da odnos između akumulacije teških metala i enzimske aktivnosti kao pokazatelja otpornosti antioksidativnog sistema biljaka najčešće se smatra nelinearnom regresijom. Primena limunske kiseline u zemljištu koje je umereno zagađeno Cd pokazala je uticaj na promenu aktivnosti antioksidativnih enzima, što je u saglasnosti sa različitim literaturnim navodima koji pokazuju isti efekat ovog helatora kod različitih biljnih vrsta (Ehsan i sar., 2014, Farid i sar., 2017).

Katalaza (CAT) je osnovni konstitutivni enzim mehanizma odbrane od stresa indukovano prisustvom teških metala u biljkama. Ovaj enzim katališe reakciju prelaska vodonik-peroksida do kiseonika i vode, uz transfer elektrona (Aebi, 1984, Gill i sar., 2011). Katalaza je enzim prisutan u citosolu, peroksizomima, kao i u mitohondrijama, ali ne i u hloroplastima (Mishra i sar., 2006). S obzirom da spada u prvu liniju odbrane, pojačana aktivnost ovog enzima kod biljaka vrba i topola izloženih teškim metalima zabeležena je u različitim studijama (Nikolić i sar., 2008, Guo i sar., 2015). U ovom istraživanju, tokom prvog eksperimenta, utvrđeno je linearno povećanje aktivnosti enzima katalaze sa povećanjem sadržaja Cd kako u mladim, tako i u starim listovima (Tabela 13). Nasuprot dobijenim rezultatima, Ehsan i sar., (2014) su utvrdili smanjenje aktivnosti CAT sa porastom sadržaja Cd sa 10 na 50 μM kod biljaka *Brassica napus*. Slično rezultate su zabeležili i Afshan i sar., (2015), koji su utvrdili da koncentracija hroma od 100 μM dovodi do povećanja koncentracije antioksidativnih enzima CAT, APX, SOD, POX u odnosu na kontrolne biljke, dok dalji porast sadržaja Cr na 500 μM uzrokuje smanjenje aktivnosti ovih enzima. Takođe, Ouyang i sar., (2017) su registrovali smanjenje aktivnosti katalaze kod biljaka *Salix babylonica* sa porastom sadržaja Cd u hranljivom rastvoru na kome su biljke gajene tokom 28 dana. Jedan od mogućih razloga za smanjenje aktivnosti CAT je nemogućnost biljaka da se suoče sa intenzivnim stresom izazvanim visokom akumulacijom metala u biljnom tkivu. U ovom istraživanju povećanje sadržaja Cd sa MDK na 2*MDK vrednost nije narušilo efikasnosti enzima katalaze u borbi protiv oksidativnog stresa, te je sa povećanjem Cd u biljnom tkivu zabeleženo povećanje aktivnosti ovog enzima. Kombinovani tretman L+Cd6 uzrokovao je smanjenje aktivnosti katalaze u starim listovima *S. matsudana* i *S. alba* u poređenju sa aktivnošću ovog enzima kod biljaka gajenih na tretmanu nehelatiranim Cd6. Nasuprot tome, u mladim listovima navedenih klonova utvrđeno je statistički značajno povećanje aktivnosti katalaze na tretmanu L+Cd6 u odnosu na tretman Cd6. Navedeni rezultati su utvrđeni tokom prvog eksperimenta, međutim aktivnost katalaze nije registrovana tokom drugog eksperimenta.

Različiti literaturni navodi su pokazali da je katalaza enzim veoma osetljiv na stres teškim metalima. Mahmud i saradnici (2018) navode smanjenje aktivnosti ovog enzima kod biljka *Brassica napus* koje su bile izložene povećanim koncentracijama Cd, dok je aplikacija limunske kiseline uzrokovala porast aktivnosti ovog enzima. Guo i sar., (2015) nisu utvrdili promene u aktivnosti CAT kod biljaka *Salix jiangsuensis* klon 172, koje su gajene tokom 90 dana na različitim tretmanima Cd (5 mg/kg i 25 mg/kg zemljišta). Povišena koncentracija Cd uzrokovala je smanjenje sadržaja katalaze kod senzitivnih i rezistentnih klonova *S. viminalis*,

međutim značajne razlike u aktivnosti katalaze među analiziranim klonovima nisu utvrđene (Landberg i Greger, 2002b). Podaci iz literature o aktivnosti katalaze tokom izloženosti biljaka povišenim koncentracijama teških metala su često kontradiktorni. Dobijene razlike u aktivnosti katalaze u različitim studijama se potencijalno mogu objasniti aktivacijom različitih mehanizama odbrane tokom ćelijskog stresa. Naime, kada jedna od komponenti antioksidativnog sistema postaje ograničavajuća, smanjena aktivnost nekog od enzima se može kompenzovati pojačanom aktivnošću drugog enzima (Foyer i Noctor, 2000). Degradacija vodonik-peroksida dejstvom enzima APX može biti potencijalni razlog za smanjenu aktivnost katalaze (Ahmad i sar., 2009), što je verovatno razlog za nisku aktivnost katalaze koja je utvrđena u ovom radu. Takođe, Asada (2006) naglašava da je katalaza pretežno lokalizovana u peroksizomima, što potencijalno utiče na umanjenu aktivnost ovog enzima u uslovima niskog stresa. Na osnovu dobijenih rezultata u ovom radu, kao i na osnovu literaturnih navoda može se zaključiti da se aktivnost katalaze ne može koristiti kao pouzdan indikator oksidativnog stresa kod analiziranih klonova vrba, jer ne predstavlja ključni enzim u mehanizmima odbrane ovih vrsta na prisustvo kadmijuma.

Peroksidaze predstavljaju grupu enzima koji katališu redoks reakcije u kojima učestvuje vodonik-peroksid i različiti supstrati (Asada, 2006). Ovde spadaju enzimi poput gvajakol-peroksidaze (GPOD) i askrobat peroksidaze (APX) koji su, uz katalazu, vrlo važni enzimatski antioksidansi čija je glavna uloga uklanjanje H_2O_2 . Za razliku od CAT, ovi enzimi koriste organske supstrate gvajakol, odnosno askrobat, kao donore elektrona i pokazuju visok afinitet prema H_2O_2 (Mourato i sar., 2012). Varijabilnost u aktivnosti različitih peroksidaza je uslovljena karakteristikama biljne vrste (koje uključuju genetičke i fiziološke osobine biljaka), koncentracijom teškog metala, kao i dužinom trajanja kojoj je biljka izložena. Istraživanja Hassan i saradnika (2016, 2017), pokazuju da svaka promena u aktivnosti različitih peroksidaza predstavlja odgovor biljaka u prevenciji oksidativnog stresa.

Gvajakol-peroksidaza (GPOD) je enzim koji je direktno uključen u detoksifikaciju ROS formi, koristi gvajakol kao donor elektrona, redukuje nivo peroksida i pretvara ga u manje toksične oblike uz nastanak vode (Singh i sar., 2003, Hasanuzzaman i sar., 2012). Brojna istraživanja potvrđuju da izloženost biljaka teškim metalima uzrokuje signifikantno povećanje aktivnosti GPOD enzima (Alayat i sar., 2014, Gao i sar., 2010, Mahmud i sar., 2018). Prema navodima Gill i Tuteja (2010) GPOD pokazuje veći afinitet za peroksid u odnosu na katalazu, a time i veću efikasnost u uslovima povišenih koncentracija teških metala, što je utvrđeno i u ovoj studiji. Aktivnost gvajakol-peroksidaze je pokazala fluktuacije u zavisnosti od

primenjenih tretmana sa trendom povećanja aktivnosti koja prati povećanje sadržaja Cd u biljnom tkivu. Dodatak limunske kiseline pri većoj dozi Cd (L+Cd6 tretman) rezultirao je u značajnom smanjenju aktivnosti GPOD u mladim listovima *Salix matsudana* u odnosu na isti tretman bez LK. Uticaj prisustva LK na aktivnost GPOD bio je jasno izražen i u starim listovima kod vrste *S. alba*, gde je zabeleženo značajno povećanje aktivnosti ovog enzima pri tretmanu L+Cd6 u poređenju sa tretmanom Cd6. Sa druge strane, sukcesivna aplikacija LK i dodatak treseta indukovali su varijabilnost u aktivnosti ovog enzima, u zavisnosti od odabranog klona. U mladim listovima tretman L+Cd6 doveo je do smanjenja aktivnosti GPOD kod vrste *S. viminalis*, do povećanja aktivnosti kod vrste *S. alba*, dok kod vrste *S. matsudana* nisu registrovane promene u aktivnosti ovog enzima u odnosu na isti tretman nehelatiranim Cd. Istovremeno, u starim listovima je registrovan pad aktivnosti enzima GPOD na kombinovanim tretmanima u odnosu na tretman nehelatiranim Cd. Veći broj istraživanja pokazuje da dodatak limunske kiseline može dovesti do smanjenja aktivnosti peroksidaza, što naglašava ulogu ovog helatora u smanjenoj produkciji kiseoničnih vrsta tokom izloženosti biljaka teškim metalima (Gao i sar., 2010, Shakoore i sar., 2014, Afsan i sar., 2015).

Askorbat-peroksidaza (APX) je enzim koji katališe reakciju oksidacije askorbata u dehidroaskorbat, a zatim i do monohidroaskrobata, čime se uklanja višak vodonik-peroksida. Ovaj enzim je konstituent askorbat-glutation ciklusa i pokazuje značajnu ulogu u neutralizaciji kiseoničnih radikala (Mourato i sar., 2012). Povećanje aktivnosti ovog enzima u prisustvu Cd detektovano je kod velikog broja biljnih vrsta *Arabidopsis thaliana* (Maksymiec i Krupa, 2006), *Solanum nigrum* (Fidalgo i sar., 2011), *Brassica juncea* (Iqbal i sar., 2010), *Triticum aestivum* (Khan i sar., 2007) i *Robinia pseudoacacia* (Župunski, 2017) i dr. Rezultati ovog istraživanja su pokazali povećanje aktivnosti enzima APX usled povećanja sadržaja Cd u biljnom tkivu. Slično tome, Landberg i Greger (2002b) su utvrdili povećanje aktivnosti APX enzima kod različitih klonova vrste *S. viminalis* koje su gajene metodom vodenih kultura na tretmanu 7 $\mu\text{mol/L}$ CdCl₂ tokom 20 dana. Nasuprot tome, Guo i saradnici (2015) su zabeležili smanjenje aktivnosti APX kod topola gajenih tokom 3 meseca u zemljištu koje je sadržalo 5 mg/kg zemljišta Cd, dok isti tretman nije doveo do promene aktivnosti ovog enzima kod vrba gajenih na istom tretmanu u poređenju sa kontrolnim biljkama. Na osnovu Pearson-ovog koeficijenta korelacije u ovom istraživanju je utvrđeno da je aktivnost APX enzima u jakoj pozitivnoj korelaciji sa akumulacijom Cd u biljnom tkivu, sa izuzetkom kod *S. alba* gde nije utvrđena signifikantna korelacija. Uticaj primene limunske kiseline na aktivnost APX varirao je u zavisnosti od analiziranog klona, starosti listova, kao i od samog načina aplikacije ovog

helatora. Tokom prvog eksperimenta kod vrste *S. alba* zabeleženo je statistički značajno povećanje aktivnosti APX na tretmanu L+Cd6 u odnosu na tretman Cd6, dok je tokom drugog eksperimenta zabeležen suprotan efekat, odnosno signifikantno smanjenje aktivnosti ovog enzima na kombinovanom tretmanu L+Cd6 u odnosu na tretman Cd6. Takođe, pad aktivnosti ovog enzima zabeležen je i u starim listovima vrste *S. viminalis*, pri tretmanu L+Cd6 u odnosu na Cd6. Ovako rezultati sugerišu da limunska kiselina ublažava toksičnost Cd u biljnom tkivu, uzrokuje smanjenje produkcije slobodnih radikala, poput vodonik-peroksida, što samim tim dovodi do smanjenja aktivnosti APX na kombinovanim tretmanima. Suprotno tome, Shakoor i saradnici (2014) navode povećanje aktivnosti enzima SOD i APX kod biljaka *Brassica napus* gajenih u vodenoj kulturi na tretmanu 50 i 100 μM Pb uz dodatak 2.5 mM limunske kiseline. Autori sugerišu da prisustvo limunske kiseline direktno deluje na aktivaciju mehanizama odbrane pri visokoj koncentraciji teških metala u biljnom tkivu, a time i na povećanje aktivnosti antioksidativnih enzima.

Glutation-S-transferaza (GST) je multigenska familija enzima koja je uključena u neutralizaciju slobodnih radikala kao važna komponenta glutation-askorbat ciklusa. GST funkcioniše kao „prihvatač“ slobodnih radikala zajedno sa glutationom i dalje vrši njihovu eliminaciju iz ćelije (Agrawal i sar., 2002). Visok nivo ovog enzima na celularnom nivou ukazuje na njegov značaj u mehanizmima detoksifikacije i tolerancije biljaka na oksidativni stres (Sharma i Dietz, 2009). U ovom radu je zabeležen trend povećanja aktivnosti GST enzima sa porastom sadržaja Cd u biljnom tkivu. Dobijeni rezultati su u skladu sa brojim istraživanjima aktivnosti GST enzima pri povećanim koncentracijama Cd kod različitih biljnih vrsta. Signifikantno povećanje aktivnosti enzima GST registrovano je kod biljaka *Ceratophyllum demersum* gajenih na tretmanima od 1, 5, 10 μM Cd (Mishra i sar., 2009). Indukcija sinteze enzima GST u uslovima povišenih koncentracija teških metala zabeležena je i kod drvenastih vrsta. Choi i sardanici (2013) su utvrdili hiperprodukciju ovog enzima kod biljaka topola gajenih na tretmanima od 0.15 i 0.3 mM CdCl₂ u medijumu. Takođe, Benyó i saradnici (2017) su zabeležili pojačanu aktivnost enzima GST u korenu i listovima različitih klonova topola gajenih na tretmanu 3 i 30 μM Cu i Zn. Dodatak limunske kiseline u kombinovanim tretmanima je pokazao klon-specifičan odgovor. Kod vrste *S. matsudana* primena ovog helatora je dovela do signifikantno veće aktivnosti GST enzima na tretmanu L+Cd6, dok je kod klonova *S. viminalis* i *S. alba* zabeležen pad aktivnosti ovog enzima u odnosu na tretman Cd6.

Glutation (GSH) je neenzimatski antioksidant koji funkcioniše kao stres signalni molekul i igra značajnu ulogu u detoksifikaciji i toleranciji biljaka izloženih teškim metalima

(Meyer i Fricker, 2002), tako što vrši neutralizaciju ROS molekula preko askorbat-glutation ciklusa (Suzuki i sar., 2012). Ovaj tripeptid je redoks aktivni molekul koji se dejstvom enzima glutation reduktaze lako prevodi iz oksidovane forme (GSSG) u redukovanu formu (GSH). Održavanje visokog nivoa GSH/GSSG je od velikog značaja za povećanje otpornosti biljaka na stres indukovani prisustvom teških metala (Foyer i sar., 2001). Ovaj metabolit predstavlja važan kofaktor mnogih enzima, a povećane koncentracije GSH neutrališu visok nivo slobodnih radikala i omogućavaju detoksifikaciju peroksida (Sharma i Dietz, 2006). Takođe, glutation predstavlja prekursor za sintezu fitohelatina koji imaju ulogu u sekvencijama i detoksifikaciji Cd^{2+} jona čime se ublažavaju štetni efekti visokih koncentracija ovog metala u ćeliji (El-Shintinawy, 1999). Rezultati ove studije su pokazali signifikantno povećanje sadržaja GSH koje prati trend povećanja sadržaja Cd u biljnom tkivu. Dobijeni podaci su u skladu sa rezultatima prethodnih studija koje pokazuju pojačanu sintezu GSH pri povišenim koncentracijama teških metala kod različitih biljnih vrsta (Mishra i sar., 2006; Romero-Puertas i sar., 2007; Mishra i sar., 2009). Gao i saradnici (2010) naglašavaju da je sinteza GSH pozitivno korelisana sa sadržajem Cd u biljnom tkivu. Visok sadržaj glutaciona u biljnom tkivu ima protektivnu ulogu u neutralizaciji ROS formi, čime se hloroplasti štite od oksidativnih oštećenja što dodatno doprinosi očuvanju funkcija elektron-transportnog lanca i nesmetanom radu fotosintetičkog aparata (El-Shintinawy, 1999). Rezultati ove studije su pokazali da je dodatak limunske kiseline pri L+Cd6 tretmanu doveo do povećanja sadržaja GSH u mladim listovima vrba, u odnosu na isti tretman nehelatiranim Cd (Cd6), što je pozitivno korelisano sa povećanjem fotosintetičke aktivnosti kod klonova *S. viminalis* i *S. matsudana* pri ovom tretmanu. Slično tome, u starim listovima ovakav trend je utvrđen kod *S. alba*. Dobijeni rezultati sugerišu da limunska kiselina pokazuje visoku efektivnost u ćelijskom odgovoru na stresne faktore i utiče na aktivaciju antioksidativnih mehanizama odbrane.

Fitohelatini (PCs) predstavljaju neproteinske tirole (NPT), niske molekulske mase, koji se sintetišu od glutaciona (GSH) i imaju ulogu da prevode metale u manje toksične oblike (Clemens, 2006). Smatra se da pojačana sinteza fitohelatina predstavlja vid adaptivnog mehanizma biljke da se suoči sa toksičnim efektima Cd u ćeliji (Mishra i sar., 2009; Saraswat i Rai 2011; Fernández i sar., 2014). Rezultati dobijeni u ovom istraživanju su pokazali da je sadržaj neproteinskih tiola bio statistički značajno veći na tretmanima limunskom kiselinom pri 2*MDK vrednosti Cd u zemljištu, u odnosu na isti tretman bez LK. Rezultati dosadašnjih istraživanja su pokazali da neproteinski tioli imaju ulogu u ublažavanju toksičnih efekata Cd, te sa povećanjem koncentracije Cd jona u ćeliji dolazi do njihovog nakupljanja, kao posledica

pojačane sinteze različitih fitohelatina (Chaney i sar., 2007; Fernández i sar., 2014; Mahdavian i sar., 2016). Samim tim tolerantnost biljaka na prisustvo teških metala je pozitivno korelisana sa sintezom tiola (Cobbett, 2000). Rezultati dobijeni u ovom istraživanju su pokazali da je najveći sadržaj ukupnih tiola u mladim listovima zabeležen kod vrste *S. alba* na tretmanu Cd6 i bio je znatno veći u odnosu na sadržaj UT kod kontrolnih biljaka. Značajno povećanje ukupnih tiola, redukovano glutatona (GSH), kao i neproteinskih tiola je zabeleženo kod leguminoze *Vigna mungo* u uslovima povećane koncentracije Cd (Molina i sar., 2008). Isti trend navode i Mishra i saradnici (2006), koji su utvrdili znatno povećanje ukupnih, kao i neproteinskih tiola kod biljaka *Ceratophyllum demersum* izloženih tretmanima 1, 5 i 10 Cd μ M. Takođe, rezultati ovog istraživanja su pokazali da je sadržaj ukupnih tiola u starim listovima *S. alba* bio statistički značajno veći pri tretmanu Cd6 u odnosu na njihov sadržaj u biljkama gajenim na kombinovanom tretmanu L+Cd6. Istovremeno, ovaj trend nije utvrđen kod ostalih analiziranih vrsta. Uticaj primene limunske kiseline na sadržaj ukupnih tiola, kao i fitohelatina (neproteinskih tiola) zabeležen je i u studiji Gao i saradnika (2010). Autori su utvrdili da aplikacija 20 mmol limunske kiseline po kg zemljišta koje sadrži 50 mg/kg Cd može da dovede do smanjenja sadržaja ukupnih i neproteinskih tiola, u odnosu na tretman bez dodatka LK. Tioli imaju ulogu da vežu usvojeni Cd, čime umanjuju negativan uticaj ovog metala u biljkama, a kako limunska kiselina pokazuje sličan efekat, dodatak ovog helatora može doprineti smanjenju produkcije ovih jedinjenja.

Cistein je aminokiselina koja predstavlja najvažniju komponentu koja izgrađuje molekul GSH. Pored cisteina, glutamat i glicin izgrađuju glutatona, međutim intracelularna koncentracija ovih aminokiselina je visoka, za razliku od cisteina čija je intracelularna koncentracija veoma ograničena. Biosinteza ove aminokiseline predstavlja energetski skup proces gde dolazi do utroška neophodnih makroelemenata azota i sumpora (Saraswat i Rai, 2011), tako je produkcija redukovano glutatona u velikoj meri zavisna od sinteze ove aminokiseline, što posledično utiče na odgovor biljaka na različite stresne činioce. Na osnovu toga može se zaključiti da akumulacija cisteina predstavlja važan biomarker u biološkom odgovoru biljaka na prisustvo teških metala u ćeliji. Rezultati dobijeni u ovoj studiji su pokazali da ne postoji jasna korelacija između akumulacije Cd u mladim listovima i produkcije cisteina. Međutim, najveća produkcija cisteina u mladim listovima zabeležena je kod vrste *S. alba* gde je konstatovana najveća koncentracija usvojenog Cd u poređenju sa ostalim analiziranim vrstama. Takođe, pojačana sinteza cisteina je pozitivno korelisana sa visokom produkcijom ukupnih, kao i proteinskih tiola koji su registrovani kod biljaka *S. alba*. Visoka produkcija

cisteina u uslovima povišenih koncentracija olova u biljnom tkivu registrovana je kod vrste *Peganum harmala* (Mahdavian i sar., 2016). Autori su utvrdili znatno veći sadržaj cisteina kod vrsta koje se definišu kao fakultativne metalofite (rastu na staništima bez metala u podlozi, a tolerišu i njihovo prisustvo) u odnosu na prave metalofite. S obzirom da vrbe nisu prave metalofite, pojačana sinteza cisteina kod ovih vrsta može se smatrati linijom odbrane biljaka na povećan sadržaj Cd u biljnom tkivu. Uticaj primene LK na sadržaj cisteina bio je jače izražen na starim listovima u odnosu na mlade, kod kojih nije utvrđena signifikantna razlika u akumulaciji ove aminokiseline usled primene kombinovanih tretmana. U starim listovima primena kombinovanog tretmana L+Cd6 indukovala je klon-specifičan odgovor kada je u pitanju sadržaj cisteina. Kod vrste *S. alba* je utvrđeno signifikantno smanjenje produkcije cisteina usled primene kombinovanog tretmana u poređenju sa Cd6 tretmanom, uz istovremeno veću akumulacija Cd. Dobijeni podaci sugerišu da aktivacija mehanizama odbrane kod vrste nije efikasna, što je potvrđuje i indeks tolerancije koji je pokazao najmanju vrednost u poređenju sa ostalim analiziranim vrstama.

Na osnovu analize glavnih komponenti (PCA analiza) utvrđen je biološki odgovor odabranih klonova vrba na primenjene tretmane. Ova analiza je pokazala da postoji jasno razdvajanje biljnog odgovora na primenjenu koncentraciju Cd, dok je primena limunske kiseline doprinela smanjenju razdvajanja između tretmana L i kombinovanih tretmana. Takođe, PCA analizom je utvrđeno je da je klon vrste *S. viminalis* pokazao najmanji stepen variranja analiziranih karaktera, dok se klon *S. alba* odlikovao visokom varijansom.

6. Zaključak

Na osnovu rezultata dobijenih u ovom istraživanju mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Biodostupnost jona Cd u zemljištu tipa fluvisol je veoma limitirana visokom pH vrednošću, dok aplikacija limunske kiseline, kao i dodatak treseta mogu dovesti do povećanja biodostupnosti jona ovog metala i time uticati na uspešniju fitoremedijaciju umereno zagađenog zemljišta.
- Distribucija Cd u biljnom tkivu je pokazala zavisnost od odabranog klona i primenjenog tretmana. Najmanji sadržaj Cd je zabeležen u izdancima biljaka, dok je sadržaj u listovima i korenu pokazao zavisnost od osobina zemljišta, odnosno od aplikacije limunske kiseline i treseta. U prvom eksperimentu najveći sadržaj Cd je konstatovan u mladim listovima *S. viminalis* i *S. matsudana*, dok su sukcesivna primena limunske kiseline i dodatak treseta doprineli povećanom usvajanju Cd, ali i zadržavanju ovog metala u korenu. Kod vrste *S. alba* (klon B-44) najveći procenat usvojenog Cd se zadržao na nivou korena, te je kod ove vrste zabeležena najmanja translokacija u nadzemne organe. Uporednom analizom odabranih klonova vrba utvrđeno je da je najveći sadržaj Cd registrovan u mladim listovima *S. matsudana*, istovremeno ovaj klon se odlikovao najmanjim sadržajem Cd u korenu.
- Na osnovu dobijenih vrednosti biokoncentracijskog faktora (BF) korena i nadzemnih organa, utvrđeno je znatno povećanje vrednosti u nadzemnom delu biljaka u odnosu na BF korena, bez obzira na analizirani klon i primenjeni tretman. Primena limunske kiseline je pokazala signifikantan uticaj na povećanje translokacijskog faktora (Tf) kod *S. viminalis*, kod *S. alba* primena ovog helatora je dovela do blagog povećanja Tf, dok kod *S. matsudana* primena ovog helatora nije pokazala pozitivan uticaj na vrednost translokacijskog faktora u pređenju sa istim tretmanom nehelatiranim Cd.
- Primenjeni tretmani Cd nisu doveli do pojave fitotoksičnosti, te nisu utvrđeni vidljivi simptomi poput hloroze i nekroze, pa se može zaključiti da su analizirani klonovi vrba rezistentni na umerenu zagađenost zemljišta. Signifikantno smanjenje posmatranih morfoloških karakterata (masa i površina listova, masa korena, visina i prečnik izdanka) utvrđeno je pri većoj primenjenoj dozi Cd (6 mg/kg zemljišta), dok su sukcesivna aplikacija limunske kiseline i dodatak treseta doprineli boljem rastu biljaka i u zemljištu kontaminiranom Cd.

- Najveći stepen redukcije rasta i produkcije biomase u uslovima povišenih koncentracija Cd utvrđen je kod *S. alba* u pređenju sa ostalim analiziranim vrstama. Ovako dobijeni rezultati su potvrđeni i na osnovu vrednosti indeksa tolerancije (TI), te je kod ove vrste utvrđena najmanja vrednost TI, dok je najveći indeks tolerancije zabeležen kod *S. matsudana*. Na osnovu dobijenih vrednosti TI, analizirani klonovi se mogu definisati kao umereno- (*S. alba*) do visoko tolerantni na primenjene doze Cd. Dodatak limunske kiseline je doveo do povećanja indeksa tolerancije kod *S. viminialis* i *S. alba* pri većoj primenjenoj dozi Cd (L+Cd6), dok je kod *S. matsudana* stimulativan efekat ovog helatora utvrđen pri tretmanu L+Cd3.
- Kod analiziranih klonova vrba utvrđeno je da je primena tretmana Cd6 uzrokovala blago smanjenje sadržaja neophodnih makroelemenata, N, P i K, dok je aplikacija limunske kiseline pokazala stimulativan efekat na usvajanje ovih biogenih elemenata.
- Primenjeni tretmani Cd usloveli su pad sadržaja fotosintetičkih pigmenata, dok je dodatak limunske kiseline uticao na blagi porast sadržaja hlorofila *a* i *b* na kombinovanim tretmanima L+Cd3 i L+Cd6, u odnosu na odgovarajući tretman bez limunske kiseline.
- Signifikantno smanjenje parametara razmene gasova, intenziteta fotosinteze i transpiracije, kao i efikasnosti korišćenja vode utvrđeno je u uslovima povišenih koncentracija Cd. Inhibitorni efekat neto fotosinteze najjače je bio izražen kod *S. viminialis*, dok je najmanji procenat smanjenja zabeležen kod vrste *S. alba*, što je zabeleženo na tretmanu Cd6. Međutim, primena treseta i sukcesivna aplikacija limunske kiseline doprineli su smanjenju fitotoksičnosti Cd, što je uticalo na efikasniju aktivnost fotosintetičkog aparata, u poređenju sa tretmanima nehelatiranim Cd.
- Primenjeni tretmani Cd su doveli do pojačane sinteze aminokiseline prolina, posebno u mladim listovima, dok je najveća produkcija ove aminokiseline utvrđena kod *S. alba*.
- Signifikantno povećanje sadržaja vodonik-peroksida (H₂O₂) utvrđeno je u mladim i starim listovima biljaka izloženih Cd. Najveći sadržaj ovog produkta je registrovan kod *S. matsudana*, što je u direktnoj vezi sa povećanom peroksidacijom lipida na plazma membrani, koja je praćena preko produkcije malondialdehida (MDA). Visoka produkcija MDA predstavlja direktan indikator oksidativnog oštećenja ćelije usled visoke koncentracije Cd u biljnoj ćeliji. Rezultati ove studije su pokazali da je aplikacija limunske kiseline doprinela smanjenju koncentracije H₂O₂ u biljnom tkivu,

u odnosu na isti tretman nehelatiranim kadmijumom, uz istovremeno smanjenje peroksidacije lipida.

- Prisustvo Cd u biljnom tkivu uzrokuje oksidativni stres i dovodi do aktivacije mehanizama odbrane i promene aktivnosti različitih antioksidativnih enzima. Tokom ovog istraživanja je utvrđeno da postoje razlike u aktivnost antioksidativnih enzima (katalaze, askorbat-peroksidaze, gvajakol-peroksidaze, glutation-s-transferaze) u zavisnosti od analiziranog klona, primenjenog tretmana, kao i od starosti listova, što je u najvećoj meri vezano za akumulaciju Cd u biljnom tkivu. Primena limunske kiseline može donekle modifikovati biološki odgovor biljaka u uslovima povećanih koncentracija Cd, tako što smanjuje toksičnost jona Cd, menjajući aktivnost komponenata antioksidativnog sistema zaštite. Uticaj ovog helatora zavisi od analiziranog genotipa, odnosno klona, kao i od koncentracije teških metala.
- Rezultati dobijeni u ovom istraživanju su pokazali signifikantno povećanje sadržaja redukovanog glutationa (GSH) koje prati trend povećanja sadržaja Cd u biljnom tkivu, što pokazuje visoku efikasnost odabranih klonova vrba u ćelijskom odgovoru na stres indukovano prisustvom Cd. U poređnom analizom klonova vrba utvrđeno je da je najveća produkcija GSH registrovana kod *S.alba*, što je pozitivno korelisano sa povećanjem sadržaja tiola, kao i koncentracije aminokiseline cisteina koja je registrovana kod ove vrste.

Na osnovu sveobuhvatnih analiza i različitih kriterijuma moguće je izvršiti odabir vrsta i selekciju klonova koji se karakterišu najvećim potencijalom za proces fitoremedijacije. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da analizirani klonovi poseduju genotipsku specifičnost posmatranih morfo-fizioloških i biohemijskih osobina u uslovima povišenih koncentracija Cd u zemljištu. Poređenjem analiziranih klonova, klonovi SV068 (vrsta *S. viminalis*) i SM4041 (vrsta *S. matsudana*) mogli bi se izdvojiti kao klonovi koji se odlikuju osobinama poželjnim za fitoremedijaciju. Aplikacija limunske kiseline se može smatrati adekvatnom ameliorativnom merom koja doprinosi povećanju biodostupnosti jona Cd u alkalnom zemljištu, a samim tim i efikasnijem izvlačenju metala. Takođe, prednost se daje sukcesivnoj aplikaciji u odnosu na jednokratni tretman ovom kiselinom. Pored toga, primena limunske kiseline uticala je na biološki odgovor biljaka u prisustvu Cd u ćeliji, kroz modifikaciju fiziološko-biohemijskih procesa i pojačanu aktivaciju mehanizama odbrane. Svakako, istraživanja potencijala limunske kiseline u procesu asistiranog fitoremedijacije je potrebno nastaviti i utvrditi mogućnost primene ovog helatora u

istraživanjima u polju, uzimajući u obzir dodatne abiotičke i biotičke faktore koji mogu uticati na biodostupnost i usvajanje teških metala iz zemljišta.

7. *Literatura*

- Adeniji, B.A., Budimir-Hussey, M.T., Macfie, S.M. (2010). Production of organic acids and adsorption of Cd on roots of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. Durum). *Acta Physiologia Plantarum*, 32: 1063–1072.
- Aderholt, M., Vogelien, D.L., Koether, M., Greipsson, S. (2017). Phytoextraction of contaminated urban soils by *Panicum virgatum* L. enhanced with application of a plant growth regulator (BAP) and citric acid. *Chemosphere*, 175: 85–96.
- Aebi, H. (1984). Catalase in Vitro. *Method Enzym*, 105: 121–126.
- Afshan, S., Ali, S., Bharwana, S. A., Rizwan, M., Farid, M., Abbas, F., Ibrahim, M., Mehmood, M. A., & Abbasi, G. H. (2015). Citric acid enhances the phytoextraction of chromium, plant growth, and photosynthesis by alleviating the oxidative damages in *Brassica napus* L. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(15): 11679–11689.
- Agrawal, G.K., Jwa, N.S., Rakwal, R. (2002). A pathogen-induced novel rice (*Oryza sativa* L.) gene encodes a putative protein homologous to type II glutathione S-transferases. *Plant Science*, 163: 153–1160.
- Ahmad, I., Naeem, M., Khan, N.A, Samiullah. (2009). Effects of cadmium stress upon activities of antioxidative enzymes, photosynthetic rate, and production of phytochelatins in leaves and chloroplasts of wheat cultivars differing in yield potential. *Photosynthetica*, 47: 146–151.
- Ahmad, P., Ozturk, M., Gucel, S. (2012). Oxidative damage and antioxidants induced by heavy metal stress in two cultivars of mustard (*Brassica juncea* L.) plants. *Fresenius Environmental Bulletin*, 12(10): 2953–2961.
- Alagić, S.Č., Šerbula, S.S., Tošić, S.B., Pavlović, A.N., Petrović, J.V. (2013). Bioaccumulation of Arsenic and Cadmium in Birch and Lime from the Bor Region. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 65(4): 671–682.
- Alayat, A., Souki, L., Grara N., Djebbar M.R., Boumedris, Z.E., Benosmane, S., Amamra, R., Berrebbah, H. (2014). Effects of cadmium on water content, soluble protein, proline changes and some antioxidant enzymes in wheat (*Triticum durum* desf.) leaves. *Annual Research and Review in Biology*, 4: 3835–3847.
- Ali, H., Khan, E., Sajad, M.A. (2013). Phytoremediation of heavy metals–Concepts and applications. *Chemosphere*, 91: 869–881.
- Alkorta, I., Hernandez-Allica, J., Becerril, J. M., Amezaga, I., Albizu, I., Garbisu, C. (2004). Recent findings on the phytoremediation of soils contaminated with environmentally

- toxic heavy metals and metalloids such as zinc, cadmium, lead, and arsenic. *Reviews in Environmental Science and BioTechnology*, 3: 71–90.
- Antoniadis, V., Levizou, E., Shaheen, S.M., Sik, Y., Sebastian, A., Baume, C., Prasad, M.N., Wenzel, W.W., Rinkle, J. (2017). Trace elements in the soil-plant interface: Phytoavailability, translocation, and phytoremediation—A review. *Earth-Science Reviews*, 171: 621–645.
- Appenroth, K.J. (2010). What are “heavy metals” in Plant Sciences?, *Acta Physiologiae Plantarum*, 32: 615–619.
- Argus, G.W. (1997). Infrageneric classification of *Salix* L. (Salicaceae) in the New World. American Society of Plant Taxonomists, *Systematic Botany Monographs*, 52: 1–121.
- Arsenov, D., Zupunski, M., Borisev, M., Nikolic, N., Orlovic, S., Pilipovic, A., Pajevic, S. (2017). Exogenously Applied Citric Acid Enhances Antioxidant Defense and Phytoextraction of Cadmium by Willows (*Salix* Spp.), *Water Air and Soil Pollution*, 228:221.
- Asada, K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*, 141: 391–396.
- Baker, A.J.M. (1981). Accumulators and excluders — strategies in response of plants to heavy metals. *Journal of plant nutrition*, 3(1-4): 643–654.
- Bates, L.S. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, 39: 205–207.
- Bauddh, K., Kumar, A., Srivastava, S., Singh, P.R., Tripathi, R.D. (2016). A study on the effect of cadmium on the antioxidative defense system and alteration in different functional groups in castor bean and Indian mustard. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 62: 877–891.
- Bedell, J.P., Capilla, X., Girya, C., Schwartzb, C., Morelb, J.L., Perrodina, Y. (2009). Distribution, movement and availability of Cd and Zn in a dredged sediment cultivated with *Salix alba*. *Environmental and Experimental Botany*, 67: 403–414.
- Benyó, D., Horváth, E., Németh, E., Leviczky, T., Takács, K., Lehotai, N., Feigl, G., Kolbert, Z., Ördög, A., Gallé, R., Csiszár, J., Szabados, L., Erdei, L., Gallé, Á. (2016). Physiological and molecular responses to heavy metal stresses suggest different detoxification mechanism of *Populus deltoides* and *P. x canadensis*. *Journal of Plant Physiology*, 201: 62–70.

- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2002). *Biochemistry*. Fifth Edition. New York : W.H. Freeman, pp. 1100.
- Bhargava, A., Carmona, F.F., Bhargava, M., Srivastava, S. (2012). Approaches for enhanced phytoextraction of heavy metals. *Journal of Environmental Management*, 105: 103–120.
- Borišev, M. (2010). Potencijal klonova vrba (*Salix* spp.) u fitoekstrakciji teških metala. Prirodno – matematički fakultet. Novi Sad. pp. 187.
- Borišev, M., Pajević, S., Nikolić, N., Orlović, S., Župunski, M., Pilipović, A., Kebert, M. (2016). Magnesium and iron deficiencies alter Cd accumulation in *Salix viminalis* L. *International Journal of Phytoremediation*, 18(2): 164–170.
- Borišev, M., Pajević, S., Nikolić, N., Pilipović, A., Arsenov, D., Župunski, M. (2018). Mine site restoration using silvicultural approach In: Prasad, M.N.V., Favas, P.J.C., Maiti, S.K. (Eds.), *Bio-Geotechnologies for Mine Site Rehabilitation*. pp. 115-131. Elsevier publisher, ISBN: 978-0-12-812986-9.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–254.
- Brooks, R.R., Lee, J., Reeves, R.D., Jaffré, T. (1977). Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants. *Journal of Geochemical Exploration* 7: 49–57.
- Burzynski, M. (1988). The uptake and accumulation of phosphorus and nitrates and the activity of nitrate reductase in cucumber seedlings treated with Pb and Cd. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 57: 349–359.
- Capuana, M. (2011). Heavy metals and woody plants - biotechnologies for phytoremediation. *iForest*, 4: 7-15.
- Cataldo, D.A., McFadden, K.M., Garland, T.R. Wildung, R.E. (1988). Organic constituents and complexation of nickel (II), iron (III), cadmium (II) and plutonium (IV) in soybean xylem exudates. *Plant Physiology*, 86: 734–739.
- Chaney, R.L. (1983). Plant uptake of inorganic waste constituents. In: J J.F. Parr, P.B. Marsh J.M. Kla (Eds.), *Land Treatment of Hazardous Wastes*. Noyes Data Corp, Park Ridge. pp. 50–76.

- Chaney, R.L., Angle, J.S., Broadhurst, C.L., Peters, C.A., Tappero, R.V., Sparks, D.L. (2007). Improved understanding of hyperaccumulation yields commercial phytoextraction and phytomining technologies. *Journal of Environmental Quality*, 36: 1429–1443.
- Chen, Y.X., Lin, Q., Luo, Y.M., He, Y.F., Zhen, S.J., Yu, Y.L., Tian, G.M., Wong, G.M.H. (2003). The role of citric acid on the phytoremediation of heavy metal contaminated soil. *Chemosphere*, 50: 807–811.
- Chen, K., Fan, B., Du, L., Chen, Z. (2004). Activation of hypersensitive cell death by pathogen-induced receptor-like protein kinases from *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 56(2): 271–283.
- Chen, Y.Z., Wang, Y.P., Wu, W.X., Lin, Q., Xue, G.S. (2006). Impacts of chelate-assisted phytoremediation on microbial community composition in the rhizosphere of a copper accumulator and non-accumulator. *Science of the Total Environment*, 356: 247–255.
- Cho, U.H., Seo, N.H. (2005). Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Science*, 168: 113–120.
- Choi, Y.I., Noh, E.W., Kim, H.J., Shim, D. (2013). Overexpression of poplar GSTU51 confers selective tolerance to both mercury and methyl viologen but not to CDNB or cadmium in transgenic poplars. *Plant Biotechnology Reports*, 7, 175–184.
- Chou, T.S., Chao, Y.Y., Kao, C.H. (2012). Involvement of hydrogen peroxide in heat shock- and cadmium-induced expression of ascorbate peroxidase and glutathione reductase in leaves of rice seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 169, 478–486.
- Clemens, S. (2001). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*, 212: 475–486.
- Clemens, S. (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*, 88: 1707–1719.
- Clemente, R., Hartley, W., Riby, P., Dickinson, N.M., Lepp, N.W. (2010). Trace elements mobility in a contaminated soil two years after field-amendment with a green waste compost mulch. *Environmental Pollution*, 158: 1644–1651.
- Cobbett, C.S. (2000). Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Current Opinion in Plant Biology*, 3: 211–216.
- Cobbett, C., Goldsbrough, P. (2002). Phytochelatins and metallothioneins: role in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 53: 159–182.

- Cocozza, C., Maiuro, L., Tognetti, R. (2011). Mapping Cadmium distribution in roots of *Salicaceae* through scanning electron microscopy with x-ray microanalysis. *iForest – Biogeosciences and Forestry*, 4: 113–120.
- Cosio, C., Vollenweider, P., Keller, C. (2006). Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis* L.). *Environmental and Experimental Botany*, 58(1–3): 64–74.
- Del Rio, L.A., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Palma, J.M., Barroso, J.B. (2006). Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology*, 141: 330–335.
- Devasagayam, T.P.A., Bloor, K.K., Ramasarma, T. (2003). Methods for estimating lipid peroxidation: an analysis of merits and demerits. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 40: 300–308.
- Dickinson, N.M., Pulford, I.D. (2005). Cadmium phytoextraction using short-rotation coppice *Salix*: the evidence trail. *Environment International*, 31: 609–613.
- Dietz, K-J., Baier, M., Krämer, U. (1999). Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. In: Prasad, M.N.V., Hagemeyer, J. (Eds.). *Heavy Metal Stress in Plants: From Molecules to Ecosystems*. Berlin: Springer-Verlag, pp. 73–97.
- Dos Santos Utmazian, M.N., Wieshammer, G., Vega, R., Wenzel, W.W. (2007). Hydroponic screening for metal resistance and accumulation of cadmium and zinc in twenty clones of willow and poplar. *Environmental Pollution*, 148: 155–165.
- Du, J., Yang, J.L., Li, C.H. (2012). Advances in metallotionein studies in forest trees. *Plant Omics Journal*, 5: 46–51.
- Ehsan, S., Ali, S., Noureen, S., Mahmood, K., Farid, M., Ishaque, W., Shakoor, M.B., Rizwan, M. (2014). Citric acid assisted phytoremediation of cadmium by *Brassica napus* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 106: 164–172.
- El-Shintinawy, F. (1999). Glutathione counteracts the inhibitory effect induced by cadmium on photosynthetic process in soybean. *Photosynthetica*, 36, (1–2): 171–179.
- Environmental Protection Agency (EPA, 2005). 40 CFR Part 51 Revision to the Guideline on Air Quality Models: Adoption of a Preferred General Purpose (Flat and Complex Terrain) Dispersion Model and Other Revisions; Final Rule. pp 1–45.

- Evangelou, M.W.H., Ebel, M., Schaeffer, A. (2007). Chelate assisted phytoextraction of heavy metals from soil. Effect, mechanism, toxicity, and fate of chelating agents. *Chemosphere*, 68: 989–1003.
- Evangelou, M.W.H., Ebel, M., Schaeffer, A. (2006). Evaluation of the effect of small organic acids on phytoextraction of Cu and Pb from soil with tobacco *Nicotiana tabacum*, *Chemosphere*, 63: 996–1004.
- Farid, M., Ali, S., Rizwan, M., Ali, Q., Abbas, F., Asad, Z., Bukharie, H., Saeed, R., Wu, L. (2017). Citric acid assisted phytoextraction of chromium by sunflower; morphophysiological and biochemical alterations in plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 145: 90–102.
- Fernández, R., Fernández-Fuego, D., Bertrand, A., González, A., (2014). Strategies for Cd accumulation in *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter: role of the cell wall, non-protein thiols and organic acids. *Plant Physiology and Biochemistry*, 78: 63–70.
- Fidalgo, F., Freitas, R., Ferreira, R., Pessoa, A.M., Teixeira, J. (2011). *Solanum nigrum* L. antioxidant defense system isozymes are regulated transcriptionally and post translationally in Cd induced stress. *Environmental and Experimental Botany*, 72: 312–319.
- Foyer, C.H., Noctor, G. (2000). Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytologist*, 146(3): 359–388.
- Foyer, C.H., Noctor, G. (2005). Oxidant and antioxidant signaling in plants: a reevaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environment*, 28: 1056–1071.
- Foyer, C.H., Theodoulou, F., Delrot, S. (2001). The functions inter and intracellular glutathione transport systems in plants. *Trends in Plant Science*, 6: 486–493.
- Franjić, J., Škvorc, Ž. (2010). Šumsko drveće i grmlje Hrvatske. Sveučilište u Zagrebu – Šumarski fakultet, str. 330.
- Freitas, E.V., Nascimento, C.W., Souza, A., Silva, F.B., (2013). Citric acid-assisted phytoextraction of lead: a field experiment. *Chemosphere*, 92: 213–217.
- Gao, Y., He, J., Ling, W., Hu, H., Liu, F. (2003). Effects of organic acids on copper and cadmium desorption from contaminated soils. *Environment International*, 29: 613–618.
- Gao, Y., Miao, C.Y., Mao, L., Zhou, P., Jin, Z.G., Shi, W.J. (2010). Improvement of phytoextraction and antioxidative defense in *Solanum nigrum* L. under cadmium stress

- by application of cadmium-resistant strain and citric acid. *Journal of Hazardous Materials*, 181: 771–777.
- Gericke, S., Kurmies, B. (1952). Die kolorimetrische Phosphorsäurebestimmung mit Ammonium-Vanadat-Molybdat und ihre Anwendung in der Pflanzenanalyse. *Zeitschrift für Pflanzenernährung, Düngung, Bodenkunde* 3, 32-35. in Borišev (2010): Potencijal klonova vrba (*Salix* spp.) u fitoekstrakciji teških metala. Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Giatonde, M.K. (1967). A spectrophotometric method for direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids. *Biochemical Journal*, 104: 627–633.
- Gill, S.S. N. Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 909–930.
- Gill, S.S, Khan, N., Tuteja, N. (2011). Differential cadmium stress tolerance in the Indian mustard (*Brassica juncea* L.) cultivars: an evaluation of the role of antioxidant machinery. *Plant Signaling and Behavior*, 6(2): 293–300.
- Gill, S.S., Khan, N.A., Tuteja, N. (2012). Cadmium at high dose perturbs growth, photosynthesis and nitrogen metabolism while at low dose it up regulates sulfur assimilation and antioxidant machinery in garden cress (*Lepidium sativum* L.). *Plant Science*, 182: 112–120.
- Gomes, M.P., Lanza Sá, T.C.L., Marques, M., Soares, A.M. (2013). Cadmium effects on mineral nutrition of the Cd-hyperaccumulator *Pfaffia glomerata*. *Biologia*, 68(2): 223–230.
- Greger, M., Landberg, T. (1999). Use of willow in phytoextraction. *International Journal of Phytoremediation*, 1: 115–123.
- Greger, M., Landberg, T. (2015). Novel Field Data on Phytoextraction: Pre-Cultivation with *Salix* Reduces Cadmium in Wheat Grains. *International Journal of Phytoremediation*, 17(10): 917–924.
- Greger, M., Lindberg, S. (1986): Effects of Cd²⁺ and EDTA on young sugar beets (*Beta vulgaris*). I. Cd²⁺ uptake and sugar accumulation. *Physiologia plantarum*, 66(1): 69–74.
- Grill, E., Löffler, S., Winnacker, E.-L., Zenk, M.H. (1989). Phytochelatins, the heavy metal binding proteins are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamyl-cysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86: 6838–6842.

- Guo, B., Dai, S., Wang, R., Guo, J., Ding, Y., Xu, Y. (2015). Combined effects of elevated CO₂ and Cd-contaminated soil on the growth, gas exchange, antioxidant defense, and Cd accumulation of poplars and willows. *Environmental and Experimental Botany*, 115: 1–10.
- Guo, H., Chen, H., Hong, C., Jiang, D., Zheng, B. (2017). Exogenous malic acid alleviates cadmium toxicity in *Miscanthus sacchariflorus* through enhancing photosynthetic capacity and restraining ROS accumulation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 141: 119–128.
- Gussarsson, M. (1994). Cadmium-induced alterations in nutrient composition and growth of *Betula pendula* seedlings: The significance of fine root as a primary target for cadmium toxicity. *Journal of Plant Nutrition*, 17: 2151–2163.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 249: 7130–7139.
- Hagemeyer, J., Breckle, S.W. (2002). Trace element stress in roots. In: Y. Waisel, A. Eshel and U. Kafkafi (Eds.), *Plant roots: the hidden half, 3rd edn.* Dekker, New York, pp. 763–785.
- Hakmaoui, A., Atera, M., Karoly, B., Baron, M. (2007). Copper and Cadmium Tolerance, Uptake and Effect on Chloroplast Ultrastructure. Studies on *Salix purpurea* and *Phragmites australis*. *Zeitschrift fur Naturforsch*, 62: 417–426.
- Hall, J.L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1–11.
- Hamer, D.H. (1986). Metallothioneins. *Annual Review of Biochemistry*, 55: 913–951.
- Hammer, D., Kayser, A., Keller, C. (2003). Phytoextraction of Cd and Zn with *Salix viminalis* in field trials. *Soil Use and Management*, 19(3): 187–192.
- Han, S.H., Kim, D.H., Shin, S.J. (2013). Bioaccumulation and Physiological Response of Five Willows to Toxic Levels of Cadmium and Zinc. *Soil and Sediment Contamination*, 22(3): 241–255.
- Hänsch, R., Mendel R. (2009). Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biology*, 12: 259–266.
- Hasanuzzaman, M., Hossain, M.A., da Silva, J.A.T., Fujita, M. (2012). Plant responses and tolerance to abiotic oxidative stress: antioxidant defense is a key factor. In: Bandi, V.,

- Shanker, A.K., Shanker, C., Mandapaka, M. (Eds.), *Crop Stress And Its Management: Perspectives and Strategies*. Springer, Berlin, pp. 261–316.
- Hassan, M., Dagari, M., Muazu, A., Sanusi, K., (2016). Effect of Citric Acid on Cadmium Ion Uptake and Morphological Parameters of Hydroponically Grown Jute Mallow (*Corchorus olitorius*). *International Journal of Chemical, Material and Environmental Research*, 3(1): 14–19.
- Hassan, Z., Ali, S., Ahmad, R., Rizwan, M., Abbas, F., Yasmeen, T., Muhammad, I. (2017). Biochemical and molecular responses of oilseed crops to heavy metal stress. In: A. Parvaiz *Oilseed Crops: Yield and adaptations under environmental Stress, First Edition*. John Wiley & Sons Ltd. pp. 236–248.
- He, J., Qin, J., Long, L., Ma, Y., Li, H., Li, K., Jiang, X., Liu, T., Polled, A., Liang, Z., Luo, Z.B. (2011). Net cadmium flux and accumulation reveal tissue-specific oxidative stress and detoxification in *Populus × canescens*. *Physiologia Plantarum*, 143: 50–63.
- He, J.L., Li, H., Luo, J., Ma, C.F., Li, S.J., Qu, L., Gai, Y., Jiang, X.N., Janz, D., Polle, A., Tyree, M., Luo, Z.B. (2013). A transcriptomic network underlies microstructural and physiological responses to cadmium in *Populus x canescens*. *Plant Physiology*, 162: 424–439.
- He, J.L., Li, H., Ma, C.F., Zhang, Y., Polle, A., Rennenberg, H., Cheng, X., Luo, Z. (2015). Overexpression of bacterial c-glutamylcysteine synthetase mediates changes in cadmium influx, allocation and detoxification in poplar. *New Phytologist*, 205: 240–254.
- Hernández-Allica, J., Garbisu, C., Barrutia, O., Becerril, J.M. (2007). EDTA-induced heavy metal accumulation and phytotoxicity in cardoon plants. *Environmental and Experimental Botany*, 60: 26–32.
- Hossain, M.A., Bhattacharje, S., Armin, S.M., Qian, P., Xin, W., Li, H.Y., Burritt, D.J., Fujita, M., Tran, L.S.P. (2015). Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: insights from ROS detoxification and scavenging. *Frontiers in Plant Science*, 6: 240.
- Hu, L., Zhang, Z., Xiang, Z., Yang, Z. (2016). Exogenous Application of Citric Acid Ameliorates the Adverse Effect of Heat Stress in Tall Fescue (*Lolium arundinaceum*). *Frontiers in Plant Science*, 7: 179.

- Huang, J.W., Blaylock, M.J., Kapulnik, Y., Ensley, B.D. (1998). Phytoremediation of uranium-contaminated soils: role of organic acids in triggering uranium hyperaccumulation in plants. *Environmental Science and Technology*, 32: 2004–2008.
- Huiyi, H., Deming, J., Chunxing, Z., Youbiao, Z., Zhiquing, L. (1991). Study on the control of cadmium-pollution in the soil by forestry ecological engineering. *China Environmental Science*. 2(1): 36–45.
- Ingwersen, J., Streck, T. (2005). A regional-scale study on the crop uptake of cadmium from sandy soils: measurement and modeling. *Journal of Environmental Quality*, 34: 1026–1035.
- Iqbal, N., Masood, A., Nazar, R., Syeed, S., Khan, N.A. (2010). Photosynthesis, growth and antioxidant metabolism in mustard (*Brassica juncea* L.) cultivars differing in Cd tolerance. *Agricultural Sciences in China*, 9: 519–527.
- Irfan, M., Hayat S., Ahmad, A., Nasser, M. (2013). Soil cadmium enrichment: Allocation and plant physiological manifestations. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 20: 1–10.
- Irtelli, B., Navari-Izzo, F. (2006). Influence of sodium nitrilotriacetate (NTA) and citric acid on phenolic and organic acids in *Brassica juncea* grown in excess of cadmium. *Chemosphere*, 65: 1348–1354.
- Islam, M.M., Hoque, M.A., Okuma, E., Banu, M.N.A., Shimoishi, Y. (2009). Exogenous proline and glycine betaine increase antioxidant enzyme activities and confer tolerance to cadmium stress in cultured tobacco cells. *Journal of Plant Physiology*, 166: 1587–1597.
- Jensen, J.K., Holm, P.E., Nejrup, J., Larsen, M.B., Borggaard, O.K. (2009). The potential of willow for remediation of heavy metal polluted calcareous urban soils. *Environmental Pollution*, 157: 931–937.
- John, R., Ahmad, P., Gadgil, K., Sharma, S., (2008). Effect of Cadmium and lead on growth, biochemical parameters and uptake in *Lemna polyrrhiza* L. *Plant, Soil and Environment*, 54: 262–270.
- Josifović, M. (1972): Flora SR Srbije, tom III, Srpska akademija nauka i umetnosti, odeljenje Prirodno – matematičkih nauka, str. 430-450.
- Jovanović, B., Tucović, A. (1972). Salicaceae, Lindl. U: Josifović, M. (Ed): Flora SR Srbije III, Srpska akademija nauka i umetnosti. Beograd, pp. 405-456.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H. (2000). Trace elements in soils and plants. 3rd edition. CRC Press LLC, Boca Raton, pp: 230–331.

- Kabata-Pendias, A. (2007). Trace elements from soil to human. Springer, Berlin. New York. pp. 294–305.
- Kacálková, L., Tlustoš, P., Száková, J. (2015). Phytoextraction of Risk Elements by Willow and Poplar Tree. *International Journal of Phytoremediation*, 17: 414–421.
- Kapetanović, I.M., Mical, I.I. (1979). Inhibition of Acetaminophen Induced Hepatotoxicity by Phenacetin and Its Alkoxy Analogs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 209: 25–30.
- Kebert, M. (2014). Biohemijška i fiziološka karakterizacija klonova topole (*Populus* spp.) u procesu fitoekstrakcije bakra, nikla i kadmijuma. Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, str. 249.
- Khan, N.A., Singh, S., Naza, R. (2007). Activities of antioxidative enzymes, sulphur assimilation, photosynthetic activity and growth of wheat (*Triticum aestivum*) cultivars differing in yield potential under cadmium stress. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 193: 435–444.
- Kim, S.H., Lee, I.S. (2010). Comparison of the Ability of Organic Acids and EDTA to Enhance the Phytoextraction of Metals from a Multi-Metal Contaminated Soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 84: 255–259.
- Kim, Y.R., Yoon, J.K., Kim, T.S., Yang, J.E., Owens, G., Kim, R.K. (2015). Bioavailability of heavy metals in soils: definitions and practical implementation—a critical review. *Environmental Geochemistry and Health*, 37(6): 1041-1061.
- Kirkham, M.B. (2006). Cadmium in plants on polluted soils: effects of soil factors, hyperaccumulation and amendments. *Geoderma*, 137: 19–32.
- Komives, T., Gullner, G. (2006). Dendroremediation: the use of trees in cleaning up polluted soils. In: A., Mackova, D., Dowling, T. Macek., (Eds.). *Phytoremediation Rhizoremediation*, Springer, pp. 23–31.
- Konlechner, C., Türkteş, M., Langer, I., Vaculík, V., Wenzel, W.W., Puschenreiter, M., Hausera, M.T. (2013). Expression of zinc and cadmium responsive genes in leaves of willow (*Salix caprea* L.) genotypes with different accumulation characteristics. *Environmental Pollution*, 178: 121–127.
- Koo, B.J., Chang, A.C., Crowley, D.E., Page, A.L., Taylor, A. (2013). Availability and Plant Uptake of Biosolid-Borne Metals. *Applied and Environmental Soil Science*, ID 892036.

- Korenkov, V., Hirschi, K., Crutchfield, J.D., Wagner, G.J. (2007). Enhancing tonoplast Cd/H antiport activity increases Cd, Zn, and Mn tolerance, and impacts root/shoot Cd partitioning in *Nicotiana tabacum* L. *Planta*, 226: 1379–1387.
- Krupa, Z., Oquist, G., Huner P.A. (1993). The effect of cadmium on photosynthesis of *Phaseolus vulgaris*: a fluorescence analysis. *Physiologia Plantarum*, 88: 626–630.
- Kubota, H., Sato, K., Yamada, T., Maitani, T. (2000). Phytochelatin homologues induced in hairy roots of horseradish. *Phytochemistry* 53: 239–245.
- Kuzovkina, Y.A., Knee, M., Quigley, M.F. (2004) Cadmium and copper uptake and translocation in five willow (*Salix* L.) species. *International Journal of Phytoremediation*, 6(3): 269–287.
- Landberg, T., Greger, M. (1994). Can heavy metal tolerant clones of *Salix* be used as vegetation filters on heavy metal contaminated land? In: *Willow Vegetation Filters for Municipal Wastewaters and Sludges*, Proceedings of a Study Tour, Conference and Workshop in Uppsala, Sweden, 5–10 June, 1994. ISBN 0282–6267.
- Landberg, T., Greger, M. (1996). Differences in uptake and tolerance to heavy metals in *Salix* from unpolluted and polluted areas. *Applied Geochemistry*, 11: 175–180.
- Landberg, T., Greger, M., (2002a). Interclonal variation of heavy metal interactions in *S. viminalis*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21: 2669–2674.
- Landberg, T., Greger, M. (2002b). Differences in oxidative stress in heavy metal resistant and sensitive clones of *Salix viminalis*. *International Journal of Plant Physiology*, 159: 69–75.
- Lasat, M.M. (2000). Phytoextraction of metals from contaminated soil: a review of plant/soil/metal interaction and assessment of pertinent agronomic issues. *Journal of Hazardous Substance Research*, (2): 5–23.
- Lasat, M.M. (2002). Phytoextraction of toxic metal: a review of biological mechanisms. *Journal of Environmental Quality*, 31: 109–120.
- Leštan, D., Luo, C.L., Li, X.D. (2008). The use of chelating agents in the remediation of metal-contaminated soils: A review. *Environmental pollution*, 153: 3–13.
- Li, H., Liu, Y., Zeng, G., Zhou, L., Wang, X., Wang, Y., Wang, C., Hu, X., Xu, W. (2014). Enhanced efficiency of cadmium removal by *Boehmeria nivea* (L.) Gaud. in the presence of exogenous citric and oxalic acids. *Journal of Environmental Sciences*, 26(12): 2508–2516.

- Liu, Y., Chen, G.C., Zhang, J., Shi, X., Wang, R. (2011). Uptake of cadmium from hydroponic solutions by willows (*Salix* spp.) seedlings. *African Journal of Biotechnology*, 10: 16209–16218.
- Luković, J., Merkulov, L., Pajević, S., Zorić, L., Nikolić, N., Borišev, M., Karanović, D. (2012). Quantitative assessment of effects of cadmium on the histological structure of poplar and willow leaves. *Water Air and Soil Pollution*, 23(6): 2979–2993.
- Lunáčková, L., Masarovičová, E., Králová, K., Streško, V. (2003). Response of fast growing woody plants from family Salicaceae to cadmium treatment. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 70(3): 576–585.
- Lux, A., Šottníková, A., Opatrná, J., Greger, M. (2004). Differences in structure of adventitious roots in *Salix* clones with contrasting characteristics of cadmium accumulation and sensitivity. *Physiologia Plantarum*, 120: 537–545.
- Lux, A., Martinka, M., Vaculík, M., White, J. (2011). Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. *Journal of Experimental Botany*, 6: 21–37.
- Ma, N.L., Rahmat, Z., Lam, S.S. (2013). A Review of the “Omics” Approach to Biomarkers of Oxidative Stress in *Oryza sativa*. *International Journal of Molecular Sciences*. 14: 7515–7541.
- Magdziak, Z., Mleczek, M., Rutkowski, P., Golinski, P. (2017). Diversity of low-molecular weight organic acids synthesized by *Salix* growing in soils characterized by different Cu, Pb and Zn concentrations. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39:137.
- Mahar, A., Wang, P., Ali, A., Kumar, M.A., Lahori, A.H., Wang, Q., Li, R., Zhang, Z. (2016). Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 26: 111–121.
- Mahmud, J.A., Hasanuzzaman, M., Nahard, K., Bhuyana, B.M.H.M., Fujita, M. (2018). Insights into citric acid-induced cadmium tolerance and phytoremediation in *Brassica juncea* L.: Coordinated functions of metal chelation, antioxidant defense and glyoxalase systems. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 144: 990–1001.
- Maksymiec, W., Krupa, Z. (2006). The effects of short-term exposition to Cd, excess Cu ions and jasmonate on oxidative stress appearing in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental and Experimental Botany*, 57: 187–194.
- Maksymiec, W., Malgorzata, W., Krupa, Z. (2007). Variation in oxidative stress and photochemical activity in *Arabidopsis thaliana* leaves subjected to cadmium and excess

- copper in the presence or absence of jasmonate and ascorbate. *Chemosphere*, 66: 421–427.
- Margazzi, O., Vergnano, O. (1948). Il contenuto di nichel nelli ceneri di *Alyssum bertlonii* Desv. *Atti della Società Toscana di Scienze Naturali A* 55: 49–77.
- Marić, M. (2014). Mogućnost korišćenja nekih divljih i kultivisanih biljaka za remedijaciju zemljišta. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Tahnički fakultet u Boru, str. 135.
- Marmioli, M., Pietrini, F., Maestri, E., Zacchini, M., Marmioli, N., Massacci, A. (2011). Growth, physiological and molecular traits in Salicaceae trees investigated for phytoremediation of heavy metals and organics. *Tree Physiology*, 31(12):1319–1334.
- Mattina M.J.I., Lannucci-Bergera W., Musantea C., Jason C. (2003). Concurrent plant uptake of heavy metals and persistent organic pollutants from soil. *Environmental Pollution* 124: 375–378.
- McCutcheon, C.S., Rock A.S. (2001). Phytoremediation: state of the science conference and other developments, *International Journal of Phytoremediation*, 3: 1–11.
- McGrath, S.P., Zhao, F.J. (2003). Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soil. *Current Opinion in Biotechnology*, 14: 277–282.
- Meers, E., Vervaeke, P., Tack, F.M.G., Lust, N., Verloo, M., Lesage, E. (2003). Field trial experiment: phytoremediation with *Salix* sp. on a dredged sediment disposal site in Flanders. *Belgium Remediation Journal*, 13: 87–97.
- Meers, E., Lesage, E., Lamsal, S., Hopgood, M., Vervaeke, P., Tack, F.M.G., Verloo, M.G. (2005). Enhanced phytoextraction: I. Effect of EDTA and citric acid on heavy metal mobility in a calcareous soil. *International Journal of Phytoremediation*, 7(2): 129–142.
- Meers, E., Vandecasteele, B., Ruttens, A., Vangronsveld, J., Tack, F.M.G. (2007). Potential of five willow species (*Salix* spp.) for phytoextraction of heavy metals. *Environmental and Experimental Botany*, 60: 57–68.
- Meers, E., Tack, F.M., Van Slycken, S., Ruttens, A., Du Laing, G., Vangronsveld, J., Verloo, M.G. (2008). Chemically assisted phytoextraction: a review of potential soil amendments for increasing plant uptake of heavy metals. *International Journal of Phytoremediation*, 10(5): 390–414.
- Melo, É.C., Nascimento, W.A.C., Accioly, A.M.A., Queiroz Santos, A.C. (2008). Phytoextraction and fractionation of heavy metals in soil after multiple applications of natural chelates, *Scientia Agricola*, 65(1): 61–68.

- Memon, A.R., Schröder, P. (2009). Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, 16: 162–175.
- Meyer, A.J., Fricker, M.D. (2002). Control of demand-driven biosynthesis of glutathione in green *Arabidopsis* suspension culture cells. *Plant Physiology*, 130: 1927–1937.
- Michalak, A. (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15: 523–530.
- Mihailović, A., Lj. Budinski-Petković, Lj., Popov, S., Ninkov, J., Vasin, J., Ralević, N.M., Vučinić Vasić, M. (2015). Spatial distribution of metals in urban soil of Novi Sad, Serbia: GIS based approach. *Journal of Geochemical Exploration*, 150: 104–114.
- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi R.D., R. Kumar, R., Seth, C.S., Gupta, D.K. (2006). Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation. *Chemosphere*, 65: 1027–1039.
- Mishra, S., Tripathi, R.D., Srivastava, S., Dwivedi, S., Trivedi, P.K, Dhankher, O.P., Khare, A. (2009). Thiol metabolism play significant role during Cd detoxification by *Ceratophyllum demersum* L. *Bioresource Technology*, 100: 2155–2161.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V.B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V., Van Breusegem, F. (2011). ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science*, 16: 300–309.
- Mleczek, M., Rutkowski, P., Rissmann, I., Kaczmarek, Z., Golinski, P., Szentner, K. (2010). Biomass productivity and phytoremediation potential of *Salix alba* and *Salix viminalis*. *Biomass Bioenergy*, 34(9): 1410–1418.
- Mleczek, M., Kozłowska, M., Kaczmarek, Z., Magdziak, Z., Goliński, P. (2011). Cadmium and lead uptake by *Salix viminalis* under modified Ca/Mg ratio. *Ecotoxicology*, 20: 158-165.
- Mleczek, M., Rutkowski, P., Kaczmarek, Z., Golinski, P., Szentner, K., Waliszewska, B., Stolarski, M., Szczukowski, S. (2017). Biological diversity of *Salix* taxa in Cu, Pb and Zn phytoextraction from soil. *Internation Journal of Phytoremediation*, 19: 121–132.
- Mnasri, M., Ghabriche, R., Fourati, E., Zaier, H., Sabally, K., Barrington, S., Lutts, S., Abdelly, C., Ghnaya, T. (2015). Cd and Ni transport and accumulation in the halophyte *Sesuvium portulacastrum*: implication of organic acids in these processes. *Frontiers in Plant Sciences*, 6: 156.

- Mohamed, A.A., Castagna, A., Ranieri, A., Sanita di Toppi, L. (2012). Cadmium tolerance in Brassica juncea roots and shoots is affected by antioxidant status and phytochelatin biosynthesis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 57: 15–22.
- Molina, A.S., Nievas, C., Chaca, M.V.P., Garibotto, F., Gonzalez, U., Marsa, S.M., Luna, C., Gimenez, M.S., Zirulnik, F. (2008). Cadmium-induced oxidative damage and antioxidative defense mechanisms in *Vigna mungo* L. *Plant Growth Regulations*, 56: 285–295.
- Moraghan, J.T. (1993). Accumulation of cadmium and selected elements in flax seed grown on a calcareous soil. *Plant and Soil*, 150 (1): 61–68.
- Moreno Pires, A.M., Marchi, G., Mattiazzo, M.E., Guimarães Guilherm, L.R. (2007). Organic acids in the rhizosphere and phytoavailability of sewage sludge-borne trace elements. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42 (7): 917–924.
- Mosa, K.A., Saadoun, I., Kumar, K., Helmy, M., Dhankher, O.P. (2016). Potential biotechnological strategies for the cleanup of heavy metals and metalloids. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1–14.
- Mourato, M., Reis, R., Martins L. (2012). Characterization of Plant Antioxidative System. In: (Ed.) Giuseppe Montanar, Response to Abiotic Stresses: A Focus on Heavy Metal Toxicity, Intech publisher, pp. 23–44.
- Nagajyoti, P.C., Lee, K.D., Sreekanth, T.V.M. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 8: 199-216.
- Najeeb, U., Jilani, G., Ali, S., Sarwar, M., Xu, L., Zhou, W.J. (2011). Insight into cadmium induced physiological and ultra-structural disorders in *Juncus effusus* L. and its remediation through exogenous citric acid. *Journal of Hazardous Materials*, 186: 565–574.
- Nakano, Y., Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, 22: 867–880.
- Nascimento, C.W.A., Xing, B. (2006). Phytoextraction: a review on enhanced metal availability and plant accumulation. *Scientia Agricola*, 63: 299–311.
- Nelson, D.W., Sommers, L.E. (1973). Determination of total nitrogen in plant material. *Agronomy Journal*, 65: 109–112.
- Nikolić, N., Kojić, D., Pilipović, A., Pajević, S., Krstić, B., Borišev, M., Orlovic, S. (2008). Responses of hybrid poplar to cadmium stress: photosynthetic characteristics, cadmium

- and proline accumulation, and antioxidant enzyme activity. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 50(2): 95–103.
- Nikolić, N. (2009). Uticaj teških metala na morfo-anatomske i fiziološke karakteristike klonova topola (*Populus* spp.). Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad. str. 243.
- Nikolić, N., Borišev, M., Pajević, S., Arsenov, D., Župunski, M., Orlović, S., Pilipović, A. (2015). Photosynthetic response and tolerance of three willow species to cadmium exposure in hydroponic culture. *Archives of Biological Sciences*, 67(4): 1411–1420.
- Nishijo, M., Nakagawa, H., Suwazono, Y., Nogawa, K., Kido, T. (2017). Causes of death in patients with Itai-itai disease suffering from severe chronic cadmium poisoning: a nested case– control analysis of a follow-up study in Japan. *BMJ Open*, 7: 015694.
- Noctor, G., De Paepe, R., Foyer, C.H. (2007). Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends Plant Sciences*, 12: 125–134.
- Oljača, R., Rodzkin, A., Krstić, B., Govedar, Z. (2017). Fiziologija vrba. Univerzitet u Banja Luci, Međunarodni ekološki institut „A.D. SAHAROVA“. Beloruski državni univerzitet Minsk, Univerzitet u Novom Sadu. pp. 13–21.
- Ouyang, J., Li, B., Li, C., Shang, X., Zou, J. (2017). Cadmium Effects on Mineral Accumulation and Selected Physiological and Biochemical Characters of *Salix babylonica* L. *Polish Journal of Environmental. Studies*, 26,(6): 2667–2676.
- Pagani, M.A., Tomas, M., Carrillo, J., Bofill, R., Capdevila, M, Atrian, S. Andreo, C.S. (2012). The response of the different soybean metallothionein isoforms to cadmium intoxication. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 117: 306–315.
- Pajević, S., Borišev, M., Nikolić, N., Krstić, B., Pilipović, A., Orlović, S. (2009). Phytoremediation capacity of poplar (*Populus* spp.) and willows (*Salix* spp.) clones in relation to photosynthesis. *Archives of Biological Sciences*, 61: 239–247.
- Pajević, S., Nikolić, N, Borišev, M., Župunski, M. (2014). Osnovi fiziologije biljaka. Praktikum za studente ekologije. Prirodno-matematički fakultet, Departman za biologiju i ekologiju, Novi Sad, str. 47–54.
- Pajević, S., Borišev, M., Nikolić, N., Arsenov, D., Orlović, S., Župunski, M. (2016). Phytoextraction of heavy metals by fast-growing trees: a review. In: A.A. Ansari, S.S. Gill, R. Gill, G.R. Lanza, L. *Phytoremediation management of environmental contaminants*. Newman, Springer, pp. 29–64.

- Parmar, P., Kumari, N., Sharma, V. (2013). Structural and functional alterations in photosynthetic apparatus of plants under cadmium stress. *Botanical Studies*, 54: 4.
- Pence, N.S., Larsen, P.B., Ebbs, S.D., Letham, D.L.D., Lasat, M.M., Garvin, D.F. (2000). The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 97: 4956–4960.
- Pérez-Chaca, M.V., Rodríguez-Serrano, M., Molina, A. S., Pedranzani, H.E., Zirulnik, Z., Sandalio, Z. S., Romero-Puertas, M.C. (2014). Cadmium induces two waves of reactive oxygen species in *Glycine max* (L.) roots. *Plant, Cell and Environment*, 37: 1672–1687.
- Pietrini, F., Iannelli, M. A., Pasqualini, S., & Massacci, A. (2003). Interaction of cadmium with glutathione and photosynthesis in developing leaves and chloroplasts of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex strudel. *Plant Physiology*, 133: 829–837.
- Pietrini, F., Iannelli, M.A., Montanari, R., Bianconi, D., Massacci, A. (2005). Cadmium interaction with thiols and photosynthesis in higher plants. In: Hemantaranjan A. (Ed.), *Advances in plant physiology*. Scientific Publishers, Jodhpur, India: pp. 313–326.
- Pietrini, F., Zacchini, M., Iori, V., Pietrosanti, L., Ferretti, M., Massacci, A. (2010). Spatial distribution of cadmium in leaves and its impact on photosynthesis: examples of different strategies in willow and poplar clones. *Plant Biology*, 12(2): 355–363.
- Pilon-Smits, E. (2005). Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*. 56: 15–39.
- Prasad, M. N. V. (2003). Phytoremediation of Metal-Polluted Ecosystems: Hype for Commercialization. *Russian Journal of Plant Physiology*, 50, (5), 686–700.
- Prasad, M.N.V., Freitas, H.M.O (2003). Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology*, (6)3: 225–321.
- Pulford, I.D., Riddell-Black, D., Stewart, C. (2002). Heavy metal uptake by *Salix* clones from sewage sludge-treated soil: the potential for phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation*, 4: 59–72.
- Pulford, I.D., Watson, C. (2003). Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees—a review. *Environment International*, 29: 529–540.
- Quartacci, M., Argilla, A., Baker, A., Navari-Izzo, F., (2006). Phytoextraction of metals from a multiply contaminated soil by Indian mustard. *Chemosphere*, 63: 918–925.

- Rao, G., Sui, J., Zeng, Y., He, C., Duan, A., Zhang, J. (2014). De novo transcriptome and small RNA analysis of two chinese willow cultivars reveals stress response genes in *Salix matsudana*. *PLoS One*, 9: 109122.
- Raskin, I., Ensley, B. D. (2000). Recent developments for in situ treatment of metal contaminated soils. In: Raskin, I., Ensley, B.D. (Eds.), *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean Up the Environment*. John Wiley and Sons Inc., New York, pp. 24-27.
- Rausser, W.E. (1995). Phytochelatins and related peptides: structure, biosynthesis, and function. *Plant Physiology*, 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.
- Reeves, R.D., Baker, A.J.M. (2000). Metal-accumulating plants. In: Raskin, I., Ensley, B.D. (Eds.), *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean-Up the Environment*. John Wiley and Sons, New York, pp. 193–230.
- Robinson, B.H., Millis, T.M., Petit, D., Fung, L.E., Green, S.R., Clothier, B.E. (2000). Natural and induced cadmium-accumulation in poplar and willow: implications for phytoremediation. *Plant Soil*, 227: 301–306.
- Rodríguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M.C., Pazmino, D.M., Testillano, P.S., Risueno, M.C., del Río, L.A., Sandalio, L.M. (2009). Cellular response of pea plants to cadmium toxicity: cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide, and calcium. *Plant Physiology*, 150: 229–243.
- Romero-Puertas, M.C., Corpas, F.J., Rodríguez-Serrano, M., Gomes, M., del Río, L.A., Sandalio, L.M. (2007). Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea plants. *Plant Physiology*, 164: 1346.
- Rosselli, W., Keller, C., Boschi, K. (2003). Phytoextraction capacity of trees growing on a metal contaminated soil. *Plant and Soil*, 256: 265–272.
- Salam, M. A., Kaipainen, E., Mohsin, M., Villa, A., Kuitnen, S., Pulkkinen, P., Pelkonen, P., Mehtatlo, L., Pappinen A. (2016). Effects of contaminated soil on the growth performance of young *Salix* (*Salix schwerinii* E. L. Wolf) and the potential for phytoremediation of heavy metals. *Journal of Environmental Management*, 183: 467–477.

- Salt, D.E., Wagner, G.J. (1993). Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots. Evidence for a $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^+$ antiport activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 268: 12297–12302.
- Salt, D.E., Prince, R.C., Pickering, I.J., Raskin, I. (1995). Mechanisms of Cadmium Mobility and Accumulation in Indian Mustard. *Plant Physiology*, 109: 1427–1433.
- Salt, D.E., Smith, R.D., Raskin, I. (1998). Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 643–668.
- Salt, D.E., Prince, R. C., Pickering, I.J. (2002). Chemical speciation of accumulated metals in plants: evidence from x-ray absorption spectroscopy. *Microchemical journal*, 71: 255–259.
- Sandbrichler, A.M., Höckner, M. (2016). Cadmium protection strategies – a hidden trade-off? *Internation Journal of Molecular Sciences*, 17: 139.
- Saraswat, S., Rai, J.P.N. (2011). Complexation and detoxification of Zn and Cd in metal accumulating plants. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 10: 327–339.
- Sarwar, N., Saifullah, Malhi, S.S., Zia, M.H., Naeem, A., Bibia, S., Farid, G. (2010). Role of mineral nutrition in minimizing cadmium accumulation by plants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90: 925–937.
- Sedlak, J., Lindsay, R.H. (1968). Estimation of total protein- bound, and non-protein sulfhydryl groups in tissue by Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*, 25: 192–208.
- Seregin, I.V., Ivanov, V.B. (2001). Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology*. 48: 523–544.
- Seregin, I.V., Kozhevnikova, A.D. (2008). Roles of root and shoot tissues in transport and accumulation of cadmium, lead, nickel and strontium. *Russian Journal of Plant Physiology*, 55: 1–22.
- Sergiev, I., Alexieva, V., Karanov, E. (1997). Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences*, 51: 121–124.
- Seth, C.S., Remans, T, Keunen, E., Jozefczak, M., Gielen, H., Opdenakker, H., Weyens, N., Vangronsveld, J., Cuypers, A. (2012). Phytoextraction of toxic metals: a central role for glutathione. *Plant Cell and Environment*, 35: 334–346.
- Shah, K., Nongkynrih, J.M. (2007). Metal hyperaccumulation and bioremediation. *Biologia planatarum*, 51(4): 618-634.

- Shahid, M., Dumat, C., Khalid, S., Niazi, N.K., Antunes, P.M. (2016). Cadmium bioavailability, uptake, toxicity and detoxification in soil-plant system. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 241: 73–137.
- Shakoor, M.B. Ali, S., Hameed, A., Farid, M., Hussain, S., Yasmeen, T., Najeeb, U., Bharwana, S.A., Abbasi G.H. (2014). Citric acid improves lead (Pb) phytoextraction in *Brassica napus* L. by mitigating Pb-induced morphological and biochemical damages. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 109: 38–47.
- Shamshad, S., Shahid, M., Rafiq, M., Khalid, S., Dumat, C., Sabir, M., Murtaza, B., Farooq, A.B.U., Shah, N.S. (2018). Effect of organic amendments on cadmium stress to pea: A multivariate comparison of germinating vs young seedlings and younger vs older leaves. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 151: 91–97.
- Sharma, S., Dietz, K.J. (2006). The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *Journal of Experimental Botany*, 57: 711–726.
- Sharma, S.S., Dietz, K.J. (2009). The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends in Plant Sciences*, 14(1): 43–50.
- Sheoran, V., Sheoran, A.S., Poonia, P. (2009). Phytomining: A review. *Minerals Engineering*, 22: 1007–1019.
- Simon, L.M., Fatrai, Z., Jonas, D.E., Matkovic, B. (1974). Study of metabolism enzymes during the development of *Phaseolus vulgaris*. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 166: 387–392.
- Singh, O.V., Labana, S., Pandey, G., Budhiraja, R. Jain, R.K. (2003). Phytoremediation: an overview of metallion decontamination from soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61: 405–412.
- Singh, H., Verma, A., Kumar, M., Sharma, R., Gupta, R., Kaur, M., Negi, M., Sharma, S.K. (2011). Phytoremediation: A Green Technology to Clean Up the Sites with Low and Moderate Level of Heavy Metals. *Austin Biochemistry*, 2: 2.
- Singh, M., Kumar, J., Singh, S., Singh, V.P., Prasad, M, Singh, M.P.V.V.B. (2015). Adaptation Strategies of Plants against Heavy Metal Toxicity: A Short Review. *Biochemistry and Pharmacology*, 4:161.
- Skrebsky, E.C., Tabaldi, L.A., Pereira, B.L., Rauber, R., Maldaner, J., Cargnelutti, D., Concelves, F.J., Castro, Y.G., Shetinger, C.R.M., Nicoloso, T.F. (2008). Effect of cadmium on growth, micronutrient concentration and δ – aminolevulinic acid

- dehydrates and acid phosphatase activities on plants of *Pfaffia glomerata*. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 20: 285–294.
- Stanislawska-Glubiak, E., Korzeniowska, J., Kocon, A. (2012). Effect of the reclamation of heavy metal contaminated soil on growth of energy willow. *Polish Journal of Environmental Studies*, 21: 187–192.
- Stephenson, C., Black, C.R. (2014). One step forward, two steps back: the evolution of phytoremediation into commercial technologies, *Bioscience Horizons: The International Journal of Student Research*, 7: 1-9.
- Stikić, J., Jovanović, Z. (2012). Fiziologija stresa biljaka. Izd. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet. Beograd, pp. 1-27.
- Stoeppler, M. (1991). Cadmium, in *Metals and their compounds in the environment*, E.M. Weinheim (Ed.), Verlag Chemie, pp. 805–849.
- Ström, L., Owen, A.G., Godbold, D.L., Jones, D.L. (2001). Organic acid behavior in a calcareous soil: sorption reactions and biodegradation rates. *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 2125–2133.
- Sun, Q., Wang, X.R., Ding, S.M., Yuan, X.F. (2005). Effects of exogenous organic chelators on phytochelatins production and its relationship with cadmium toxicity in wheat (*Triticum aestivum* L.) under cadmium stress. *Chemosphere* 60: 22–31.
- Sun, Y.L., Hong, S.K. (2011). Effects of citric acid as an important component of the responses to saline and alkaline stress in the halophyte *Leymus chinensis* (Trin.). *Plant Growth Regulations*, 64: 129–139.
- Suzuki, N., Koussevitzky, S., Mittler, R.O.N., Miller, G.A.D. (2012). ROS and redox signaling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell and Environment*, 35: 259–270.
- Sytar, O., Kumar, A., Latowski, D., Kuczynska, P., Strzałka, K., Prasad, M.N.V. (2013). Heavy metal-induced oxidative damage, defense reactions, and detoxification mechanisms in plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35: 985–999.
- Takáč, P., Szabová, S., Kozáková, L., Benková, M. (2009). Heavy metals and their bioavailability from soils in the long-term polluted central Spiš region of SR. *Plant Soil and Environmental*, 55(4): 167–172.
- Tlustoš, P., Száková, J., Vysloužilová, M., Pavlíková, D., Weger, J., Javorská, H. (2007). Variation in the uptake of arsenic, cadmium, lead, and zinc by different species of willows *Salix* spp. grown in contaminated soils. *Central European Journal of Biology*, 2(2): 254–275.

- Toth, G., Hermann, T., Da Silva, M.R., Montanarella, L. (2016). Heavy metals in agricultural soils of the European Union with implications for food safety. *Environment International*, 88: 299–309.
- Tózsér, D., Harangi, S., Baranyai, E., Lakatos, G., Fülöp, Z., Tóthmérész, B., Simon, E. (2018). Phytoextraction with *Salix viminalis* in a moderately to strongly contaminated area. *Environmental Science and Pollution Research*, 25: 3275–3290.
- Trakal, L., Komárek, M., Száková, J., Tlustoš, P., Tejnecký, V., Drábek, O. (2012). Sorption behavior of Cd, Cu, Pb, and Zn and their interactions in phytoremediated soil. *International Journal of Phytoremediation*, 14: 806–819.
- Trevisan, S., Francioso, O., Quaggiotti, S., Nardi, S. (2010). Humic substances biological activity at the plant-soil interface. From environmental aspects to molecular factors. *Plant Signaling & Behavior*, 5(6): 635–643.
- Ubavić, M., Bogdanović D. (2006). Praktikum iz Agrohemijske. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, str. 34–63.
- Ueno, D., Ma, J.F., Iwashita, T., Zhao, F.J., McGrath, S.P. (2005). Identification of the form of Cd in the leaves of a superior Cd-accumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens* using ¹¹³Cd-NMR. *Planta*, 221: 928–936.
- Vaculík, M., Konlechner, C., Langer, I., Adlassnig, W., Puschenreiter, M., Lux, A., Hauser, M.T. (2012). Root anatomy and element distribution vary between two *Salix caprea* isolates with different Cd accumulation capacities. *Environmental Pollution*, 163: 117–126.
- Vamerali, T., Bandiera, M., Mosca, G. (2010). Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land. A review. *Environmental Chemistry Letters*, 8: 1–17.
- Vassilev, A., Vangronsveld, J., Yordanov, I. (2002). Cadmium Phytoextraction: Present state, Biological backgrounds and research needs. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 8 (3-4): 68–95.
- Vassilev, A., Perez-Sanz, A., Semane, B., Carteer, R., Vangronsveld, J. (2005). Cadmium accumulation and tolerance of two *Salix* genotypes hydroponically grown in presence of cadmium. *Journal of Plant Nutrition*. 28: 2159–2177.
- Verbruggen, N., Hermans, C. (2008). Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids*, 35: 753–759.

- Vidojević, D., Dimić, B., Baćanović, N. (2013). Praćenje stanja zemljišta - zakonski osnov, ciljevi i indikatori. Ministarstvo energetike, razvoja i zaštite životne sredine, Agencija za zaštitu životne sredine. ISBN 978-86-87159-10-5.
- Vukanović, V., Bertić, B. (1989). Praktikum iz agrokemije i ishrane bilja. Poljoprivredni fakultet, Sveučilište u Osijeku, Biotehnički znanstveno nastavni centar, Osijek, str 3–4.
- Vukićević, E. (1987). Dekorativna dendrologija. Naučna knjiga, Beograd, str. 292-293.
- Vysloužilová, M., Puschenreiter, M., Wieshammer, G., Wenzel, W.W. (2006). Rhizosphere characteristics, heavy metal accumulation and growth performance of two willow (*Salix x rubens*) isolates. *Plant, Soil and Environment*, 52: 353–361.
- Wagner, G.J. (1993). Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Advances in Agronomy*, 51: 173–212.
- Wahsha, M., Bini, C., Fontana, S., Wahsha, A., Zilioli, A. (2011). Toxicity assessment of contaminated soils from a mining area in Northeast Italy by using lipid peroxidation assay. *Journal of Geochemical Exploration*, 113: 112–117.
- Wan, X., Lei, M., Chen, T. (2016). Cost–benefit calculation of phytoremediation technology for heavy-metal-contaminated soil. *Science of The Total Environment*, 563/564: 796–802.
- Wang, A.S., Chaney, R.L., Angle, J.S., McIntosh, M.S., (2006). Using hyperaccumulator plants to phytoextract soil Cd. In: Macková, M., Dowling, D., Macek, T. (eds.). *Phytoremediation and Rhizoremediation*. Springer Verlag, Dordrecht, the Netherlands. pp 103-114.
- Wang, X., Liu, Y., Zeng, G., Chai, L., Song, X., Min, Z., Xiao, X. (2008). Subcellular distribution and chemical forms of cadmium in *Beckmannia nivea* (L.) Gaud. *Environmental and Experimental Botany*, 62: 389–395.
- Wang, S., Dong, Q., Wang, Z., (2017). Differential effects of citric acid on cadmium uptake and accumulation between tall fescue and Kentucky bluegrass. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 145: 200–206.
- Welikala, D., Hucker, C., Hartland, A., Robinson, B, Lehto, N.J. (2018). Trace metal mobilization by organic soil amendments: insights gained from analyses of solid and solution phase complexation of cadmium, nickel and zinc. *Chemosphere*, 199: 684–693.

- Wenzel, W.W., Unterbrunner, R., Sommer, P., Sacco, P. (2003). Chelate-assisted phytoextraction using canola (*Brassica napus* L.) in outdoors pot and lysimeter experiments. *Plant and Soil*, 249: 83–96.
- Wettstein, D. (1957). Chlorophyll-letale und der Submikroskopische Formwechsel der Plastiden. *Experimental Cell Research*, 3: 427–433.
- Wilkins, D.A. (1978). The measurement of tolerance to edaphic factors by means of root growth. *New Phytologist*, 80: 623–633.
- Witters, N., Van Slycken, S., Meers, E., Adriaensen, K., Meiresonne, L., Tack, F.M.G., Vangronsveld, J., Thewys, T. (2009). Short-Rotation Coppice of Willow for Phytoremediation of a Metal-Contaminated Agricultural Area: A Sustainability Assessment. *BioEnergy Research*, 2: 144–152.
- Wu, H.F., Wang, J.Y., Li, B.B., Ou Y.J., Wang, J.R., Shi, Q.Y., Jiang, W.S., Liu, D.H., Zou J.H. (2016). *Salix matsudana* Koidz tolerance mechanisms to cadmium: Uptake and accumulation, subcellular distribution, and chemical forms. *Polish Journal of Environmental Studies*, 25(4): 1739–1747.
- Wuana, R.A., Okieimen, F.E. (2011). Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. *International Scholarly Research Network*, ID 402647.
- Xie, Y., Hu, L., Du, Z., Sun, X., Amombo, E. (2014). Effects of Cadmium Exposure on Growth and Metabolic Profile of Bermudagrass *Cynodon dactylon* (L.). *PloS ONE*, 9(12): 115279.
- Xu, J., Yin, H., Li, X. (2009). Protective effects of proline against cadmium toxicity in micropropagated hyperaccumulator, *Solanum nigrum* L. *Plant cell reports* 28, 325–333.
- Xu, X., Zhang, S., Xian, J., Yang, Z., Cheng, Z., Li, T., Jia, Y., Pu, J., Li, J. (2017). Subcellular distribution, chemical forms and thiol synthesis involved in cadmium tolerance and detoxification in *Siegesbeckia orientalis* L. *International Journal of Phytoremediation*, 20(10): 973–980.
- Yeung, A.T., Hsu, C.N. (2005). Electrokinetic remediation of cadmium contaminated clay. *Journal of Environmental Engineering*, 131: 298–304.
- Yang, Z., Chu, C. (2011). Towards Understanding Plant Response to Heavy Metal Stress. In: (Eds.) Shanker, A.K., Venkateswarl, B. *Abiotic Stress in Plants—Mechanisms and Adaptations*, InTech, Shanghai, China pp. 59–78.

- Yang, W., Zhao, F., Zhang, X., Ding, Z., Wang, Y., Zhu, Z., Yang, X. (2015a). Variations of cadmium tolerance and accumulation among 39 *Salix* clones: implications for phytoextraction. *Environmental Earth Sciences*, 73(7): 3263–3274.
- Yang, J., Li, K., Zheng, W., Zhang, H., Cao, X., Lan, Y., Yang, C., Li, C., (2015b). Characterization of early transcriptional responses to cadmium in the root and leaf of Cd-resistant *Salix matsudana* Koidz. *BMC Genomics*, 16, 1–1.
- Yang, X. (2018). Principles and Technologies of Phytoremediation for Metal-Contaminated Soils: A Review. In: Luo Y., Tu C. (Eds). Twenty Years of Research and Development on Soil Pollution and Remediation in China. Springer, Singapore pp. 279–331.
- Zacchini, M., Pietrini, F., Scarascia, G., Iori, M., 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.
- Zaheer, I.E., Ali, S., Rizwan, M., Farid, M., Shakoor, M.B., Gill, R.A., Najeeb, U., Iqbal, N., Ahmad, R. (2015). Citric acid assisted phytoremediation of copper by *Brassica napus* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 120: 310–317.
- Zárubová, P., Hejcman, M., Vondráčková, S., Mrnka, L., Száková, J., Tlustoš, P. (2015). Distribution of P, K, Ca, Mg, Cd, Cu, Fe, Mn, Pb and Zn in wood and bark age classes of willows and poplars used for phytoextraction on soils contaminated by risk elements. *Environmental Science and Pollution Research*, 22: 18801–18813.
- Zayed, A., Gowthaman, S., Terry, N. (1998). Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: I. Duck weed. *Journal of Environmental Quality*, 27: 715–721.
- Zhang, H., Gao, Y., Xiong, H. (2017). Removal of heavy metals from polluted soil using the citric acid fermentation broth: a promising washing agent. *Environmental Science and Pollution Research*, 24: 9506–9514.
- Zhang, X., Zang, R., Li, S. (2004). Population differences in physiological and morphological adaptations of *Populus davidiana* seedlings in response to progressive drought stress. *Plant Science*, 166(3): 791–797.
- Zhao, H.Y., Lin, L.J., Yan, Q.L., Yang, Y.X., Zhu, X.M., Shao, J.R. (2011). Effects of EDTA and DTPA on lead and zinc accumulation of ryegrass. *Journal of Environmental Protection*, 2: 932–939.
- Zhao, Y., Chu C. (2011). Towards Understanding Plant Response to Heavy Metal Stress In: Arun Shanker, A. (Ed.), *Abiotic Stress in Plants-Mechanisms and Adaptations*, InTech. Pp: 59-78.

- Zhivotovsky, O.P., Kuzovkina, Y.A., Schulthess, C.P., Morris, T., Pettinelli, D. (2011). Lead uptake and translocation by *Salix* in pot and field experiments. *Internation Journal of Phytoremediation*, 13: 731-749.
- Zou, J.H., Wang, G., Ji J., Wang J.Y., Wu H.F., Ou Y.J., Li B.B. (2017). Transcriptional, physiological and cytological analysis validated the roles of some key genes linked Cd stress in *Salix matsudana* Koidz. *Environmental and Experimental Botany*, 134: 116–129.
- Župunski, M. (2017). Potencijal bagrema (*Robinia pseudoacacia*, L. 1753) u fitoekstrakciji kadmijuma, nikla i olova. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za biologiju i ekologiju. str.139.
- Župunski, M., Pajević, S., Arsenov, D., Nikolić, N., Pilipović, A, Borišev, M. (2018). Insights and Lessons Learned From the Long-Term Rehabilitation of Abandoned Mine Lands— A Plant Based Approach approach In: Prasad, M.N.V., Favas, P.J.C., Maiti, S.K. (Eds.). *Bio-Geotechnologies for Mine Site Rehabilitation*. pp. 215-233. Elsevier publisher, ISBN: 978-0-12-812986-9.

8. Prilog

Tabela P1. Korelacije između analiziranih parametara (različitih morfoloških i fiziološko-biohemijskih karaktera) i akumulacije Cd u mladim listovima *S. viminalis*.

Označene korelacije su značajne za $p < .05000$, N=18

Varijable	masa listova	povrsina listova	A	E	WUE	gs	hlor a	hlor b	ukupni hlor	karotenoidi	prolin	proteini	APX	GST	GPOD	MDA	TT	PT	NPT	H ₂ O ₂	cistein	akumulacija
masa listova	1.00	0.94	0.61	0.51	0.60	0.49	-0.15	0.01	-0.06	0.47	-0.32	-0.88	-0.74	-0.58	-0.48	-0.65	-0.82	-0.75	-0.19	-0.40	-0.55	-0.76
povrsina listova	0.94	1.00	0.55	0.44	0.54	0.43	-0.37	0.13	-0.14	0.26	-0.21	-0.71	-0.51	-0.40	-0.41	-0.47	-0.61	-0.52	-0.03	-0.24	-0.71	-0.70
A	0.61	0.55	1.00	0.78	0.98	0.48	0.46	-0.58	-0.26	0.62	-0.20	-0.68	-0.50	-0.76	-0.83	-0.89	-0.60	-0.34	-0.31	-0.76	-0.46	-0.94
E	0.51	0.44	0.78	1.00	0.71	0.64	0.32	-0.47	-0.22	0.58	-0.18	-0.52	-0.38	-0.58	-0.64	-0.69	-0.41	-0.31	-0.26	-0.60	-0.43	-0.76
WUE	0.60	0.54	0.98	0.71	1.00	0.46	0.47	-0.53	-0.16	0.58	-0.21	-0.66	-0.50	-0.78	-0.84	-0.86	-0.61	-0.31	-0.23	-0.76	-0.50	-0.91
Gs	0.49	0.43	0.48	0.64	0.46	1.00	0.07	-0.28	-0.10	0.47	-0.29	-0.32	-0.21	-0.42	-0.54	-0.41	-0.27	-0.23	0.37	-0.47	-0.42	-0.52
hlor a	-0.15	-0.37	0.46	0.32	0.47	0.07	1.00	-0.70	0.18	0.61	-0.30	-0.25	-0.36	-0.65	-0.54	-0.59	-0.31	-0.19	-0.38	-0.72	0.35	-0.30
hlor b	0.01	0.13	-0.58	-0.47	-0.53	-0.28	-0.70	1.00	0.45	-0.75	0.38	0.22	0.20	0.47	0.52	0.68	0.18	0.11	0.42	0.76	-0.28	0.58
ukupni hlor	-0.06	-0.14	-0.26	-0.22	-0.16	-0.10	0.18	0.45	1.00	-0.08	-0.31	0.00	-0.18	-0.32	-0.15	0.21	-0.10	-0.14	0.31	-0.06	-0.10	0.37
Karotenoidi	0.47	0.26	0.62	0.58	0.58	0.47	0.61	-0.75	-0.08	1.00	-0.72	-0.67	-0.69	-0.80	-0.68	-0.86	-0.63	-0.66	-0.43	-0.90	0.12	-0.72
Prolin	-0.32	-0.21	-0.20	-0.18	-0.21	-0.29	-0.30	0.38	-0.31	-0.72	1.00	0.37	0.48	0.63	0.55	0.43	0.36	0.48	0.09	0.69	-0.01	0.32
Proteini	-0.88	-0.71	-0.68	-0.52	-0.66	-0.32	-0.25	0.22	0.00	-0.67	0.37	1.00	0.95	0.75	0.53	0.85	0.97	0.90	0.51	0.57	0.22	0.78
APX	-0.74	-0.51	-0.50	-0.38	-0.50	-0.21	-0.36	0.20	-0.18	-0.69	0.48	0.95	1.00	0.75	0.44	0.77	0.97	0.96	0.55	0.56	0.00	0.61
GST	-0.58	-0.40	-0.76	-0.58	-0.78	-0.42	-0.65	0.47	-0.32	-0.80	0.63	0.75	0.75	1.00	0.88	0.84	0.75	0.62	0.26	0.91	0.26	0.72
GPOD	-0.48	-0.41	-0.83	-0.64	-0.84	-0.54	-0.54	0.52	-0.15	-0.68	0.55	0.53	0.44	0.88	1.00	0.74	0.47	0.29	0.04	0.89	0.46	0.75
MDA	-0.65	-0.47	-0.89	-0.69	-0.86	-0.41	-0.59	0.68	0.21	-0.86	0.43	0.85	0.77	0.84	0.74	1.00	0.80	0.66	0.55	0.85	0.12	0.92
TT	-0.82	-0.61	-0.60	-0.41	-0.61	-0.27	-0.31	0.18	-0.10	-0.63	0.36	0.97	0.97	0.75	0.47	0.80	1.00	0.90	0.48	0.54	0.15	0.69
PT	-0.75	-0.52	-0.34	-0.31	-0.31	-0.23	-0.19	0.11	-0.14	-0.66	0.48	0.90	0.96	0.62	0.29	0.66	0.90	1.00	0.51	0.44	-0.07	0.52
NPT	-0.19	-0.03	-0.31	-0.26	-0.23	0.37	-0.38	0.42	0.31	-0.43	0.09	0.51	0.55	0.26	0.04	0.55	0.48	0.51	1.00	0.27	-0.39	0.38
H ₂ O ₂	-0.40	-0.24	-0.76	-0.60	-0.76	-0.47	-0.72	0.76	-0.06	-0.90	0.69	0.57	0.56	0.91	0.89	0.85	0.54	0.44	0.27	1.00	0.11	0.74
Cistein	-0.55	-0.71	-0.46	-0.43	-0.50	-0.42	0.35	-0.28	-0.10	0.12	-0.01	0.22	0.00	0.26	0.46	0.12	0.15	-0.07	-0.39	0.11	1.00	0.41
Akumulacija	-0.76	-0.70	-0.94	-0.76	-0.91	-0.52	-0.30	0.58	0.37	-0.72	0.32	0.78	0.61	0.72	0.75	0.92	0.69	0.52	0.38	0.74	0.41	1.00

Tabela P2. Korelacije između analiziranih parametara (različiti morfološki i fiziološko-biohemijski karakteri) i akumulacije Cd u mladim listovima *S. matsudana*.

Označene korelacije su značajne za $p < .05000$; N=18

Varijable	masa listova	povrsina listova	A	E	WUE	gs	hlor a	hlor b	ukupni hlor	karotenoidi	prolin	proteini	APX	GST	GPOD	MDA	TT	PT	NPT	H ₂ O ₂	cistein	akumulacija
masa listova	1.00	0.30	-0.05	0.37	-0.16	-0.16	-0.01	-0.05	0.10	0.24	0.23	-0.19	-0.24	-0.23	-0.39	0.04	0.37	0.41	0.34	0.08	-0.05	-0.08
povrsina listova	0.30	1.00	0.09	0.32	-0.13	0.13	-0.26	0.19	0.52	0.46	0.23	-0.81	-0.46	-0.46	-0.75	0.02	0.07	-0.26	0.60	-0.03	0.10	-0.65
A	-0.05	0.09	1.00	0.71	0.96	0.72	0.27	0.72	0.83	0.79	0.24	-0.21	-0.67	-0.56	-0.17	-0.55	-0.34	-0.22	-0.10	-0.55	0.38	-0.59
E	0.37	0.32	0.71	1.00	0.57	0.25	0.39	0.40	0.62	0.64	0.25	-0.34	-0.72	-0.70	-0.44	-0.41	0.22	0.27	0.17	-0.33	0.26	-0.58
WUE	-0.16	-0.13	0.96	0.57	1.00	0.75	0.27	0.74	0.74	0.70	0.16	-0.01	-0.50	-0.38	0.02	-0.57	-0.48	-0.29	-0.24	-0.55	0.38	-0.45
Gs	-0.16	0.13	0.72	0.25	0.75	1.00	-0.34	0.67	0.72	0.55	0.42	-0.05	-0.31	-0.04	0.05	-0.47	-0.59	-0.68	0.13	-0.34	0.56	-0.36
hlor a	-0.01	-0.26	0.27	0.39	0.27	-0.34	1.00	0.30	0.12	0.19	-0.69	0.20	0.01	-0.24	-0.08	-0.47	0.15	0.40	-0.22	-0.26	-0.26	-0.21
hlor b	-0.05	0.19	0.72	0.40	0.74	0.67	0.30	1.00	0.86	0.75	-0.19	-0.09	-0.19	-0.16	-0.26	-0.73	-0.57	-0.54	0.12	-0.45	0.33	-0.64
ukupni hlor	0.10	0.52	0.83	0.62	0.74	0.72	0.12	0.86	1.00	0.91	0.13	-0.45	-0.57	-0.49	-0.50	-0.58	-0.43	-0.48	0.25	-0.50	0.36	-0.81
Karotenoidi	0.24	0.46	0.79	0.64	0.70	0.55	0.19	0.75	0.91	1.00	0.19	-0.58	-0.72	-0.69	-0.60	-0.32	-0.38	-0.27	0.03	-0.57	0.27	-0.78
Prolin	0.23	0.23	0.24	0.25	0.16	0.42	-0.69	-0.19	0.13	0.19	1.00	-0.37	-0.61	-0.34	-0.07	0.37	0.14	0.02	0.12	-0.04	0.37	-0.03
Proteini	-0.19	-0.81	-0.21	-0.34	-0.01	-0.05	0.20	-0.09	-0.45	-0.58	-0.37	1.00	0.73	0.78	0.75	-0.37	0.03	0.13	-0.08	0.20	-0.08	0.64
APX	-0.24	-0.46	-0.67	-0.72	-0.50	-0.31	0.01	-0.19	-0.57	-0.72	-0.61	0.73	1.00	0.93	0.51	-0.10	-0.06	-0.13	0.05	0.37	-0.22	0.59
GST	-0.23	-0.46	-0.56	-0.70	-0.38	-0.04	-0.24	-0.16	-0.49	-0.69	-0.34	0.78	0.93	1.00	0.59	-0.16	-0.13	-0.25	0.16	0.37	-0.05	0.62
GPOD	-0.39	-0.75	-0.17	-0.44	0.02	0.05	-0.08	-0.26	-0.50	-0.60	-0.07	0.75	0.51	0.59	1.00	-0.06	0.04	-0.03	-0.33	0.14	-0.14	0.76
MDA	0.04	0.02	-0.55	-0.41	-0.57	-0.47	-0.47	-0.73	-0.58	-0.32	0.37	-0.37	-0.10	-0.16	-0.06	1.00	0.18	0.26	-0.36	0.24	-0.16	0.32
TT	0.37	0.07	-0.34	0.22	-0.48	-0.59	0.15	-0.57	-0.43	-0.38	0.14	0.03	-0.06	-0.13	0.04	0.18	1.00	0.76	0.36	0.20	-0.35	0.28
PT	0.41	-0.26	-0.22	0.27	-0.29	-0.68	0.40	-0.54	-0.48	-0.27	0.02	0.13	-0.13	-0.25	-0.03	0.26	0.76	1.00	-0.08	0.13	-0.31	0.29
NPT	0.34	0.60	-0.10	0.17	-0.24	0.13	-0.22	0.12	0.25	0.03	0.12	-0.08	0.05	0.16	-0.33	-0.36	0.36	-0.08	1.00	0.17	0.15	-0.22
H ₂ O ₂	0.08	-0.03	-0.55	-0.33	-0.55	-0.34	-0.26	-0.45	-0.50	-0.57	-0.04	0.20	0.37	0.37	0.14	0.24	0.20	0.13	0.17	1.00	-0.16	0.36
Cistein	-0.05	0.10	0.38	0.26	0.38	0.56	-0.26	0.33	0.36	0.27	0.37	-0.08	-0.22	-0.05	-0.14	-0.16	-0.35	-0.31	0.15	-0.16	1.00	-0.36
akumulacija	-0.08	-0.65	-0.59	-0.58	-0.45	-0.36	-0.21	-0.64	-0.81	-0.78	-0.03	0.64	0.59	0.62	0.76	0.32	0.28	0.29	-0.22	0.36	-0.36	1.00

Tabela P3. Korelacije između analiziranih parametara (različiti morfoloških i fiziološko-biohemijskih karaktera) i akumulacije Cd u mladim listovima *S. alba*.

Označene korelacije su značajne za $p < .05000$, $N=18$

Varijable	masa listova	površina listova	A	E	WUE	gs	hlor a	hlor b	ukupni hlor	karotenoidi	prolin	proteini	APX	GST	GPOD	MDA	TT	PT	NPT	H ₂ O ₂	cistein	akumulacija
masa listova	1.00	0.35	0.73	0.29	-0.44	0.57	0.21	0.67	0.10	-0.01	-0.47	-0.90	-0.06	-0.28	-0.87	0.00	0.18	0.20	-0.32	-0.44	-0.85	0.11
površina listova	0.35	1.00	0.87	0.30	0.37	0.72	0.74	0.07	0.74	0.72	-0.34	-0.19	-0.55	-0.83	-0.20	-0.85	-0.73	-0.66	-0.20	-0.63	-0.61	0.24
A	0.73	0.87	1.00	0.47	0.00	0.74	0.60	0.35	0.56	0.48	-0.56	-0.58	-0.41	-0.70	-0.58	-0.58	-0.41	-0.34	-0.35	-0.63	-0.85	0.23
E	0.29	0.30	0.47	1.00	-0.17	0.28	-0.03	0.07	-0.03	-0.16	-0.84	-0.19	-0.21	-0.25	-0.34	-0.19	-0.13	-0.09	-0.20	-0.18	-0.29	-0.06
WUE	-0.44	0.37	0.00	-0.17	1.00	0.36	0.45	-0.36	0.46	0.58	0.44	0.33	-0.72	-0.62	0.64	-0.75	-0.85	-0.90	0.64	-0.47	0.00	-0.26
gs	0.57	0.72	0.74	0.28	0.36	1.00	0.38	0.27	0.31	0.35	-0.31	-0.47	-0.75	-0.84	-0.42	-0.70	-0.62	-0.63	0.31	-0.89	-0.75	-0.28
hlor a	0.21	0.74	0.60	-0.03	0.45	0.38	1.00	0.28	0.94	0.92	0.17	-0.30	-0.45	-0.71	0.16	-0.69	-0.57	-0.54	-0.22	-0.33	-0.54	0.39
hlor b	0.67	0.07	0.35	0.07	-0.36	0.27	0.28	1.00	0.14	0.10	-0.05	-0.79	-0.01	-0.14	-0.46	0.12	0.28	0.27	-0.15	-0.01	-0.56	-0.08
ukupni hlor	0.10	0.74	0.56	-0.03	0.46	0.31	0.94	0.14	1.00	0.85	0.17	-0.16	-0.41	-0.66	0.23	-0.70	-0.59	-0.55	-0.27	-0.32	-0.44	0.37
karotenoidi	-0.01	0.72	0.48	-0.16	0.58	0.35	0.92	0.10	0.85	1.00	0.25	-0.06	-0.43	-0.66	0.27	-0.72	-0.64	-0.62	-0.07	-0.33	-0.37	0.34
prolin	-0.47	-0.34	-0.56	-0.84	0.44	-0.31	0.17	-0.05	0.17	0.25	1.00	0.23	0.00	0.12	0.65	0.05	-0.05	-0.11	0.39	0.17	0.32	-0.12
proteini	-0.90	-0.19	-0.58	-0.19	0.33	-0.47	-0.30	-0.79	-0.16	-0.06	0.23	1.00	0.15	0.30	0.65	-0.03	-0.19	-0.18	0.18	0.35	0.84	-0.03
APX	-0.06	-0.55	-0.41	-0.21	-0.72	-0.75	-0.45	-0.01	-0.41	-0.43	0.00	0.15	1.00	0.91	-0.21	0.86	0.87	0.89	-0.59	0.64	0.42	0.40
GST	-0.28	-0.83	-0.70	-0.25	-0.62	-0.84	-0.71	-0.14	-0.66	-0.66	0.12	0.30	0.91	1.00	-0.01	0.94	0.87	0.86	-0.26	0.72	0.64	0.12
GPOD	-0.87	-0.20	-0.58	-0.34	0.64	-0.42	0.16	-0.46	0.23	0.27	0.65	0.65	-0.21	-0.01	1.00	-0.22	-0.36	-0.40	0.38	0.33	0.61	-0.08
MDA	0.00	-0.85	-0.58	-0.19	-0.75	-0.70	-0.69	0.12	-0.70	-0.72	0.05	-0.03	0.86	0.94	-0.22	1.00	0.97	0.95	-0.25	0.62	0.39	0.06
TT	0.18	-0.73	-0.41	-0.13	-0.85	-0.62	-0.57	0.28	-0.59	-0.64	-0.05	-0.19	0.87	0.87	-0.36	0.97	1.00	0.99	-0.41	0.61	0.24	0.17
PT	0.20	-0.66	-0.34	-0.09	-0.90	-0.63	-0.54	0.27	-0.55	-0.62	-0.11	-0.18	0.89	0.86	-0.40	0.95	0.99	1.00	-0.51	0.62	0.23	0.23
NPT	-0.32	-0.20	-0.35	-0.20	0.64	0.31	-0.22	-0.15	-0.27	-0.07	0.39	0.18	-0.59	-0.26	0.38	-0.25	-0.41	-0.51	1.00	-0.34	0.14	-0.73
H ₂ O ₂	-0.44	-0.63	-0.63	-0.18	-0.47	-0.89	-0.33	-0.01	-0.32	-0.33	0.17	0.35	0.64	0.72	0.33	0.62	0.61	0.62	-0.34	1.00	0.69	0.23
Cistein	-0.85	-0.61	-0.85	-0.29	0.00	-0.75	-0.54	-0.56	-0.44	-0.37	0.32	0.84	0.42	0.64	0.61	0.39	0.24	0.23	0.14	0.69	1.00	-0.07
Akumulacija	0.11	0.24	0.23	-0.06	-0.26	-0.28	0.39	-0.08	0.37	0.34	-0.12	-0.03	0.40	0.12	-0.08	0.06	0.17	0.23	-0.73	0.23	-0.07	1.00

BIOGRAFIJA



Danijela Arsenov je rođena 14.09.1988. u Zrenjaninu. Osnovnu školu završila je u Novom Miloševu, nakon čega upisuje gimnaziju „Dušan Vasiljev“ u Kikindi, koju završava sa odličnim uspehom. 2007 godine upisuje Prirodno-matematički fakultet, Departman za Biologiju i Ekologiju na Univerzitetu u Novom Sadu. Nakon zvršenih osnovnih studija, 2011. godine, Danijela upisuje Master akademske studije, a 2012 Doktorske akademske studije smer doktor nauka – biološke nauke. Svoju doktorsku disertaciju započela je u okviru Laboratorije za fiziologiju biljaka, gde je 2013 godine izabrana u zvanje istraživača pripravnika, a 2016 godine u zvanje istraživača saradnika. Od 2013. godine Danijela je zaposlena na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja: III 43007 “Istraživanje klimatskih promena i njihovog uticaja na životnu sredinu - praćenje uticaja, adaptacija i ublažavanje”. Takođe, Danijela je uključena u vođenje praktične nastave na predmetu Biologija ćelije. Kao student doktorand, učestvovala je u različitim manifestacijama: Noć biologije, Budi student jedan dan i dr. Tokom studija bila je na nekoliko studijskih boravaka i usavršavanja: 2014 – Međunarodni Državni Ekološki Univerzitet A.D. Saharov, Minsk, Belorusija (10 dana), 2016 - PCR škola u biološkim i biomedicinskim analizama u organizaciji Biološkog faulteta, Centra za molekularnu i humanu genetiku, Valjevo, Srbija (7 dana); dobitnik je stipendija za učestvovanje u Internacionalnoj letnjoj školi u okviru laboratorije izvrsnosti: The TULIP LabEx “Biological interactions from genes to ecosystems” (14-20 jul, 2018), programa mobilnosti na Radboud Univerzitetu, Holandija u okviru razmene za mlade istraživače (13-17 avgust, 2018), kao i stipendije za studente doktorande u okviru Bilateralne saradnje Univerziteta u Novom Sadu, Centra za strategijske i napredne studije i Jagelonski Univerziteta u Krakovu gde je boravila tokom dve nedelje (8-21 oktobar, 2018).

Do sada je u koautorstvu objavila 6 radova sa SCI liste, 3 poglavlja u monografijama međunarodnog značaja (ukupan broj citata: 30, izvor SCOPUS), 3 rada u naučnim časopisima, kao i 35 saopštenja na međunarodnim i domaćim skupovima. Član je Društva biljnih fiziologa Srbije, Evropskog društva za fiziologiju biljaka (The Federation of European Societies of Plant Biology - FESPB), kao i Srpskog biološkog društva.

UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO – MATEMATIČKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:

RBR

Identifikacioni broj:

IBR

Tip dokumentacije:

Monografska dokumentacija

TD

Tip zapisa:

Tekstualni štampani materijal

TZ

Vrsta rada:

Doktorska disertacija

VR

Ime i prezime autora:

Danijela Arsenov

AU

Mentor:

Dr Nataša Nikolić, vanredni profesor

MN

Naslov rada:

Fiziološki aspekti potencijala vrba (*Salix* spp.) u
asistiranoj fitoremedijaciji kadmijuma
upotrebom limunske kiseline

NR

Jezik publikacije:

Srpski

JP

Jezik izvoda:

srp. / eng.

JI

Zemlja publikovanja:

Srbija

ZP

Uže geografsko područje: AP Vojvodina
UGP
Godina: 2018.
GO
Izdavač: Autorski reprint
IZ
Mesto i adresa: Trg Dositeja Obradovića 2, Novi Sad
MA
Fizički opis rada: (broj poglavlja: 8/ stranica: 158/ slika: 13/
FO grafika: 30/ tabela: 25/ referenci: 292/ priloga: 3)

Naučna oblast: Biologija
NO
Naučna disciplina: Fiziologija biljaka
ND
Predmetna odrednica, ključne reči: kadmijum, limunska kiselina, asistirana
PO fitoremedijacija, fitoekstrakcija, oksidativni stres, vrbe
UDK
Čuva se: U biblioteci Prirodno-matematičkog fakulteta
ČU Univerziteta u Novom Sadu, 21000 Novi Sad,
Trg Dositeja Obradovića 2, Srbija
Važna napomena: Nema
VN
Izvod:
IZ
U radu je analiziran uticaj limunske kiseline na morfološke, fiziološke i biohemijske karakteristike odabranih klonova vrba (*Salix* spp.) gajenih u zemljištu umereno

zagađenom kadmijumom (Cd). Definisanjem parametara akumulacije, otpornosti i tolerantnosti različitih klonova vrba na prisustvo kadmijuma u podlozi, kao i uspešnosti primene limunske kiseline kao helatora u procesu asistirane fitoremedijacije, mogao bi se identifikovati klon (ili klonovi) pogodan za dekontaminaciju zemljišta zagađenog kadmijumom. Da bi se postigao cilj istraživanja biljke su gajene u polu-kontrolisanim uslovima tokom 3 meseca. Eksperiment je podeljen u dve faze (dve godine istraživanja), zasnovane na razlikama u metodološkom pristupu. Tokom prve godine limunska kiselina je dodata jednom, dok je tokom druge godine aplikacija ovog helatora vršena u tri ponavljanja. U radu je analiziran sadržaj i distribucija Cd u zemljištu i različitim biljnim organima (koren, izdanak, mladi i stari listovi); uticaj Cd i limunske kiseline na morfometrijske parametre: visina i prečnik izdanka, masa i površina listova, broj listova, masa i zapremina korena; na fotosintetičke karakteristike: intenzitet fotosinteze, intenzitet transpiracije, stomatalnu provodljivost, intercelularnu koncentraciju CO₂, efikasnost korišćenja vode, koncentraciju fotosintetičkih pigmenata; na mineralnu ishranu i distribuciju makronutrijenata u biljkama (sadržaj azota, fosfora i kalijuma); na sadržaj aminokiseline prolina i cisteina; na aktivnost antioksidativnih enzima (katalaza, askorbat-peroksidaza, gvajakol-peroksidaza), kao neenzimskih antioksidanata poput sadržaja redukovano glutationa i tiola.

Dobijeni rezultati su ukazali na genotipsku specifičnost analiziranih klonova vrba u procesu fitoremedijacije u zavisnosti od primenjenog tretmana, doze Cd i prisustva limunske kiseline. Toksično dejstvo nije bilo jasno uočljivo na morfološkom nivou, dok su primenjeni tretmani signifikantno uticali na fiziološko-biohemijske procese u biljkama. Sa povećanjem sadržaja Cd u biljkama je utvrđena tendencija smanjenja intenziteta fotosinteze, transpiracije, kao i efikasnosti korišćenja vode, dok je primena limunske kiseline ublažila štetan efekat ovog teškog metala, što je registrovano na kombinovanim tretmanima. Kao odgovor na akumulaciju Cd u biljnom tkivu utvrđena je promena aktivnosti antioksidativnih enzima, kao i neenzimskih komponenti odbrambenog sistema zaštite. Pored toga, u radu je utvrđeno da primena limunske kiseline utiče na usvajanje, akumulaciju i toleranciju vrba na prisustvo Cd, te rezultati ove studije imaju praktičan značaj u usavršavanju tehnika fitoremedijacije i dekontaminacije zagađenih područja.

Datum prihvatanja teme od strane
Senata:

11.01.2018. na 35. sednici.

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:

(ime i prezime / titula / zvanje /
naziv organizacije / status)

Predsednik: dr Slobodanka Pajević, redovni
profesor

Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u
Novom Sadu, Departman za biologiju i ekologiju

KO

Član (Mentor): dr Nataša Nikolić, vanredni
profesor

Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u
Novom Sadu, Departman za biologiju i ekologiju

Član: dr Saša Orlović, redovni profesor

Poljoprivredni fakultet, Institut za nizijsko
šumarstvo i životnu sredinu, Univerzitet u
Novom Sadu

Član: dr Andrej Pilipović, naučni saradnik

Insitut za nizijsko šumarstvo i životnu sredinu,
Univerzitet u Novom Sadu

Član: dr Milan Borišev, vanredni profesor

Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u
Novom Sadu, Departman za biologiju i ekologiju

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: Danijela Arsenov

AU

Mentor: Dr Nataša Nikolić, associate professor

MN

Title:

TI

Language of text: Serbian

LT

Language of abstract: eng. / srp.

LA

Country of publication: Serbia

CP

Locality of publication: AP Vojvodina
LP

Publication year: 2017
PY

Publisher: Personal reprint
PU

Publication place: Novi Sad
PP

Physical description: (chapters: 8/ pages: 158/ pictures: 13/ figures: 30/
PD tables: 25/ references: 292/ supplement material: 3)

Scientific field: Biology
SF

Scientific discipline: Plant physiology
SD

Subject, Key words: cadmium, citric acid, assisted phytoremediation,
SKW phytoextraction, oxidative stress, willows

UC

Holding data: Library of Faculty of Sciences, University of
HD Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 2, 21000
Novi Sad, Serbia

Note: None.
N

Abstract:
AB

The role of citric acid on morphological, physiological and biochemical characteristics of selected willow clones (*Salix* spp.) grown in soil with moderately polluted cadmium

(Cd) was presented. The aim of this study was to determine the Cd accumulation, translocation and tolerance of different willow clones, as well as the influence of citric acid as a chelator in the assisted phytoremediation process. In order to achieve this goal, plants were grown in semi-controlled conditions for 3 months. The experiment was divided into two phases (two years of research), based on differences in the methodological approach, regarding the application of citric acid. During the first-year experiment, citric acid was added once, while in the second year the application of this chelator was performed in three repetitions. The analyses included: the accumulation and distribution of Cd in soil and various plant organs (root, stem, young and old leaves); influence of Cd and citric acid on morphometric parameters: stem height and diameter, number of leaves, biomass and area of leaves, biomass and volume of the root; on photosynthetic characteristics: net photosynthetic and transpiration rate, water use efficiency, stomatal conductance, intercellular concentration of CO₂, concentration of photosynthetic pigments; on mineral nutrition and distribution of macronutrients in plants (nitrogen, phosphorus and potassium content); on the content of the amino acid proline and cysteine; on the activity of antioxidant enzymes (catalase, ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase), as non-enzymatic components such as reduced glutathione and thiol content.

The obtained results indicated the genotypic specificity of the analyzed willow clones in the phytoremediation process, depending on the treatment applied, the Cd dose, and the presence of citric acid. The toxic effect was not evident on the morphological level, while the applied treatments showed a significant influence on the physiological-biochemical processes in the willows. The net photosynthetic rate, transpiration rate, as well as, water use efficiency showed decreasing with increasing Cd concentration in plant tissue, while the application of citric acid mitigated the harmful effect of this heavy metal, which was registered on combined treatments. In response to the accumulation of Cd in plant tissue, a change in the activity of anti-oxidant enzymes, as well as non-enzymatic components of the defense system has been established. In addition, the application of citric acid showed the promotion role on the absorption, accumulation and tolerance of willows grown in moderately polluted soil cadmium, which has a practical significance in the improvement of phytoremediation techniques and decontamination of polluted soil.

Accepted on Senate on:

11.01.2018., on 35th meeting.

AS

Defended:

DE

Thesis Defend Board:

DB

President: Slobodanka Pajević, PhD, full professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Department of biology and ecology

Member (Mentor): Nataša Nikolić, PhD, associate professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Department of biology and ecology

Member: Saša Orlović, PhD, full professor, Faculty of Agriculture, Institute of lowland forestry and environment, University of Novi Sad

Member: Andrej Pilipović, PhD, research associate, Institute of lowland forestry and environment, University of Novi Sad

Member: Milan Borišev, PhD, associate professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Department of biology and ecology