



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



Mr Milan Borišev

**Potencijal klonova vrba (*Salix spp.*) u
fitoekstrakciji teških metala**

- DOKTORSKA DISERTACIJA -

Novi Sad, 2010.

1. UVOD

Zagađenje teškim metalima je problem današnjeg društva sa karakterističnim kumulativnim efektom. Rešenja je malo, dok su uzroci koji su iznedrili stvaranje ovog problema, sastavni deo našeg načina života. Teški metali se neprestano nagomilavaju u pojedinim delovima biosfere usled niza antropogenih aktivnosti čiji je obim sve veći širom planete, uprkos realnim upozorenjima naučne i etičke javnosti. Cene prečišćavanja životnih staništa u zoni zagađenja, često prevazilaze mogućnosti interesnih finansijskih grupa. Čak i kada sredstva postoje, ciljevi i prioriteta organizacija koje raspolažu odgovarajućim materijalnim sredstvima usmereni su često ka sticanju dodatnih profita, bez ozbiljne analize etičkih i moralnih posledica koje će se ostaviti budućim generacijama. Jedno od kompromisnih rešenja jeste primena biljaka u remedijaciji staništa zagađenih teškim metalima (Pilon-Smiths, 2005). Ova tehnologija je po nizu stručnih procena značajno jeftinija od ustanovljenih fizičko-hemijskih metoda remedijacije. Pored dobre finansijsko-materijalne predispozicije, čitav niz drugih karakteristika definišu fitoremedijaciju kao perspektivnu metodu. Epiteti „zelene”, „ekološke”, „plemenite” tehnologije na koncizan način izražavaju osnovnu prednost fitoremedijacije. U Srbiji je primena fitoremedijacije još u ranim fazama razvoja, kao i istraživanja u oblasti tzv. „bioremedijacije”, bez ozbiljnih primera konkretne primene. Ipak, poslednjih godina veći broj istraživača u zemlji bavi se ovom problematikom što je rezultovalo sticanjem teorijsko-praktične baze za mogućnost implementacije stečenih znanja. Zagađenje teškim metalima, kako u Srbiji tako i u drugim delovima sveta, ima naročit značaj, zbog činjenice da se teški metali ne mogu uništiti, već samo raspoređivati i premeštati iz staništa u stanište. Stoga je njihovo opstajanje kao zagađivača opasno u vremenskim periodima koji se mere stotinama ljudskih generacija, pogotovo ukoliko remedijacija izostane. Među teškim metalima Cd i Pb zauzimaju posebno mesto jer spadaju u tzv. štetne elemente. Do sada nije potvrđena pozitivna uloga ovih ksenobiotskih elemenata u metabolizmu bioloških organizama. Zbog toga je njihovo akumuliranje u životnoj sredini naročito opasno i zahteva primenu svake moguće strategije remedijacije. Ni je takođe teški metal koji je čest zagađivač današnjice. Mada u biljnim organizmima ima značajnu ulogu kada je prisutan u

malim koncentracijama, u povećanim koncentracijama ima značajan toksičan efekat, kako na biljne tako i na životinjske organizme. Pored ispitivanja pojedinačnog efekta Cd, Pb i Ni na fiziologiju vrba, u ovom radu je analizirano i njihovo kombinovano dejstvo, jer se i na zagađenim staništima teški metali često nalaze istovremeno.

Istraživanje koje je prikazano u ovoj doktorskoj disertaciji je deo višegodišnjeg istraživanja ostvarenog kroz saradnju istraživačkog tima Fiziologije biljaka na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu i stručnjaka sa Instituta za nizijsko šumarstvo i životnu sredinu u Novom Sadu. Kroz projektnu realizaciju finansiranu od strane Ministarstva Republike Srbije za nauku i tehnološki razvoj (TR 20001), dobijen je veliki broj značajnih informacija kako o konkretnom potencijalu vrba i topola u fitoremedijaciji tako i o pojedinim fundamentalnim oblastima fiziologije biljaka. Rezultati dobijeni u ovom radu treba da ukažu na potencijal četiri genotipa vrba za fitoekstrakciju Cd, Pb i Ni koji se ubrajaju u česte zagađivače našeg regiona. Rasvetljavanje određenih funkcionalnih procesa metabolizma teških metala ima fundamentalni značaj u fiziologiji biljaka kao naučnoj disciplini.

2. PREGLED ISTRAŽIVANJA

2.1. Teški metali– zagađivači životne sredine

Zagađenje u širem smislu se može definisati kao unošenje elemenata, supstanci ili energije u životnu sredinu u nivoima koji narušavaju funkcionisanje i ravnotežu datog staništa, odnosno predstavljaju rizik za živa bića koja su direktno ili indirektno povezana sa tom životnom sredinom. U užem, praktičnom smislu, zagađenje je kada u nekom staništu određeni zagađivač prelazi granice propisane odgovarajućim zakonskim regulativama važećim za dato područje (Scullion, 2006). Čovek je u opasnosti od zagađenja usled različitih načina dodira sa određenim zagađivačem: dermalnog kontakta, unošenja hrane gajene na zagađenim područjima ili zalivane zagađenim vodama, udisanja štetnih čestica ili gasovitih materija (Nathanail i Earl, 2001).

Teški metali su elementi čija je gustina atoma veća od 5 g/cm^3 . Neki su u manjim koncentracijama neophodni za optimalno rastenje i razviće biljaka (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Co i Mo), dok drugi pokazuju štetno dejstvo i pri veoma niskim koncentracijama, pa se definišu kao zagađivači (Cd, Pb, Hg, Cr). Biljke nisu evolutivno razvile visoku selektivnost pri usvajanju hranljivih elemenata. Pored elemenata koji su im potrebni - hraniva, mogu da usvajaju i teške metale koji nemaju poznatu funkciju u biljnom metabolizmu, te predstavljaju opasnost za živi svet, jer preko biljaka ovi „bioštetni“ elementi ulaze u lance ishrane. Teški metali se prvenstveno usvajaju iz zemljišta i vode preko korena, a pri određenim uslovima i preko nadzemnih organa. Nakupljanje i koncentrovanje teških metala u zemljištu, vodi i atmosferi posledica je prirodnih litogenih i pedogenih procesa, ali najveći izvori teških metala su antropogenog porekla (Kastori i sar., 1996). Bez obzira na poreklo, povišene koncentracije mnogih metala u zemljištu dovode do trajne degradacije, redukcije prinosa biljaka i lošeg kvaliteta poljoprivrednih proizvoda, čime se direktno ugrožavaju ljudi, životinje i ekosistem (Blaylock i Huang., 2000; Long i sar., 2002). Ova zagađenja posledica su prisustva metala i metaloida kao što su: arsen (As), kadmijum (Cd), hrom (Cr), bakar (Cu), olovo (Pb), nikel (Ni), živa (Hg), selen (Se), srebro (Ag), cink (Zn), aluminijum (Al), cezijum (Cs), kobalt (Co), mangan (Mn), molibden (Mo), stroncijum (Sr) i uranijum (U) (McIntyre, 2003).

Zagađenje biosfere teškim metalima je zabrinjavajuće usled njihove toksičnosti, sve veće akumulacije u životnoj sredini, te otpornosti i održivosti na duge vremenske periode. Čitav niz antropogenih aktivnosti (industrija, poljoprivreda, saobraćaj, urbane deponije i otpadne vode, rudarstvo, vojne aktivnosti, ratna razaranja), za posledicu ima kumulativno nakupljanje teških metala u različitim delovima biosfere. Posledice zavise od veličine i vrste zagađenja i sinergističkog delovanja sa drugim zagađivačima, ali osnovni problem je što se teški metali ne mogu uništiti, već samo premestiti u zone biosfere gde bi njihov uticaj bio manje štetan, odnosno transformisati i deponovati u neaktivne hemijske forme (Pilon-Smiths, 2005).

Uprkos velikom broju naučno utemeljenih upozorenja, oslobađanje teških metala se i dalje nastavlja, naročito u tzv. "zemljama u razvoju" (gde se ubraja i Srbija) za koje je karakteristično da se oslobađanje teških metala u životnu sredinu brzo povećava (Jarup, 2003). Najveća opasnost krije se u ulasku teških metala u lance ishrane i njihove sve češće pojave u ljudskim namirnicama. Metode detekcije teških metala u prehrambenim proizvodima su skupe, a posledice po zdravlje su višestruko negativne. Čitav je niz primera bolesti izazvanih teškim metalima, za koje se nije znao uzrok. Najdrastičniji primer, koji je aktuelizovao naučno interesovanje za ovu temu, je trovanje metil-živo u zalivu Minamata u Japanu, po čemu je ovo trovanje dobilo naziv Minamata bolest. Kontinuiranim oslobađanjem metil-žive u zaliv kroz otpadne vode obližnje fabrike u periodu od 1932.-1968. godine došlo je do akumuliranja ovog metala u školjkama i ribama koje su stanovnici koristili za ishranu. Simptomi koji opstaju i do 30 godina nakon prestanka izlaganja metil-živo su gubitak kontrole pokreta, utrnulost udova, mišićna slabost, poremaćaji vida, sluha i govora, a u ozbiljnijim slučajevima paraliza, koma i smrt. Metil-živa dovodi do direktnih difuznih oštećenja somatosenzitivnog korteksa mozga. Ova bolest je transportom polutanta preko placente fetusa prenošena i na potomstvo ljudi koji su koristili zagađenu ribu i školjke u ishrani. Bilo je potrebno preko 20 godina da se metil-živa utvrdi kao pravi uzrok ove bolesti (Ekino i sar., 2007).

Opasnost od ishrane ribom u kojoj su akumulirani teški metali (Hg, Cd, Pb, As i dr.) postoji i danas u nesmanjenom obimu (Castro-González i Méndez-Armenta, 2008). U Srbiji se desio čitav niz ekoloških katastrofa u nekoliko reka u poslednjoj deceniji. Nakon izlivanja ogromne količine teških metala u reku Tisu u Rumuniji 2000. godine iz naselja Baie Mare, utvrđeno je prekoračenje maksimalno dozvoljenih

koncentracija pojedinih teških metala u sedimentu na mnogim lokalitetima u Rumuniji, Mađarskoj i Srbiji (MDK po službenom glasniku republike Srbije). Fleit i Lakatos (2002) su utvrdili da koncentracija Hg u štukama Tise u Mađarskoj ($247 \mu\text{g kg}^{-1}$), po propisima američke organizacije za zaštitu životne sredine (US, EPA), dozvoljava najviše tri prosečna obroka ove ribe mesečno. Nedostatak organizovane kontinuirane kontrole prisustva teških metala u životnoj sredini i namirnicama Srbije, pre svega usled velikih cena takvih analiza, ima za posledicu sve veće koncentrovanje teških metala u sedimentu, vodi i zemljištu.

Genuis (2008) navodi da su teški metali kao uzročnici značajnog udela mentalnih bolesti, često nepotvrđeni, usled čega se postavlja pogrešna dijagnoza i način lečenja. U ovom istraživanju se naglašava da se teški metali kao uzročnici bolesti veoma retko uzimaju u obzir u kliničkoj praksi. Mueeler i Seger (1985) navode da je uzroke groznice izazvane inhalacijom isparenja niza oksida teških metala, koji se oslobađju pri varenju gotovo nemoguće utvrditi, jer su simptomi slični čitavom nizu respiratornih oboljenja. U gradu Galena (Kansas, SAD) utvrđena je direktna veza između prisustva Cd i Pb u vodi za piće i površinskom zemljištu sa nizom hroničnih bolesti koje su značajno povećale mortalitet stanovništva u poređenju sa susednim nekontaminiranim gradovima (Neuberger i sar., 1990). Velika opasnost se krije u ishrani povrćem koje je zalivano vodama zagađenim teškim metalima (Mapanda i sar., 2007). Procenjeno je da je prosečan biološki poluživot Cd u ljudskom telu od 10-18 godina. Posledice njegove toksičnosti idu od običnog dermatitisa do DNK oštećenja i karcinogenih efekata (Yang i sar., 2005).

Pored neposrednog negativnog dejstva teških metala na zdravlje čoveka, oni takođe narušavaju delikatnu ravnotežu u ekosistemu i deluju negativno na živi svet, čime se posredno ugrožava i čovekova pozicija u biogeocenozi na duži vremenski period (Bennett i sar., 2001).

2.2. Uticaj kadmijuma, nikla i olova na fiziološke procese u biljkama i njihova mobilnost u biljnom organizmu

Izlaganje biljaka povišenim koncentracijama teških metala dovodi do narušavanja normalnog toka mnogih metaboličkih procesa, što za posledicu ima

značajno smanjenje organske produkcije. Negativni efekti toksičnosti nastaju usled niza poremećaja. Teški metali reaguju sa $-S^-$, $-OH^-$, amino grupama i terminalnim delovima karboksilnih kiselina. Vezivanjem za sulfhidrilne grupe i azotne atome proteina, inhibira se aktivnost proteina ili narušava njihova struktura. Teški metal može i da istisne (zameni) neki neophodni element te da dovede do ispoljavanja simptoma nedostatka tog elementa (Van Assche i Clijsters, 1990). Takođe, teški metali stimulišu formiranje slobodnih radikala i reaktivnih kiseoničnih derivata, što uzrokuje oksidativni stres i dovodi do lipidne peroksidacije membrane čime se narušava njena funkcionalnost i selektivnost pri transportu materija (Dietz i sar. 1999). Mada su primarni efekti toksičnosti teških metala specifično zavisni od osobina njihovih jona, sekundarne posledice su veoma slične i ogledaju se u brojnim fiziološkim, anatomskim i morfološkim poremećajima (Kastori i Maksimović., 2008).

2.2.1. Kadmijum

Toksični efekti na ćelijskom nivou ispoljavaju se na organskim sistemima biljke i određenim metaboličkim procesima. Među teškim metalima Cd se relativno lako usvaja korenom i dobro translocira u listove, te stoga ima izražene efekte toksičnosti i na malim koncentracijama. Cd inhibira klijanje semena, redukuje rast, uzrokuje lisnu hlorozu kroz indukciju nedostatka Fe, narušava vodni režim, fotosintezu, funkcionisanje niza enzima, dovodi do formiranja slobodnih radikala i izaziva poremećaje u usvajanju N, P, K, Mg, Ca, Zn, Cu i Na (Greger i Lindberg, 1987; Barceló i Poschenrieder, 1990; Greger i sar., 1991; Wallace i sar. 1992; Narwal i sar., 1993; Pál i sar., 2006). Cd ulazi u ćeliju preko membranskih transportera koji prenose esencijalne katjone (Meharg i sar., 1993; Hart i sar., 1998; Clemens i sar. 2001; Hall, 2002). Thomine i sar. (2000) su utvrdili da je usvajanje Cd i Fe u *Arabidopsis*-u konstitutivno, tj. vezano za tzv. *Nramp* gene koji kodiraju sintezu proteinskih transportera za Cd i Fe. Sinteza transportera stimulisana je smanjenjem sadržaje Fe u podlozi. Na taj način nedostatak Fe u korenskom medijumu, može da poveća usvajanje prisutnog Cd (Awad i Römheld, 2000). Takođe, dokazano je postojanje tzv. Zn/Cd transportera (kodiranih genima ZNT1) u hiperakumulatorskoj vrsti *Thlaspi caerulescens* (Pence i sar., 2000).

2.2.2. Nikl

Ni je kao esencijalni element u malim koncentracijama neophodan za normalno funkcionisanje biljke. Međutim, u povišenim koncentracijama, Ni smanjuje rast, dovodi do hlorotičnih promena praćenih nekrozom lista, te smanjuje sadržaj vode u tkivu narušavanjem vodnog režima. Ni u povećanim koncentracijama stimuliše lipidnu peroksidaciju, čime se narušava funkcionisanje membrana, kroz povećanu produkciju toksičnih kiseoničnih radikala kao što su superoksidni anjoni (O_2^-), vodonik peroksid (H_2O_2) i hidroksilni radikali (OH^-) (Kumar i sar., 2007). Suvišak Ni smanjuje sadržaj mnogih esencijalnih elemenata (Foy i sar., 1978; Yang, 1996). Kevrešan i sar. (2001) su utvrdili opadanje sadržaja nitrata, aktivnosti nitrat reduktaze i sadržaja proteina u biljkama graška, gajenih u uslovima suviška Ni. U grupi teških metala, Ni spada u elemente koji se dobro transportuju kroz biljku, jer je kao neophodan element potreban u malim dozama. U hiperakumulatorskim vrstama kao što su vrste iz roda *Thlaspi spp.*, Ni se efikasno usvaja i magacionira u centralnoj vakuoli ćelija izdanka, usled delovanja katjonskih tranportera kodiranih tzv. TgMTP1 genima (Persans i sar., 2001). Utvrđeno je da se jedan manji deo Ni akumulira van vakuole, što ukazuje na postojanje tolerancije i na nivou citoplazme kod hiperakumulatorskih vrsta (Krämer i sar., 2000).

2.2.3. Olovo

Pb inhibira rast i funkcionisanje metabolizma biljke, vezuje se za brojne molekule kao što su amino kiseline, enzimi, DNK, RNK, narušavajući njihovu funkciju. Pb u biljkama smanjuje sadržaj pigmenata i intenzitet fotosinteze, inhibira nodulaciju, usvajanje N i redukciju nitrata, smanjuje količinu Fe, Mn, Cu i Zn u izdanku i dovodi do poremećaja u vodnom režimu direktnim narušavanjem funkcije vodnih kanala (Huang i sar., 1974; Singh i sar., 1997; Fodor i sar., 1998; Cseh i sar., 2000; Xiong i sar., 2006). Pb je teško rastvorljivo, u zemljištu je najčešće vezano za organske i neorganske čestice, te je njegov veći deo najčešće biološki nedostupan (Grěman i sar., 2001; McGrath i sar., 2001). Angelova i sar. (2004) navode da su rastvorne i karbonatne frakcije teških metala u zemljištu najviše uticale na akumuliranje metala u biljkama duvana, mada je dostupnost karbonatne frakcije

teških metala zadovoljavajuća samo u kiselim pH vrednostima. U istom istraživanju utvrđeno je da je rastvorna frakcija Pb u zemljištu samo 0,8 – 2,0% ukupne količine olova, dok je za Cd bila daleko veća (26,2 - 38,3%). Pored slabe dostupnosti usvajanja korenom, mobilnost Pb u biljci je veoma mala i smatra se da se može povećati kompleksiranjem sa nekim helatnim supstancama kao što je EDTA – etilen-diamin-tetrasirćetna kiselina (Vassil i sar., 1998) ili dodatkom kombinacije EDTA i indol-3-sirćetne kiseline (Lopez i sar., 2005). EDTA ima zaštitni efekat u odnosu na toksičnost olova. U većem broju istraživanja utvrđeno je da tretman Pb-EDTA ne dovodi do značajnih redukcija parametara bioprodukcije, pri čemu su čak utvrđeni i stimulatívni efekti (Larbi i sar., 2002; López i sar., 2007). Ipak, i u malim koncentracijama, čisto Pb je veoma štetno za sve žive organizme, i do sada nije utvrđena njegova pozitivna biološka uloga u zemljištu i biološkim sistemima (Lambert i sar., 1997). Usled slabe translokacije Pb u biljkama, hiperakumulatorske vrste za ovaj teški metal još nisu identifikovane, uprkos njegovom prisustvu u životnoj sredini (Kos i Leštan, 2003).

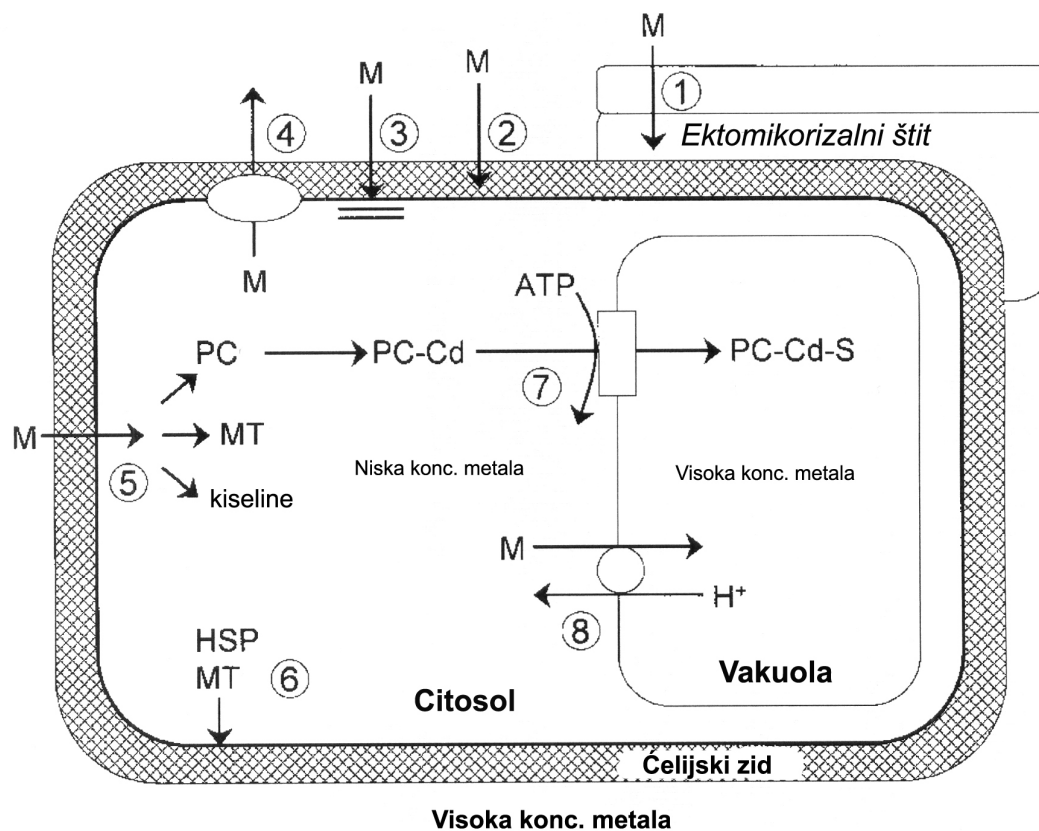
Da bi koren biljke usvojio teški metal, potrebno je da se metal rastvori u vodi. Često su metali u zemljištu u nerastvornom obliku vezani za organske ili neorganske čestice u podlozi. Sekretijom helatorskih supstanci ili nekih reduktaza metala, koren biljke može da stimuliše rastvaranje i usvajanje teških metala. Kada se rastvori, metal ulazi i kreće se kroz koren ekstracelularno (apoplastno) ili intracelularno (kroz citoplazme – protoplaste) što podrazumeva učešće jonskih kanala ili transportnih proteina u ćelijskim membranama. Za neke prenosioce ove vrste potvrđeno je da su u određenoj meri nespecifični, te da prenose više različitih teških metala (Kramer i sar., 1996; Chardonens i sar., 1999; Pilon-Smiths, 2005). Kada se teški metal konačno nađe u ćeliji, dalji metabolizam zavisi od detoksifikacije i izolacije teškog metala na ćelijskom nivou (Yang i sar., 2005).

2.3. Mehanizmi zaštite i adaptacije biljaka na stres izazvan teškim metalima

Neke biljne vrste razvile su sposobnost preživljavanja na staništima sa povišenim koncentracijama teških metala u podlozi. Tokom evolucije, ovakve biljke

su razvile čitav niz adaptivnih mehanizama, što je uslovalo stvaranje konstitutivne tolerancije na teške metale na ćelijskom nivou (Slika 1).

Većina ovih mehanizama dovodi do sprečavanja nagomilovanja toksičnih koncentracija teških metala u osetljivim delovima biljke, odnosno biljne ćelije. Na taj način biljka u mnogo većoj meri izbegava nastupanje stresa, nego što aktivira direktne kompenzatorne mehanizme, kao što su stvaranje zaštitnih proteina u cilju odbrane od direktne oksidacije. Ovi mehanizmi su raznovrsni i obično ne deluju pojedinačno, što zavisi od teškog metala koji ih aktivira i biljne vrste.



Slika 1. Pregled mehanizama detoksifikacije i tolerancije na teške metale u višim biljkama (Hall, 2002)

1. Ektomikorizno ograničavanje kretanja metala ka korenu 2. Vezivanje metala za ćelijski zid i korenske izlučevine 3. Redukovano usvajanje kroz ćelijsku membranu 4. Aktivno izbacivanje u apoplast 5. Stvaranje helata metala u citosolu različitim ligandima 6. Oporavak i zaštita ćelijske membrane od stresa izazvanog teškim metalima 7. Transport PC-Cd kompleksa u vakuolu 8. Transport i akumuliranje teških metala u vakuoli

Skraćenice: M – teški metali; PC – fitohelatini; MT – metalotionini; HSP – proteini temperaturnog šoka; Cd – kadmijum

2.3.1. Ektomikorize

Većina mehanizama odbrane, kada su u pitanju ektomikorizne gljive, uključuju različite ekskluzione procese koji ograničavaju pokretljivost teških metala ka korenu biljke. Ovi procesi uključuju apsorpciju metala hifama gljiva, smanjen pristup metala apoplastu biljke usled hidrofobnosti „barijere“ koja se formira prisustvom gljiva, helatiranje metala gljivičnim izlučevinama i adsorpcija na spoljašnjem delu micelijuma (Jentschke i Godbold, 2000). Ovi mehanizmi se mogu u većoj ili manjoj meri javljati zajedno ili nezavisno u zavisnosti od vrste ektomikorize i načina interakcije sa određenom biljnom vrstom.

2.3.2. Vezivanje teških metala za ćelijski zid i korenske izlučevine

Ćelijski zid je u direktnom kontaktu sa metalima u okolnom rastvoru, koji se adsorbuju na njegovu površinu. Ovaj proces ima relativno ograničen kapacitet, ne postoje dokazi o njegovoj specifičnosti, ali su potvrđeni pojedini slučajevi u kojima je količina teških metala na ćelijskom zidu bila značajna (Ernst i sar., 1992; Bringezu i sar., 1999). Korenske izlučevine imaju više uloga. One mogu stvaranjem helata da povećaju usvajanje i mobilnost metala ili naprotiv da dovedu do smanjenja te pokretljivosti. Toksični efekat nekih metala se smanjuje ili potpuno eliminiše, stvaranjem neutralnih kompleksa sa korenskim izlučevinama (Hall, 2002).

2.3.3. Redukovano usvajanje kroz plazma membranu

Kako je ćelijska membrana prva živa struktura na ulasku teških metala u biljku, na njoj se prvo i ogleda njihov toksični uticaj. Teški metali narušavaju transport drugih jona kroz membranu, najčešće usled oksidacije proteina, ukrštenog povezivanja proteinskih tiola, inhibicije ključnih membranskih proteina kao što je protonska ATP-aza ili promene u sastavu i fluidnosti lipidne komponente membrane (Meharg, 1993). Tolerancija ćelijske membrane na povišene koncentracije teških metala podrazumeva zaštitu integriteta membrane od štetnih promena koje dovode do povećanog ulaska toksičnih jona i drugih materija u ćeliju. Dokazi koji ukazuju na postojanje ovakvih mehanizama su malobrojni. U slučaju stresa izazvanog teškim

metalima dolazi do stimulisanja procesa koji obnavljaju oštećenja na membrani. Takođe, unos teških metala se ograničava inhibiranjem transporta određenog metala u ćeliju (Hall, 2002). Specifičnost ove inhibicije je različita u zavisnosti od biljne vrste i genotipa. U nekim slučajevima zajedno sa smanjenjem transporta jona štetnog metala biljka smanjuje i unos nekog esencijalnog elementa, jer se transport vrši preko istog nosača (Meharg i Macnair, 1992). Arazi i sar. (1999) su utvrdili da se transgene biljke duvana sa povećanom sintezom NtCBP4 proteina karakterišu povećanom akumulacijom Pb koje se prenosi navedenim proteinskim nosačem koji inače služi za prenos esencijalnih elemenata. Uporedo sa povećanom akumulacijom Pb, iste biljke su imale značajno smanjenu akumulaciju Ni. Genska specifičnost ovih procesa je potvrđena.

2.3.4. Aktivno izbacivanje u apoplast

Povećano izbacivanje štetnih jona teških metala iz biljne ćelije je mehanizam koji je još uvek potvrđen u malom broju slučajeva. Ovaj proces se vezuje za specifične proteinske transportere koji su sintetisani transkripcijom specifičnih gena, i potvrđen je u mnogo većoj meri kod nekih životinjskih i bakterijskih ćelija (Hall, 2002). Smatra se da su ovi proteini aktivni transporteri za čiji rad je potrebna energija.

2.3.5. Proteini temperaturnog šoka

Potvrđeno je da kod nekih biljaka dolazi do ekspresije ovih proteina pod uticajem povišenih koncentracija teških metala. Ovi proteini štite i stabilizuju membrane čime se smanjuje štetan efekat teških metala na ćeliju (Neumann i sar., 1994; Lewis i sar., 2001)

2.3.6. Stvaranje helata metala u citosolu različitim ligandima

Stvaranje helata teških metala u citosolu ligandima visokog afiniteta je potencijalno veoma važan mehanizam detoksifikacije i tolerancije na teške metale. Među ove ligande spadaju amino kiseline, organske kiseline, dve klase peptida,

fitohelatini i metalotionini (Rauser, 1999; Clemens, 2001). Najveći broj naučno utemeljenih informacija prikupljen je za fitohelatine.

Fitohelatini (PC) su peptidi koji imaju strukturu $(\gamma\text{-Glu Cys})_n\text{-Gly}$, gde je $n=2-11$. Sintetišu se iz glutationa kao supstrata, aktivnošću enzima PC-sintaze (nisu direktno genetski kodirani, tj. ne sintetišu se translatorno). Ovaj enzim se aktivira u prisustvu jona teških metala (Rauser, 1995). Veliki broj istraživanja potvrđuje ulogu sinteze PC u toleranciji na teške metale, naročito kad je u pitanju Cd (Hall, 2002). Međutim, jedan broj istraživača navodi da sinteza PC kod mnogih vrsta nije mehanizam zaštite od teških metala, te da ovi peptidi imaju druge uloge u ćeliji, vezane za metabolizam sumpora i antioksidantnu aktivnost (Davies i sar., 1991; Ernst i sar., 1992; De Knecht i sar., 1994, Rauser, 1995). Njihova uloga u stvaranju helata i neutralisanju teških metala je sekundarna, te nastaje kao posledica navedenih primarnih uloga. Ipak, veliki broj radova potvrđuje da kod mnogih biljnih vrsta, PC imaju značajnu ulogu u zaštiti od teških metala.

Metalotionini (MT) su genski kodirani polipeptidi koji takođe imaju u svom sastavu veliku količinu cisteina, slično fitohelatinima (Prasad, 1999). Utvrđeno je da MT igraju važnu ulogu u detoksifikaciji teških metala, pogotovo Cu, Zn i u manjoj meri Cd, za koji se navodi da značajnije indukuje sintezu FH nego MT (Hall, 2002). Veći broj istraživača navodi da MT imaju različit efekat pod uticajem različitih metala. Takođe, ističe se mogućnost njihovog antioksidantnog dejstva i uloga u oporavku oštećenja ćelijske membrane (Salt i sar., 1998; Dietz i sar., 1999). Međutim, tačna uloga ovih jedinjenja tek treba da se utvrdi.

Organske i amino kiseline (citrati, malati, histidin) su takođe potencijalni ligandi teških metala sa mogućom ulogom njihove detoksifikacije (Clemens, 2001).

2.3.7. Vakuolarna izolacija

Transport teških metala u vakuolu je direktan mehanizam kojim se izoluje njihovo toksično dejstvo. Dobro je dokumentovan transport Cd putem Cd/H⁺ antiporta i tzv. ABC transportera zavisnog od ATP-a, u tonoplastu. Paralelno sa nakupljanjem Cd, u vakuoli dolazi do nakupljanja fitohelatina koji stvaraju stabilan, netoksičan Cd-PC kompleks (Hall, 2002). Još jedan primer je nakupljanje Ni u vakuoli vrsta *Thlaspi spp.* usled povećane ekspresije TgMTP1 gena, čime se

stimuliše sinteza katjonskih transportera (Persans i sar., 2001). Indukcijom ekspresije AtHMA3 proteina u vrsti *Arabidopsis thaliana* koji ima funkciju tzv. P_{1B}-ATP-aze, povećava se tolerancija na Cd i Pb i njihovo deponovanje u vakuoli (Morel i sar., 2009). Potvrđeno je nakupljanje i drugih teških metala u vakuoli, ali i ovaj mehanizam tolerancije pokazuje specifičnost. Aktivira se u većoj ili manjoj meri u prisustvu određenih teških metala.

2.4. Uticaj teških metala na akumulaciju azota, kalijuma i fosfora u biljnom organizmu

Teški metali, naročito Cd i Pb, mogu da poremete ravnotežu u mineralnoj ishrani biljke. Oni kompeticijom redukuju usvajanje i translokaciju nutrijenata, utiču na korenske ćelije, ćelijske membrane, izmenjuju funkciju ATP-aza i drugih prenosioca, što za posledicu ima smanjenje broja nesuberizovanih vršnih delova korena i oštećenja permeabilnosti korenskih ćelija (Greger i sar., 1991). Smanjen sadržaj osnovnih nutrijenata je takođe uzrokovan direktnim gubljenjem jona iz oštećenih korenova i njihovom imobilizacijom u korenu, usled čega je moguć visok nedostatak nutrijenata u nadzemnom delu (Siedleska, 1995).

Larbi i sar. (2002) su utvrdili značajno opadanje koncentracije N, K i P u šećernoj repi pod uticajem Cd u vodenim kulturama. U većini istraživanja utvrđeno je da Cd redukuje usvajanje N, P, K, Mg, Ca, Zn, Cu i Na (Greger i Lindberg, 1987; Barceló i Poschenrieder, 1990; Greger i sar., 1991; Wallace i sar. 1992; Narwal i sar., 1993; Pál i sar., 2006). Međutim, drugi autori navode da kadmijum nije doveo do promena u usvajanju P (Yang i sar., 1996; Nocito i sar., 2004), ili čak utvrđuju povećanje koncentracije K (Ciecko i sar., 2004).

U većem broju istraživanja potvrđeno je da povišene koncentracije Ni smanjuju usvajanje nutrijenata. Ni u povećanim koncentracijama smanjuje sadržaj nitrata, aktivnost nitrat reduktaze i sadržaj proteina (Kevrešan i sar. 2001). U izdancima kukuruza, prisustvo Ni i Cd dovelo je do smanjenja koncentracija Zn, Fe, Cu i Mn i povećanja koncentracije Mg (Maksimović i sar., 2007). Sa povećanjem koncentracija Ni u rastvoru, koncentracija nitrata, fosfata i ukupne koncentracije N i P, proporcionalno su opadale u vrsti *Elodea canadensis* (Kähkönen i Kairesalo,

1998). Ni se lako usvaja korenom i transportuje u slobodnoj i helatiranoj formi kroz ksilem, a njegova mobilnost u floemu je uglavnom dobra i zavisi od biljne vrste (Neumann i Chomel, 1986).

Bibi i sar. (2006) su utvrdili značajno smanjenje koncentracije K pod uticajem čistog Pb. Oni navode da teški metali dovode do opadanja sadržaja nutrijenata, ali da je taj efekat manje izražen kod biljaka adaptiranih na stres. Pb u biljkama smanjuje usvajanje nutrijenata, ali je potrebno da se nađe u rastvornom, za biljke dostupnom obliku. Veći broj istraživanja ukazuje da kad je Pb kompleksirano sa EDTA, ovaj organski helat neutrališe negativan efekat Pb na usvajanje nutrijenata. López i sar. (2007) su utvrdili da je čisto Pb smanjilo usvajanje većeg broja neophodnih makro i mikroelemenata u biljci *Medicago sativa*. Dodatkom EDTA, došlo je do povećanog usvajanja i translokacije Pb, bez značajnog uticaja na koncentracije K, P i nekih mikroelemenata, pri čemu je čak utvrđen stimulativan efekat na translokaciju P u nadzemni deo. Larbi i sar. (2002) u šećernoj repi pod uticajem tretmana Pb-EDTA nisu utvrdili opadanje koncentracije esencijalnih elemenata ili je ono bilo blago izraženo, ali u znatno manjoj meri u odnosu na Cd.

2.5. Uticaj teških metala na fotosintezu, disanje i transpiraciju

Studije na većem broju biljnih vrsta su pokazale da Cd, Ni i Pb inhibiraju fotosintezu direktno i indirektno narušavanjem strukture hloroplasta, biosinteze hlorofila, karotenoida i plastohinona, destruktivnim delovanjem na pigment-proteinske komplekse, fotooksidaciju vode, enzime, usvajanje CO₂ i transport elektrona (Seregin i Ivanov, 2001; Seregin i Kozhevnikova, 2006).

Cd remeti ravnotežu u mineralnoj ishrani, smanjuje usvajanje vode, transpiraciju, što konačno dovodi do inhibicije intenziteta fotosinteze i disanja (Barcelo i Poschenrieder, 1990). Cd direktno zaustavlja proces fotosinteze uništavanjem tilakoidnih membrana u listovima, čime narušava enzimsku aktivnost (Becceril i sar., 1988; Pietrini i sar., 2005). Utvrđeno je da Cd prouzrokuje oksidativni stres, smanjuje stomatenu provodljivost kroz direktan uticaj na ćelije zatvaračice, smanjuje sadržaj pigmenata i gustinu hloroplasta u ćeliji (Hendry i sar., 1992; Barila i sar., 2001; Perfus-Barbeoch i sar., 2002; Milone i sar., 2003). Smanjenje sadržaja

pigmenata je direktno vezano za inhibiciju sinteze hlorofila i karotenoida. Vezivanjem za SH grupe u ATP-azi, Cd narušava njenu funkciju (Burzynski i Kolano, 2003; Pál i sar., 2006). Wallace i sar. (1992) navode da Cd utiče na smanjenje sadržaja Fe, čime posredno dolazi do hloroze listova i opadanja intenziteta fotosinteze. Dinakar i sar. (2008) navode dva moguća uzroka opadanja sadržaja hlorofila pod uticajem Cd: 1) direktna inhibicija prothlorofilid reduktaze i 2) inhibicija aktivnosti enzima koji razlaže vodu u fotosistemu II.

Pod uticajem olovo-acetata utvrđeno je povećanje sadržaja ukupnih fosfolipida, povećanje fosfatidil holina uz smanjenje fosfatidil glicerola, čime se redukuje propustljivost membrane i narušava niz metaboličkih procesa (Pál i sar., 2006). U biljkama *Brassica pekinensis* (kineski kupus) Pb je izazvalo opadanje sadržaja hlorofila, sa izuzetkom pri tretmanu od 0.4 mmol Pb kg⁻¹ suvog zemljišta, kad je utvrđen stimulativan efekat na sadržaj hlorofila b (Xiang i sar., 2006).

Funkcionisanje fotosintetičkog aparata *in vivo* se može proceniti praćenjem fluorescencije hlorofila u intaktnim listovima, s obzirom da na fluorescenciju utiču isti činioci koji inhibiraju fotosintezu: zagađivači, vodni stres, fotoinhibicija, patogeni, ekstremne temperature i dr. Fluorescencija hlorofila je mera fotoefikasnosti funkcionisanja fotosistema II, jer se praćenjem parametara fluorescencije donose zaključci o rasipanju dela energije koji nije iskorišćen u fotohemijским reakcijama. Parametri fluorescencije hlorofila emitovane iz PS II koriste se kao kvantitativni indikatori koji ukazuju na oštećenja u transportu elektrona (Bolhár-Nordenkamp, 1989; Karukstis, 1992; Nogués i sar., 1994). Za utvrđivanje stanja elektronskog toka u PS II najveći značaj ima indukcija fluorescencije koja se indikativno izražava preko niza parametara, od kojih je u ovom radu korišćen odnos varijabilne i maksimalne indukovane fluorescencije Fv/Fm (Pajević, 1996). Stoga je praćenje fluorescencije hlorofila često korišćena metoda u određivanju stabilnosti procesa fotosinteze pod uticajem nekog činioca stresa kao što su teški metali (Maxwell i Johnson, 2000; Longenberger i sar., 2009).

Niz istraživanja ukazuje da teški metali redukuju promet vode u biljkama neposrednim i posrednim delovanjem. Narušavanjem niza fundamentalnih metaboličkih procesa (fotosinteze, disanja, mineralne ishrane itd.) teški metali smanjuju bioprodukciju, što uzrokuje smanjen kapacitet korena za usvajanje vode i narušavanje transporta i odavanja vode. Direktno delovanje teških metala dovodi do inhibicije otvaranja stoma (Yang i sar., 2006), narušavanja transporta jona kroz

membranu ćelija zatvaračica (Milone i sar., 2003) i blokiranja akvaporinskih kanala (Ionenko i sar., 2006). Takođe, teški metali smanjuju kapacitet biljaka u adaptaciji na stres izazvan pojavom suše (Santala i Ryser, 2009).

Iz svega navedenog se može zaključiti da je merenje pokazatelja fotosinteze, disanja i vodnog režima veoma značajno za precizno definisanje metaboličkog uticaja teških metala na rastenje i razviće biljaka.

2.6. Uticaj teških metala na sadržaj nitrata i aktivnost nitrat reduktaze

Nitrat reduktaza je ključni enzim u asimilaciji nitrata, odnosno azota. Geni koji kodiraju sintezu ovog enzima aktiviraju se u prisustvu nitrata, te je stoga nitrat reduktaza inducibilan enzim (Stitt, 1999). Aktivnost nitrat reduktaze zavisi od količine nitrata u ćeliji, a u većoj meri od usvajanja i translokacije nitrata u mesta njihove redukcije (Barneix i sar., 1984). Transport nitrata odvija se velikim delom kroz simplast preko ATP-aznih transportera osetljivih na teške metale koji se vezuju za SH grupe ATP-aza. Pod uticajem teških metala narušava se polarizacija membrana, protonski protok te selektivnost u usvajanju pojedinih elemenata (Kennedy i Gonsalves, 1989). Bhandal i Kaur (1992) su utvrdili da Cd, Ni, Pb i Cu inhibiraju usvajanje nitrata kod pšenice, što za posledicu ima progresivno smanjenje aktivnosti nitrat reduktaze. Awasthi i Rai (2005) navode da su teški metali u direktnoj konkurenciji sa nitratima za aktivno i pasivno usvajanje u ćeliju. Teški metali sekundarno mogu uzrokovati simptome dehidracije biljnih tkiva. Nastali nedostatak vode može da dovede do snižavanja sadržaja aktivnih poliribozoma i stoga do smanjene sinteze i aktivnosti nitrat reduktaze (Srivastava, 1980). Kevresan i sar. (2001) su utvrdili da je aktivnost nitrat reduktaze u grašku opala pod uticajem Cd, Ni i Pb, u korelaciji sa smanjenim usvajanjem i translokacijom nitrata. Značajno opadanje usvajanja nitrata u prisustvu Cd u hranljivom rastvoru utvrđeno je u biljkama pasulja, a kao posledica došlo je i do opadanja aktivnosti nitrat reduktaze (Gouia i sar., 2000). Xiong i sar. (2006) utvrdili su značajno opadanje sadržaja nitrata i aktivnosti nitrat reduktaze u biljkama vrste *Brassica pekinensis* (kineski kupus) pod uticajem povišenih koncentracija Pb. Veći broj autora navode da je moguća i direktna

inhibicija nitrat reduktaze dejstvom teških metala koji se vezuju za sulfhidrilne grupe enzima, čime ga inaktiviraju (Awasthi i Rai, 2005; Xiong i sar., 2006). Veći broj istraživača navodi da je nitrat reduktaza osetljiva na H₂O₂ čija je povećana akumulacija moguća pod uticajem teških metala (Gajewska i Skłodowska, 2007).

2.7. Prolin kao indikator stresa izazvanog teškim metalima

Cilj fitoekstrakcije je da se što veća količina teških metala transportuje i akumulira u nadzemnim delovima biljke. Jedna od strategija povećavanja ovog transporta je stimulisanje transpiracije, čime se istovremeno povećava translokacija teških metala u nadzemni deo biljke. Međutim, stres izazvan teškim metalima često redukuje transport vode, čime se ograničava i transport samih teških metala (Barcelo i Poschenrieder, 1990).

Akumulacija iminokiseline prolina u pojedinim delovima biljke najčešće se vezuje za osmoregulaciju biljnih tkiva u uslovima vodnog stresa, te se ovo jedinjenje svrstava u grupu tzv. kompatibilnih osmolita (Arsenijević-Maksimović i Pajević, 2002). Kako teški metali dovode do poremećaja u vodnom režimu biljaka, nakupljanje prolina u biljkama često se uzima kao biomarker i za stres izazvan teškim metalima (Sharma i Dietz, 2006). Mnoga istraživanja utvrdila su povećanu akumulaciju prolina u biljnom tkivu pod uticajem Cd (Alia i Saradhi, 1991; Costa i Morel, 1994; Schat i sar., 1997; Lesko i Simon-Sarkadi, 2003; Hasan i sar., 2007; Nikolić i sar., 2008), Ni (Saleh i Amal, 2002; Gajewska i sar., 2006; Lin i Kao, 2007) i Pb (Alia i Saradhi 1991; Kastori i sar. 1992). U prisustvu teških metala prolina ima ulogu stabilizovanja osmotskih uslova, predstavlja dodatan izvor C i N, stabilizuje sintezu proteina i funkcioniše kao antioksidant i pH regulator (Nagoor, 1999; Pál i sar., 2006).

Prihvaćeno je mišljenje da je akumulacija prolina pod uticajem stresa, genski regulisan proces, pri kom dolazi do intenzivne ekspresije gena koji regulišu njegovu sintezu i depresije gena koji utiču na njegovu degradaciju. Takođe utvrđeno je da se inhibira sinteza proteina koji u svom sastavu sadrže prolina, a stimuliše razlaganje već sintetisanih proteina (Kishor i sar., 1995). Analiza prolina u ovom radu trebala je da

utvrđi da li je sadržaj slobodnog prolina u biljnom tkivu, pouzdan indikator stresa izazvanog teškim metalima u vrbama.

2.8. Fitoremedijacija

Fitoremedijacija je proces prečišćavanja životne sredine korišćenjem biljaka i mikroorganizama u njihovoj korenskoj zoni. Ova tehnologija podrazumeva korišćenje prirodnih procesa kojima biljke i njihova mikrobiološka rizosfera uklanjaju, premeštaju, stabilizuju, izoluju ili razgrađuju organske i neorganske zagađivače u zemljištu, sedimentu, vodi ili vazduhu. U poslednjih nekoliko godina objavljen je čitav niz preglednih radova koji su se bavili dosadašnjim istraživanjima u oblasti fitoremedijacije (McIntyre, 2003; Prasad, 2003; Pulford i Watson, 2003; Singh i sar., 2003; Pilon-Smits, 2005; Padmavathiamma i Li, 2007).

Fitoremedijacija je primenjivana na zagađivačima tri agregatna stanja:

- a) Čvrsto agregatno stanje: zemljišta i sedimenti zagađeni u zoni vojnih aktivnosti (TNT, metali, organski otrovi), na poljoprivrednim površinama (herbicidi, pesticidi, metali, Se), u industrijskim zonama (organske materije, metali, As), u zoni rudnih kopova (metali), u zonama prerade drveta (PAH-ovi) (Bañuelos 1990; Ferro i sar., 1999; Olson i sar., 2003; Rock, 2003; Winter Syndor i Redente, 2002).
- b) Tečno agregatno stanje: otpadne vode iz naselja (nutrijenti, metali), sa poljoprivrednih površina (nutrijenti iz đubriva, metali, As, Se, B, organski pesticidi, herbicidi), industrijske otpadne vode (metali, Se), iz naslaga uglja (metali), iz podzemnih voda (organske materije, metali) (Ferro i sar., 2001; Hansen i sar., 1998; Horne, 2000; Lin Z-Q i sar., 2000; Rock, 2003).
- c) Gasovito agregatno stanje: korišćenje biljaka u filtriranju vazduha van i unutar objekata, od materija kao što su NO_x, SO₂, ozon, CO₂, nervni gasovi, prašina, halogeni isparljivi ugljovodonici (Jeffers i Liddy, 2003; Morikawa i sar., 2003).

Uslovno se primena fitoremedijacije deli na osnovu organske i neorganske prirode zagađenja.

Organski tip zagađenja je u prirodi pretežno poreklom od čovekovih aktivnosti, zbog čega su ovakve supstance u prirodnoj sredini nove i nepoznate za živi svet (ksenobiotske materije). Efekat takvih jedinjenja na biljni i životinjski svet i kruženje materija u lancima ishrane je nepredvidiv i često toksičan, čak kancerogen. Organski zagađivači se oslobađaju u prirodu oslobađanjem različitih tipova goriva i rastvarača, vojnim aktivnostima (eksplozivi, hemijsko oružje), poljoprivredom (pesticidi, herbicidi), industrijom (hemijska, petrohemijska), u saobraćaju, prerađivanjem drveta, itd.

Organsko zagađenje i biljke - U zavisnosti od karakteristika samog zagađivača, organske materije mogu biti razgrađene već u korenskoj zoni biljke, ili se na netoskične komponente razgrađuju u nadzemim delovima nakon usvajanja. Moguće je izolovanje polutanta u pojedinim delovima biljnog tkiva ili njegovo isparavanje u atmosferu. Dokumentovan je čitav niz organskih jedinjenja čija je fitoremedijacija bila uspešna:

- TCE (trihloretilen) – organski rastvarač koji se smatra najčešćim zagađivačem podzemnih voda (Newman i sar., 1997; Shang i sar., 2003),
- herbicidi - npr. atrazin (Burken i Schnoor, 1997),
- eksplozivi kao što je TNT (trinitrotoluen) (Hughes i sar., 1997)
- petrolejski ugljovodonici: nafta, benzen, toluen, PAH-ovi (polciklični aromatični ugljovodonici) (Aprill i sar., 1990; Schnoor i sar., 1995; Olson i sar., 2003)
- aditiv goriva MTBE (metil tercijarni butil etar) (Davis i sar., 2003; Hong i sar., 2001; Winnike-McMillan i sar., 2003)
- (PCB) polihlorisani bifenili (Harms i sar., 2003)

Neorganski tip zagađenja – neorganske materije se prirodno nalaze u Zemljinoj kori i atmosferi u umerenim koncentracijama. Čovekove delatnosti kao što su rudarstvo, industrija, saobraćaj, poljoprivreda i vojne aktivnosti ubrzavaju njihovo oslobađanje i koncentrisanje u određenim zonama životne sredine. Na taj način, koncentracije neorganskih zagađivača često dostižu toksične nivoe.

Neorgansko zagađenje i biljke - Za razliku od organskih materija, biljke ne mogu metabolički razložiti neorganske zagađivače, ali se korišćenjem fitoremedijacije može izvršiti stabilizacija ili izolovanje zagađivača u delu biljnog tkiva

koje se može pokositi i ukloniti iz određenog staništa. Fitoremedijacija je primenjivana za sledeće neorganske zagađivače:

- makroelemente (nitrati, fosfati) (Horne, 2000)
- mikroelemente Cr, Cu, Fe, Mn, Mo i Zn (Lytle i sar., 1998)
- neesencijalne elemente Cd, Co, F, Hg, Se, Pb, V, W (Blaylock i Huang, 2000; Horne, 2000)
- radioaktivne izotope ^{238}U , ^{137}Cs i ^{90}Sr (Dushenkov, 2003; Dushenkov i Kapulnik, 2000; Negri i Hinchman, 2000)

2.8.1. Prednosti i nedostaci primene fitoremedijacije

Fitoremedijacija u poslednjih nekoliko godina stiče sve veću popularnost, kako u nauci tako i u državnim i industrijskim strategijama mnogih zemalja. Pored nesumnjivih prednosti, tehnologije primenjivane u okrilju fitoremedijacije imaju i niz mana (Pilon-Smiths, 2005).

Nedostaci su:

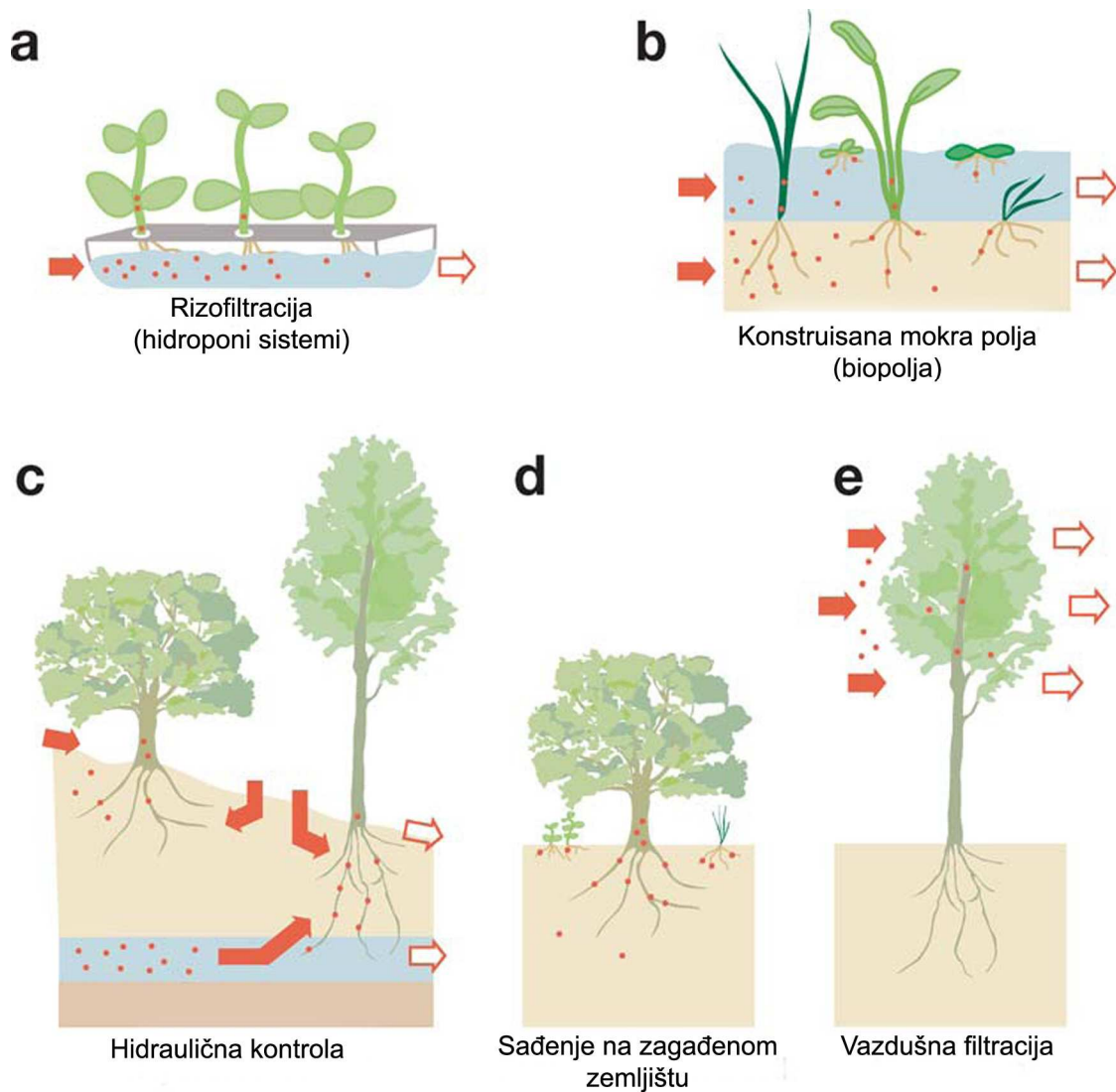
- teško prilagođavanje na nepovoljne karakteristike zemljišta
- previsok nivo toksičnosti zagađivača
- teško prilagođavanje na neoptimalne klimatske uslove
- nedovoljna razvijenost korena u dubinu, zbog čega biljka ne može da „dohvati“ zagađenje
- fitoekstrakcija zagađenog zemljišta može da traje i godinama što je sporije od ustanovljenih konvencionalnih fizičko-hemijskih metoda
- nedovoljna biološka dostupnost zagađivača

Prednosti su:

- jeftina tehnologija – u proseku, deset i više puta jeftinija u odnosu na uobičajene fizičko-hemijske metode prečišćavanja
- obično se izvodi na konkretnom lokalitetu (*in situ*) što smanjuje mogućnost dodatnog kontakta između zagađenog substrata i čoveka, te sekundarnih zagađenja drugih organizama i životne sredine
- u odnosu na klasične fizičko-hemijske metode prečišćavanja, količina sekundarno nastalog otpada je mnogo manja
- ova tzv. „zelena tehnologija“ ima ekološku konotaciju, vizuelno je prijemčiva, zbog čega je popularna u marketingu. Velike kompanije (u oblasti naftne industrije, elektroprivrede, hemijske industrije, vladine agencije) sklone su da ulažu u ovu vrstu tehnologije jer se na taj način sa malim ulaganjima predstavljaju kao ekološki podobne organizacije (Glass, 1999).
- mogućnost jednostavnog kombinovanja sa drugim metodama remedijacije životne sredine

Primena biljaka i rizosferne mikroflore u remedijaciji zagađivača, moguća je njihovom manipulacijom na nekoliko načina ili tehnika (Slika 2).

Zagađeni vodeni medijumi se mogu filtrirati u **hidroponskim sistemima** (vodenim kulturama), što je proces koji se često naziva **rizofiltracija** (Raskin i sar., 1997). Za prečišćavanje vode, prave se i veštačka **mokra polja (biopolja)**, na kojima se biljke sade u čvrst porozan medijum, a otpadna voda se propušta preko tako formiranog sistema. Drvenaste vrste sa ekstenzivnim korenovima mogu da se koriste kao **hidraulična barijera** koja stvara uzlazni tok vode čime se sprečava kontaminacija dubljih slojeva zemljišta i podzemnih voda. Takođe, drveće se može koristiti i za sprečavanje horizontalnih kretanja zagađivača u podzemnim vodama (Newman i sar., 1997). Najčešći vid primene biljaka je **sađenje (*in situ*)** na konkretnom zagađenom lokalitetu. Moguća je i primena biljaka u prečišćavanju vazduha, tzv. **vazдушna filtracija** (Jeffers i Liddy, 2003; Morikawa i sar., 2003).



Slika 2. Tehnike fitoremedijacije

• crvenom bojom su označeni zagađivači (Pilon-Smiths, 2005)

U zavisnosti od načina neutralisanja samog zagađivača, fitoremedijacija se može podeliti u nekoliko vidova (Slika 3).

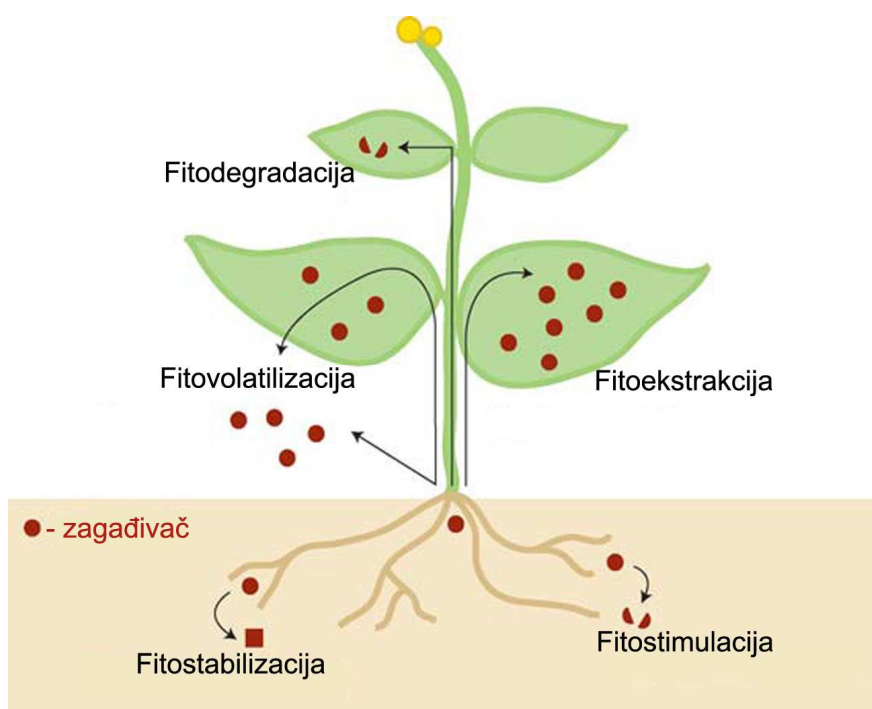
Fitodegradacija - fitodegradacija je proces razlaganja organskih zagađivača delovanjem unutrašnjih ili sekretovanih biljnih enzima, pri čemu se zagađivači hemijski prevode u manje toksične forme. Određene zagađivače biljke čak mogu da iskoriste u svom metabolizmu, pri čemu ih inkorporiraju u sopstvena tkiva, bez štetnog efekta.

Fitovolatilizacija – nakon usvajanja, određeni polutanti mogu se delovanjem metabolizma biljke prevesti u specifičnu isparljivu formu. Tako transformisan zagađivač otpušta se u atmosferu.

Fitoekstrakcija – usvajanje polutanta i njihovo akumuliranje u nadzemnim delovima biljke. Postupak je praćen košenjem delova biljnog tkiva u kom je akumuliran zagađivač. Takav biljni materijal je moguće dalje uključiti u različite proizvodne, neprehrambene procese, ili bezbedno deponovati.

Fitostimulacija – u zoni rizosfere, biljke mogu da stimulišu razgradnju zagađenja, direktnim izlučivanjem supstanci iz korena ili stvaranjem povoljnih uslova za razmnožavanje i rast specifičnih mikroorganizama. Ovaj vid fitoremedijacije naziva se još i rizodegradacija.

Fitostabilizacija – ovaj termin odnosi se na korišćenje biljaka za stabilizovanje ili neutralizovanje zagađivača u zemljištu. Fizička stabilizacija podrazumeva sprečavanje erozije i ceđenja zagađivača u dublje slojeve. Hemijska stabilizacija se odnosi na transformaciju zagađivača u biološki manje dostupnu formu.



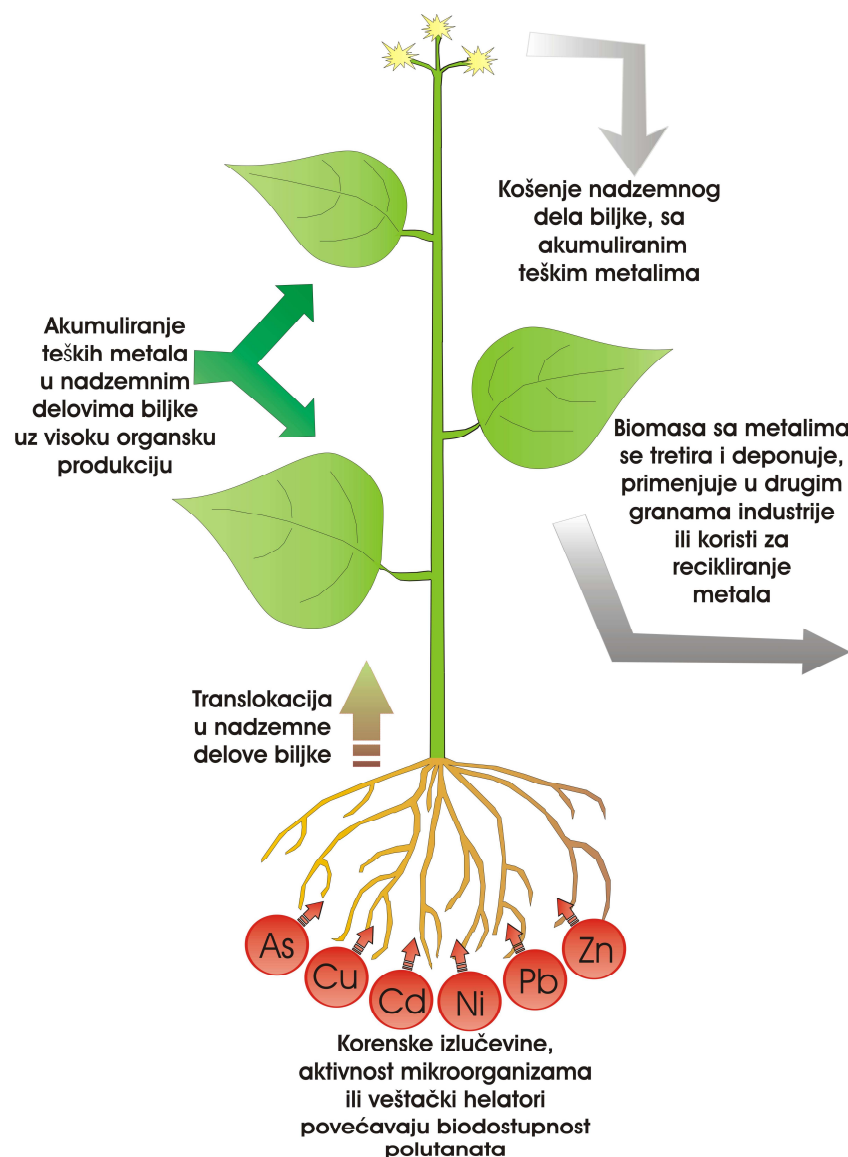
Slika 3. Različiti vidovi fitoremedijacije (Pilon-Smiths, 2005)

2.8.2. Fitoekstrakcija

U slučaju neorganskog tipa zagađenja (u većini slučajeva to su teški metali) u fitoremedijaciji se koriste dva tehnološka postupka: fitostabilizacija i fitoekstrakcija. Fitostabilizacija se koristi samo na onim staništima gde fitoekstrakciju nije moguće

primeniti, te se zagađivač samo stabilizuje, čime se smanjuje njegova toksičnost i biološka dostupnost. Pri tome zagađivač ostaje u staništu. Stoga, gde god postoji mogućnost, teži se primeni fitoekstrakcije (McGrath i Zhao, 2003).

Fitoekstrakcija je tehnologija kojom se teški metali, metaloidi i radionuklidi uklanjaju iz životne sredine korišćenjem pogodnih vrsta i genotipova biljaka, sposobnih da date polutante usvoje i akumuliraju u delovima biljnog tkiva koje je moguće na što jednostavniji način ukloniti iz zagađenog područja (Slika 4).



Slika 4. Principijelna šema fitoekstrakcije teških metala

U oblasti fitoekstrakcije, poslednjih godina publikovano je više preglednih radova (Lasat, 2002; Prasad, 2002; McGrath i Zhao 2003; Prasad i Freitas, 2003;

Alkorta i sar., 2004; Ghosh i Singh, 2005). Dominantno, fitoekstrakcija podrazumeva manipulaciju biljakama u cilju prečišćavanja sredine zagađene teškim metalima, a u znatno manjoj meri metaloidima i radionuklidima. U drugoj polovini 20. veka više istraživača je došlo na ideju o primeni biljaka u remedijaciji, upravo za ekstrakciju teških metala (Utsunomyia, 1980; Chaney, 1983; Baker i sar., 1991). Ova ideja se intenzivno razvila krajem 20. i početkom 21. veka. U SAD, 2005. godine, vrednost tržišta fitoremedijacije koja je komercijalizovana, procenjena je na oko 100-150 miliona dolara godišnje i u konstantnom je rastu (Pilon-Smiths, 2005). U Evropi se, u poslednjih 10 godina, ideja o komercijalizaciji ove tehnologije sve više realizuje. U zavisnosti od uslova staništa i nivoa kontaminacije, jedna procena kaže da je cena fitoekstrakcije ispod 5% cene alternativnih fizičko-hemijskih metoda remedijacije (Prasad, 2002). Mogućnost naknadnog korišćenja biljne mase sa akumuliranim teškim metalima u raznim granama industrije dodatno povećava ekonomičnost ove tehnologije.

Uspešna primena fitoekstrakcije zavisi od niza činilaca koji uključuju stepen zagađenja zemljišta ili vode (kvantitet i kvalitet kontaminacije), biološku dostupnost metala za usvajanje korenom određene biljke, te potencijal biljke da usvoji i akumulira teške metale u biljnim organima koje je lako ukloniti iz zagađenog staništa (poželjno nadzemni delovi biljaka). Za potencijal fitoekstrakcije u zemljištu veoma je važna interakcija između zemljišta, metala i biljke. Kompleksnost ove interakcije, kontrolisane lokalnim klimatskim, abiotičkim i biotičkim uslovima, u većini istraživanja ukazuje na specifičnost pristupa svakom individualnom slučaju primene ove tehnologije (Lasat, 2002).

Poželjne karakteristike biljke fitoekstraktora su (Prasad, 2002; Pilon-Smiths, 2005):

- tolerancija na povišene koncentracije određenog teškog metala
- sposobnost usvajanja određenog teškog metala
- visok nivo translokacije u nadzemni deo biljke koji se lako uklanja sa staništa
- brz rast (veliki prirast biomase)
- velika površina korenovog sistema (što veći kontakt sa zagađivačem u podlozi)
- otpornost na lokalne patogene
- prilagođenost lokalnim klimatskim uslovima
- kompetitivnost u odnosu na druge organizme određenog staništa

- stabilnost nabrojanih karakteristika tokom dužeg vremenskog perioda
- praktičan i lak način kosidbe nadzemnih delova

Veoma je teško pronaći biljnu vrstu ili njen genotip, koji ima sve nabrojane karakteristike. Najčešće se traži zadovoljavajući kompromis između svih navedenih osobina.

2.8.2.1. Hiperakumulatorske vrste biljaka

Hiperakumulatori su vrste biljaka sa kapacitetom usvajanja i akumuliranja jednog ili više teških metala, u koncentracijama od 100 i više puta većim od drugih biljnih vrsta gajenih u istim uslovima, bez značajnih posledica po preživljavanje biljke i njenu bioprodukciju. Hiperakumulatorske vrste biljaka su često izolovane sa prirodnih područja koja su već imala povišene koncentracije teških metala. Koncentracije teških metala u biljkama za neke metale kreću se u nivoima do 10 000 mg kg⁻¹ suve biljne mase Zn i Mn, do 1000 mg kg⁻¹ Co, Cu, Ni, As i Se i do 100 mg kg⁻¹ Cd. Utvrđeno je preko 400 biljnih hiperakumulatorskih vrsta (zeljaste forme), te se procenjuje da do 0,2% cvetnica čine hiperakumulatori (McGrath i Zhao, 2003). Ove vrste akumuliraju čitav niz metala – As, Co, Cu, Mn, Ni, Pb, Se i Zn (Baker i sar., 2000; LQ i sar., 2001). Metali se akumuliraju u koncentraciji 0,1-1% suve biljne mase, čak i kada koncentracija specifičnih metala u podlozi nije značajno povišena. Hiperakumulatori imaju visoku sposobnost translokacije teških metala iz korena u nadzemni deo biljke. Karakterišu se značajno povećanom tolerancijom (tzv. hipertolerancijom) na prisustvo teških metala u korenskom okruženju i u samoj ćeliji, što ukazuje na specifične, snažno razvijene mehanizme detoksifikacije (Prasad i Freitas, 2003; Alkorta i sar., 2004).

Uprkos potvrđenoj sposobnosti hiperakumulacije, većina ovih biljnih vrsta se ne koristi u fitoekstrakciji, jer uglavnom imaju spor rast i slab prirast biomase. Ukupna količina teških metala koja se iznese iz zemljišta je suviše mala da bi primena ovakvih biljaka bila optimalna. Množenjem količine akumuliranog metala u biljci (g metala po kg biljnog tkiva) sa stopom organskog prirasta (kg biljnog tkiva po hektaru godišnje), dobija se količina teškog metala koju je moguće ekstrahovati sa nekog područja za godinu dana. Po nekim procenama, ova količina treba da dostigne nekoliko stotina, čak 1000 kg metala po hektaru godišnje, da bi

fitoekstrakcija bila isplativa, ali čak i tad, njena primena traje 15-20 godina, u zavisnosti od količine i dubine zagađenja (Prasad, 2002). Tipičan primer ovakve vrste je *Thlaspi caerulescens*, poznat hiperakumulator Zn i Cd. Po jednom hektaru ova vrsta ima relativno mali prirast od 2-5 tona (McGrath i sar., 2002). Ipak, postoje izuzeci. Hiperakumulator Ni, *Alyssum bertolonii* je više puta uspešno korišćena za remedijaciju zemljišta zagađenog Ni sa produkcijom od 9-22 tone po hektaru (Chaney i sar., 2003). Paprat *Pteris vittata* pokazala je veliki potencijal u akumulaciji As. Za 20 nedelja, ova paprat gajena na zemljištu zagađenom sa 98 mg As po kg zemlje, uklonila je 26% As iz podloge, sa akumulacijom i do 22 000 mg kg⁻¹ As (LQ i sar., 2001). Long i sar. (2002) ukazuju na veliki potencijal vrste *Sedum alfredii*, hiperakumulatora Zn. Ova biljka ima veliku bioprodukciju, a otkrivena je na drevnim napuštenim površinskim kopovima rude Zn i Pb istočne Kine, što ukazuje da je selekcija mehanizama tolerancije na teške metale trajala tokom dužeg vremenskog perioda.



Slika 5. *Alyssum bertolonii* – uspešno primenjena kao hiperakumulator i fitoekstraktor Ni

Nažalost, mali broj prirodnih hiperakumulatora je primenjen i testiran u poljskim uslovima. Takođe, za većinu hiperakumulatorskih vrsta, faktor biokoncentracije teških metala je zadovoljavajući samo na zemljištima zagađenim umerenom koncentracijom teških metala, dok se sa povećanjem sadržaja metala u podlozi faktor biokoncentracije značajno smanjuje (McGrath i sar. 2002). Važno je napomenuti da većina istraživača ukazuje na velika variranja potencijala fitoekstrakcije određene vrste u zavisnosti od populacije, odnosno genotipa. Specifičnost genotipa ukazuje na selekciju genski kodiranih mehanizama tolerancije na teške metale, na subspecijskom, populacionom nivou.

2.8.2.2. Fitoremedijacija i biljke visoke organske produkcije

Alternativa hiperakumulatorskim vrstama u fitoekstrakciji su neakumulatorske vrste velike organske produkcije. Među biljke takvih karakteristika spadaju drvenaste vrste. Kada je u pitanju potencijal drvenastih vrsta u fitoremedijaciji, u literaturi se pojavljuje termin „dendroremedijacija“ (Komives i Gullner, 2006). Međutim, dug period generacije drveća onemogućava brzu selekciju vrsta i genotipova drveća tolerantnih na teške metale. Stoga, drveće generalno nije adaptirano na povišene koncentracije teških metala u podlozi, sa vrlo malim brojem metal-tolerantnih ekotipova (Dickinson i sar., 1991; Kahle, 1993). Karakteristična crta metalima zagađenih staništa u Evropi je odsustvo drvenastih vrsta (Turner, 1994). Međutim, utvrđeno je da mnoge vrste drveća mogu da prežive u uslovima povišenih koncentracija teških metala uz očuvanu metaboličku stabilnost. Akumuliranje teških metala u korenu i niska translokacija metala u nadzemne delove biljke je osnovni uzrok preživljavanja drveća na staništu sa koncentrovanim teškim metalima. Na ovaj način fotosintetički aparat je zaštićen od toksičnog dejstva teških metala, jer „izbegava“ stres. Smatra se da je veliki genom drvenastih vrsta uslovio njihovu veliku fakultativnu, fenotipsku toleranciju na razne nepovoljne uslove u zemljištu, pa i na teške metale. Na ovaj način drvenaste vrste koje nisu u procesu genetičke selekcije stekle toleranciju na teške metale (nemaju konstitutivnu toleranciju poput hiperakumulatorskih vrsta), velikom fenotipskom varijabilnošću koju su razvile tokom evolucije, uspevaju da se izbore sa nepovoljnim uticajem kao što je prisustvo teških

metala u životnoj sredini (Pulford i Watson, 2003). Genetička predispozicija postoji, ali je utvrđeno da je fakultativna tolerancija na teške metale u drvenastim vrstama dominantna. Ona podrazumeva strategiju izbegavanja toksičnosti, čime se otklanja selektivni pritisak koji bi doveo do direktne genetičke selekcije tolerancije (Watmough i Dickinson, 1995). Tipičan primer je rast korena u zagađenoj zemlji, pri čemu koren „traži“ manje zagađena mesta u zemlji i „izbegava“ zagađenje (Pulford i Watson, 2003). U tom smislu utvrđeno je da se adaptacija drveća na stres izazvan teškim metalima povećava aklimatizacijom, linearnim postepenim povećavanjem nivoa polutanta (Punshon i Dickinson, 1997), čime se stimuliše fenotipska plastičnost tj. fakultativna tolerancija. U većem broju istraživanja utvrđen je značaj i specifičnost genotipa u ispoljavanju takve tolerancije (Landberg i Greger, 1994). U poređenju sa hiperakumulatorima, među drvenastim vrstama mnogo je češće da su razlike u toleranciji i fitoekstrakciji teških metala među klonovima (genotipovima) iste vrste, veće nego razlike između različitih vrsta. Stoga su mehanizmi tolerancije drvenastih vrsta na povišene koncentracije teških metala, različiti od onih prisutnih u hiperakumulatorskim vrstama.

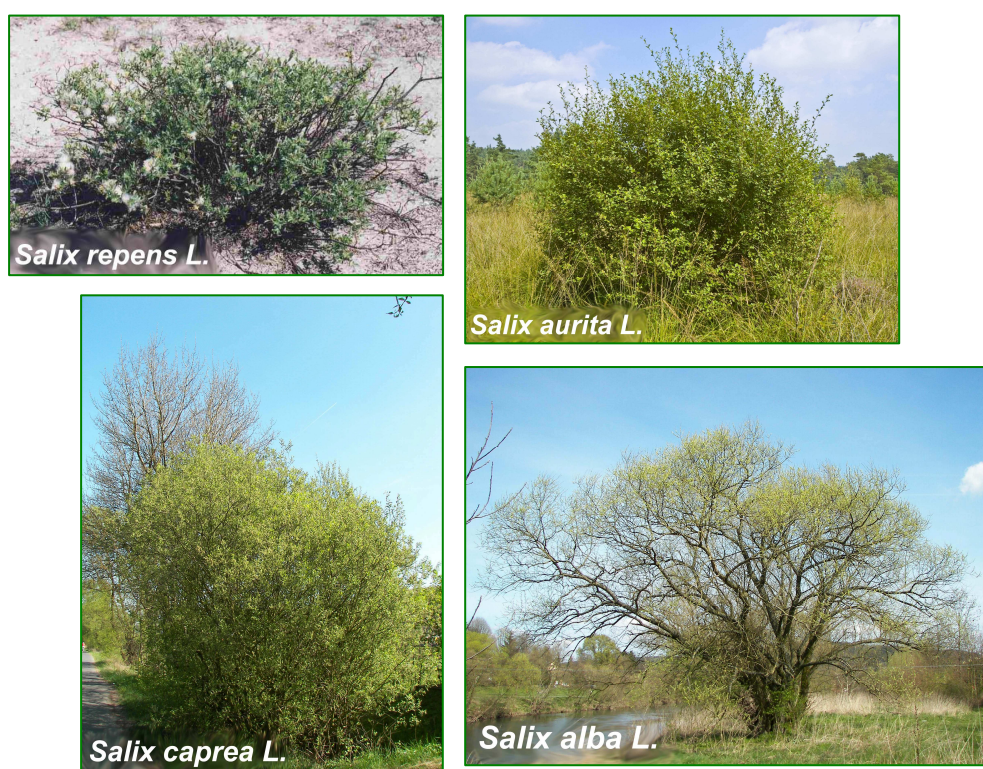
Uprkos niskim stopama akumulacije teških metala u nadzemnim delovima, drveće velike organske produkcije i brzog rasta u mnogim slučajevima u stanju je da iznese veće količine teških metala iz podloge u odnosu na hiperakumulatorske vrste. Za potrebe fitoekstrakcije poželjne su sledeće karakteristike drvenaste vrste (Punshon i sar. 1996; Dickinson 2000):

- sposobnost rasta na zemljištu sa sniženim nivoima esencijalnih elemenata
- ekstenzivan korenov sistem velike površine
- brza stopa rasta
- tolerancija na teške metale
- adaptiranost na lokalne klimatske uslove
- kompeticija sa korovskim vrstama

Veći broj drvenastih vrsta je istraživan ili korišćen u fitoremedijaciji: vrbe (*Salix*), topole (*Populus*), breze (*Betula*), jove (*Alnus*) i javori (*Acer*). Mada su svi nabrojani rodovi istraživani, za potrebe fitoremedijacije najveća pažnja je data brzorastućim vrstama, među kojima posebno mesto zauzimaju vrbe.

2.9. Vrbe (*Salix spp.*) u fitoekstrakciji

Rod *Salix* (vrbe) spada u familiju *Salicaceae*. Utvrđeno je preko 400 vrsta vrba sa preko 200 hibrida (Newsholme, 1992). Većina vrsta vrba živi u nizijskim vlažnim staništima. Veliki broj varijeteta i hibrida, koji se razvio tokom evolucije ukazuje na značajnu genetičku varijabilnost ovog roda. Vrbe su razvile različite tipove rasta (Slika 6), od puzećih formi (*Salix repens*), malih grmova (*Salix aurita*), žbunastih i šibastih (*Salix caprea*, *Salix cinerea*) do manjeg broja stablastih formi (*Salix alba*).



Slika 6. Različite forme rasta u rodu *Salix*^{1,2,3,4}

Većina vrsta ima sposobnost formiranja vazdušnih korenova iz delova stabla i grana, sa velikim potencijalom vegetativnog rasađivanja (Sommerville, 1992). Imaju visoku organsku produktivnost, i invazivnu strategiju preživljavanja. Korenovi se razvijaju brzo i ekstenzivno. Brzo širenje korenova u kombinaciji sa velikim intenzitetima transpiracije su odlične karakteristike jedne fitoekstraktorske vrste, usled velike kontaktne zone korena sa podlogom i rastvorenim materijama u njoj. Još jedna dobra karakteristika vrba je da se izbojci iz razvijenog korena razvijaju

brzo i relativno često se mogu kositi. Prinos po hektaru za neke vrste iznosi do 15 tona suve biljne mase godišnje (Riddell-Black, 1993). Među najbolje proučene vrste u fitoekstrakciji spada vrsta *Salix viminalis* žbunaste forme rasta sa dokazanim potencijalom u remedijaciji (Pulford i Watson, 2003). Predispozicije vrba u fitoekstrakciji veoma zavise od genotipa. Pored vrba koje su tolerantne na teške metale u kombinaciji sa zadovoljavajućom translokacijom u nadzemne delove, određeni broj genotipova je osetljiv na teške metale (Lux et al., 2004). Zbog toga je izbor pravog genotipa od presudnog značaja u fitoekstrakciji vrbama.

Brojnim istraživanjima, potvrđeno je da su vrbe biljke sa velikim potencijalom u fitoekstrakciji teških metala, naročito Cd (Dickinson i Pulford, 2005). Značajan broj vrsta iz roda *Salix* je zadovoljio kriterijume fitoekstrakcije (Landberg i Greger, 1994; Punshon i Dickinson, 1999; Hammer i sar. 2003; Pulford i sar., 2002; Kuzovkina i sar., 2004; Dos Santos Utmazian i sar., 2007).

Nakon fitoekstrakcije, nastala biomasa vrba se može dalje koristiti u nizu delatnosti: kao gorivo za sagorevanje u vidu sečke, piljevine ili presovanih briketa, za proizvodnju papira, kartona, pirolizovanog uglja, viskoze u tekstilnoj industriji, za pletenje korparskih proizvoda, proizvodnju etanola i prehrambene dodatke za stoku (McElroy i Dawson, 1986). Primena vrba kao goriva za sagorevanje dozvoljava i mogućnost „fitorudarstva“, recikliranja akumuliranih teških metala putem filtriranja dima i pravilnog rukovanja i prerade pepela zaostalog nakon sagorevanja (Perttu i Kowalik, 1997; Dahl, 2000). U Švedskoj, vrste iz roda *Salix* gaje se već decenijama u komercijalne svrhe na poljoprivrednom zemljištu, u cilju proizvodnje biomase kao goriva za gradske toplane. Oko 15 000 ha u Švedskoj pokriveno je tzv. „energetskom šumom“, koju u većini čine zasadi vrba (Statistics Sweden, 2001). Jedan zasad vrba traje i do 25 godina, sa čestim košenjem. Nakon tog perioda, zasad se uklanja i zemljište oslobađa za novi zasad ili druge svrhe. Smatra se da je potrebno 8 tona suve materije po hektaru godišnje, da bi gajenje vrba bilo ekonomski isplativo u smislu produkcije biomase (Rosenqvist, 1997). Spaljivanjem u toplanama, Cd ostaje u pepelu. Predloženo je da se vrši separacija pepela, pri čemu se teži deo pepela bez Cd može ponovo vratiti u zasad kao đubrivo, a lakši deo (najveći deo pepela), može se deponovati ili reciklirati u cilju dobijanja koncentrovanog Cd za druge primene (Klang-Westin i Eriksson, 2003).

Važna karakteristika vrba, kao drvenastih vrsta, je veliki značaj genotipske specifičnosti u potencijalu koji imaju u fitoekstrakciji teških metala. Genotipska

specifičnost je potvrđena u čitavom nizu istraživanja. Landberg i Greger (1994) su testirali akumulaciju Cd i Zn u nizu klonova u vodenim rastvorima. Neki klonovi su bili tolerantni na oba metala, neki samo na jedan. Transport metala u nadzemni deo varirao je od 1% do 70%. Greger (1999) je između 70 genotipova vrba istraživao kapacitet akumulacije Cd i utvrdio razlike i do 43 puta. Punshon i Dickinson (1999) su ispitivali otpornost vrba na tretman Zn, Cd, Cu i Ni u vodenim kulturama. Tolerancija je bila u većoj meri korelisana sa genotipom ili hibridima nego sa vrstom kao taksonomskom kategorijom. Većina istraživača naglašava da je izbor specifičnih genotipova potreban za svaki pojedinačan slučaj zagađenja teškim metalima.

Dužina fitoekstrakcije vrbama veoma zavisi od karakteristika biljke fitoekstraktora, ali i od karakteristika staništa. Na staništima koja nemaju drugu namenu, moguće je koristiti vrbe koje nemaju izraženu sposobnost akumulacije, pa se remedijacija celog staništa do prihvatljivih koncentracija polutanta u zemljištu, izvodi i do nekoliko decenija. Na ovaj način izbegava se opasnost od unošenja teških metala u lance ishrane, jer je njihova koncentracija „razblažena“ u tkivu vrba. Za staništa koja zahtevaju kraći vremenski period remedijacije, potrebno je izvršiti izbor genotipova vrba koje imaju veću sposobnost akumulacije teških metala. Nekoliko istraživanja je potvrdilo da je potencijal vrba u fitoekstrakciji Cd izuzetan (Pulford i Watson, 2003). Zacchini i sar. (2009) su testirali šest klonova vrba na povišenim koncentracijama Cd u hidroponima, i klasifikovali ih kao visoko tolerantne, po klasifikaciji koju su postavili Lux i sar. (2004). U ovom istraživanju, genotipovi topola su klasifikovani kao srednje tolerantni. Kako su dosada potvrđena samo dva hiperakumulatora Cd (*Thlaspi caerulescens* - sa nedovoljnom produkcijom mase i *Arabidopsis halleri* - sa izuzetno malom bioprodukcijom), eksploatacija vrba u remedijaciji staništa zagađenih Cd ima veliki potencijal.

3. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja je ispitivanje potencijala četiri genotipa vrba u fitoekstrakciji Cd, Ni i Pb. Da bi se pravilno procenile predispozicije odabranih genotipova u prečišćavanju zagađenih prirodnih staništa, potrebno je utvrditi uticaj pojedinačnih i kombinovanih koncentracija Cd, Ni i Pb-EDTA u vodenim rastvorima, na niz morfoloških i fizioloških parametara kao što su:

- morfološki parametri: masa i zapremina korena, masa i visina izbojka, masa i površina listova
- intenzitet transpiracije kao pokazatelj stabilnosti vodnog režima
- intenziteti disanja i fotosinteze
- sadžaj pigmenata hloroplasta i fluorescencija hlorofila
- sadržaj N, P, K i nitrata
- stepen akumulacije Cd, Ni i Pb u svim delovima biljaka
- aktivnost enzima nitrat reduktaze
- sadržaj akumuliranog slobodnog prolina kao vid adaptacije na stres.

Rezultati svih navedenih analiza treba da daju dragocene informacije o karakteristikama ispitanih klonova i omoguće pravilnu procenu njihove primene u fitoekstrakciji. Poželjno bi bilo da se što veće koncentracije teških metala akumuliraju u izbojku i listovima, uz održanje optimalne organske produkcije. U ispitivanju će se koristiti dva genotipa autohtone vrste *Salix alba* i dva genotipa alohtonih vrsta *Salix nigra* i *Salix matsudana*, o kojima u dostupnoj stručnoj literaturi za sada nema objavljenih rezultata sličnih analiza. Očekuje se da se statističkim ispoljavanjem specifičnosti genotipova izvede naučno utemeljena selekcija najefikasnijeg ekstraktora ispitivanih teških metala. Rezultati analize navedenih parametara trebalo bi da omoguće detaljnije definisanje ustanovljenih procesa u metabolizmu teških metala.

4. Materijal i metode

4.1. Biljni materijal

Istraživanje se odvijalo u dva odvojena ogleda. U prvoj godini istraživanja (2006.) u eksperimentu su korišćena četiri klona vrba:

1. *Salix alba* – klon 68/53/1 (Slika 7)
2. *Salix alba* – klon 106/54/0 (Slika 8)
3. *Salix matsudana* – klon SM 4041 (Slika 9)
4. *Salix nigra* – klon 0408 (Slika 10)

Analizom rezultata dobijenih u 2006. godini, izvršena je selekcija genotipova na osnovu njihovog potencijala u fitoekstrakciji. U drugoj godini istraživanja (2007.) u drugom eksperimentu su korišćena dva klona: klon 1 i klon 4.



Slika 7. *Salix alba* – klon 68/53/1



Slika 8. *Salix alba* – klon 106/54/0



Slika 9. *Salix matsudana* – klon SM
4041



Slika 10. *Salix nigra* – klon 0408

Klonovi su dobijeni kao rezultat selekcije genotipova u Institutu za nizijsko šumarstvo i životnu sredinu u Novom Sadu.

Reznice stabla vrba su uzete u periodu mirovanja vegetacije, povezane u snopove i čuvane u hladnjači. Neposredno pre upotrebe, reznice su dezinfikovane potapanjem u 2% rastvor bakar-sulfata u trajanju od 15 minuta. Prilikom pravljenja reznica vodilo se računa da sve budu približno ujednačene debljine i dužine, imajući u vidu značaj njihovih dimenzija za rast i razviće biljaka.

4.2. Eksperiment – osnovni principi

Vrbe su gajene u polukontrolisanim uslovima (u staklari), u hranljivim rastvorima, metodom vodenih kultura. Hranljivi rastvori, pripremljeni po recepturi Hoagland-a (Hoagland i Arnon, 1950) kontinuirano su aerisani pomoću vazdušnih pumpi. Po 18 reznica stavljeno je u plastične posude zapremine 40 litara. Reznice

klonova (15-20 cm dužine) su u početnom periodu od 30 dana gajene u dejonizovanoj vodi dok se nije razvio korenov sistem. Rastvori su menjani svake dve nedelje.

4.2.1. Prvi eksperiment

Ogled je postavljen 20. 04. 2006. Biljke sva četiri klona ožiljavane su u čistoj dejonizovanoj vodi. Na svakoj reznici izvršeno je uklanjanje viška izbojaka, pri čemu je ostavljen samo jedan izbojak po reznici. Nakon 30 dana započet je tretman biljaka rastvorima tri teška metala (Cd, Ni, Pb-EDTA) u dve različite koncentracije. Svaki tretman izvršen je na 36 reznica, raspoređenih u dve posude od po 40 litara. Kontrolne biljke gajene su u potpunom hranljivom rastvoru. U cilju što optimalnijeg usvajanja metala, pH vrednost rastvora održavana je u dijapazonu od 5 do 5,5. Soli teških metala korišćene za njihovo rastvaranje, odnosno koncentracije primenjenih tretmana, date su u tabeli 1.

Kako se Pb u zemljištu nalazi vezano za druge mineralne elemente i komponente organskih materija, ono je nedostupno biljkama jer je u nerastvornoj ili teško rastvornoj formi (Larbi i sar., 2002). U cilju povećanja količine dostupne frakcije olova, česta je primena sintetičkih helatirajućih supstanci. Da bi se izbeglo taloženje sa drugim solima iz hranljivog rastvora, i povećalo usvajanje i transport Pb u biljci, u ovom istraživanju, Pb je dodato u obliku kompleksa sa EDTA.

Tabela 1. Soli teških metala i njihove koncentracije korišćene u prvom eksperimentu

Tretman	Soli teških metala	Koncentracije teških metala	Koncentracija hranljivog rastvora po Hoagland-u
Cd	CdCl ₂ ·H ₂ O	10 ⁻⁴ mol/l, 10 ⁻⁵ mol/l	100%
Ni	NiSO ₄ ·6 H ₂ O	10 ⁻⁴ mol/l, 10 ⁻⁵ mol/l	100%
Pb	Pb-EDTA	10 ⁻⁴ mol/l, 10 ⁻⁵ mol/l	100%
Kontrola	-	-	100%

Ukupan tretman Cd i Ni trajao je 70 dana, a Pb 95 dana. Tretman Cd i Ni je prekinut ranije jer su toksični simptomi na većoj primenjenoj koncentraciji (10⁻⁴ M) ugrozili opstanak biljaka.

4.2.2. Drugi eksperiment

Ogled je postavljen 18.04.2007. Na osnovu rezultata prvog eksperimenta dobijenih 2006. godine, izvršena je selekcija genotipova, te su za dalju analizu izdvojena dva klona:

1. *Salix alba* – klon 68/53/1 (Slika 7)
4. *Salix nigra* – klon 0408 (Slika 10)

Uklanjanje izbojaka je izvršeno tako da je na svakoj reznici ostavljeno po dva gornja izbojka. Nakon 17 dana ožiljavanja na čistoj dejonizovanoj vodi, biljke su 05.05.2007. tretirane sa 1/8 koncentracije hranljivog rastvora po Hoagland-u. Nakon 35 dana od početka ogleda, 23.05. i 24. 05. započet je tretman biljaka sa tri teška metala (Cd, Ni i Pb) kako pojedinačno, tako i u svim međusobnim kombinacijama u hranljivom rastvoru. Svaki tretman izvršen je na 36 reznica, raspoređenih u dve kadice od po 40 litara. Spisak primenjenih tretmana, hemikalija i koncentracija dat je u tabeli 2.

Tabela 2. Soli teških metala i njihove koncentracije korišćene u drugom eksperimentu

Tretman	Soli teških metala	Koncentracije teških metala	Koncentracija hranljivog rastvora po Hoagland-u
Cd	$\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10^{-4} mol/l, 10^{-5} mol/l	25%
Ni	$\text{NiSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	10^{-4} mol/l, 10^{-5} mol/l	25%
Pb	Pb-EDTA	10^{-4} mol/l, 10^{-5} mol/l	25%
Cd + Ni	$\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ i $\text{NiSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	10^{-4} mol/l, 10^{-5} mol/l	25%
Cd + Pb	$\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ i Pb-EDTA	10^{-4} mol/l, 10^{-5} mol/l	25%
Ni + Pb	$\text{NiSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ i Pb-EDTA	10^{-4} mol/l, 10^{-5} mol/l	25%
Cd + Ni + Pb	$\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{NiSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ i Pb-EDTA	10^{-4} mol/l, 10^{-5} mol/l	25%
Kontrola	-	-	25%

Soli teških metala rastvarane su u 25% rastvoru po Hoagland-u, dok je pH rastvora održavan u rasponu od 4,5 do 5,0. Smanjivanje koncentracije hranljivog rastvora bilo je neophodno jer u 100% Hoagland-ovom rastvoru, kombinacije Pb-EDTA sa CdCl_2 ili sa NiSO_4 (koncentracija 10^{-4} M), dovode do taloženja nerastvornih oblika metala, čime su oni biološki nedostupni za biljke. Stvara se belo zamućenje koje verovatno potiče od stvaranja hidroksida olova - $\text{Pb}(\text{OH})_2$ ili stvaranja Pb-fosfata (Kopittke i sar., 2008). Talog se stvara čim pH vrednost pređe prag od 4,5-5,0, dok u jako kiseloj sredini nije zapažen (pH=2,5-4,0). Stoga, su i kontrolne grupe reznica takođe gajene u 25% rastvoru po Hoagland-u, u cilju ujednačavanja eksperimentalnih uslova kontrole i tretmana.

4.3. Fiziološke analize

4.3.1. Parametri bioprodukcije

Od parametara rastenja mereni su sledeći pokazatelji:

a) Širina izbojka d (mm) izmerena je na nivou prvog (najdonjeg) lisnog ožiljka koji je u većini slučajeva oko 1 cm od gornje površine posude.

b) Visina biljaka h (cm) merena od reznice do vrha apikalnog meristema.

c) Biomasa biljaka (g) u svežem stanju, izražena je i kao masa pojedinih delova biljke: masa listova (prosečna masa jednog lista i prosečna masa svih listova po biljci), masa izbojka, masa korena.

d) Lisna površina (LA) izražena u cm^2 kao prosečna površina jednog lista i prosečna površina svih listova po biljci

e) zapremina korena izražena u cm^3

4.3.2. Sadržaj suve materije

Koncentracije nitrata, pigmenata, intenziteta disanja i fotosinteze izražene su u odnosu na suhu biljnu masu. Određivanje sadržaja suve materije je izvršeno sušenjem pomoću aparata Sartorius Moisture Analyzer (model MA 30).

4.3.3. Intenzitet transpiracije

Merenje intenziteta transpiracije izvršeno je postavljanjem celih biljaka u erlen-majer sudove, pri čemu je isparavanje vode sa slobodne površine sprečeno dodavanjem parafinskog ulja na površinu rastvora (Slika 11). Merene su promene mase sudova sa biljkama tri puta u toku dana (7h, 13h i 19h). Merenja su vršena u kontinuitetu tokom tri dana, u tri ponavljanja po tretmanu. Nakon završenih merenja određene su lisne površine korišćenih biljaka, primenom fotoelektričnog merača (LI-COR, LI-3000C). Intenzitet transpiracije je izražen u $\text{g H}_2\text{O}\cdot\text{dm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$.



Slika 11. Određivanje intenziteta transpiracije

4.3.4. Fotosinteza i disanje

Intenziteti fotosinteze i disanja određeni su kao brzine respiratornog usvajanja, odnosno fotosintetičkog odavanja kiseonika, polarografski, korišćenjem Clark-ove membranske elektrode (model Hansatech, DW1) merenjem količine kiseonika u rastvoru reakcione komore (Walker, 1987; Marjanović i Krstić, 1998). Kao indikatorska elektroda korišćena je platinska katoda odvojena od reakcionog rastvora polupropustljivom teflonskom membranom koja od mogućih depolarizatora propušta isključivo kiseonik. Redukcijom kiseonika na katodi oslobađa se odgovarajuća količina anjona koji omogućavaju proticanje struje proporcionalne jačine. Kao referentna elektroda korišćena je Ag/AgCl elektroda. Strujno kolo je zatvoreno preko KCl mosta. Za potrebe kalibracije korišćeni su rastvori $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ i destilovane vode. Potupak kalibracije elektrodnog sistema je ponavlján na svakih 20 izmerenih uzoraka. Isečci od 0,08 g svežeg listnog materijala su suspendovani u 50 mM HEPES rastvoru (N-2-hidroksietilpiperazin-N-2 etansulfonska kiselina) koji održava pH (7,6-7,8) i osmotsku vrednost na optimumu. Kao izvor CO_2 u reakcionu komoru je dodat rastvor 1 mM NaHCO_3 . Reakciona komora je hermetički zatvorena, temperatura je održavana na 25°C, a homogena razmena gasova održavana je kontinuiranim mešanjem rastvora. Tokom merenja fotosinteze, reakciona komora je osvetljena zasićujućim belim svetlom ($1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}$), dok je komora zamračena tokom merenja disanja. Intenziteti fotosinteze i disanja izraženi su u $\mu\text{mol izdvojenog/usvojenog O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Koncentracija fotosintetičkih pigmenata (hlorofil *a*, hlorofil *b*, karotenoidi) određena je metodom Wettstein-a (1957). Koncentracije su izražene u mg g^{-1} suve biljne materije.

Fluorescencija hlorofila *a* je merena pomoću PSM fluorimetra (model Biomonitor AB) na centralnom delu intaktnih listova (Öquist i Wass, 1988; Pajević, 1996). Nakon 30 minuta držanja listova u zamračenim komoricama, listovi su osvetljeni pobuđujućim svetlom (spektar od 330-660 nm sa pikom na 500 nm), pri čemu je izmerena kinetika inicijalne fluorescencije. Rezultati su izraženi kao odnos između varijabilne i maksimalne vrednosti fluorescencije (F_v/F_m).

4.3.5. Koncentracija N, P, K i teških metala

Biljni materijal je osušen i samleven. Odstranjivanje organske materije je izvršeno dejstvom visokih temperatura (suvim putem) osim u slučaju određivanja N. Od mineralizovanog biljnog materijala napravljeni su matični rastvori po metodi preuzetoj iz Sarić i sar. (1990). Matični rastvori su korišćeni za određivanje P, K i teških metala. Sadržaj fosfora određen je spektrofotometrijski primenom amonijum-vanadat-molibdat metode (Gericke i Kurmies, 1952). Koncentracija K određen je direktno iz matičnog rastvora pomoću plamene fotometrije, a koncentracija Cd, Ni i Pb atomskom apsorpcionom spektrofotometrijom. Nakon razaranja organske materije u biljnim uzorcima mokrim putem (dejstvom sumporne kiseline), koncentracija N utvrđena je metodom Kjeldahl-a (Kjeldahl, 1883; Nelson i Sommers, 1973).

4.3.6. Koncentracija nitrata

Koncentracija nitrata određena je po metodi preuzetoj iz Sarić i sar. (1990) i Maksimović i Pajević (2002). Odmereno je po 0,5 g suvog, samlevenog biljnog materijala. Uzorci su mučkani u 20 ml dejonizovane vode na orbitalnoj mučkalici 10 minuta, a nakon toga profiltrirani i pipetom preneti (5 ml) u staklene čaše. Mineralizovanje biljnog materijala je izvršeno u peščanom kupatilu na 120 °C uz povremeno dodavanje 3ml H₂O₂ do formiranja belog suvog pepela na dnu posuda. Nakon hlađenja, čaše su zagrevane 10 minuta uz dodatak 2 ml fenol di-sulfonske kiseline. Nakon toga, rastvoreni pepeo je kvantitativno prenet ispiranjem sa 20 ml dejonizovane vode u normalne sudove od 50 ml. U sudove je dodato još 20 ml 50% NH₄OH, nakon čega su dopunjeni dejonizovanom vodom. Nakon 30 minuta čitana je apsorbanca dobijenog ekstrakta pomoću UV-VIS spektrofotometra (model DU-65, Beckman) na 420 nm. Sadržaj nitrata je izračunat i izražen u $\mu\text{g NO}_3^- \cdot \text{g}^{-1}$ suve biljne mase.

4.3.7. Aktivnost nitrat reduktaze

Aktivnost nitrat reduktaze određena je *in vivo* metodom koju su opisali Hageman i Reed (1980). Svež biljni materijal je isitnjen, a zatim je po 200 mg isečaka listova i korena dodato u epruvetu u kojoj je bilo 5 ml inkubacionog rastvora 0,25 mol/L KH_2PO_4 (pH = 7,4). Svaka epruveta je mučkana po 15 sekundi da bi se isečci homogeno izmešali u puferu. Epruvete su inkubirane 75 minuta na 36°C u vodenom kupatilu (oko 15 minuta je potrebno da se temperatura uzorka u epruveti izjednači sa temperaturom inkubacije). Odmah nakon inkubacije 0,8 ml uzorka je dodato u epruvetu u kojoj je bilo 0,6 ml 0,1% N-(1-naftil)-etilendiaminhlorida, 0,6 ml 1% sulfanilamida u 1,5 mol/L HCl i 2 ml dejonizovane vode. Rastvori su ostavljeni 30 minuta na sobnoj temperaturi da bi se razvila boja. Apsorbanca je očitana na UV-VIS spektrofotometru (model DU-65, Beckman) na talasnoj dužini od 540 nm. Aktivnost enzima je izražena kao $\mu\text{M NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

4.3.8. Koncentracija slobodnog prolina

Sadržaj slobodnog prolina je određen po metodi koju su opisali Bates i sar. (1973). Isitnjen 1g svežeg biljnog materijala je suspendovan u 10 ml 3% sulfosalicilne kiseline, čime je izvršeno aloženje proteina. Odstranjivanje proteina i ostataka ćelije je vršeno centrifugiranjem (10 minuta na 3000 o min^{-1}). Po 2 ml bistrog rastvora prolina iz supernatanta je izmešano sa 2 ml CH_3COOH i 2 ml ninhidrinskog reaktanta. Rastvori su inkubirani 15 minuta na 100°C. Zatim je izvršeno hlađenje rastvora, a formirani bojeni kompleks ninhidrina i prolina je ekstrahovan dodavanjem 4 ml toluola. Apsorbanca toluolskog ekstrakta prolina očitana je na UV-VIS spektrofotometru (model DU-65, Beckman) na talasnoj dužini 520 nm. Koncentracija slobodnog prolina je izražena u $\mu\text{g g}^{-1}$ sveže biljne mase.

4.4. Statistička obrada podataka

Dobijeni podaci obrađeni su pomoću Microsoft Excel-a i MSTATC softvera. Statistička obrada rezultata obuhvatala je nekoliko koraka. Svi parametri mereni su u većem broju nezavisnih ponavljanja za svaki pojedinačni tretman. Dobijeni podaci su obrađeni metodom analize varijanse (ANOVA) faktorijalnog ogleda. Upoređivanje tretmana, dvofaktorijalnom analizom tj. poređenje srednjih vrednosti ispitivanih parametara (genotip, tretman) izvršeno je putem Dankanovog testa (Duncan's multiple range test), za nivo značajnosti $p < 0.05$. Rezultati su prikazani tabelarno i grafički. U opisu svake tabele, odnosno grafika, za svaki analizirani parametar data je najmanja zajednička razlika (NZR). Vrednosti za svaki tretman koje su u tabelama označene istim slovom ne razlikuju se značajno za pomenuti nivo značajnosti. Najveća vrednost označena je slovom „a“, zatim vrednosti opadaju po abecednom nizu.

Praćena je učestalost statistički značajnih odstupanja vrednosti određenih parametara značajnih za fitoekstrakciju u odnosu na svaki genotip: masa korena, zapremina korena, masa izbojka, visina biljke, masa i površina listova, intenzitet transpiracije, disanja i fotosinteze i akumulacija metala u nadzemnom delu biljke.

Svakom genotipu dodeljena su tri „karaktera“:

„a“ – vrednost parametra za dati genotip je statistički veća od kontrole ili veća od vrednosti drugih genotipova

„b“ – vrednost parametra za dati genotip je statistički jednaka sa kontrolom

„c“ – vrednost parametra za dati genotip je statistički manja od kontrole

Na osnovu učestalosti dodeljenih karaktera izvršena je klaster analiza, korišćenjem programskog paketa STATISTICA 8. Genotipovi su grupisani u grupe (klasterne) na osnovu statističke bliskosti potencijala u fitoekstrakciji.

5. Rezultati istraživanja

5.1. Rast biljaka i produkcija biomase u prisustvu teških metala

Homogena hloroza mladih listova je uočena na svim biljkama tretiranim većom koncentracijom Cd od 10^{-4} M (Slika 12). Na tretmanu od 10^{-5} M Cd, hloroza nije bila toliko česta (na manje od 50% mladih listova biljaka).



Slika 12. Hloroza mladih gornjih listova na tretmanu 10^{-4} M Cd – klon 1



Slika 13. Hloroza i nekrotične mrlje na listovima na tretmanu 10^{-4} M Ni -klon 1

Hlorotični listovi su takođe uočeni na svim biljkama tretiranim koncentracijom Ni od 10^{-4} M, na starim i na mladim listovima (Slika 13). Za razliku od Cd, hloroza je u početnom stadijumu bila interkostalnog tipa, sa kasnijim prelaskom u potpunu homogenu hlorozu lisne ploče (Slika 14). Takođe je utvrđena nekroza listova, koja je u početnom stadijumu bila vidljiva u tačkastoj formi na adaksijalnoj strani lista, najčešće na marginama lisne ploče. Početna tačkasta nekroza se kasnije razvila u jasne, šire mrlje nekrotičnog tkiva. Na nižoj koncentraciji Ni od 10^{-5} M, simptomi su bili vidljivi sporadično.



Slika 14. Početna interkostalna hloroza pod uticajem Ni – klon 2

Na tretmanu Pb-EDTA nije bilo vidljivih negativnih simptoma na tretiranim biljkama (Slika 15).



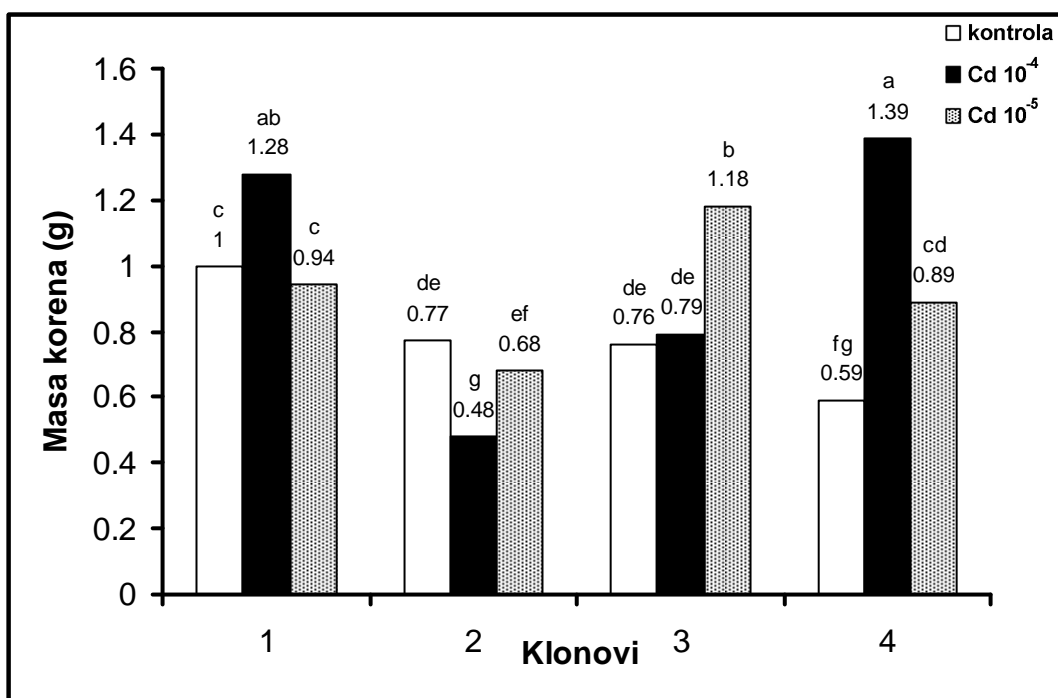
Slika 15. Biljke na tretmanu Pb-EDTA bile su bez vidljivih negativnih simptoma – klon 4

Opisani simptomi toksičnosti su se javljali i u kombinovanim rastvorima teških metala, u zavisnosti od prisustva Cd odnosno Ni u rastvoru. Najjača izraženost

simptoma uočena je na biljkama gajenim u rastvorima u kojima su se Cd i Ni nalazili zajedno u koncentraciji od 10^{-4} M (tretman Cd+Ni i tretman Cd+Ni+Pb).

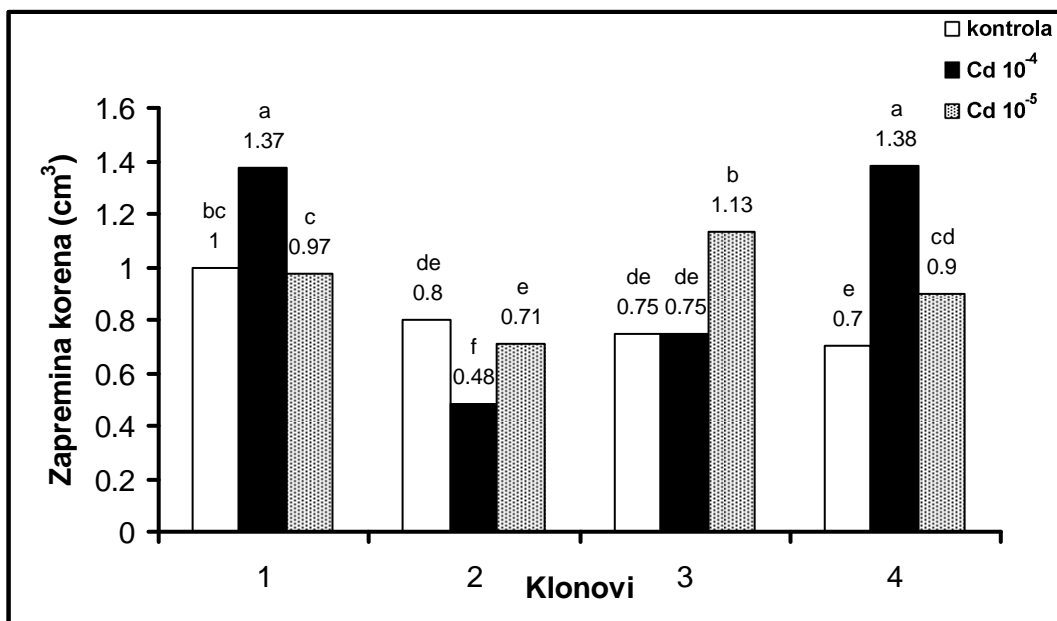
5.1.1. Uticaj kadmijuma na rast biljaka i produkciju biomase

Pod uticajem Cd, masa korena je bila veća ili statistički jednaka masi korena kontrolnih biljaka (Slika 16). Izuzetak je klon 2, koji je imao značajno manju masu korena pri tretmanu 10^{-4} M Cd.



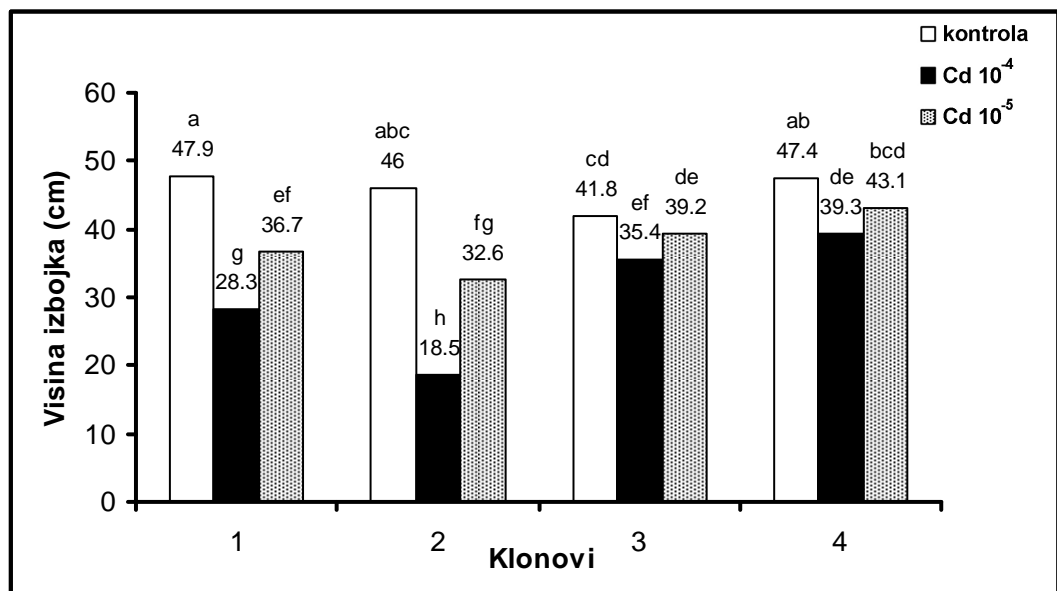
Slika 16. Masa korena u zavisnosti od koncentracije Cd
(NZR – 0,13)

Zapremina korena se povećala pod uticajem kadmijuma u korelaciji sa masom korena (Slika 17). Ponovo je jedini izuzetak bio klon 2, kod koga je došlo do značajnog smanjenja zapremine korena.

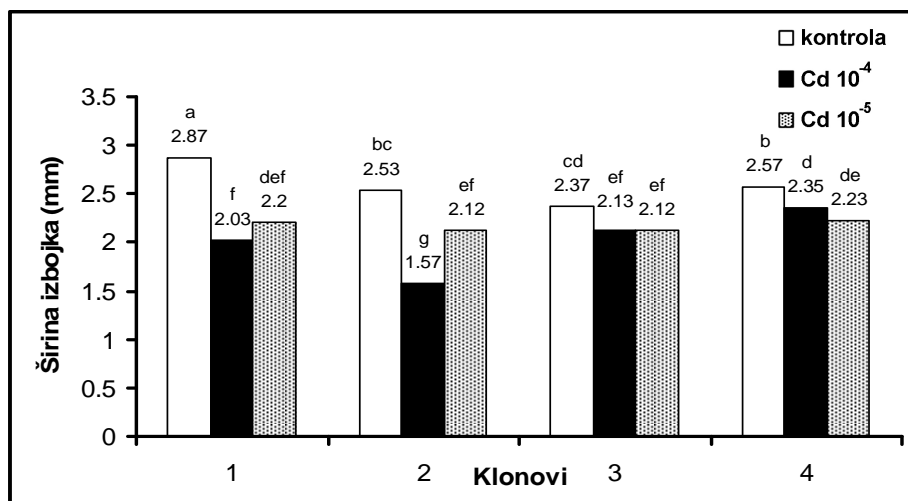


Slika 17. Zapremina korena u zavisnosti od koncentracije Cd
(NZR – 0,15)

Visina izbojka je značajno opala pod uticajem kadmijuma, naročito na većoj primenjenoj koncentraciji 10⁻⁴ M Cd (Slika 18). Pod uticajem koncentracije 10⁻⁵ M Cd kod klonova 3 i 4 nije došlo do značajnog smanjenja visine izbojka.



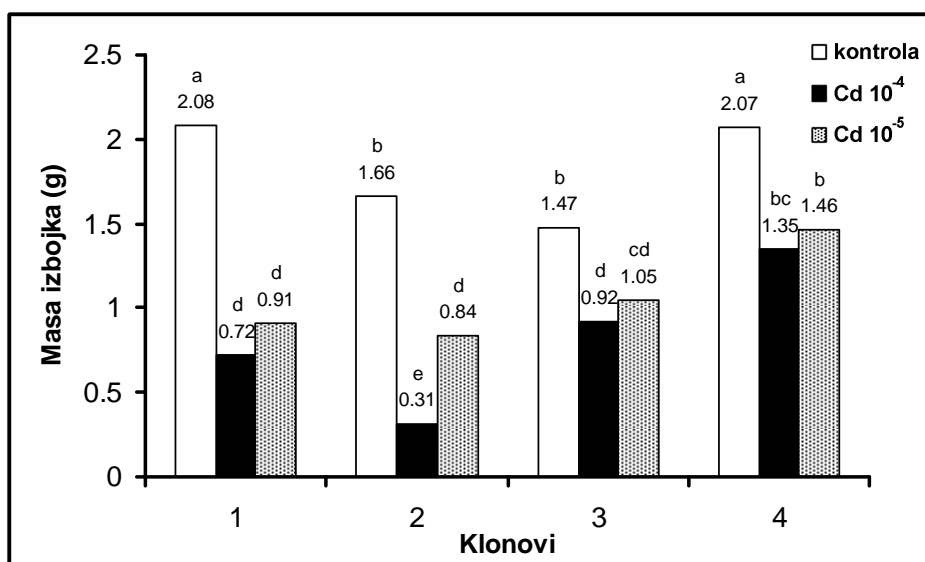
Slika 18. Visina izbojka u zavisnosti od koncentracije Cd
(NZR – 4,41)



Slika 19. Širina izbojka u zavisnosti od koncentracije Cd (NZR – 0,17)

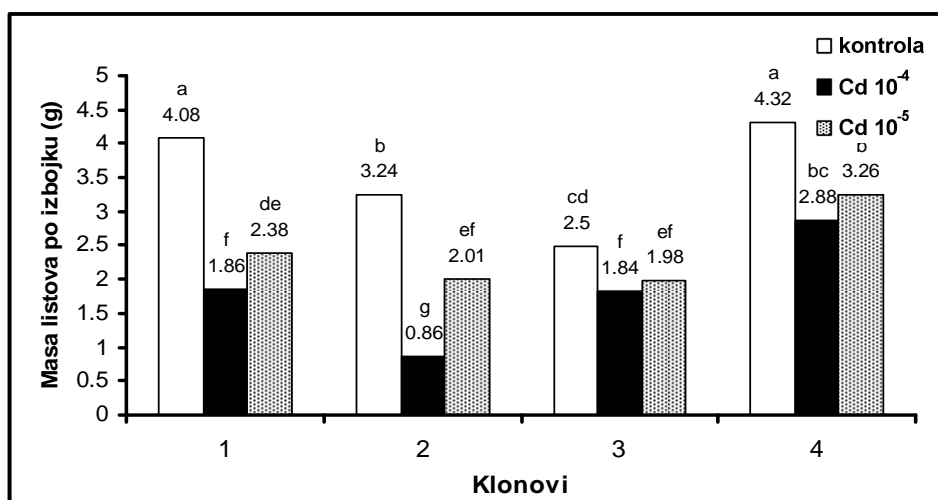
Širina izbojka se značajno smanjila u odnosu na kontrolne biljke pri oba tretmana Cd (Slika 19). Statistički značajnih razlika u širini izbojka između tretmana 10⁻⁴ i 10⁻⁵ M Cd, nije bilo, osim kod klona 2.

Masa izbojka je takođe značajno redukovana pod uticajem tretmana kadmijumom, naročito dejstvom veće koncentracije Cd od 10⁻⁴ M (Slika 20). Razlika u masi izbojka, koja je utvrđena između dve koncentracije Cd 10⁻⁴ i 10⁻⁵ M, bila je statistički značajna samo kod klona 2.



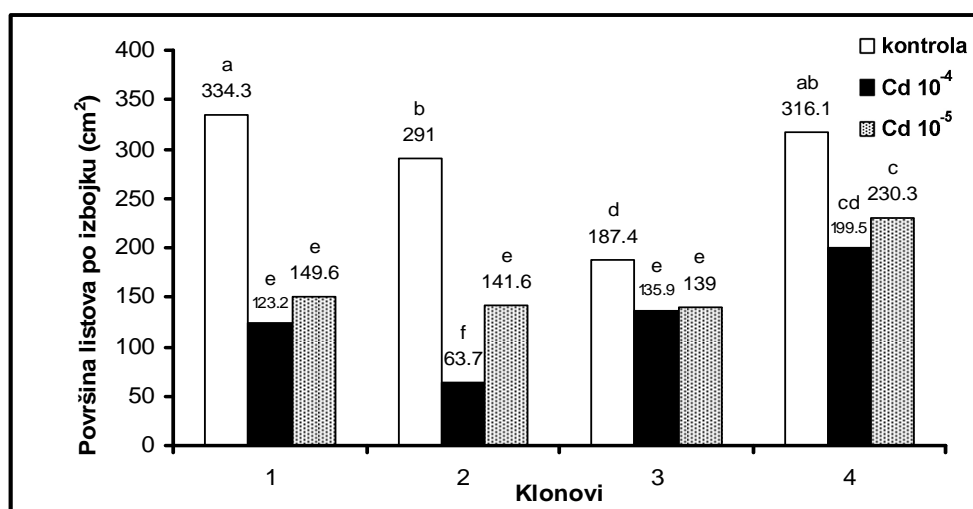
Slika 20. Masa izbojka u zavisnosti od koncentracije Cd (NZR – 0,35)

Ukupna masa listova po izbojku značajno je opala pod uticajem kadmijuma kod svih ispitivanih klonova (Slika 21). Klon 4 je imao najveću masu lista na tretmanima Cd, a klonovi 2 i 3 najmanju. Viša koncentracija Cd je kod klonova 1 i 2 značajnije redukovala ukupnu masu listova.



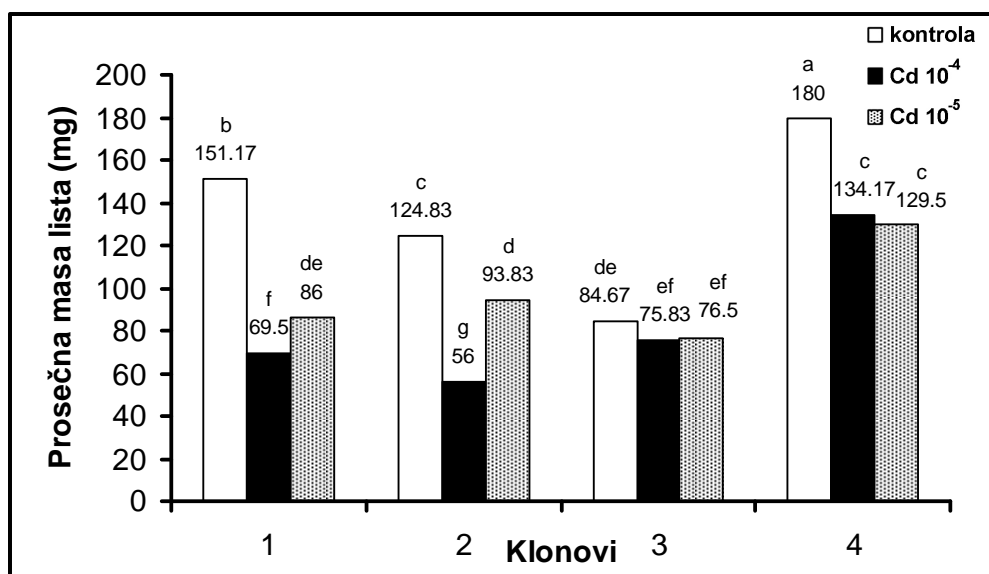
Slika 21. Masa listova po izbojku u zavisnosti od koncentracije Cd (NZR – 0,45)

Površina listova po izbojku se takođe značajno smanjila pod uticajem obe primenjene koncentracije Cd (Slika 22). Klon 4 se izdvojio kao genotip sa najvećom površinom listova pod uticajem Cd, dok između klonova 1, 2 i 3 nije bilo značajnih razlika na tretmanu Cd, osim kod klona 2 na većoj koncentraciji (10⁻⁴ M).



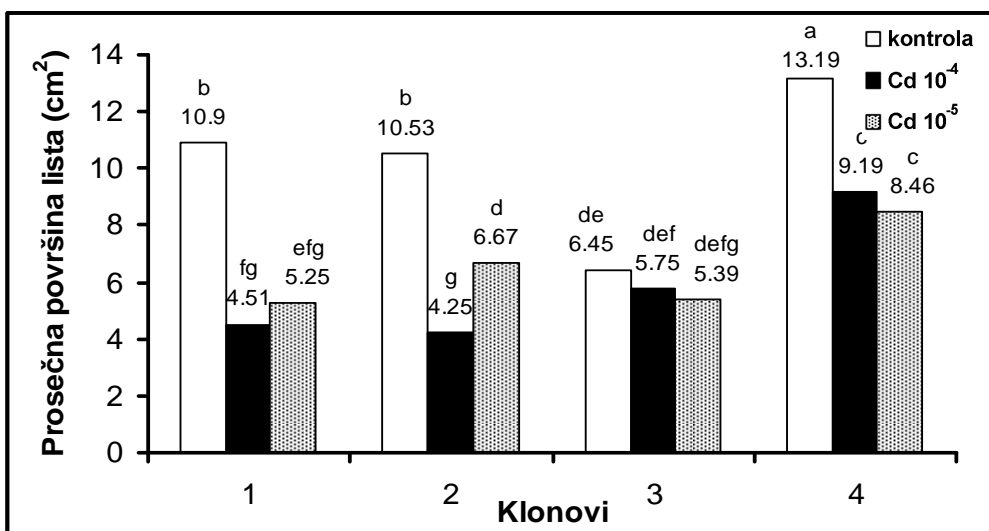
Slika 22. Površina listova po izbojku u zavisnosti od koncentracije Cd (NZR – 37,55)

Prosečna masa lista je bila najveća kod klona 4, gde su tretirane biljke imale veću masu lista od kontrolnih biljaka klona 2 i 3 (Slika 23). Uticaj tretmana Cd, pogotovo veće koncentracije od 10^{-4} M, doveo je do opadanja mase lista kod svih klonova, mada kod klona 3, gde je masa lista bila najmanja, razlike između tretmana nisu bile značajne.



Slika 23. Prosečna masa lista u zavisnosti od koncentracije Cd (NZR – 12,10)

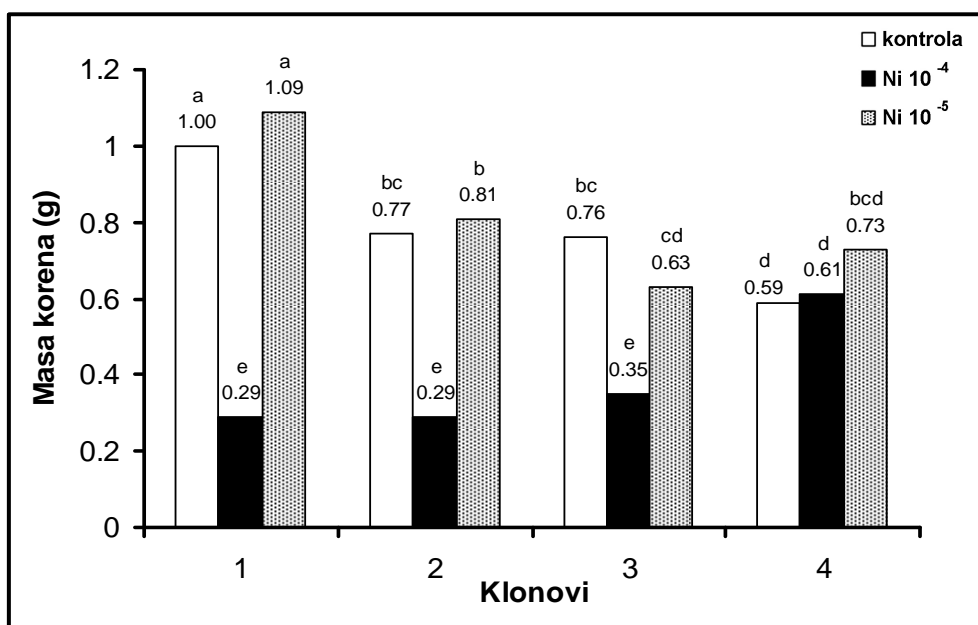
Prosečna površina lista je bila u korelaciji ($r=0,97$) sa prosečnom masom lista (Slika 24). Klon 4 je imao najveću površinu lista, dok je kod klona 3 imao smanjenje prosečne površine lista pod uticajem Cd, koje nije bilo statistički značajno. Uticaj dve primenjene koncentracije Cd (10^{-4} i 10^{-5} M) međusobno se značajno razlikovao samo kod klona 2.



Slika 24. Prosečna površina lista u zavisnosti od koncentracije Cd (NZR – 1,21)

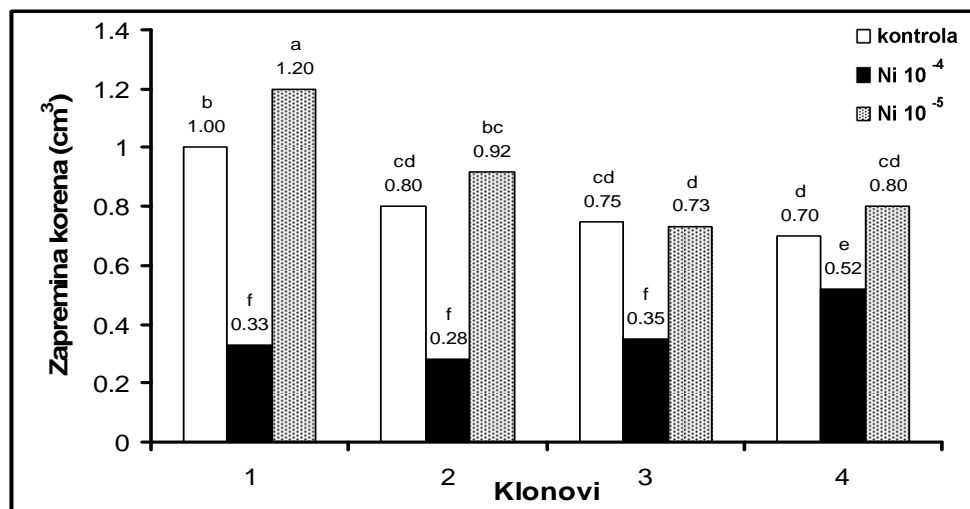
5.1.2. Uticaj nikla na rast biljaka i produkciju biomase

Tretman većom koncentracijom Ni (10^{-4} M) doveo je do značajnog smanjenja mase korena svih klonova osim četvrtog, u poređenju sa kontrolnim tretmanom (Slika 25). Primenom koncentracije Ni od 10^{-5} M nije došlo do značajne promene u masi korena u odnosu na kontrolu.



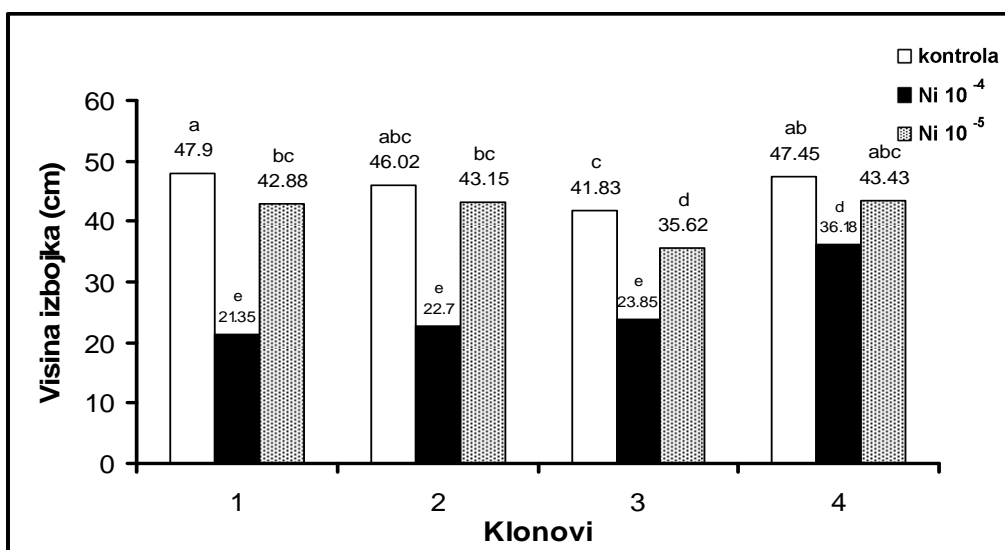
Slika 25. Masa korena u zavisnosti od koncentracije Ni (NZR – 0,14)

Manja koncentracija Ni (10^{-5} M) nije značajno uticala na zapreminu korena, sem kod klona 1 gde je u odnosu na kontrolne biljke došlo do značajnog povećanja ovog parametra (Slika 26). Veća koncentracija Ni (10^{-4} M) dovela je do značajnog smanjenja zapremine korena. Pod uticajem veće koncentracije Ni zapremina korena je opala više od dva puta, uz izuzetak biljaka klona 4.



Slika 26. Zapremina korena u zavisnosti od koncentracije Ni (NZR – 0,17)

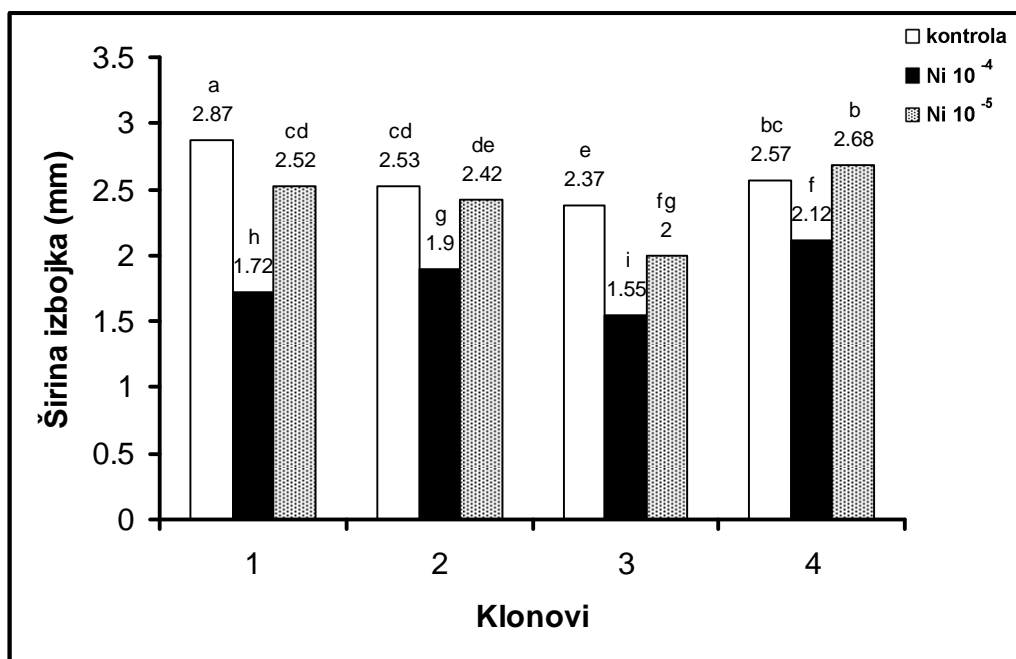
Visina izbojka se značajno smanjila pod uticajem povišenih koncentracija Ni (Slika 27). Redukcija visine nije bila statistički značajna samo na manjoj primenjenoj koncentraciji nikla (10^{-5} M) kod klonova 1 i 4. Izuzimajući klon 4, tretman 10^{-4} M Ni, doveo je do smanjenja visine biljke za približno 50%.



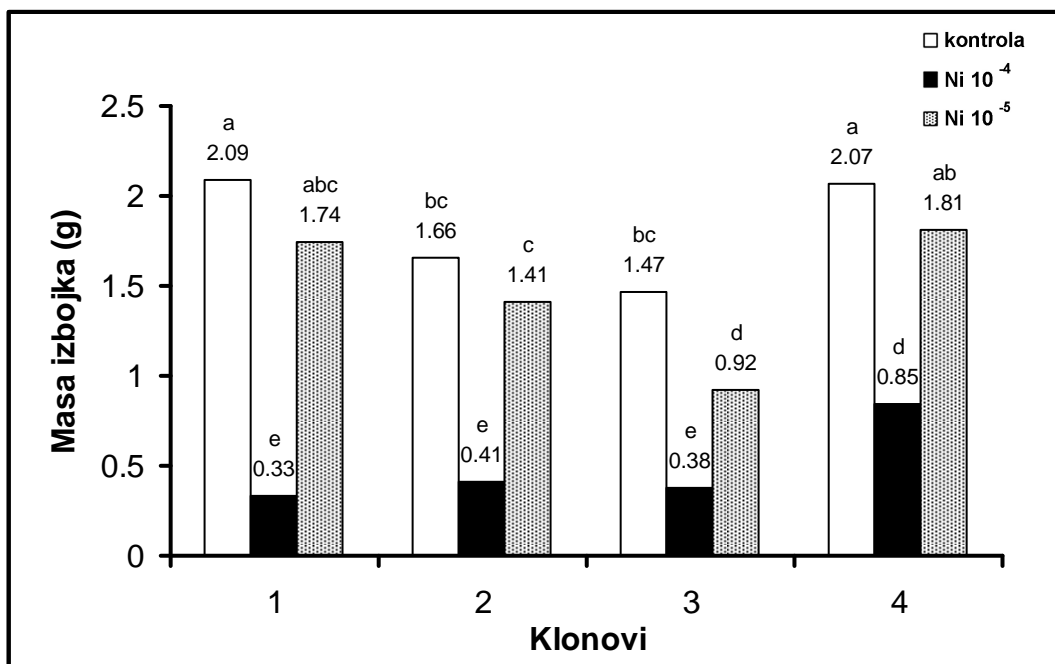
Slika 27. Visina izbojka u zavisnosti od koncentracije Ni (NZR – 4,42)

Širina izbojka je značajno redukovana pod uticajem Ni, naročito na većoj primenjenoj koncentraciji 10^{-4} M Ni, ali u manjoj meri u odnosu na visinu (Slika 28). Klonovi 2 i 4 gajeni na manjoj koncentraciji od 10^{-5} M Ni nisu imali statistički značajno smanjenje širine izbojka u odnosu na kontrolne biljke.

Masa izbojka je najviše redukovana u odnosu na ostale morfološke parametre, pod uticajem više primenjene koncentracije 10^{-4} M Ni (Slika 29). Kod klona 1 masa izbojka je opala 6,33 puta u odnosu na kontrolu, dok je najmanja redukcija mase utvrđena kod klona 4, - 2,43 puta. Manja koncentracija 10^{-5} Ni, takođe je dovela do smanjenja mase izbojaka, ali je to smanjenje bilo statistički značajno jedino kod klona 3.

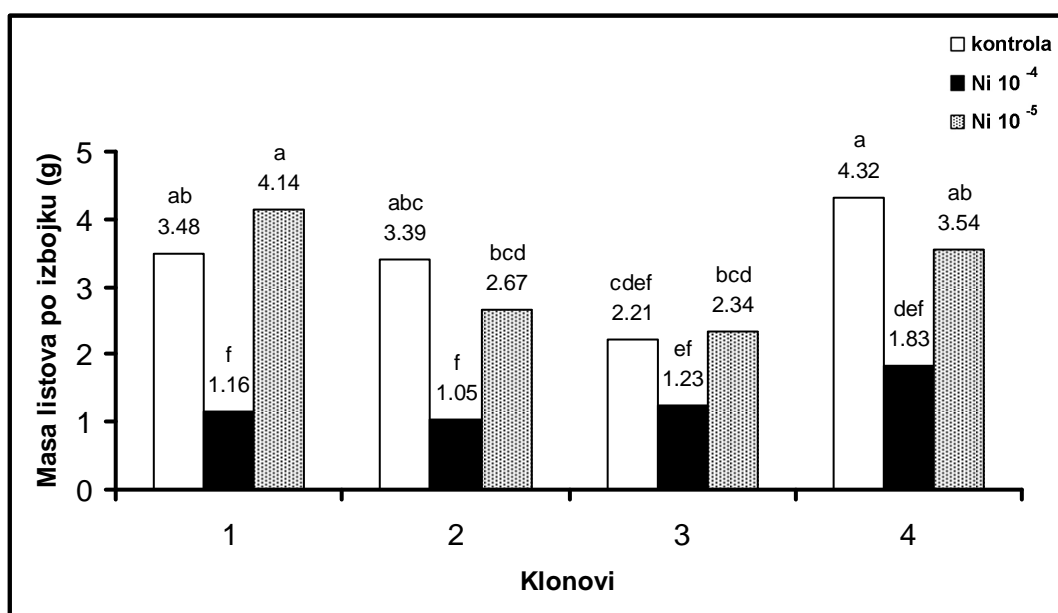


Slika 28. Širina izbojka u zavisnosti od koncentracije Ni
(NZR – 0,14)



Slika 29. Masa izbojka u zavisnosti od koncentracije Ni
(NZR – 0,35)

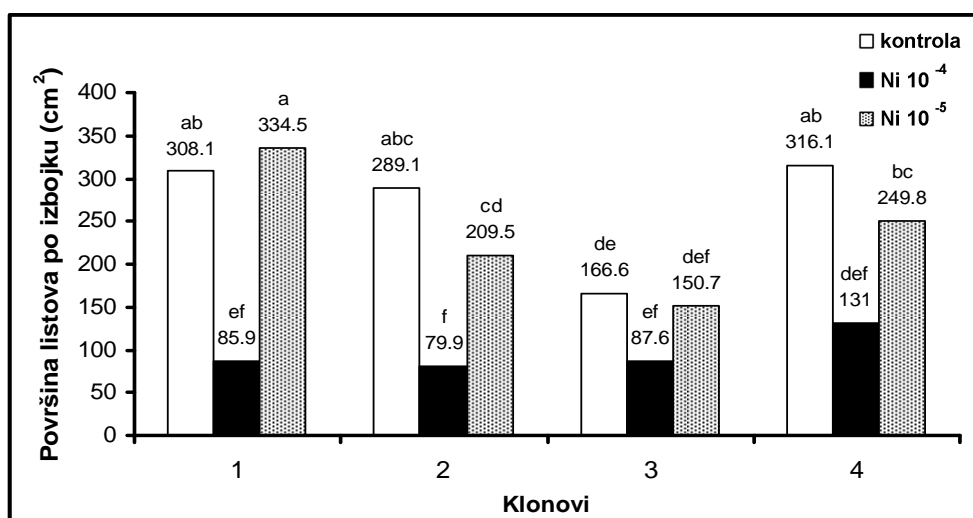
Pod uticajem tretmana većom koncentracijom Ni (10^{-4} M) došlo je do značajnog opadanja ukupne mase listova po izbojku (Slika 30). Veća koncentracija Ni (10^{-5} M) nije dovela do značajnih promena u masi listova. Klon 3 je imao najmanju masu listova na kontrolnom tretmanu u poređenju sa ostalim klonovima.



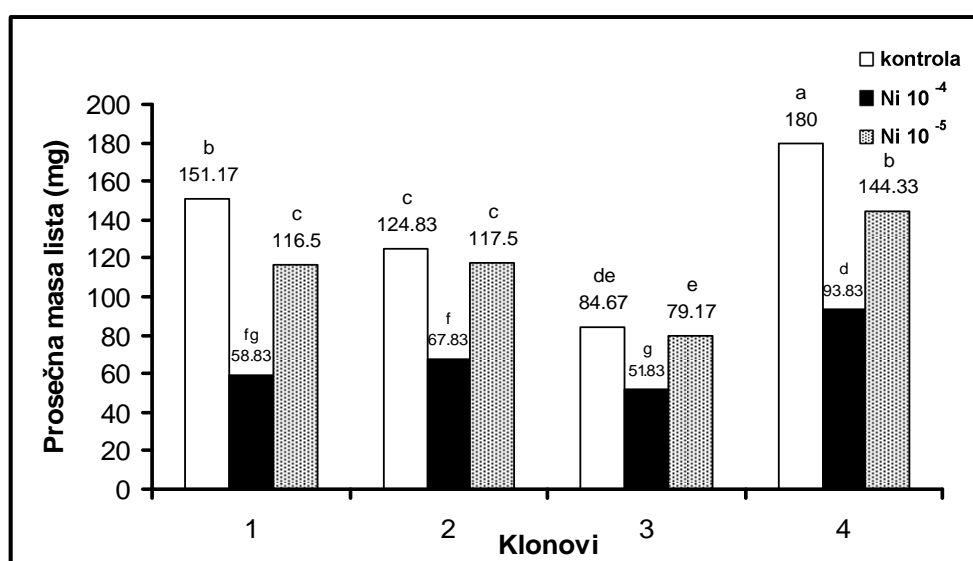
Slika 30. Masa listova po izbojku u zavisnosti od koncentracije nikla
(NZR – 1,154)

Površina listova po izbojku je bila u potpunoj korelaciji ($r=0,98$) sa masom listova (Slika 31). Samo veća koncentracija Ni je značajno redukovala lisne površine, dok je klon 3 takođe imao najmanju površinu lista na kontrolnom tretmanu u poređenju sa drugim genotipovima.

Prosečna masa lista se smanjila značajno pod uticajem oba primenjena tretmana Ni (Slika 32). Izuzetak je klon 3 kod kojeg nije bilo statistički značajne razlike u ovom parametru između kontrolnih i biljaka na tretmanu manjom koncentracijom Ni (10^{-5} M).

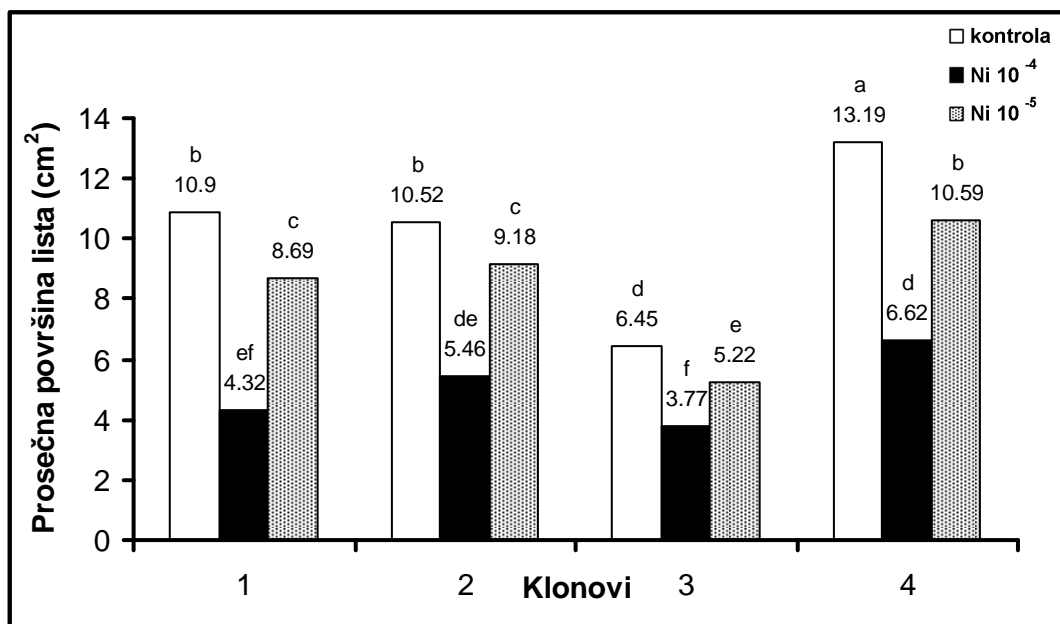


Slika 31. Površina listova po izbojku u zavisnosti od koncentracije nikla (NZR – 79,76)



Slika 32. Prosečna masa lista u zavisnosti od koncentracije Ni (NZR – 11,31)

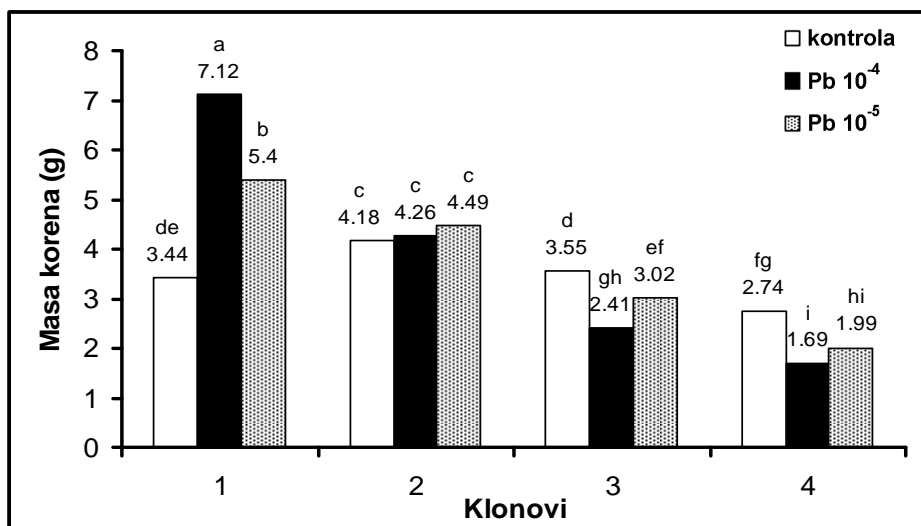
Površina lista je opadala slično kao i masa lista (Slika 33). Veća koncentracija Ni je uslovila značajniju redukciju lisne površine. Klon 4 je imao najveću površinu lista na svim primenjenim tretmanima.



Slika 33. Prosečna površina lista u zavisnosti od koncentracije Ni (NZR – 1,12)

5.1.3. Uticaj Pb na rast biljaka i produkciju biomase

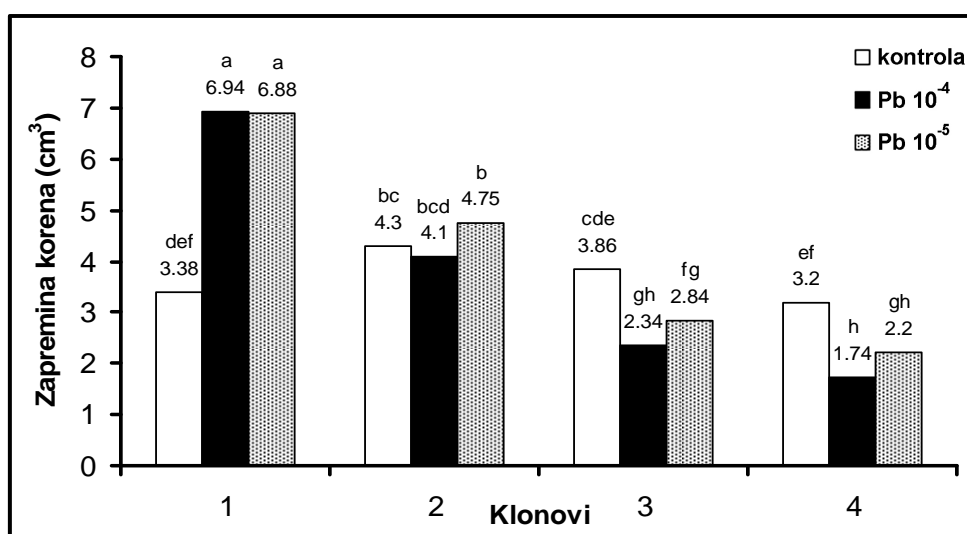
Pod uticajem tretmana Pb-EDTA masa korena je specifično varirala u zavisnosti od klona (Slika 34). Kod klona 1 došlo je do značajnog povećanja mase korena kod obe primenjene koncentracije Pb-EDTA, dok kod klona 2 tretmani nisu usloveli statistički značajne promene. Tretman Pb-EDTA je doveo do smanjenja mase korenova kod klonova 3 i 4, naročito pod uticajem veće koncentracije Pb-EDTA od 10⁻⁴ M.



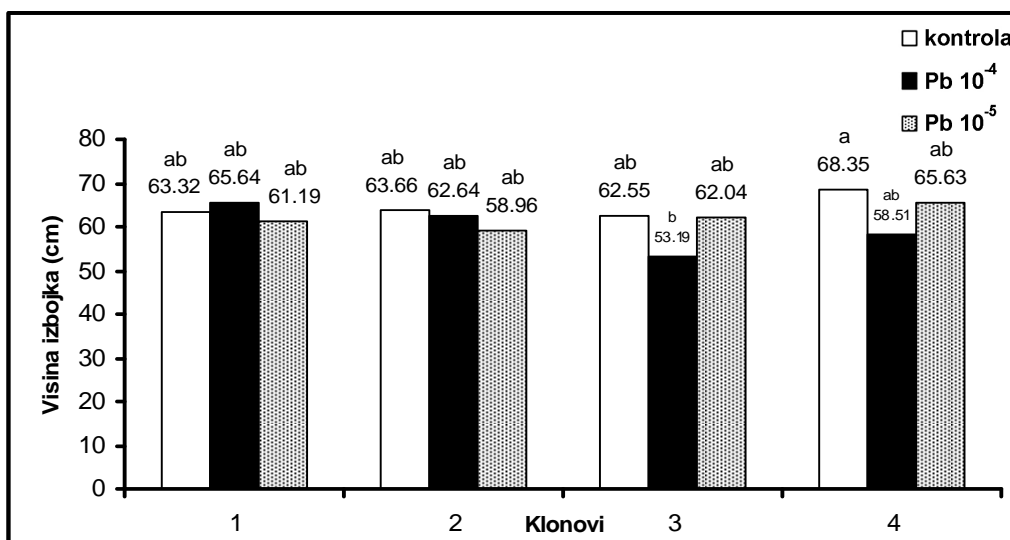
Slika 34. Masa korena u zavisnosti od koncentracije Pb-EDTA (NZR – 0,47)

Zapremina korena se menjala pod uticajem tretmana Pb-EDTA u korelaciji sa masom korena (Slika 35). Tretman Pb-EDTA doveo je do povećanja zapremine korena kod klona 1, dok kod klona 2 nije bilo značajnih razlika između kontrolnih i tretiranih vrba. Zapremina korena je značajno opala pod uticajem obe koncentracije Pb-EDTA kod klonova 3 i 4, naročito pod uticajem veće koncentracije (10^{-4} M).

Visina izbojka se nije značajno menjala pod uticajem tretmana Pb-EDTA (Slika 36). Izuzetak je klon 3, kod koga su biljke na koncentraciji od 10^{-4} M Pb-EDTA bile niže za jedan nivo značajnosti u poređenju sa kontrolom klona 4.

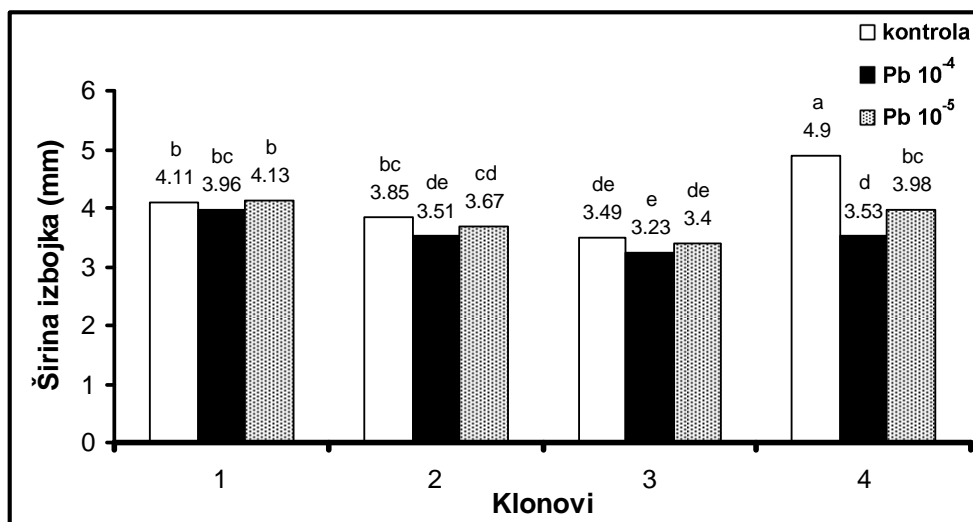


Slika 35. Zapremina korena u zavisnosti od koncentracije Pb (NZR – 0.72)



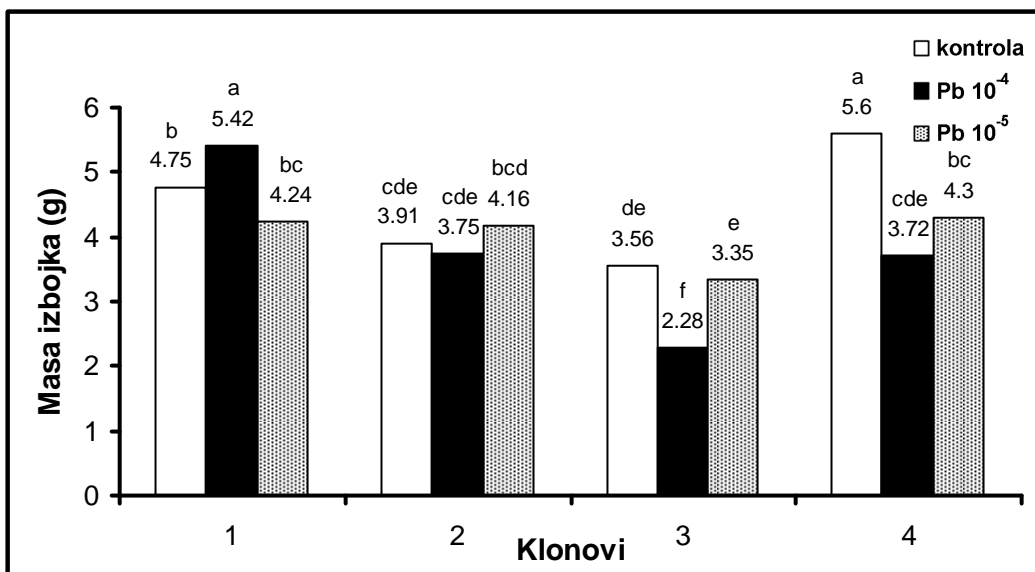
Slika 36. Visina izbojka u zavisnosti od koncentracije Pb
(NZR – 13.32)

Kod klonova 3 i 4 pod uticajem veće koncentracije Pb-EDTA, došlo je do statistički značajnog opadanja širine izbojka u odnosu na kontrolne biljke (Slika 37). U svim ostalim slučajevima tretman Pb-EDTA nije značajno uticao na ovaj morfološki parametar.



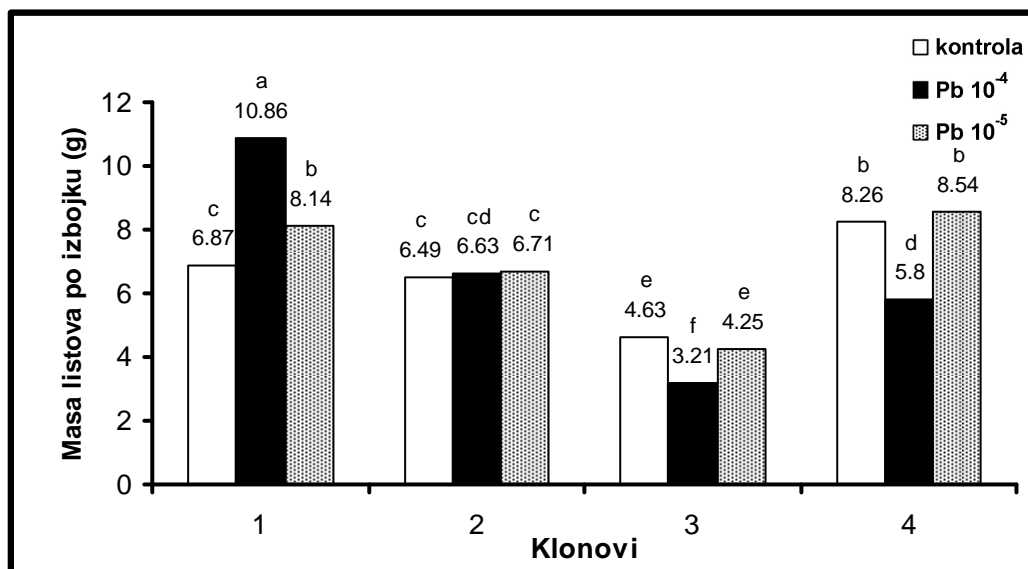
Slika 37. Širina izbojka u zavisnosti od koncentracije Pb
(NZR – 0,28)

Masa izbojka varirala je pod uticajem Pb-EDTA u korelaciji sa visinom i širinom izbojka (Slika 38). Pod uticajem Pb-EDTA, kod klonova 3 i 4 masa izbojka se smanjila, kod klona 2 nije bilo značajnih promena, dok se kod klona 1 značajno povećala na većoj primenjenoj koncentraciji od 10⁻⁴ M.



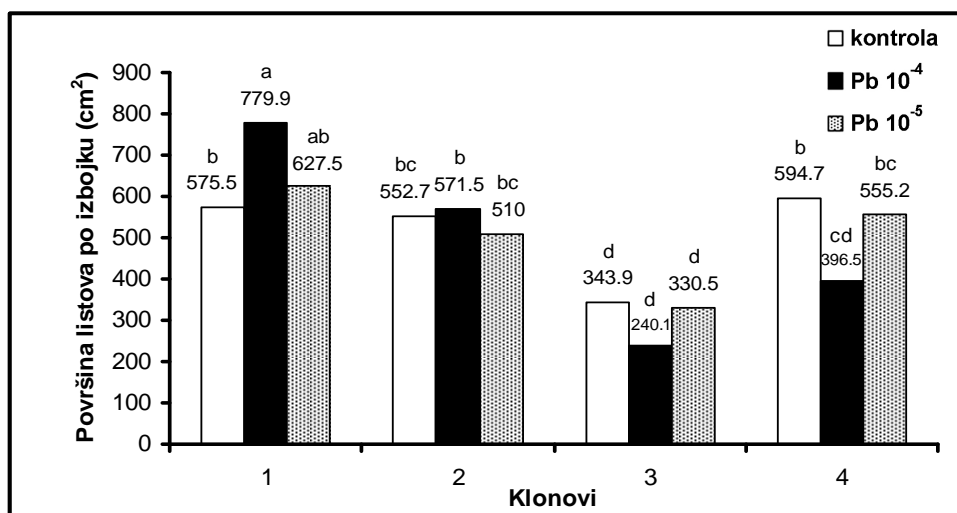
Slika 38. Masa izbojka u zavisnosti od koncentracije Pb (NZR – 0,60)

Delovanje Pb-EDTA dovelo je do značajne redukcije mase listova po izbojku klonova 3 i 4 na većoj koncentraciji (10^{-4} M), dok je kod klona 1 došlo do značajnog povećanja mase listova pri obe primenjene koncentracije Pb-EDTA (Slika 39). Najmanju masu listova imao je klon 3.



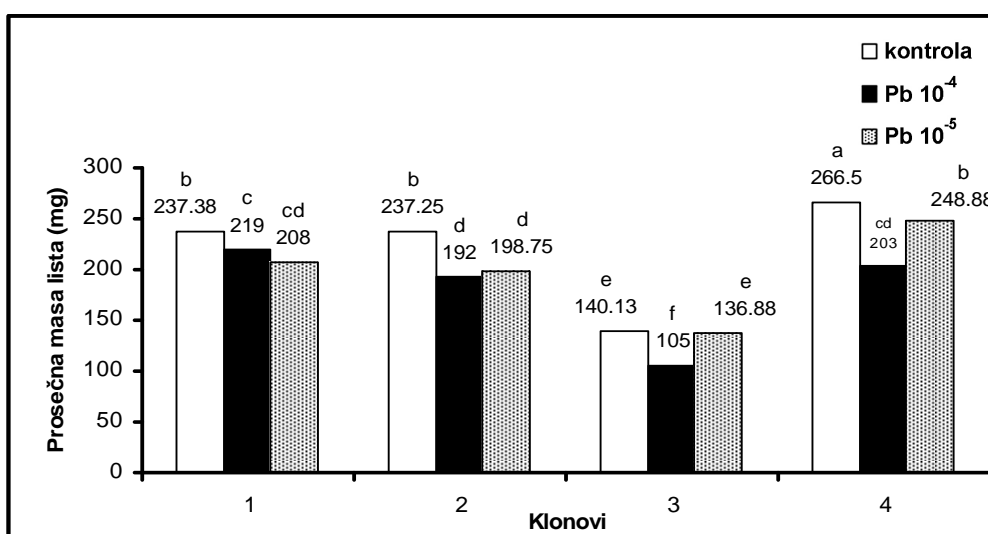
Slika 39. Masa listova po izbojku u zavisnosti od koncentracije Pb (NZR – 0,55)

Površina listova po izbojku se značajno smanjila kod klona 4 pod uticajem veće primenjene koncentracije Pb-EDTA (Slika 40). Manja koncentracija Pb-EDTA nije uzrokovala značajne promene ovog parametra ni kod jednog genotipa. Klon 3 je imao najmanju lisnu površinu dok je kod klona 1 utvrđen stimulatívni efekat Pb-EDTA.



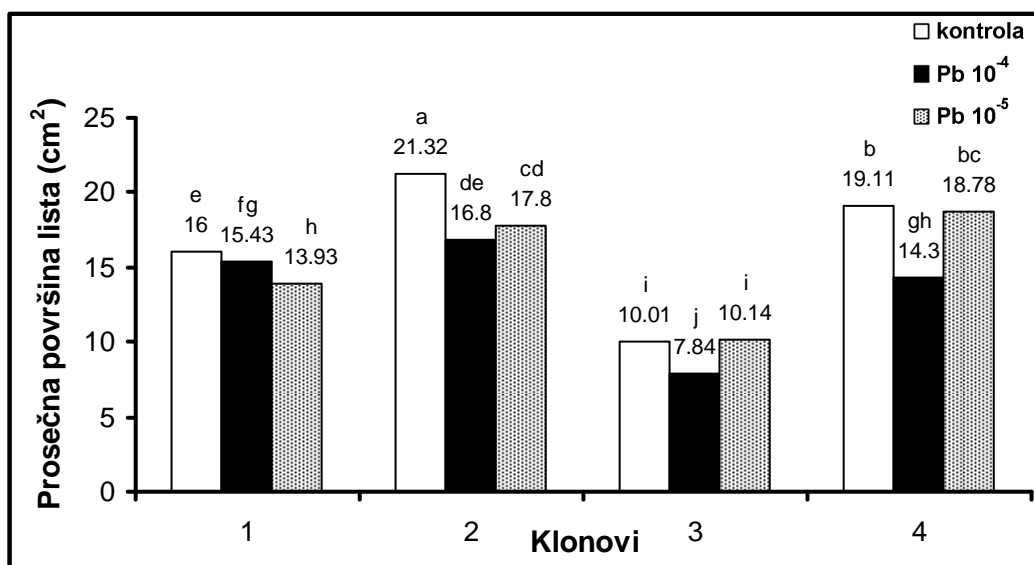
Slika 40. Površina listova po izbojku u zavisnosti od koncentracije Pb (NZR – 156,40)

Prosečna masa lista se značajno smanjila pod uticajem Pb-EDTA kod svih ispitivanih klonova (Slika 41). Smanjenje mase lista pod uticajem veće primenjene koncentracije od 10⁻⁴ M Pb-EDTA je bilo značajno veće kod klonova 3 i 4.



Slika 41. Prosečna masa lista u zavisnosti od koncentracije Pb (NZR – 16.79)

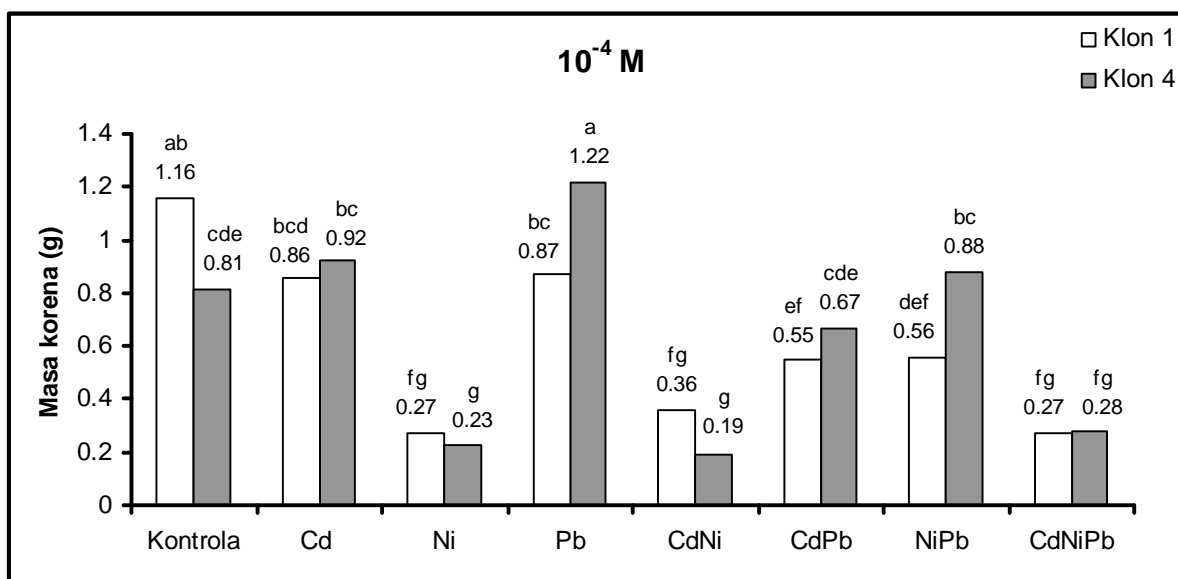
Prosečna površina lista se značajno smanjila pod uticajem tretmana Pb-EDTA sa izuzetkom klonova 3 i 4 na većoj koncentraciji od 10^{-4} M Pb-EDTA (Slika 42). Klon 3 imao je najmanju površinu lista na svim primenjenim tretmanima.



Slika 42. Prosečna površina lista u zavisnosti od koncentracije Pb (NZR – 1,23)

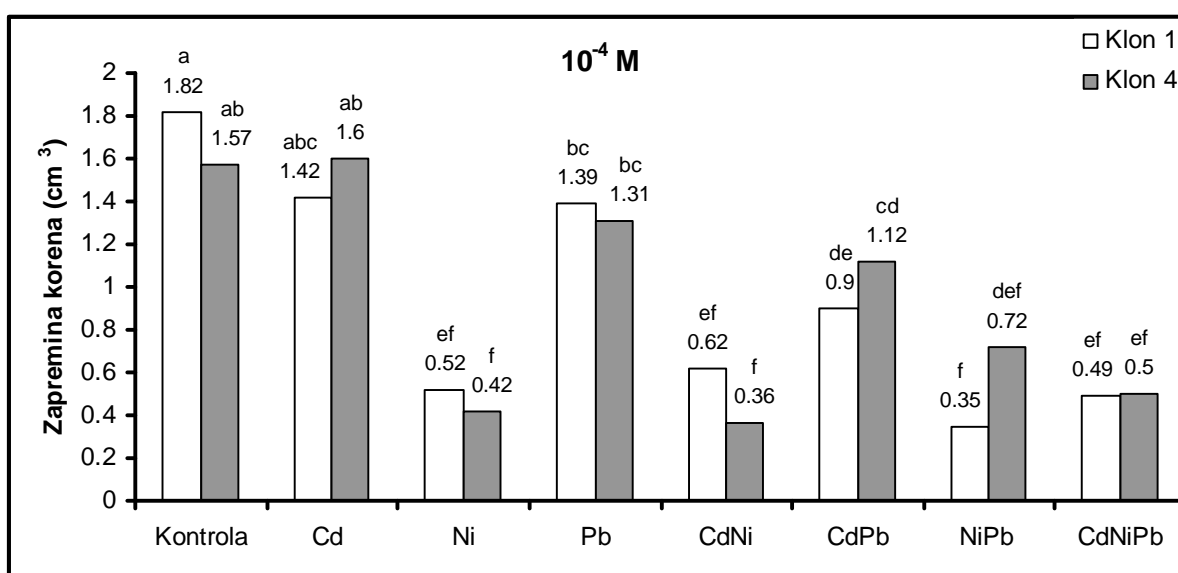
5.1.4. Uticaj kombinovanih tretmana teških metala na rast biljaka i produkciju biomase

Uticaj kombinovanih tretmana Cd, Ni i Pb-EDTA u koncentraciji od 10^{-4} M na klonove 1 i 4 prikazan je na slici 43. Kod klona 1 nije utvrđeno povećanje mase korena u odnosu na kontrolu, dok je kod klona 4 došlo do povećanja pod uticajem Cd, Pb i Ni+Pb. Te razlike nisu bile statistički značajne, osim pod uticajem olova. Tretmani Ni, Cd+Ni i Cd+Ni+Pb doveli su do značajne redukcije u masi korena. Tretmani Cd+Pb i Ni+Pb značajno su smanjili masu korena klona 1.



Slika 43. Masa korena u zavisnosti od tretmana teškim metalima koncentracije 10^{-4} M (NZR – 0,28)

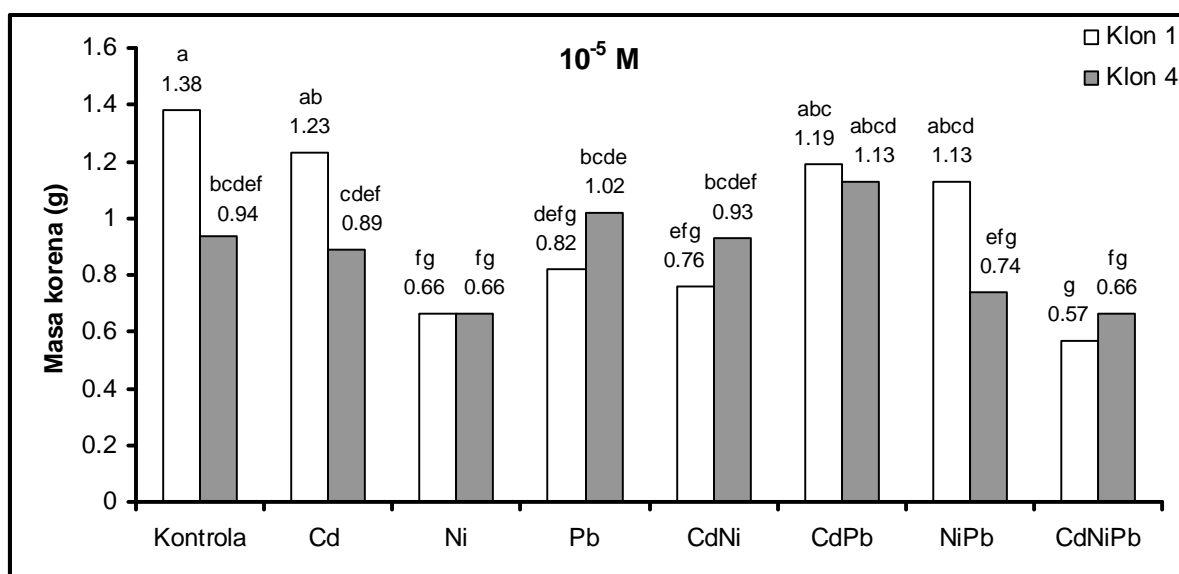
Zapremina korena klona 1 opala je značajno pod uticajem svih rastvora teških metala osim pojedinačnog rastvora kadmijuma (Slika 44). Kao i kod mase korena, zapremina korena je najviše redukovana dejstvom tretmana Ni, Cd+Ni i Cd+Ni+Pb. Značajno manju zapreminu korena, klonovi su imali i pod uticajem tretmana Cd+Pb i Ni+Pb. U okviru istog tretmana nije bilo značajnih razlika između genotipova.



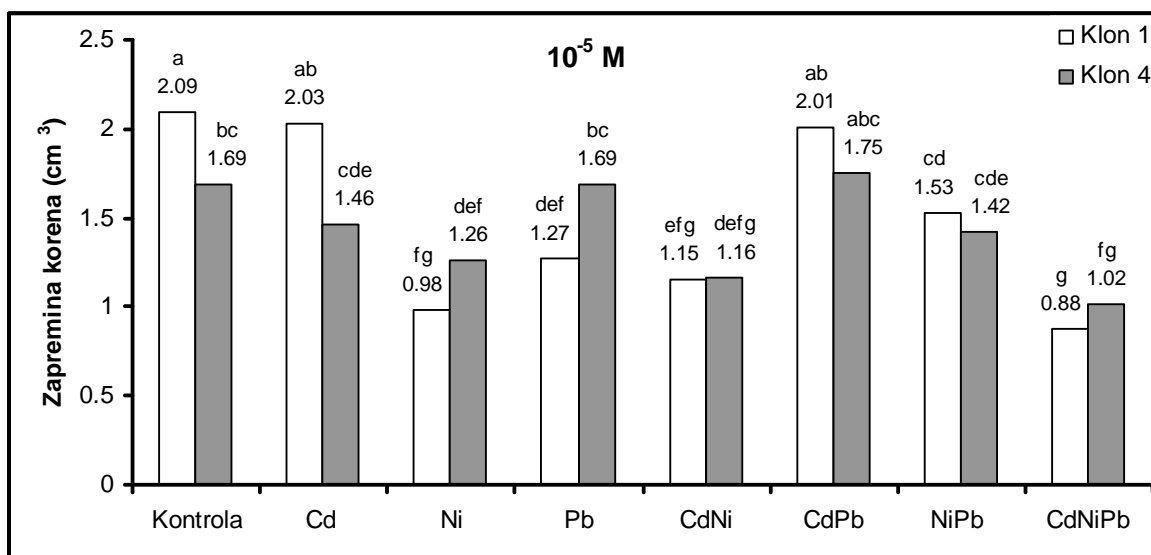
Slika 44. Zapremina korena u zavisnosti od tretmana teškim metalima koncentracije 10^{-4} M (NZR – 0,40)

Uticaj kombinovanih tretmana teških metala koncentracije 10^{-5} M na masu korena prikazan je na slici 45. Tretmani Cd i Cd+Pb nisu doveli do promene u masi korena ispitivanih klonova. Tretman Pb i Cd+Ni doveo je do značajnog redukovanja mase korena kod klona 1. Najmanju masu korena imale su vrbe tretirane sa sva tri teška metala. Klon 1 imao je veću masu korena u odnosu na klon 4 na kontrolnom tretmanu i na tretmanima Cd i Ni+Pb.

Zapremina korena nije se značajno promenila u odnosu na kontrolu pod uticajem Cd, Cd+Pb koncentracije 10^{-5} M kod oba ispitivana klona, a kod klona 4 i na tretmanima Pb, i Ni+Pb (Slika 46). Najmanja zapremina korena je izmerena kod vrba gajenih u rastvorima Cd+Ni i Cd+Ni+Pb.

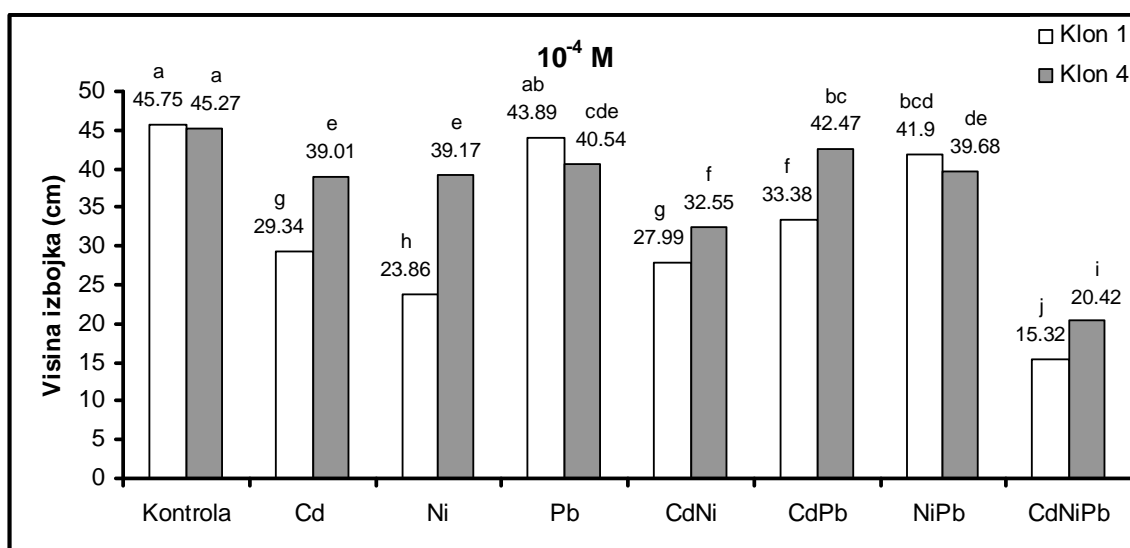


Slika 45. Masa korena u zavisnosti od tretmana teškim metalima koncentracije 10^{-5} M (NZR – 0,29)



Slika 46. Zapremina korena u zavisnosti od tretmana teškim metalima koncentracije 10^{-5} M (NZR – 0,34)

Svi tretmani teških metala koncentracije 10^{-4} M uticali su na značajno smanjenje visine izbojka, sa izuzetkom tretmana Pb klona 1 (Slika 47). Biljke gajene u rastvorima Cd+Pb i Ni+Pb imale su veću visinu u poređenju sa pojedinačnim tretmanima Cd i Ni. Kombinovani tretman sva tri teška metala je najznačajnije redukovao visinu izbojka.

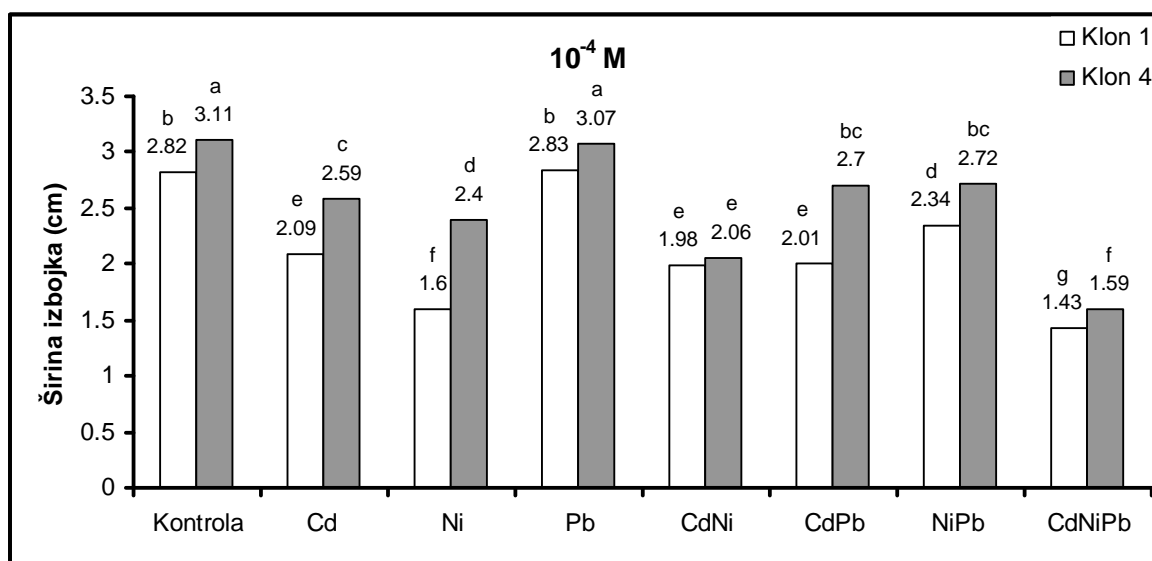


Slika 47. Visina izbojka u zavisnosti od tretmana teškim metalima koncentracije 10^{-4} M (NZR – 2,45)

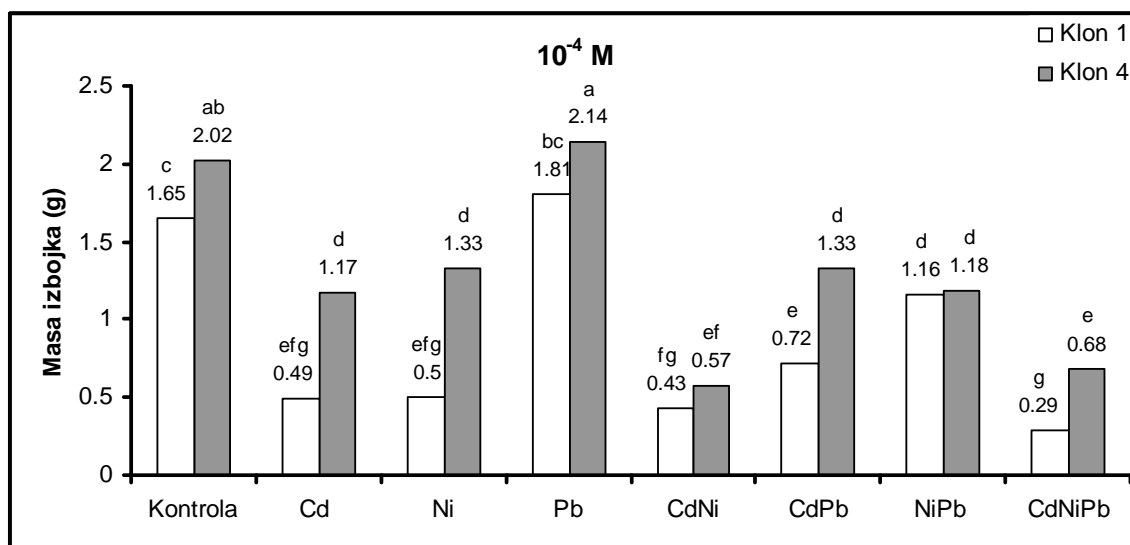
Tretman Pb (10^{-4} M) nije uticao na značajnu promenu širina izbojaka u odnosu na kontrolu (Slika 48). Vrbe tretirane rastvorom Ni+Pb, imale su signifikantno

veću širinu izbojka u odnosu na čist tretman Ni. Najmanje širine izbojaka izmerene su kod oba klona na kombinovanom tretmanu sva tri teška metala.

Slično parametrima visine i širine izbojka, tretman Pb (10^{-4} M) nije doveo do signifikantnog opadanja mase izbojka u poređenju sa kontrolnim tretmanom, dok je najznačajnije smanjenje ovog parametra utvrđeno na kombinovanom tretmanu sva tri teška metala (slika 49). Masa izbojka tretmana Cd+Pb i Ni+Pb bila je jednaka ili značajno veća u odnosu na pojedinačne tretmane Cd i Ni.



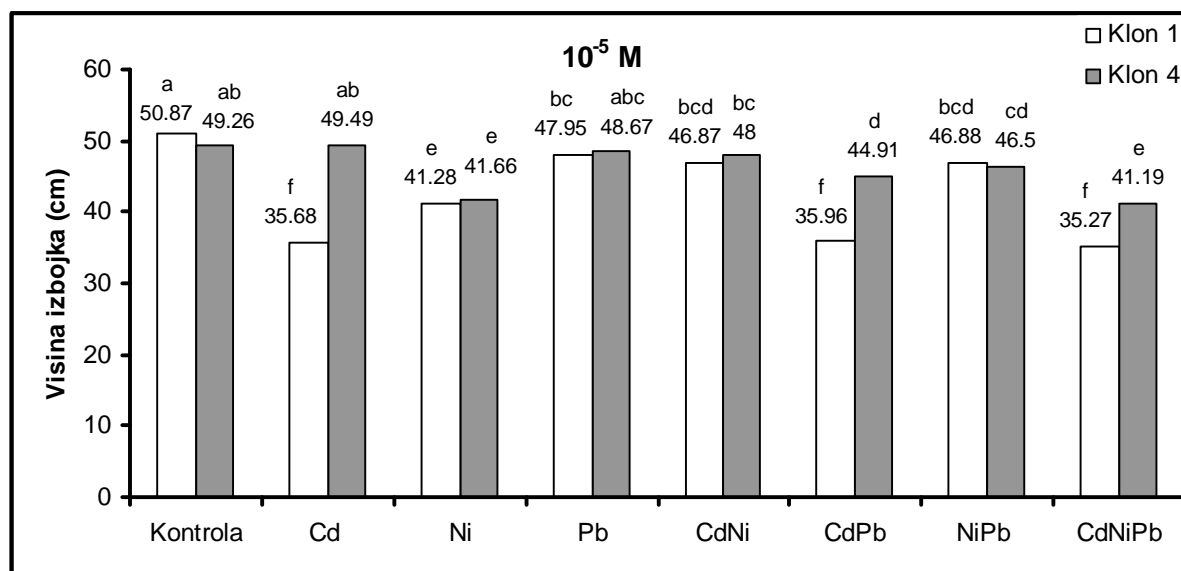
Slika 48. Širina izbojka u zavisnosti od tretmana teškim metalima koncentracije 10^{-4} M (NZR – 0,13)



Slika 49. Masa izbojka u zavisnosti od tretmana teškim metalima koncentracije 10^{-4} M (NZR – 0.23)

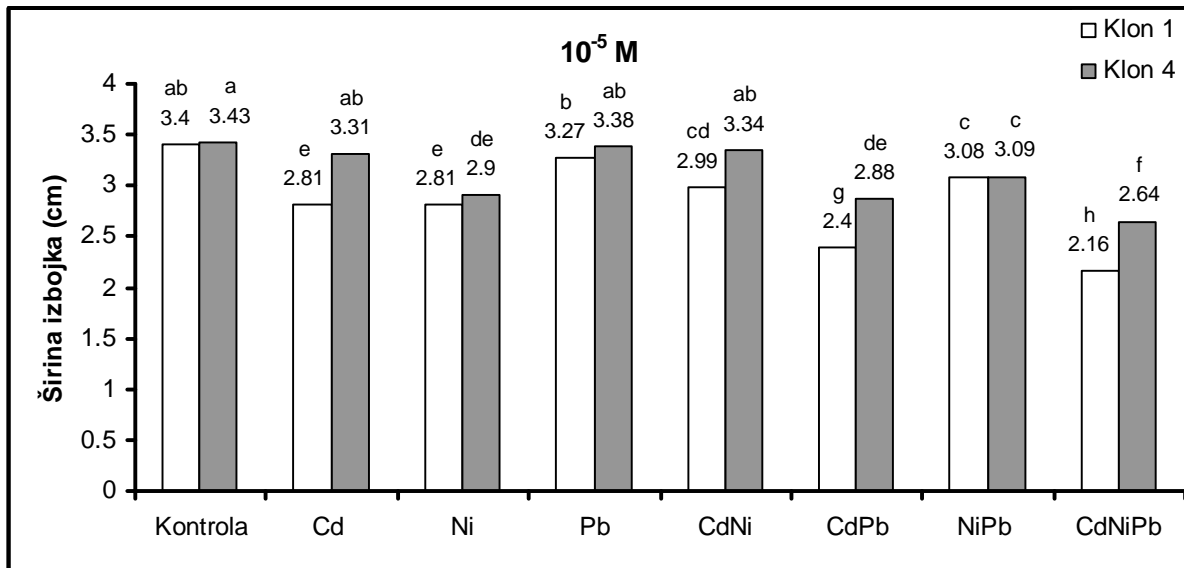
Za sve parametre izbojka je karakteristično da su praćene vrednosti pod dejstvom tretmana sa dva teška metala (Cd+Ni, Cd+Pb i Ni+Pb – koncentracija 10^{-4} M) bile najniže na tretmanu Cd+Ni (Slike 47 - 49). Klon 4 je u većini slučajeva (16 od 21 tretman teškim metalima) imao značajno veće vrednosti u odnosu na klon 2.

Kod klona 4 nisu utvrđene značajne razlike u visini izbojka za tretmane Cd, Pb i Cd+Ni koncentracije 10^{-5} M (Slika 50). Kod klona 1 svi tretmani su doveli do značajnog opadanja visine izbojka, ali u manjoj meri nego na koncentracijama 10^{-4} M (Slika 47 i 50).



Slika 50. Visina izbojka u zavisnosti od tretmana teškim metalima koncentracije 10^{-5} M (NZR – 2,54)

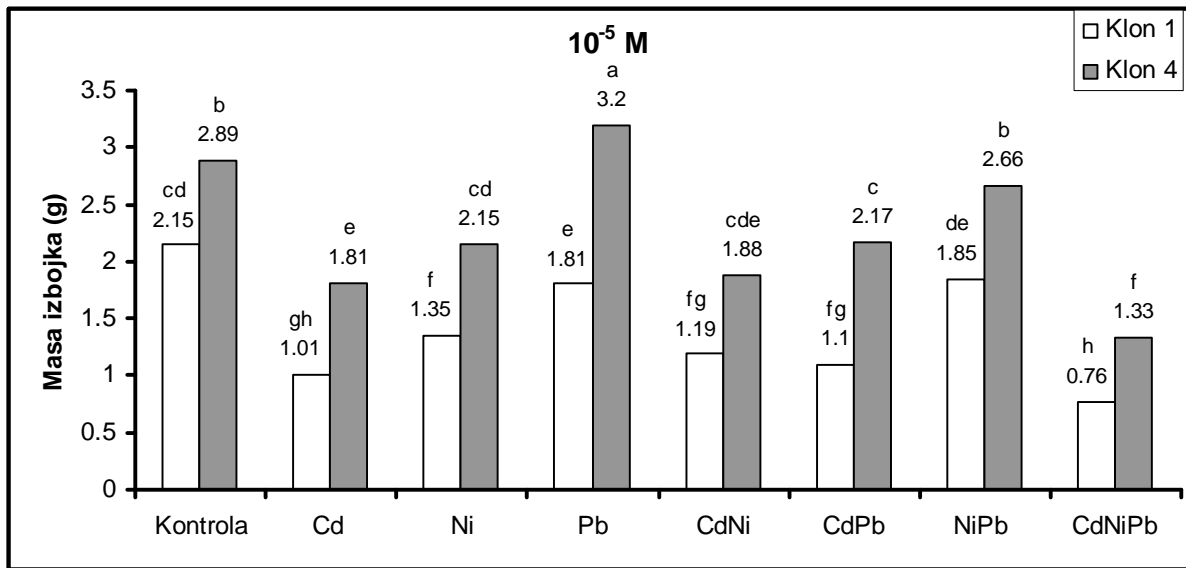
Širina izbojka je takođe opadala manje pod dejstvom koncentracija 10^{-5} M, u poređenju sa koncentracijama 10^{-4} M (Slika 51). Najmanju širinu izbojka imale su biljke gajene na rastvoru Cd+Ni+Pb.



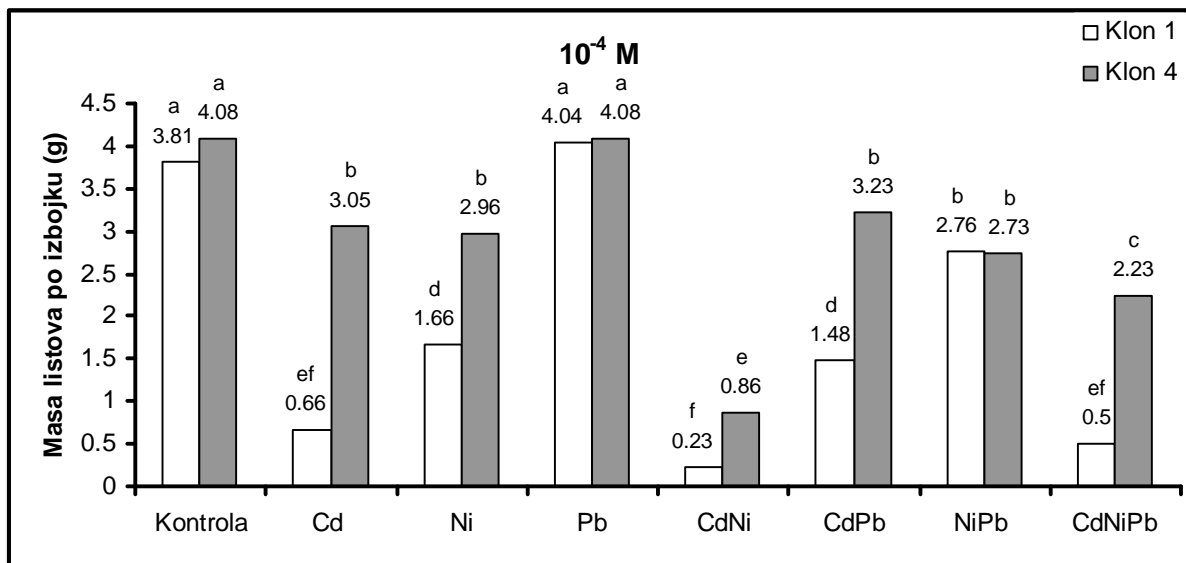
Slika 51. Širina izbojka u zavisnosti od tretmana teškim metalima koncentracije 10^{-5} M (NZR – 0,13)

Masa izbojka je na svim tretmanima koncentracija 10^{-5} M bila statistički značajno veća kod klona 4 u poređenju sa klonom 1 (Slika 52). Najniže mase imale su biljke na tretmanu sva tri metala. Tretman Pb-EDTA je stimulatивно delovao na masu izbojka klona 4. Masa izbojaka je bila veća na tretmanima Cd+Pb i Ni+Pb u poređenju sa pojedinačnim tretmanima Cd i Ni. Tretman Cd+Ni je više redukovao masu izbojka u poređenju sa tretmanima Cd+Pb (bez značajnosti) i Ni+Pb (statistički značajno).

Ukupne mase listova po izbojku (Slika 53) i površine listova po izbojku (Slika 54) su značajno opale pod uticajem svih tretmana osim Pb. Najmanje vrednosti su utvrđene na tretmanu Cd+Ni, pa zatim na tretmanu Cd+Ni+Pb. Kod klona 1 tretmani Cd+Pb i Ni+Pb su uzrokovali značajno veću masu listova u poređenju sa pojedinačnim tretmanima Cd i Ni (Slika 53). Klon 4 je imao jednaku ili značajno veću masu i površinu listova u odnosu na klon 1.

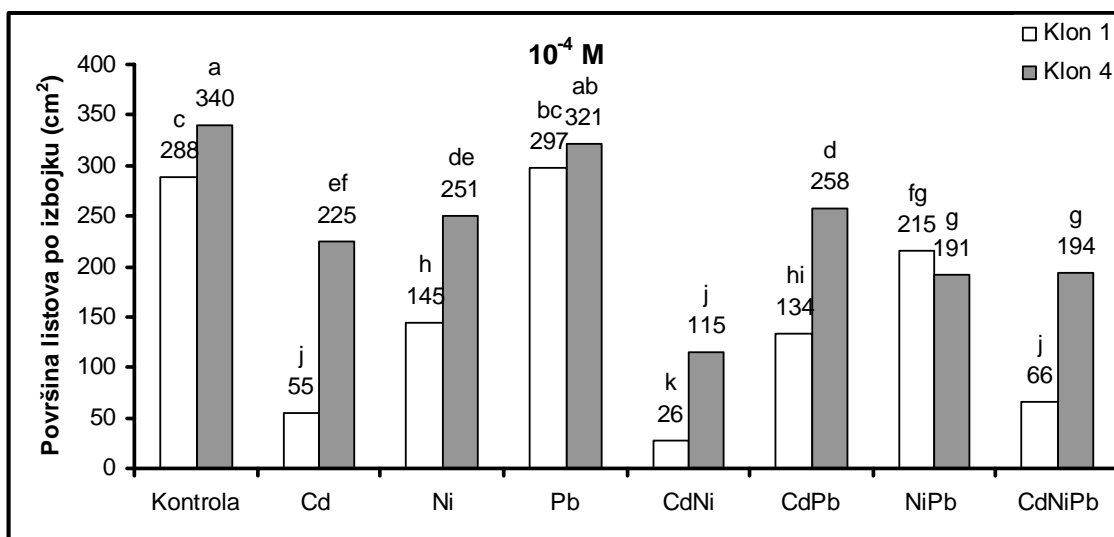


Slika 52. Masa izbojka u zavisnosti od tretmana teškim metalima koncentracije 10^{-5} M (NZR – 0,29)



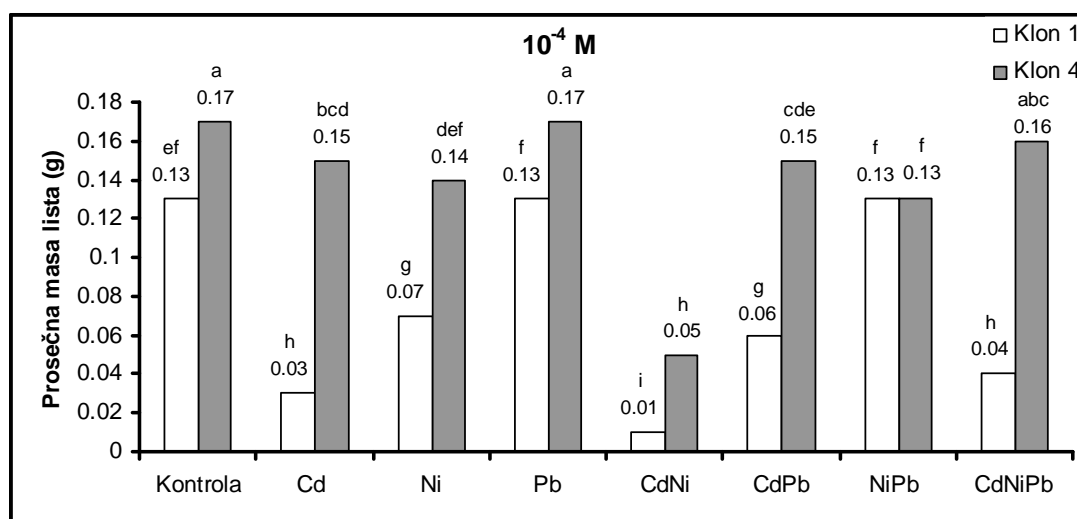
Slika 53. Masa listova po izbojku u zavisnosti od tretmana teškim metalima koncentracije 10^{-4} M (NZR – 0,46)

Tretman Cd+Pb je kod oba klona uzrokovao veću površinu listova po izbojku u poređenju sa pojedinačnim tretmanom Cd.



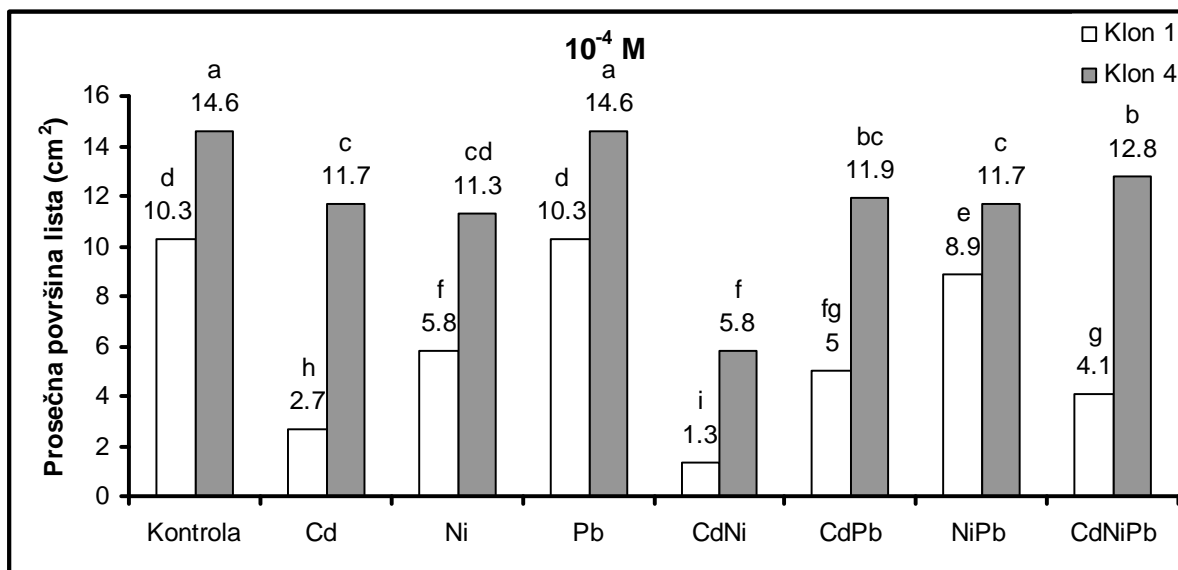
Slika 54. Površina listova po izbojku u zavisnosti od tretmana teškim metalima koncentracije 10^{-4} M (NZR – 26,06)

Prosečna masa lista i prosečna površina lista su se u značajnijoj meri smanjivale kod klona 1 pod uticajem teških metala (Slike 55 i 56). Najmanju prosečnu masu i površinu pojedinačnog lista oba klona su imala na tretmanu Cd+Ni. Uticaj tretmana Cd, Pb i Cd+Ni+Pb nije doveo do smanjenja mase lista klona 4 (Slika 55). Masa lista klona 1 bila je značajno manja na tretmanima Cd+Pb i Ni+Pb u poređenju sa pojedinačnim tretmanima Cd i Ni.



Slika 55. Prosečna masa lista u zavisnosti od tretmana teškim metalima koncentracije 10^{-4} M (NZR – 0,016)

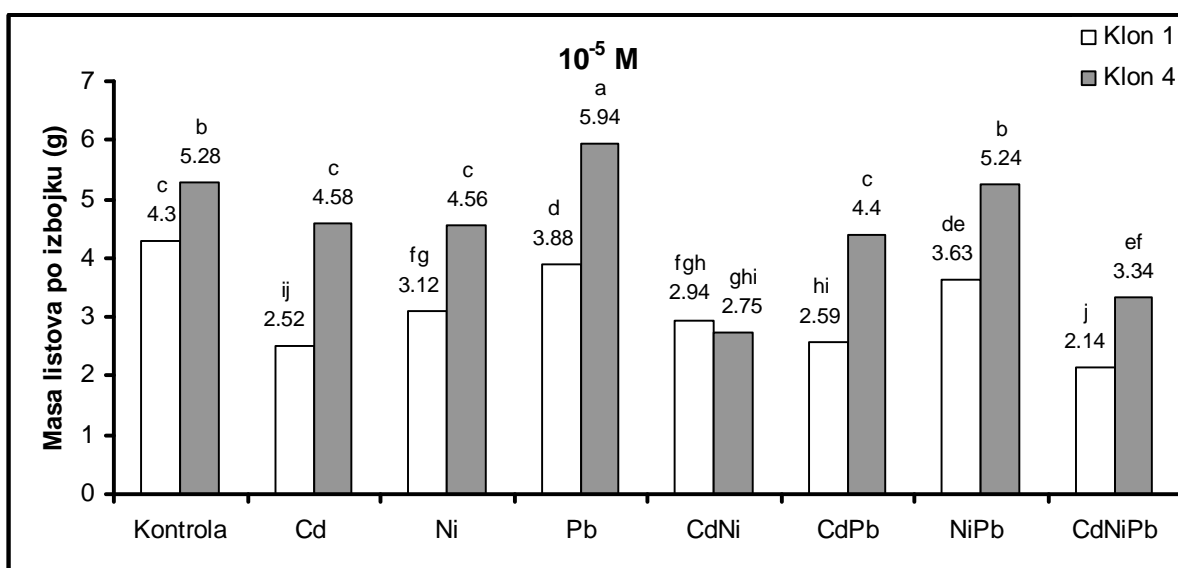
Prosečna površina lista klona 4 nije se značajno menjala pod uticajem tretmana Pb (Slika 56).



Slika 56. Prosečna površina lista u zavisnosti od tretmana teškim metalima koncentracije 10⁻⁴ M (NZR – 0,016)

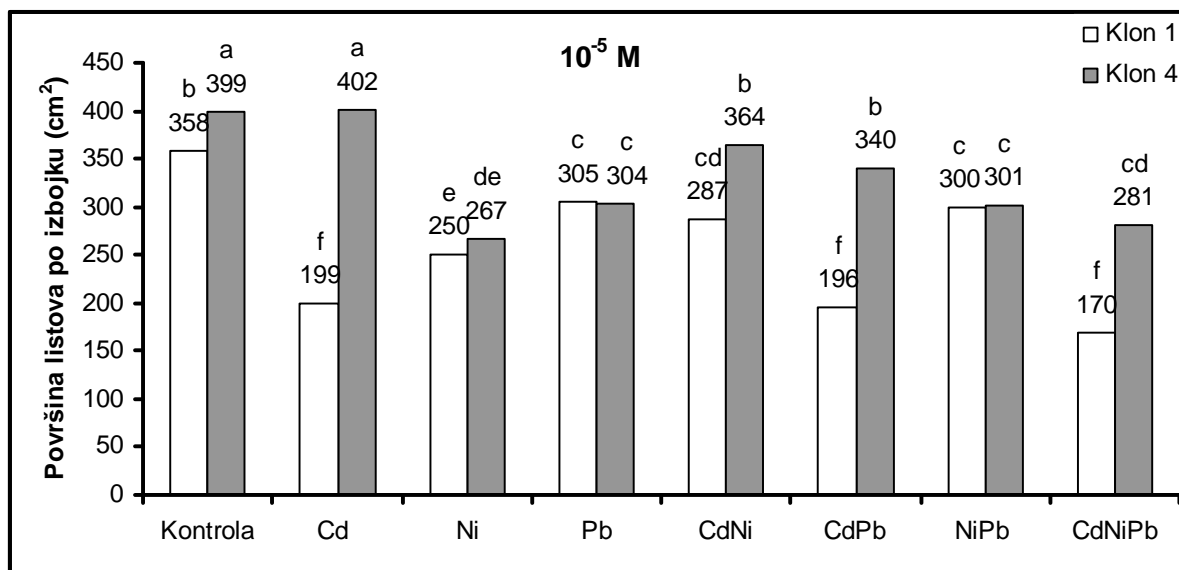
Tretmani teškim metalima koncentracije 10⁻⁵ M su u manjoj meri redukovali ukupnu masu i površinu listova po izbojku u odnosu na koncentracije 10⁻⁴ M (Slike 57 i 58). Klon 4 je imao značajno veće vrednosti ovih parametara u većini slučajeva.

Klonovi su reagovali specifično na tretmane. Signifikantno najmanju masu listova klon 1 imao je na tretmanu Cd+Ni+Pb, zatim na tretmanima Cd, Cd+Pb i Cd+Ni, a klon 4 na tretmanima Cd+Ni i Cd+Ni+Pb (Slika 57). Tretman Pb-EDTA je delovao stimulatивно na masu listova klona 4.



Slika 57. Masa listova po izbojku u zavisnosti od tretmana teškim metalima koncentracije 10⁻⁵ M (NZR – 0,39)

Površina listova po izbojku se nije značajno promenila kod klona 4 samo na tretmanu Cd u odnosu na kontrolu, dok je u svim ostalim slučajevima opala (Slika 58).

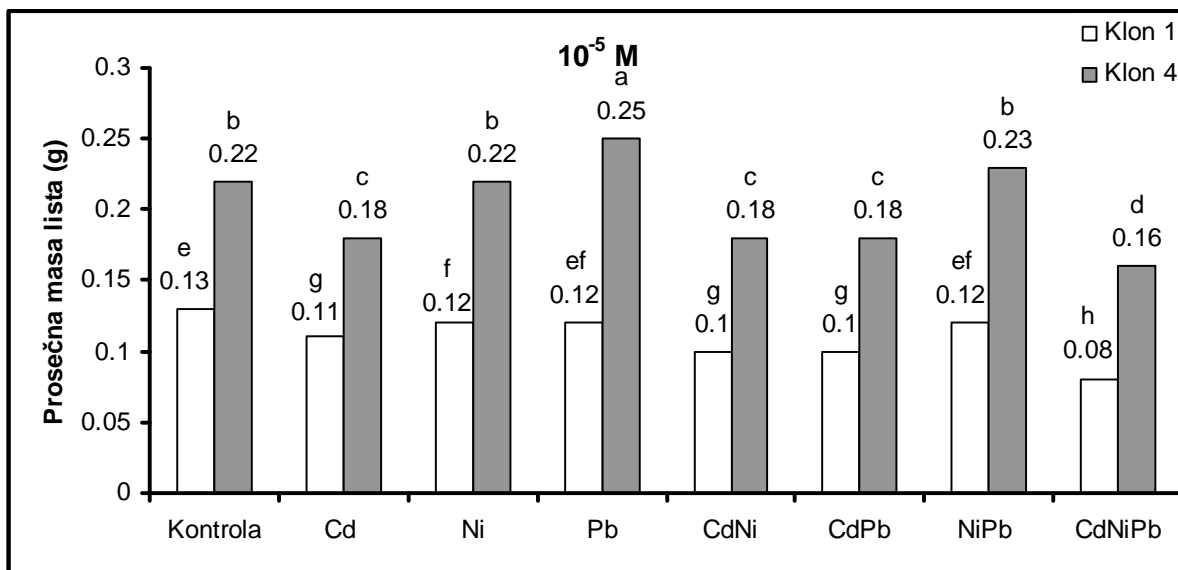


Slika 58. Površina listova po izbojku u zavisnosti od tretmana teškim metalima koncentracije 10^{-5} M (NZR – 28,47)

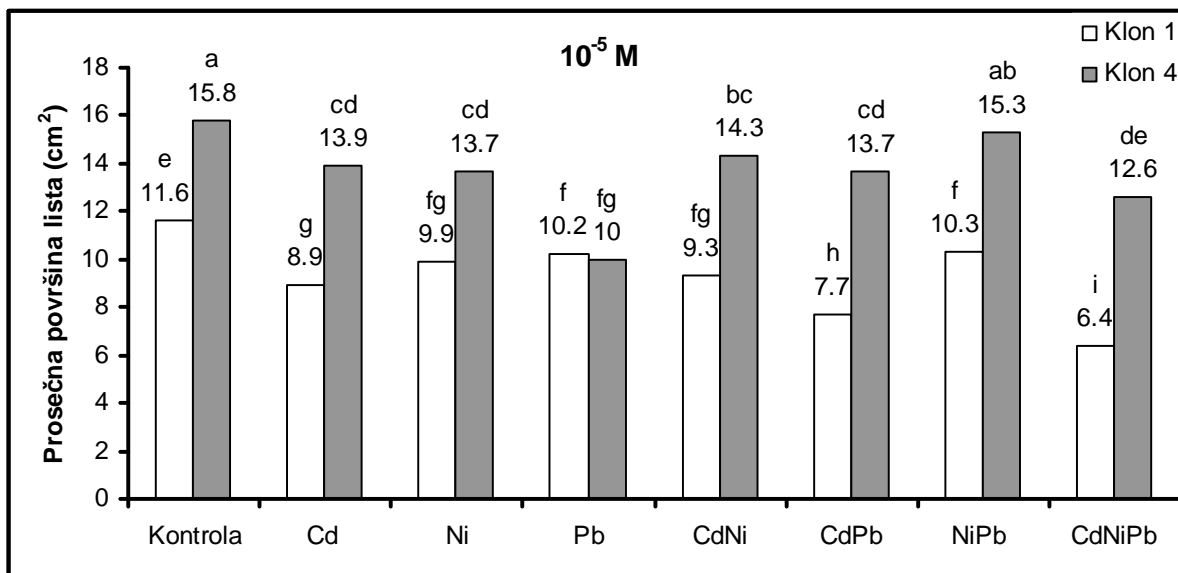
Prosečne mase i površine pojedinačnog lista bile su značajno veće u svim slučajevima kod klona 4 u odnosu na klon 1 (Slike 59 i 60). Najmanje vrednosti ovih parametara su utvđene na tretmanu sva tri teška metala.

Prosečna masa lista nije značajno opala kod klona 1 na tretmanima Pb i Ni+Pb, a kod klona 4 na tretmanima Ni i Ni+Pb (Slika 59). Tretman Pb je stimulatивно delovao na prosečnu masu lista klona 4.

Prosečna površina lista nije se značajno smanjila samo kod klona 4 na tretmanu Ni+Pb, dok je u svim ostalim tretmanima značajno opala (Slike 60). Između tretmana teških metala u većini slučajeva nisu utvđene statistički značajne razlikje u okviru istog genotipa.



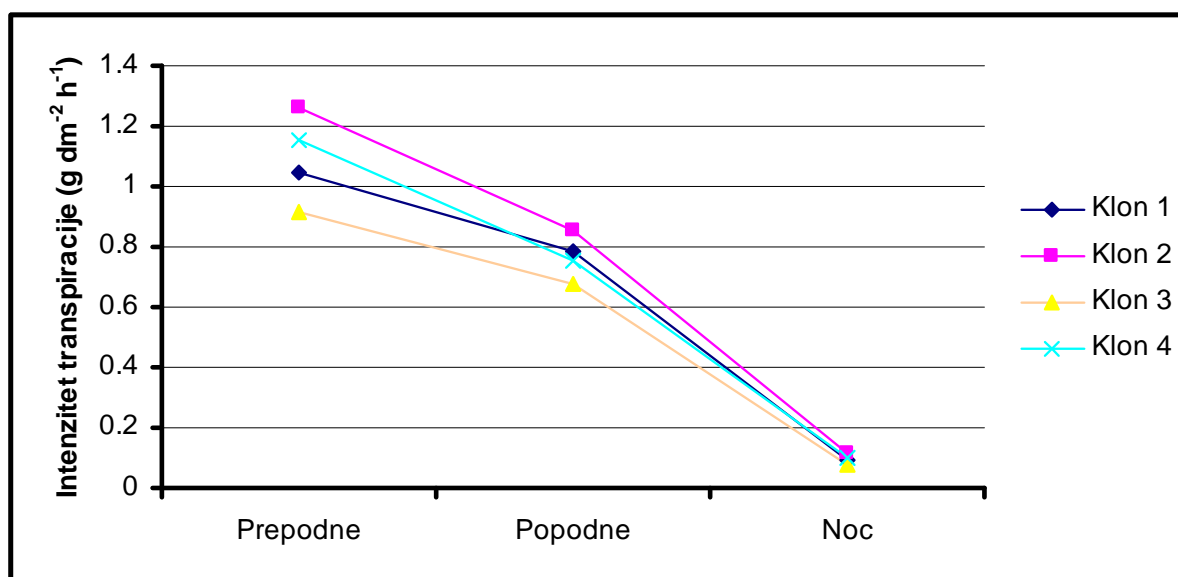
Slika 59. Prosečna masa lista u zavisnosti od tretmana teškim metalima koncentracije 10^{-5} M (NZR – 0,014)



Slika 60. Prosečna površina lista u zavisnosti od tretmana teškim metalima koncentracije 10^{-5} M (NZR – 1,15)

5.2. Uticaj Cd, Ni i Pb-EDTA na intenzitet transpiracije

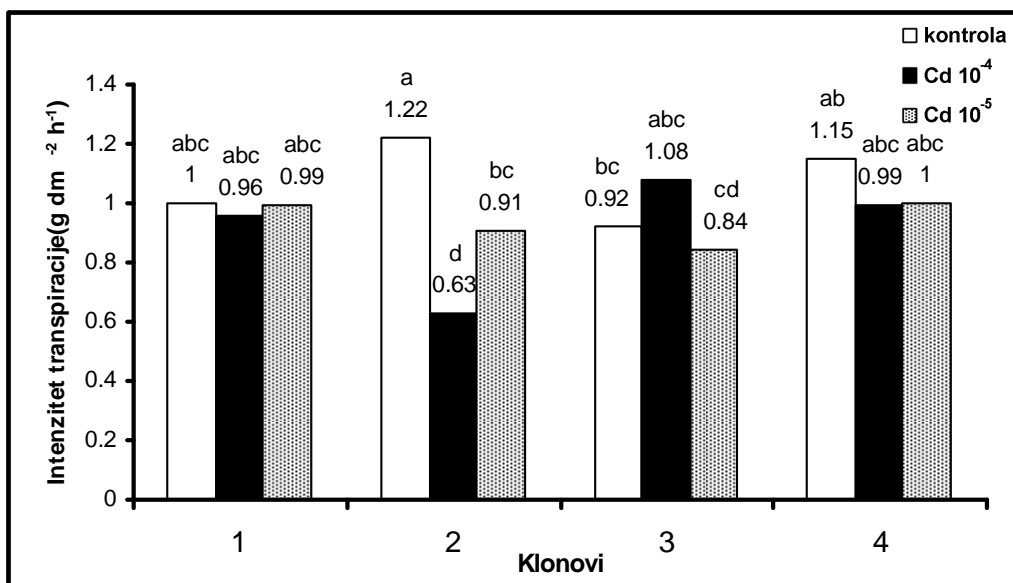
Intenzitet transpiracije je bio najveći u prepodnevnom periodu, sa tendencijom opadanja tokom popodnevnog perioda, dok je u toku noći bio na najnižem nivou (Slika 61). Ovakva dinamika promene transpiracije tokom 24 sata dnevno imala je isti obrazac pod uticajem svih primenjenih tretmana.



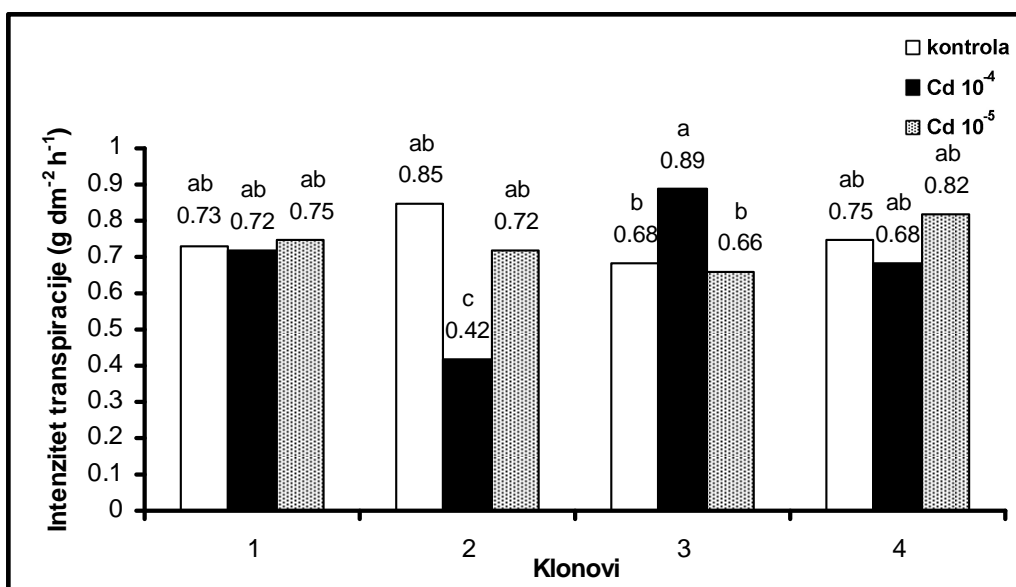
Slika 61. Intenzitet transpiracije kontrolnih biljaka u zavisnosti od perioda dana

Pod uticajem Cd u toku prepodneva, intenzitet transpiracije značajno je opao samo kod klona 2 (Slika 62).

U popodnevnom periodu, prisustvo Cd je takođe značajno smanjilo transpiraciju biljaka klona 2, dok je kod klona 3, pod uticajem veće koncentracije Cd (10^{-4} M) došlo do povećanja intenziteta transpiracije (Slika 63).

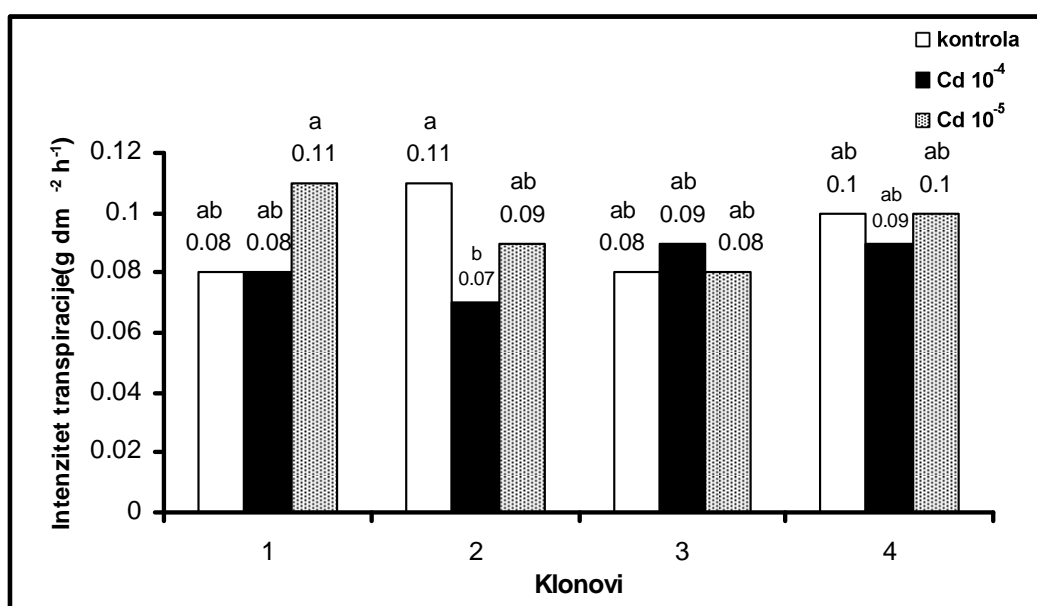


Slika 62. Intenzitet transpiracije u zavisnosti od tretmana Cd u periodu od 07-13h
(NZR = 0,25)



Slika 63. Intenzitet transpiracije u zavisnosti od tretmana Cd u periodu od 13-19h
(NZR = 0,20)

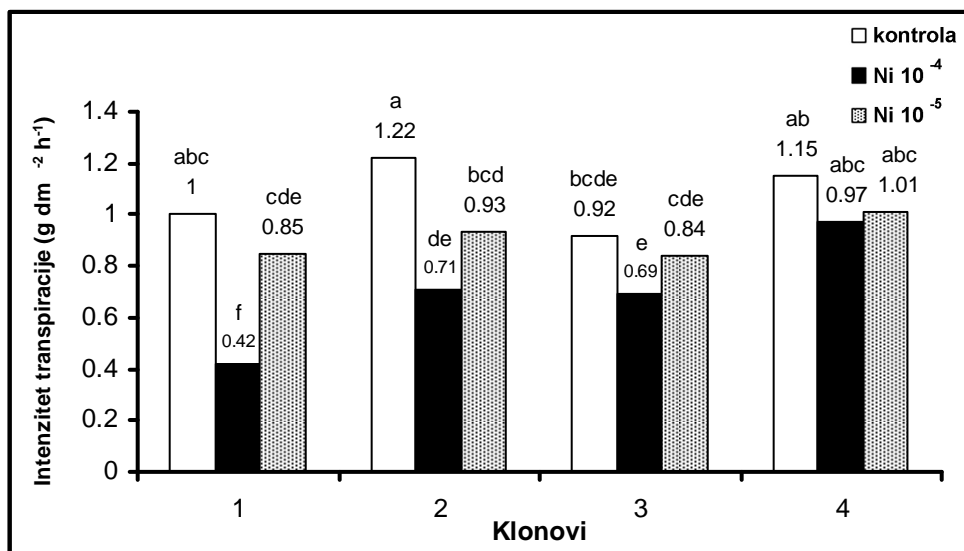
U toku noći intenzitet transpiracije je opao na zanemarljivo malu vrednost, usled čega razlike u intenzitetu transpiracije između tretmana nisu pokazale statističku značajnost (Slika 64).



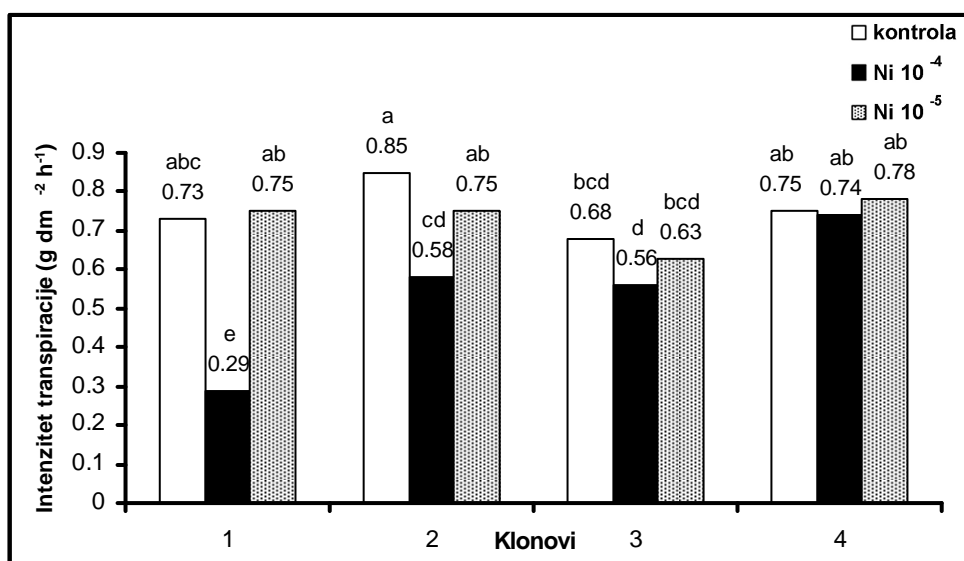
Slika 64. Intenzitet transpiracije u zavisnosti od tretmana Cd u periodu od 19-07h (NZR = 0,04)

Pod uticajem tretmana većom koncentracijom Ni (10^{-4} M) kod klonova 1 i 2 je došlo do značajnog opadanja intenziteta transpiracije, što nije bio slučaj za klonove 3 i 4 (Slika 65). Klon 1 imao je najmanju vrednost intenziteta transpiracije pod uticajem tretmana. Klon 2 imao je značajno manju transpiraciju u odnosu na kontrolne biljke kod oba primenjena tretmana Ni.

Intenzitet transpiracije u toku popodneva varirao je u korelaciji sa prepodnevnim periodom (Slika 66). Klonovi 1 i 2 su jedini imali značajno opadanje transpiracije, dok kod klonova 3 i 4 nije bilo značajnih promena.

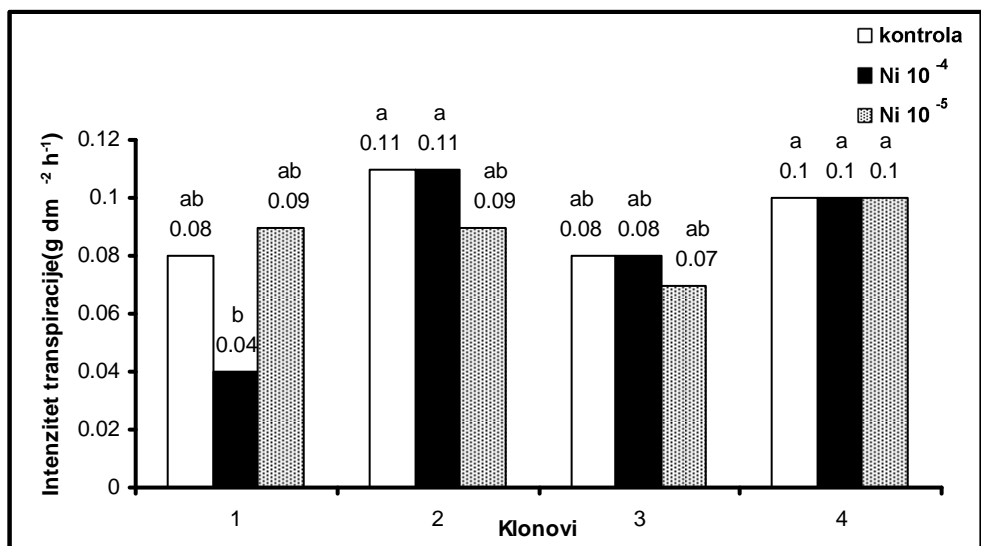


Slika 65. Intenzitet transpiracije u zavisnosti od tretmana Ni u periodu od 07-13h (NZR = 0.23)



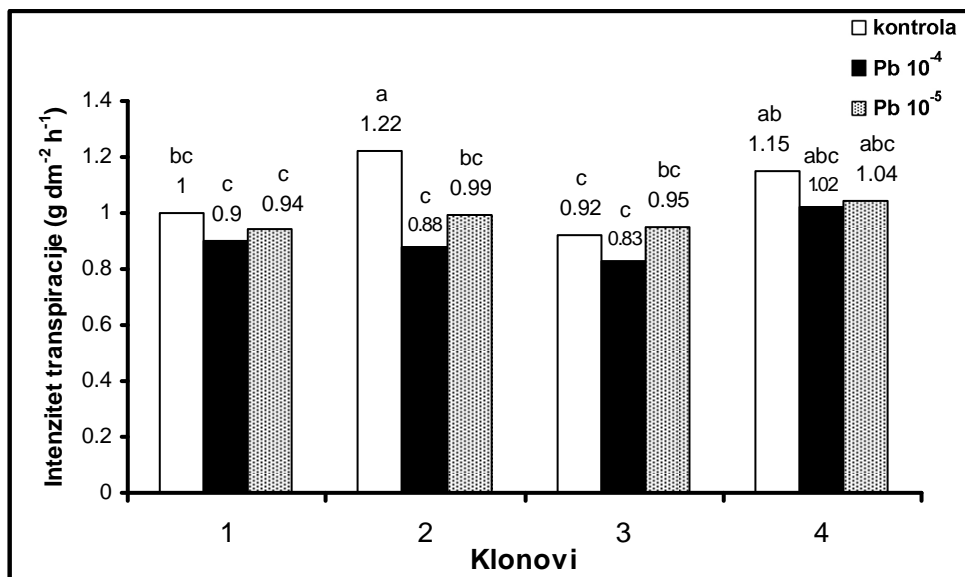
Slika 66. Intenzitet transpiracije u zavisnosti od tretmana Ni u periodu od 13-19h (NZR = 0.15)

U toku noći tretman Ni nije doveo do značajnih promena u intenzitetu transpiracije koji je opao za nekoliko puta u odnosu na dnevni period (Slika 67).



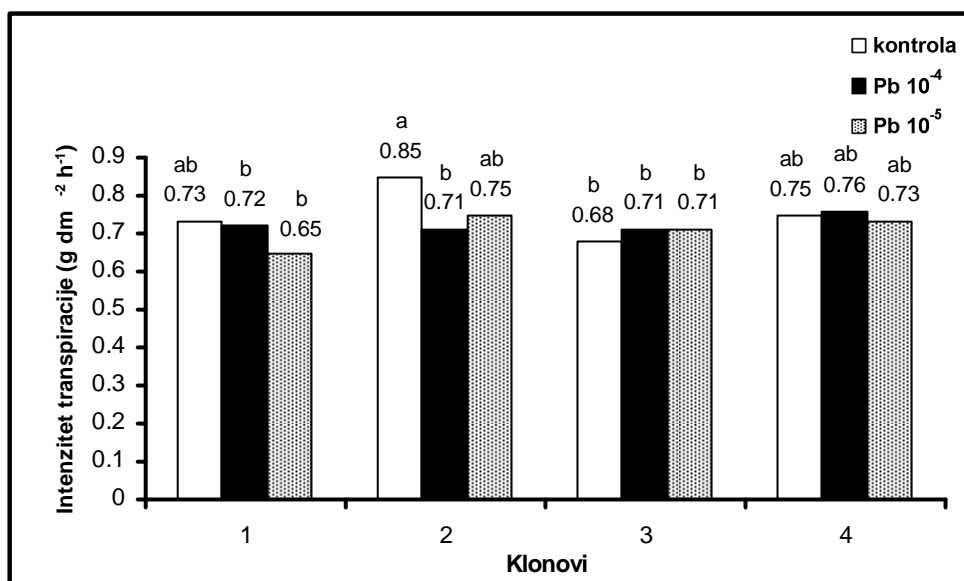
Slika 67. Intenzitet transpiracije u zavisnosti od tretmana Ni u periodu od 19-07h (NZR = 0.06)

Tretman Pb-EDTA doveo je do značajnog smanjenja intenziteta transpiracije u odnosu na kontrolni tretman samo kod klona 2 i to pri obe primenjene koncentracije Pb-EDTA (Slika 68).



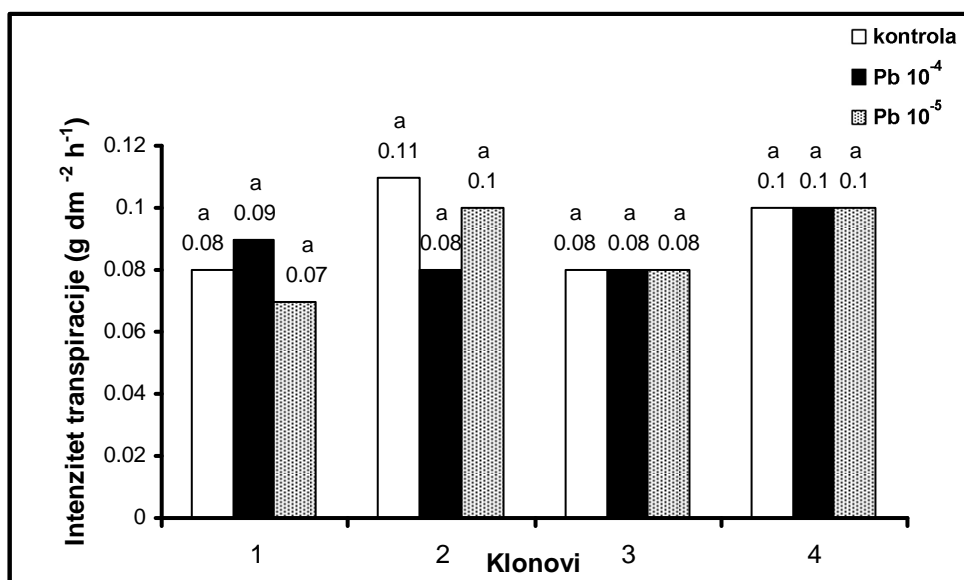
Slika 68. Intenzitet transpiracije u zavisnosti od tretmana Pb-EDTA u periodu od 07-13h (NZR = (0.02)

U toku popodneva, tretman Pb-EDTA doveo je do značajnog smanjenja transpiracije samo kod klona 2 pod uticajem koncentracije 10⁻⁴ M (Slika 69).



Slika 69. Intenzitet transpiracije u zavisnosti od tretmana Pb-EDTA u periodu od 13-19h (NZR = 0.12)

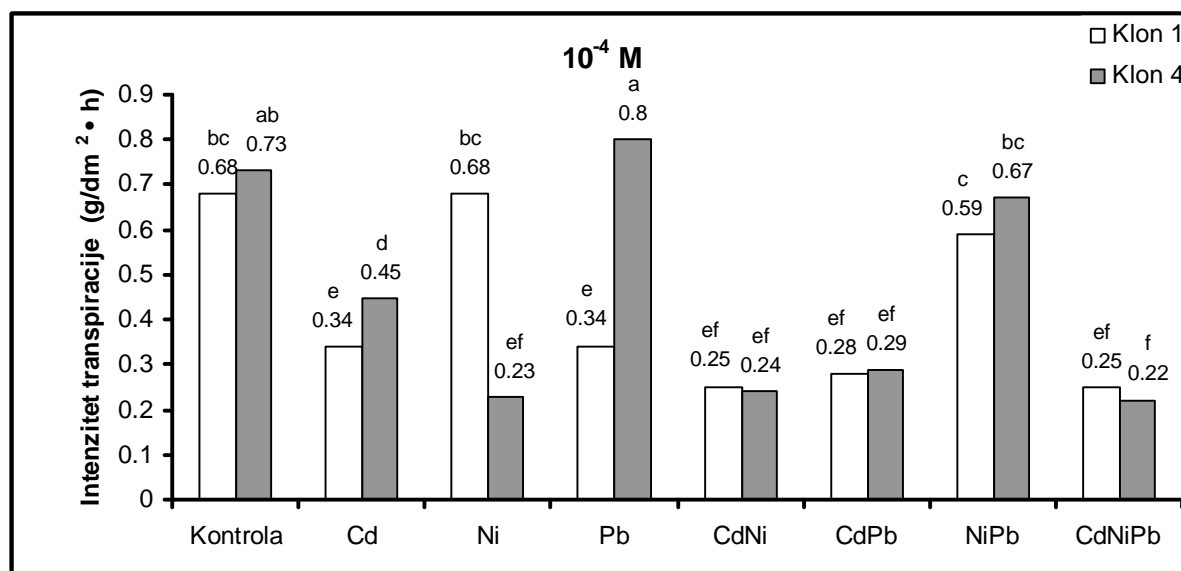
U toku noći, kao i pri tretmanima Cd i Ni, Pb-EDTA nije uticalo na značajne promene u intenzitetima transpiracije između tretmana i klonova (Slika 70).



Slika 70. Intenzitet transpiracije u zavisnosti od tretmana Pb-EDTA u periodu od 19-07h (NZR = 0.05)

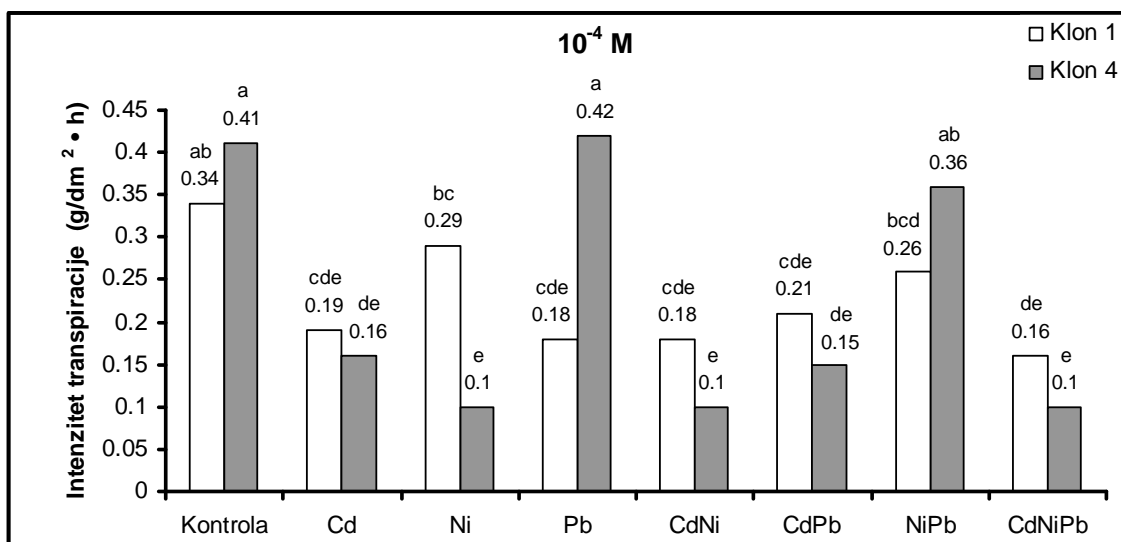
5.2.1. Uticaj kombinovanih tretmana teških metala na intenzitet transpiracije

Intenzitet transpiracije u prepodnevnom periodu je najznačajnije opao na tretmanima Cd+Ni, Cd+Pb i Cd+Ni+Pb (Slika 71). Takođe, kod klona 1, transpiracija je bila u istom nivou značajnosti sa najnižim vrednostima tretmana Cd i Pb, a kod klona 4 na tretmanu Ni.



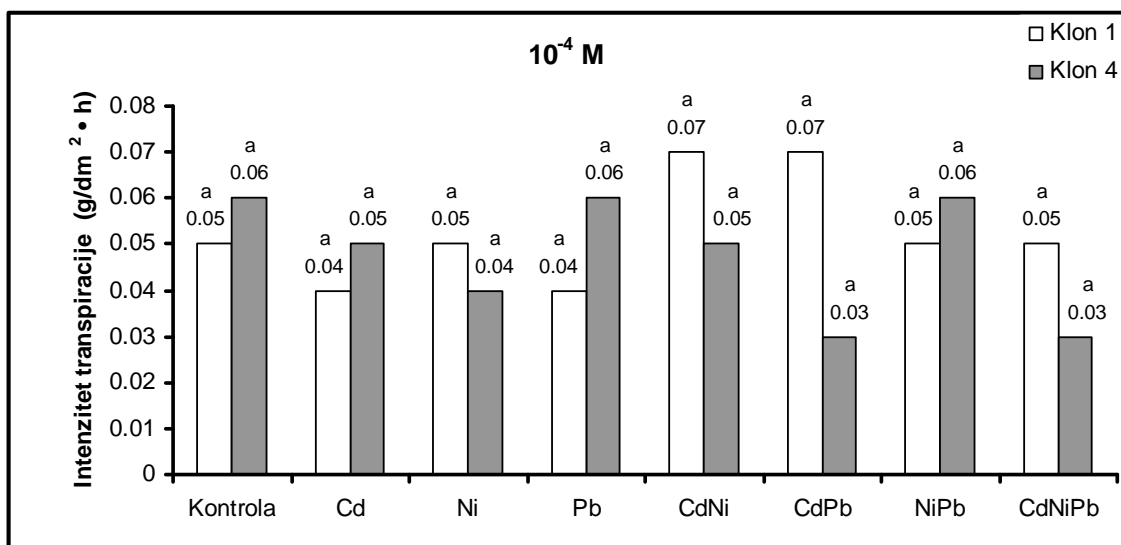
Slika 71. Intenzitet transpiracije u zavisnosti od tretmana teškim metalima koncentracije 10^{-4} M u periodu od 07-13h (NZR = 0,10)

Odnosi između uticaja tretmana na intenzitet transpiracije u popodnevnom periodu bili su u potpunoj korelaciji sa prepodnevnim periodom (Slika 72). Vrednosti intenziteta transpiracije u toku popodneva su bile manje u odnosu na prepodne za sve primenjene tretmane.



Slika 72. Intenzitet transpiracije u zavisnosti od tretmana teškim metalima koncentracije 10⁻⁴ M u periodu od 13-19h (NZR = 0,16)

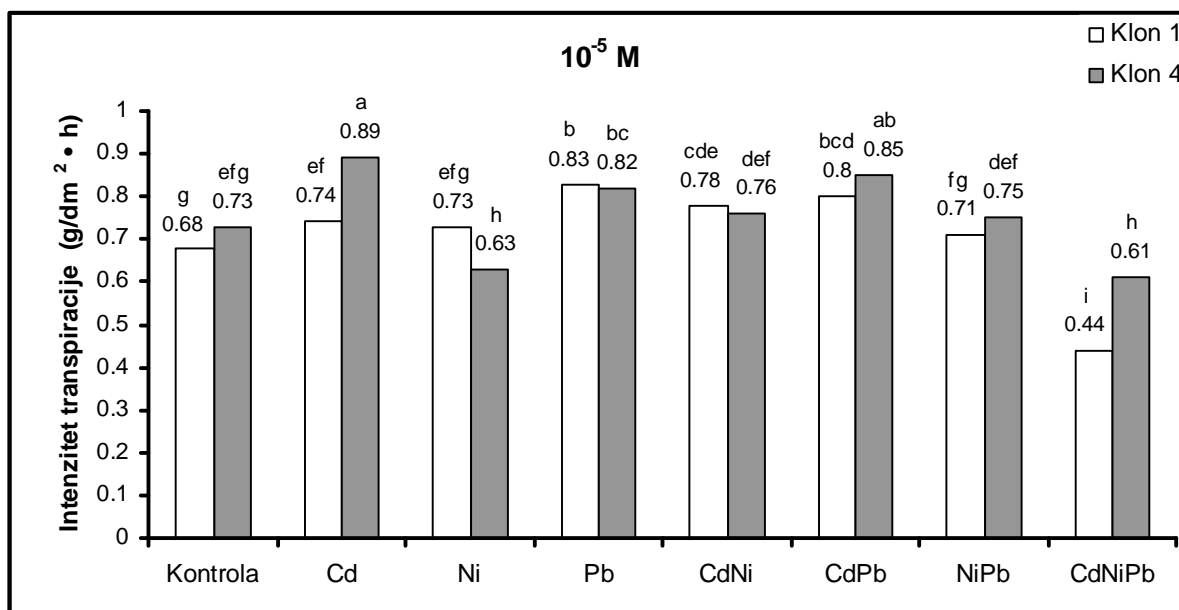
U toku noći, intenzitet transpiracije je imao vrlo niske vrednosti između kojih nije bilo značajnih razlika (Slika 73).



Slika 73. Intenzitet transpiracije u zavisnosti od tretmana teškim metalima koncentracije 10⁻⁴ M u periodu od 19-07h (NZR = 0,04)

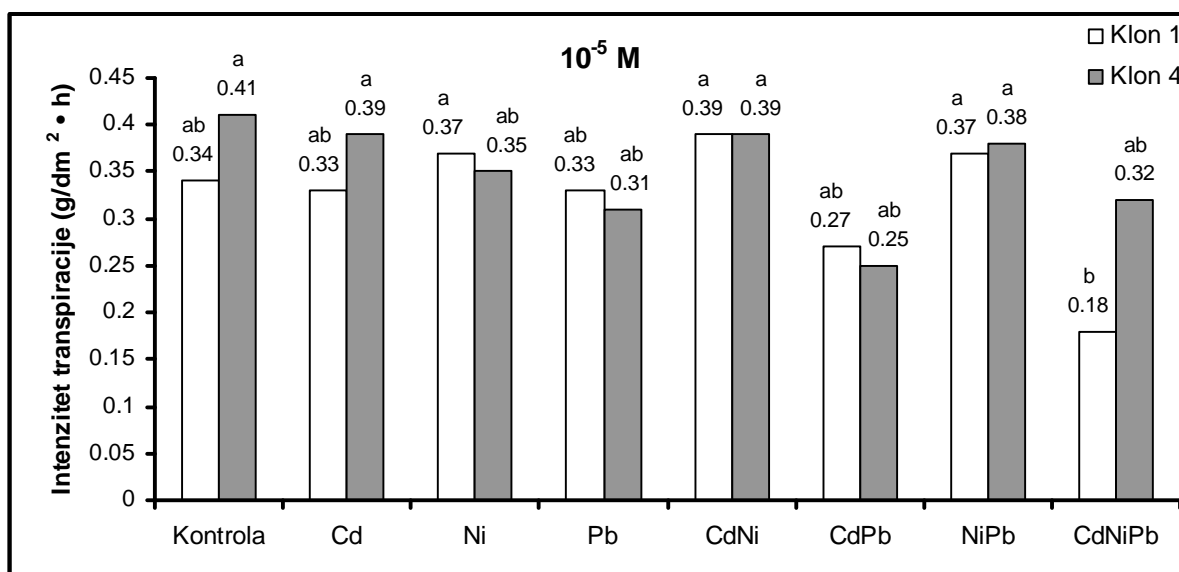
Intenzitet transpiracije u toku prepodneva je opao u manjoj meri na tretmanima teških metala koncentracije 10⁻⁵ M, u poređenju sa koncentracijom 10⁻⁴ M, te su i razlike između tretmana manje značajne (Slika 74). Kod klona 1 intenzitet transpiracije se značajno povećao na tretmanima Cd, Pb, Cd+Ni i Cd+Pb, a kod klona 4 na tretmanima Cd, Pb i Cd+Pb. Značajno opadanje praćenog parametra

utvrđeno je kod klona 1 na tretmanu Cd+Ni+Pb, a kod klona 4 na tretmanima Ni i Cd Ni+Pb.



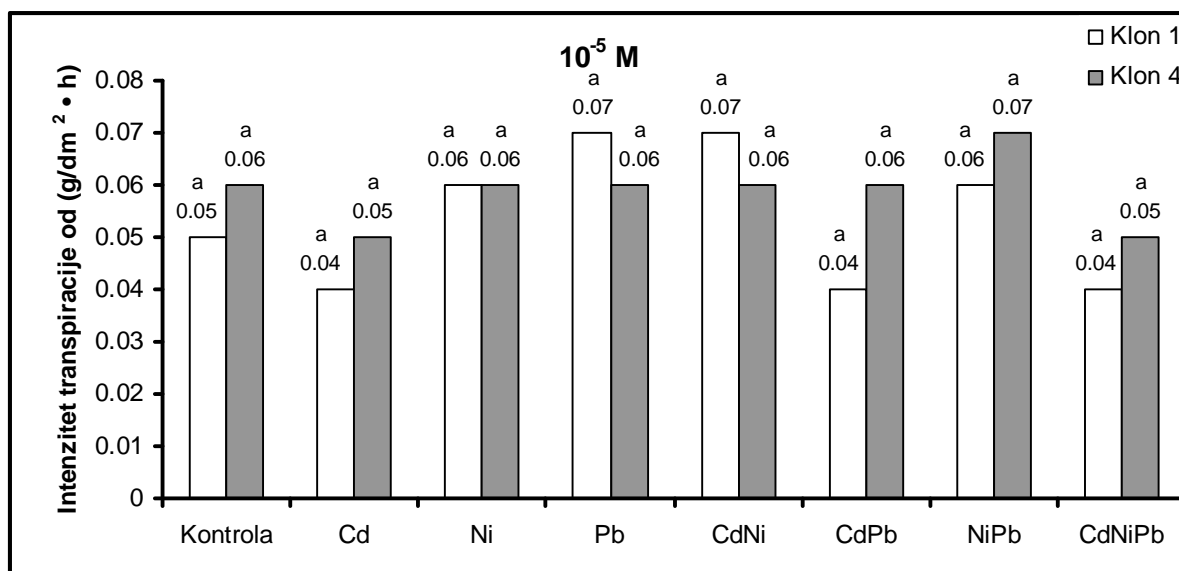
Slika 74. Intenzitet transpiracije u zavisnosti od tretmana teškim metalima koncentracije 10⁻⁵ M u periodu od 07-13h (NZR = 0,4927)

U toku popodneva, teški metali koncentracije 10⁻⁵ M nisu uticali na statistički značajnu promenu intenziteta transpiracije kod oba ispitivana klona (Slika 75), a vrednosti su bile značajno manje u odnosu na prepodnevni period.



Slika 75. Intenzitet transpiracije u zavisnosti od tretmana teškim metalima koncentracije 10⁻⁵ M u periodu od 13-19h (NZR = 0,169)

Pod uticajem teških metala koncentracija 10^{-5} M, u toku noći intenzitet transpiracije se održavao na niskom nivou, bez značajnih razlika među tretmanima i genotipovima, kao i pri primeni veće koncentracije od 10^{-4} M (Slika 76).



Slika 76. Intenzitet transpiracije u zavisnosti od tretmana teškim metalima koncentracije 10^{-5} M u periodu od 19-07h (NZR = 0,04)

5.3. Koncentracija pigmenata pod uticajem teških metala

Koncentracija pigmenata u mladim listovima je značajno opala pod uticajem tretmana Cd na obe primenjene koncentracije (Tabela 3). Izuzetak je koncentracija hlorofila *b* kod klonova 2 i 3 kada nije bilo statistički značajnog smanjenja koncentracije ovog pigmenta u odnosu na kontrolne biljke. Međutim, u ovom slučaju koncentracija pigmenata u kontrolnim biljkama je takođe bila značajno niža u odnosu na klonove 1 i 4.

Tabela 3. Uticaj Cd na koncentraciju pigmenata u mladim listovima

Klon	Tretman	Hlorofil a	Hlorofil b	Hlorofil a + b	Karotenoidi
	Cd (M)	mg/g suve materije			
1	0	9.89 c	2.87 a	12.45 b	2.55 d
	10 ⁻⁴	1.12 j	0.38 d	1.57 h	0.35 j
	10 ⁻⁵	1.73 hi	0.38 d	2.07 gh	0.68 i
2	0	11.01 b	1.43 bc	12.47 b	3.58 b
	10 ⁻⁴	6.99 d	1.13 c	8.19 c	2.12 e
	10 ⁻⁵	1.52 ij	0.62 d	2.11 gh	0.54 i
3	0	11.96 a	1.57 b	13.32 a	3.77 a
	10 ⁻⁴	3.31 f	1.33 bc	4.80 e	1.13 g
	10 ⁻⁵	4.01 e	1.54 b	5.59 d	1.34 f
4	0	10.61 b	3.14 a	13.58 a	2.85 c
	10 ⁻⁴	2.78 g	0.63 d	3.40 f	0.98 h
	10 ⁻⁵	2.18 h	0.75 d	2.83 fg	0.68 i
NZR		0.49	0.35	0.78	0.14

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za p<0.05

Uticaj Cd na starije listove takođe je doveo do opadanja koncentracije pigmenata (Tabela 4). Značajnih razlika nije bilo jedino kod klona 3 za hlorofil b i karotenoide. Međutim, smanjenje koncentracije fotosintetičkih pigmenata u starim listovima bilo je manje izraženo u odnosu na mlade listove. U mladim listovima koncentracija pigmenata je u većini slučajeva opala za više od dva puta (često i više) u odnosu na kontrolu, što kod starijih listova, uz neke izuzetke, nije bio slučaj.

Tabela 4. Uticaj Cd na koncentraciju pigmenata u starim listovima

Klon	Tretman	Hlorofil a	Hlorofil b	Hlorofil a + b	Karotenoidi
	Cd (M)	mg/g suve materije			
1	0	11.39 a	3.08 a	14.12 a	2.95 b
	10 ⁻⁴	7.07 cd	1.45 cd	8.46 cd	2.25 cd
	10 ⁻⁵	6.55 de	2.39 b	9.04 cd	1.92 def
2	0	12.17 a	1.37 cd	13.57 a	3.82 a
	10 ⁻⁴	1.04 g	0.34 e	1.42 g	0.33 h
	10 ⁻⁵	6.22 de	2.36 b	8.71 cd	1.76 efg
3	0	8.74 b	2.32 b	11.03 b	2.33 c
	10 ⁻⁴	4.16 f	1.50 cd	5.89 f	1.43 g
	10 ⁻⁵	6.94 cd	2.34 b	9.29 cd	2.04 cde
4	0	8.11 bc	2.24 b	9.97 bc	2.11 cde
	10 ⁻⁴	5.62 e	1.25 d	6.74 ef	1.75 efg
	10 ⁻⁵	6.10 de	1.73 c	7.90 de	1.64 fg
NZR		1.15	0.44	1.48	0.34

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za p<0.05

Tretman većom koncentracijom Ni (10^{-4} M) doveo je do značajnog smanjenja koncentracije pigmenata u mladim listovima sa jednim izuzetkom za hlorofil *b* kod klona 3, koji je i u kontrolnim biljkama imao značajno manju koncentraciju pigmenata u odnosu na ostale klonove (Tabela 5).

Tabela 5. Uticaj Ni na koncentraciju pigmenata u mladim listovima

Klon	Tretman	Hlorofil a	Hlorofil b	Hlorofil a + b	Karotenoidi
	Ni (M)	mg/g suve materije			
1	0	9.89 bcd	2.87 b	12.45 bc	2.55 bc
	10^{-4}	5.11 e	0.33 d	5.51 d	1.50 e
	10^{-5}	10.66 abc	3.55 a	14.43 a	2.54 bc
2	0	11.01 ab	1.43 c	12.47 bc	3.58 a
	10^{-4}	2.50 f	0.45 d	2.95 e	0.84 f
	10^{-5}	8.83 d	3.07 b	12.05 bc	2.18 cd
3	0	11.96 a	1.57 c	13.32 ab	3.77 a
	10^{-4}	4.86 e	1.29 c	6.38 d	1.21 ef
	10^{-5}	9.34 cd	2.95 b	12.24 bc	2.31 cd
4	0	10.61 abc	3.14 ab	13.58 ab	2.85 b
	10^{-4}	4.76 e	1.24 c	6.08 d	0.98 f
	10^{-5}	8.63 d	2.85 b	11.54 c	2.05 d
NZR		1.32	0.46	1.64	0.37

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za $p < 0.05$

Manja koncentracija Ni (10^{-5} M) u nekoliko slučajeva kod svih klonova nije dovela do značajnog smanjenja sadržaja pigmenata, a kod klona 3 došlo je do signifikantnog povećanja koncentracije hlorofila *b* u odnosu na kontrolu.

Smanjenje koncentracije pigmenata pod uticajem Ni u starim listovima nije bilo tako izraženo kao kod mladih listova (Tabela 6). Primenom veće koncentracije nije utvrđeno značajno smanjenje nivoa hlorofila *a* i *b* kod klona 3 i hlorofila *b* kod klona 4. Manja koncentracija nikla (10^{-5} M) nije dovela do statistički značajnog smanjenja koncentracije pigmenata kod klonova 1 i 4, dok je kod klonova 2 i 3 utvrđeno stimulatивно delovanje na sintezu pigmenata.

Tabela 6. Uticaj Ni na koncentraciju pigmentata u starim listovima

Klon	Tretman	Hlorofil a	Hlorofil b	Hlorofil a + b	Karotenoidi
	Ni (M)	mg/g suve materije			
1	0	11.39 ab	3.08 b	14.12 ab	2.95 b
	10 ⁻⁴	7.76 c	0.73 e	8.53 d	2.47 cd
	10 ⁻⁵	11.91 ab	3.84 ab	15.88 a	3.05 b
2	0	12.17 a	1.37 d	13.57 b	3.82 a
	10 ⁻⁴	6.20 d	1.96 c	8.10 d	1.62 fg
	10 ⁻⁵	10.54 b	3.58 ab	14.12 ab	2.46 cd
3	0	8.74 c	2.32 c	11.03 c	2.33 d
	10 ⁻⁴	7.24 cd	2,39 c	9.62 cd	1.86 ef
	10 ⁻⁵	11.78 ab	2.50 ab	15.18 ab	2.86 bc
4	0	8.11 c	2.24 c	9.97 cd	2.11 de
	10 ⁻⁴	6.18 d	2.10 c	8.31 d	1.33 g
	10 ⁻⁵	7.43 cd	2.24 c	9.50 cd	1.79 ef
NZR		1.48	0.48	1.87	0.43

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za $p < 0.05$

Tretman Pb-EDTA nije doveo do statistički značajnog smanjenja koncentracije pigmentata u mladim listovima, sa nekoliko izuzetaka (Tabela 7). Kod klonova 1 i 2, Pb-EDTA je stimulatивно delovalo na sintezu pigmentata, ali nisu dokazane signifikantne razlike.

Tabela 7. Uticaj Pb-EDTA na koncentraciju pigmentata u mladim listovima

Klon	Tretman	Hlorofil a	Hlorofil b	Hlorofil a + b	Karotenoidi
	Pb-EDTA (M)	mg/g suve materije			
1	0	11.27 abc	3.46 a	14.75 abc	2.87 bc
	10 ⁻⁴	9.29 de	2.76 b	12.13 d	2.42 cd
	10 ⁻⁵	12.65 a	3.47 a	16.04 a	3.21 ab
2	0	12.59 ab	3.75 a	16.30 a	3.33 ab
	10 ⁻⁴	12.16 ab	3.38 a	15.70 a	3.25 ab
	10 ⁻⁵	12.74 a	3.54 a	16.32 a	3.61 a
3	0	11.55 abc	3.39 a	14.96 ab	3.16 ab
	10 ⁻⁴	10.79 bcd	3.71 a	14.63 abc	2.35 de
	10 ⁻⁵	7.43 f	3.40 a	11.34 d	1.87 e
4	0	10.20 cde	3.90 a	12.42 cd	2.27 de
	10 ⁻⁴	8.52 ef	2.36 b	10.65 d	2.06 de
	10 ⁻⁵	8.76 ef	3.68 a	12.55 bcd	1.97 de
NZR		1.72	0.61	2.35	0.50

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za $p < 0.05$

Koncentracija pigmentata u starim listovima takođe nije značajno opala, sa nekoliko izuzetaka (Tabela 8). Klon 2 je bio najmanje tolerantan na tretman Pb-EDTA, dok je kod klona 3 utvrđen stimulativni efekat na koncentraciju pigmentata.

Tabela 8. Uticaj Pb-EDTA na koncentraciju pigmentata u starim listovima

Klon	Tretman	Hlorofil a	Hlorofil b	Hlorofil a + b	Karotenoidi
	Pb-EDTA (M)	mg/g suve materije			
1	0	11.11 bc	3.96 abc	14.99 b	2.85 bc
	10 ⁻⁴	11.53 b	3.11 cde	15.00 b	3.12 abc
	10 ⁻⁵	9.42 b	2.60 e	12.02 c	2.65 bc
2	0	14.93 a	4.60 a	19.44 a	3.89 a
	10 ⁻⁴	12.46 b	3.77 abcd	16.38 b	2.87 bc
	10 ⁻⁵	12.45 b	3.45 bcde	15.89 b	3.17 ab
3	0	12.09 b	3.32 cde	15.29 b	3.23 ab
	10 ⁻⁴	11.81 b	4.09 abc	16.23 b	2.54 bc
	10 ⁻⁵	6.32 e	4.59 ab	10.75 c	2.57 bc
4	0	9.05 d	2.74 de	11.75 c	2.58 bc
	10 ⁻⁴	9.58 d	2.60 e	11.83 c	2.36 c
	10 ⁻⁵	9.95 cd	2.43 e	12.39 c	2.69 bc
NZR		1.428	1.078	1.998	0.7422

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za $p < 0.05$

5.3.1. Uticaj kombinovanih tretmana teških metala na koncentraciju pigmentata

Kombinovani i pojedinačni tretmani teških metala koncentracije 10⁻⁴ M su doveli do značajnog opadanja koncentracije svih pigmentata u mladim listovima kod oba klona (Tabela 9). Izuzetak je tretman Pb koji je kod klona 1 stimulativno delovao na koncentraciju svih analiziranih pigmentata. Koncentracija pigmentata je bila genotipski specifična. Najnižu koncentraciju pigmentata u mladim listovima klon 1 je imao na tretmanu Cd, a klon 4 na tretmanu Ni+Pb, zatim na pojedinačnim tretmanima Ni i Cd. Klon 1 je imao signifikantno veći nivo svih pigmentata u odnosu na klon 4, na tretmanu Pb, zatim veći sadržaj hlorofila *b* i karotenoida na tretmanu Cd+Ni i veći zajednički sadržaj hlorofila *a* i *b* na tretmanu Ni+Pb (vrednosti u tabeli date bold simbolima).

Tabela 9. Uticaj kombinovanih tretmana teških metala koncentracije 10^{-4} M na koncentraciju pigmenata u mladim listovima

Klon	Tretman	Hlorofil a	Hlorofil b	Hlorofil a+b	Karotenoidi
	10^{-4} M	mg/g suve materije			
1	Kontrola	9.83 b	2.89 b	12.54 b	2.65 c
	Cd	1.62 f	0.54 h	2.16 h	0.61 h
	Ni	4.17 de	1.12 fg	5.28 ef	1.42 ef
	Pb	13.03 a	3.62 a	16.95 a	3.66 a
	Cd Ni	5.43 d	1.59 e	7.02 d	1.93 d
	Cd Pb	3.49 e	1.10 fg	4.59 fg	1.18 fg
	Ni Pb	4.22 de	1.07 fg	5.49 def	1.34 efg
	Cd Ni Pb	4.88 d	1.29 ef	6.17 def	1.91 d
4	Kontrola	10.47 b	2.76 bc	13.23 b	3.19 b
	Cd	4.42 de	1.30 ef	5.72 def	1.38 ef
	Ni	3.44 e	1.05 fg	4.50 fg	1.15 fg
	Pb	8.12 c	2.35 d	10.52 c	2.09 d
	Cd Ni	4.48 de	1.31 i	5.79 def	1.59 e
	Cd Pb	5.01 d	1.36 ef	6.37 de	1.46 ef
	Ni Pb	3.34 e	0.77 gh	3.46 gh	1.05 g
	Cd Ni Pb	7.02 c	2.39 cd	9.41 c	2.43 c
NZR		1,19	0,39	1,56	0,30

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za $p < 0.05$
vrednosti označene bold simbolima su značajno veće u odnosu na isti tretman drugog klona

Klon 4 je imao statistički značajno veće vrednosti koncentracija svih pigmenata u mladim listovima u poređenju sa klonom 1, na tretmanima Cd i Cd+Ni+Pb, kao i hlorofila a na tretmanu Cd (Tabela 9).

U starim listovima, teški metali koncentracije 10^{-4} M su takođe doveli do smanjenja koncentracije pigmenata, ali u manjoj meri nego u mladim listovima (Tabela 10). Tretman Pb je kod klona 1 takođe stimulisao sintezu pigmenata u odnosu na kontrolu (osim hlorofila a, gde nije bilo signifikantnih razlika), dok je kod klona 4 sadržaj pigmenata pod uticajem ovog tretmana bio jednak sa kontrolom ili niži za jedan nivo značajnosti.

Tabela 10. Uticaj kombinovanih tretmana teških metala koncentracije 10^{-4} M na koncentraciju pigmentata u starim listovima

Klon	Tretman	Hlorofil <i>a</i>	Hlorofil <i>b</i>	Hlorofil <i>a+b</i>	Karotenoidi
	10^{-4} M	mg/g suve materije			
1	Kontrola	12.05 ab	2.84 b	14.89 b	3.13 b
	Cd	4.64 e	1.44 de	6.08 f	1.69 fg
	Ni	6.60 d	1.65 d	8.24 e	1.88 ef
	Pb	13.16 a	3.49 a	16.98 a	3.41 a
	Cd Ni	4.97 e	1.65 d	6.63 f	1.91 ef
	Cd Pb	7.45 cd	2.19 c	9.65 d	2.23 cd
	Ni Pb	4.61 e	1.07 ef	6.00 f	1.37 h
	Cd Ni Pb	4.64 e	1.69 d	6.00 f	1.91 ef
4	Kontrola	12.71 ab	3.35 a	16.19 a	3.50 a
	Cd	4.72 e	1.54 d	6.25 f	1.68 fg
	Ni	7.13 cd	2.19 c	9.33 de	2.09 de
	Pb	11.87 b	3.35 a	15.00 b	3.08 b
	Cd Ni	4.65 e	1.62 d	6.27 f	1.53 gh
	Cd Pb	7.80 c	2.33 c	10.14 cd	2.20 cd
	Ni Pb	5.22 e	0.77 f	6.69 f	1.50 gh
	Cd Ni Pb	8.20 c	2.20 c	11.03 c	2.43 c
NZR		1,07	0,41	1,16	0,25

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za $p < 0.05$
vrednosti označene bold simbolima su značajno veće u odnosu na isti tretman drugog klona

Najmanje vrednosti oba klona su imala na tretmanima Ni+Pb, pa zatim tretmanima Cd, i Cd+Ni, a klon 1 i na tretmanu Cd+Ni+Pb. Klon 1 je imao značajno veću koncentraciju pigmentata (osim hlorofila *b*) u odnosu na klon 4 na tretmanu Pb, i karotenoida na tretmanu Cd+Ni, a klon 4 na kontrolnom tretmanu (osim hlorofila *a*), zatim na tretmanu Cd+Ni+Pb i veći nivo hlorofila *b* na tretmanu Ni.

Rastvori teških metala koncentracije 10^{-5} M su u mladim listovima značajno smanjili koncentraciju svih pigmentata u odnosu na kontrolu kod klona 4, kod klona 1 nije bilo razlika na tretmanu Ni, dok je tretman Pb delovao stimulatивно (Tabela 11). Najmanje vrednosti koncentracija analiziranih pigmentata kod oba klona su utvrđene na tretmanima Cd, Cd+Pb i Cd+Ni+Pb, a kod klona 4 i na tretmanu Cd+Ni. U poređenju dva ispitivana genotipa na istim tretmanima, klon 1 je imao veći sadržaj pigmentata u mladim listovima na tretmanima Ni, Pb i Ni+Pb, a klon 4 na tretmanima Cd, Cd+Pb i Cd+Ni+Pb.

Tabela 11. Uticaj kombinovanih tretmana teških metala koncentracije 10^{-5} M na koncentraciju pigmenata u mladim listovima

Klon	Tretman	Hlorofil a	Hlorofil b	Hlorofil a+b	Karotenoidi
	10^{-5} M	mg/g suve materije			
1	Kontrola	9.83 b	2.89 b	12.54 b	2.65 b
	Cd	1.98 h	0.53 gh	2.51 f	0.70 g
	Ni	9.64 bc	2.91 b	12.55 b	2.72 b
	Pb	12.16 a	3.40 a	15.67 a	3.29 a
	Cd Ni	3.41 fg	1.04 e	4.45 e	1.15 f
	Cd Pb	1.84 h	0.41 h	2.25 f	0.64 g
	Ni Pb	8.69 cd	2.47 c	11.17 c	2.59 bc
	Cd Ni Pb	2.50 gh	0.65 g	3.15 f	0.84 g
4	Kontrola	10.47 b	2.76 b	13.23 b	3.19 a
	Cd	3.60 f	1.01 ef	4.60 e	1.11 f
	Ni	8.55 d	2.47 c	11.02 c	2.38 cd
	Pb	8.43 d	2.42 c	10.77 c	2.30 d
	Cd Ni	3.39 fg	0.98 ef	4.37 e	1.12 f
	Cd Pb	3.68 f	0.95 ef	4.63 e	1.17 f
	Ni Pb	7.30 e	2.07 d	9.32 d	2.01 e
	Cd Ni Pb	3.61 f	0.84 f	4.45 e	1.17 f
NZR	1,02	0,18	1,09	0,25	

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za $p < 0.05$
vrednosti označene bold simbolima su značajno veće u odnosu na isti tretman drugog klona

U starim listovima je takođe došlo do značajnog opadanja koncentracije pigmenata (Tabela 12). Izuzeci su kod klona 1 tretman Pb, te kod klona 4 tretmani Ni i Pb gde nije došlo do opadanja hlorofila *b* u poređenju sa kontrolom. Najniže vrednosti kod oba klona utvrđene su na tretmanu Cd+Ni Pb, zatim na tretmanima Cd+Ni, Cd+Pb i Cd. Poredeći dva klona, klon 1 je imao značajno veću koncentraciju pigmenata na tretmanima Pb, Ni+Pb i Cd (izuzetak je hlorofil *a*), a klon 4 na kontrolnom tretmanu (izuzetak je hlorofil *a*) i na tretmanu Ni (koncentracije hlorofila *b* i hlorofila *a+b*).

Tabela 12. Uticaj kombinovanih tretmana teških metala koncentracije 10^{-5} M na koncentraciju pigmentata u starim listovima

Klon	Tretman	Hlorofil a	Hlorofil b	Hlorofil a+b	Karotenoidi
	10^{-5} M	mg/g suve materije			
1	Kontrola	12.05 a	2.84 c	14.89 b	3.13 bc
	Cd	7.32 e	2.51 d	9.83 fg	2.45 f
	Ni	9.30 cd	2.43 def	11.72 de	2.53 ef
	Pb	12.91 a	3.48 a	16.46 a	3.30 ab
	Cd Ni	5.95 fgh	2.14 efgh	8.09 ijk	1.98 gh
	Cd Pb	7.01 ef	2.27 defg	9.27 gh	2.07 g
	Ni Pb	10.06 bc	2.47 de	12.66 cd	2.82 d
	Cd Ni Pb	5.72 gh	1.84 hi	7.57 jk	1.64 ij
4	Kontrola	12.71 a	3.35 ab	16.19 a	3.50 a
	Cd	6.42 efg	2.11 fgh	8.52 hij	2.04 gh
	Ni	10.03 bc	3.06 bc	13.10 c	2.73 de
	Pb	11.01 b	3.14 bc	14.20 b	2.95 cd
	Cd Ni	6.77 efg	2.12 fgh	8.88 ghi	1.92 gh
	Cd Pb	6.37 efg	2.05 gh	8.42 hij	1.80 hi
	Ni Pb	8.45 d	2.07 gh	10.87 ef	2.32 f
	Cd Ni Pb	5.32 h	1.69 i	7.01 k	1.52 j
NZR		1,00	0,32	1,05	0,24

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za $p < 0.05$
vrednosti označene bold simbolima su značajno veće u odnosu na isti tretman drugog klona

Koncentracija pigmentata pod uticajem veće primenjene koncentracije teških metala (10^{-4} M) na kombinovanom tretmanu Cd+Ni, često je bila veća u odnosu na pojedinačan tretman Cd (Tabele 9 – 12).

5.4. Disanje, fotosinteza i fluorescencija hlorofila

Intenziteti disanja i fotosinteze u mladim listovima tretiranim Cd varirali su specifično u zavisnosti od primenjene koncentracije i genotipa (Tabela 13). U svim slučajevima došlo je do statistički značajnog opadanja intenziteta disanja i fotosinteze pod uticajem obe primenjene koncentracije Cd. Ta tendencija je bila značajnije izražena na većoj primenjenoj koncentraciji (10^{-4} M).

Parametar F_v/F_m nije značajno varirao pod uticajem svih tretmana (Tabela 13). Izuzetak je tretman Cd od 10^{-4} M koji je uticao na značajno opadanje ovog parametra.

Tabela 13. Uticaj Cd na disanje, fotosintezu i fluorescenciju hlorofila u mladim listovima

Klon	Tretman	Int. disanja	Int. fotosinteze	Fluorescencija
	Cd (M)	$\mu\text{mol O}_2 \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$		F_v/F_m
1	0	114.27 c	221.62 c	0.736 a
	10^{-4}	63.02 f	136.79 ef	0.687 b
	10^{-5}	72.43 ef	99.35 g	0.741 a
2	0	156.98 a	280.31 a	0.755 a
	10^{-4}	91.42 d	106.54 g	0.758 a
	10^{-5}	142.32 b	250.40 b	0.761 a
3	0	144.52 ab	280.65 a	0.754 a
	10^{-4}	81.94 de	142.86 ef	0.753 a
	10^{-5}	106.05 c	181.83 d	0.748 a
4	0	114.27 c	192.54 d	0.729 a
	10^{-4}	84.02 de	129.40 f	0.754 a
	10^{-5}	136.79 b	151.92 e	0.741 a
NZR		14.07	17.47	0.03

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za $p < 0.05$

Intenziteti disanja i fotosinteze opali su pod uticajem Cd u manjoj meri u starijim listovima u odnosu na mlađe (Tabela 14). Tako nije utvrđena statistički značajna razlika u intenzitetu disanja između kontrolnih i biljaka tretiranih koncentracijom od 10^{-5} M kod klonova 2 i 3.

Fluorescencija hlorofila nije značajno varirala sem kod klona 3 pri većoj koncentraciji Cd (10^{-4} M), gde je utvrđeno narušavanje fotohemijske efikasnosti fotosistema (Tabela 14).

Pod uticajem obe koncentracije nikla značajno su opali intenziteti disanja i fotosinteze kod svih ispitivanih genotipova u mladim listovima (Tabela 15). Ova inhibicija disanja i fotosinteze je bila najviše izražena na koncentraciji 10^{-4} M, naročito kod klonova 3 i 4.

Fluorecencija hlorofila nije značajno varirala pod uticajem tretmana u mladim listovima (Tabela 15).

Tabela 14. Uticaj Cd na disanje, fotosintezu i fluorescenciju hlorofila u starim listovima

Klon	Tretman	Int. disanja	Int. fotosinteze	Fluorescencija
	Cd (M)	$\mu\text{mol O}_2 \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$		F_v/F_m
1	0	121.67 c	213.42 b	0.763 a
	10^{-4}	93.61 def	136.79 ef	0.725 ab
	10^{-5}	142.86 b	182.50 c	0.743 ab
2	0	153.78 ab	211.27 b	0.777 a
	10^{-4}	114.27 cd	152.25 def	0.789 a
	10^{-5}	151.25 ab	176.08 cd	0.760 a
3	0	111.74 cde	228.54 ab	0.720 ab
	10^{-4}	82.36 f	144.52 ef	0.689 b
	10^{-5}	121.00 c	173.44 cd	0.722 ab
4	0	169.68 a	247.87a	0.739 ab
	10^{-4}	90.75 ef	129.06 f	0.729 ab
	10^{-5}	121.00 c	160.65 cde	0.718 ab
NZR		20.57	25.63	0.06

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za $p < 0.05$

Pod uticajem Ni, intenziteti disanja i fotosinteze bili su značajno smanjeni i u starim listovima (Tabela 16), specifično u odnosu na genotip. Fluorescencija je značajno opala samo kod klona 1 (10^{-4} M), ali se ta vrednost parametra F_v/F_m ne smatra indikativnom za potvrđivanje narušavanja fotohemijske efikasnosti.

Tabela 15. Uticaj Ni na disanje, fotosintezu i fluorescenciju hlorofila u mladim listovima

Klon	Tretman	Int. disanja	Int. fotosinteze	Fluorescencija
	Ni (M)	$\mu\text{mol O}_2 \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$		F_v/F_m
1	0	114.05 b	221.28 c	0.737 a
	10^{-4}	55.21 g	128.82 e	0.742 a
	10^{-5}	64.64 f	103.75 ef	0.734 a
2	0	142.00 a	250.73 b	0.755 a
	10^{-4}	45.12 h	80.88 f	0.779 a
	10^{-5}	94.36 c	86.29 f	0.758 a
3	0	144.19 a	280.98 a	0.754 a
	10^{-4}	42.11 hi	20.72 g	0.765 a
	10^{-5}	73.36 e	90.49 f	0.752 a
4	0	113.94 b	175.64 d	0.730 a
	10^{-4}	35.05 i	21.39 g	0.769 a
	10^{-5}	85.63 d	85.62 f	0.736 a
NZR		8.22	25.71	0.05

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za $p < 0.05$

Tabela 16. Uticaj Ni na disanje, fotosintezu i fluorescenciju hlorofila u starim listovima

Klon	Tretman	Int. disanja	Int. fotosinteze	Fluorescencija
	Ni (M)	$\mu\text{mol O}_2 \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$		F_v/F_m
1	0	121.00 b	213.42 b	0.763 ab
	10^{-4}	86.74 c	129.51 c	0.718 b
	10^{-5}	86.29 c	81.76 de	0.775 a
2	0	155.45 a	204.35 b	0.777 a
	10^{-4}	84.22 c	74.56 e	0.768 ab
	10^{-5}	77.23 cd	94.69 de	0.775 a
3	0	110.41 b	228.21 ab	0.720 ab
	10^{-4}	46.96 e	70.15 e	0.733 ab
	10^{-5}	64.98 d	85.96 de	0.737 ab
4	0	169.02 a	248.87 a	0.739 ab
	10^{-4}	25.73 f	108.62 cd	0.764 ab
	10^{-5}	86.29 c	137.67 c	0.749 ab
NZR		14.87	30.70	0.05675

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za $p < 0.05$

Za razliku od Cd i Ni, tretman Pb-EDTA je u značajno manjoj meri narušio intenzitet disanja i fotosinteze u mladim listovima (Tabela 17). Tako kod klonova 1 i 2 nije bilo značajnih razlika između kontrolnih i biljaka tretiranih koncentracijom 10^{-4} M. Kod klona 3 utvrđen je stimulativni efekat na intenzitet disanja.

Tabela 17. Uticaj Pb-EDTA na disanje, fotosintezu i fluorescenciju hlorofila u mladim listovima

Klon	Tretman	Int. disanja	Int. fotosinteze	Fluorescencija
	Pb-EDTA (M)	$\mu\text{mol O}_2 \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$		F_v/F_m
1	0	126.42 abcd	234.40 bc	0.736 a
	10^{-4}	108.48 cdef	264.37 ab	0.745 a
	10^{-5}	91.25 ef	182.50 de	0.742 a
2	0	92.88 ef	234.40 bc	0.755 a
	10^{-4}	95.10 def	261.66 ab	0.747 a
	10^{-5}	133.02 abc	184.17 de	0.742 a
3	0	105.63 cdef	284.33 a	0.754 a
	10^{-4}	155.00 a	234.69 bc	0.747 a
	10^{-5}	145.42 ab	180.31 de	0.745 a
4	0	120.04 bcde	211.25 cd	0.729 a
	10^{-4}	83.54 f	170.39 e	0.716 a
	10^{-5}	82.02 f	130.83 f	0.719 a
NZR		30.77	32.52	0.05

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za $p < 0.05$

Fluorescencija hlorofila se nije značajno menjala u zavisnosti od tretmana (Tabela 17).

U starijim listovima nije bilo značajnog opadanja intenziteta disanja kod klona 1 između kontrole i tretmana Pb-EDTA koncentracije 10^{-4} M, kao i kod klonova 2 i 3 u odnosu na manju koncentraciju 10^{-5} M (Tabela 18). Intenzitet fotosinteze takođe nije signifikantno opao kod klonova 1 i 2.

Mada je signifikantna razlika u parametru F_v/F_m između tretmana utvrđena kod klonova 2 i 4 (veća, tj. manja vrednost parametra), održavanje ovog odnosa iznad 0,7 ukazuje da je fotohemijaska efikasnost fotosistema II bila stabilna (Tabela 18).

Tabela 18. Uticaj Pb-EDTA na disanje, fotosintezu i fluorescenciju hlorofila u starim listovima

Klon	Tretman	Int. disanja	Int. fotosinteze	Fluorescencija
	Pb-EDTA (M)	$\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	$\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	F_v/F_m
1	0	77.46 cde	214.59 b	0.763 ab
	10^{-4}	68.60 def	228.12 ab	0.756 abc
	10^{-5}	65.75 ef	128.85 d	0.761 ab
2	0	87.85 bcd	240.08 ab	0.777 a
	10^{-4}	78.50 cde	229.79 ab	0.752 abc
	10^{-5}	108.19 b	174.79 c	0.742 abc
3	0	91.21 bc	255.19 a	0.720 bc
	10^{-4}	29.35 g	137.54 cd	0.722 abc
	10^{-5}	102.68 b	126.19 d	0.712 bc
4	0	139.17 a	229.69 ab	0.739 abc
	10^{-4}	49.48 f	121.27 d	0.719 bc
	10^{-5}	91.06 bc	158.00 cd	0.703 c
NZR		20.13	37.10	0.06

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za $p < 0.05$

5.4.1. Uticaj kombinovanih tretmana teških metala na intenzitet disanja, fotosinteze i fluorescenciju hlorofila

Brzina razmene kiseonika u mladim listovima je značajno opala pod uticajem kombinovanih i pojedinačnih tretmana teških metala koncentracije 10^{-4} M (Tabela 19). Kod klona 4 nisu utvrđene značajne razlike u intenzitetu disanja između kontrole i tretmana Pb i Cd+Ni, a u intenzitetu fotosinteze na tretmanima Pb i Ni+Pb. Najniži intenziteti disanja utvrđeni su na tretmanima Cd+Pb, a kod klona 4 i na tretmanu

Cd+Ni+Pb. Intenzitet fotosinteze je opao više od dva puta u odnosu na kontrolu kod oba klona, na svim tretmanima osim Pb i Ni+Pb. Klon 1 je u okviru istih tretmana imao značajno veći intenzitet disanja na tretmanima kontrole, Ni+Pb i Cd+Ni+Pb, u odnosu na klon 4. Intenzitet fotosinteze nije značajno varirao među klonovima u okviru istog tretmana sa izuzetkom tretmana Pb.

Parametar fluorescencije (F_v/F_m) nije značajno varirao pod uticajem primenjenih tretmana teških metala (Tabela 19). Signifikantno niža vrednost utvrđena je na tretmanu Ni+Pb.

Tabela 19. Uticaj kombinovanih tretmana teških metala koncentracije 10^{-4} M na intenzitet disanja i fotosinteze i fluorescenciju hlorofila u mladim listovima

Klon	Tretman	Int. disanja	Int. fotosinteze	Fluorescencija
	10^{-4} M	$\mu\text{mol O}_2 \text{ g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$		F_v/F_m
1	Kontrola	129.73 a	119.19 a	0.756 abcd
	Cd	78.75 cde	34.98 e	0.743 abcd
	Ni	85.77 bcde	55.46 cde	0.738 bcd
	Pb	89.25 bc	79.33 bcd	0.763abcd
	Cd Ni	75.95 cde	51.84 de	0.776 ab
	Cd Pb	46.09 g	54.07 cde	0.742 bcd
	Ni Pb	87.96 bcd	85.96 bc	0.717 d
	Cd Ni Pb	78.48 cde	55.55 cde	0.768 abc
4	Kontrola	100.19 b	106.58 ab	0.758 abcd
	Cd	71.69 ef	26.31 e	0.764 abc
	Ni	72.68 def	53.03 de	0.764 abc
	Pb	100.17 b	135.50 a	0.762abcd
	Cd Ni	90.10 bc	28.12 e	0.771 abc
	Cd Pb	59.59 fg	33.87 e	0.759 abcd
	Ni Pb	75.46 cde	76.12 bcd	0.730 cd
	Cd Ni Pb	54.00 g	41.67 e	0.787 a
NZR		14,76	30,00	0,04

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za $p < 0.05$
vrednosti označene bold simbolima su značajno veće u odnosu na isti tretman drugog klona

U starijim listovima, intenzitet disanja je bio značajno manji u odnosu na kontrolu u svim tretmanima osim tretmana Pb i Cd+Ni kod oba ispitivana genotipa (Tabela 20). Intenzitet fotosinteze je značajno opao u svim slučajevima osim kod klona 4 na tretmanu Pb. Intenzitet fotosinteze je i u starim listovima opao više od dva puta na svim tretmanima osim Pb i Ni+Pb, sa izuzetkom tretmana Cd+Ni kod klona 1. U poređenju klonova 1 i 4 unutar istih tretmana, klon 1 je imao značajno veći intenzitet disanja i fotosinteze na tretmanu Cd+Ni, a klon 4 intenzitet disanja na tretmanu Pb.

Fluorescencija hlorofila je bila značajno manja na tretmanu Cd+Ni+Pb klona 1, dok između ostalih tretmana nije bilo signifikantnih razlika (Tabela 20).

Tabela 20. Uticaj kombinovanih tretmana teških metala koncentracije 10^{-4} M na intenzitet disanja i fotosinteze i fluorescenciju hlorofila u starim listovima

Klon	Tretman	Int. disanja	Int. fotosinteze	Fluorescencija
	10^{-4} M	$\mu\text{mol O}_2 \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$		F_v/F_m
1	Kontrola	106.77 a	110.02 a	0.766 a
	Cd	57.90 cdef	25.58 ef	0.749 a
	Ni	80.34 bc	51.28 bcde	0.755 a
	Pb	92.58 ab	69.42 b	0.767 a
	Cd Ni	87.93 ab	70.00 b	0.754 a
	Cd Pb	57.56 cdef	39.36 bcdef	0.761 a
	Ni Pb	60.58 cdef	64.96 bc	0.734 a
	Cd Ni Pb	56.05 def	33.60 cdef	0.662 b
4	Kontrola	95.04 ab	101.54 a	0.740 a
	Cd	58.90 cdef	32.52 def	0.731 a
	Ni	73.86 bcde	39.93 bcdef	0.738 a
	Pb	78.33 bcd	122.33 a	0.749 a
	Cd Ni	62.93 cdef	34.31 cdef	0.759 a
	Cd Pb	46.97 f	17.63 f	0.768 a
	Ni Pb	54.71 def	60.58 bcd	0.728 a
	Cd Ni Pb	54.17 ef	35.33 cdef	0.743 a
NZR		21,9	29,51	0,04

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za $p < 0.05$
vrednosti označene bold simbolima su značajno veće u odnosu na isti tretman drugog klona

Primena manjih koncentracija teških metala (10^{-5} M), u mladim listovima uslovila je značajnu deperesiju intenziteta disanja na svim tretmanima osim tretmana Cd klona 4 (Tabela 21). Intenzitet fotosinteze je u mladim listovima manje opao na koncentraciji 10^{-5} M u poređenju sa koncentracijom 10^{-4} M. Nisu utvrđene značajne razlike između kontrole i tretmana Ni, Pb i Ni+Pb klona 1, odnosno Ni, Ni+Pb i Cd+Ni+Pb klona 4. Intenzitet disanja je među klonovima unutar istih tretmana, bio veći kod klona 1 na tretmanima kontrole, Ni, Pb i Ni+Pb, a kod klona 4 na tretmanu Cd. Intenzitet fotosinteze bio je značajno veći kod klona 1 na tretmanima Ni i Pb.

Parametar F_v/F_m nije značajno varirao pod uticajem primenjenih tretmana (Tabela 21). Na tretmanima Pb klona 1 odnosno Cd+Pb klona 4 utvrđene su najveće vrednosti ovog parametra, koje su bile značajno veće samo u odnosu na tretman Cd+Ni+Pb klona 1.

Tabela 21. Uticaj kombinovanih tretmana teških metala koncentracije 10^{-5} M na intenzitet disanja i fotosinteze i fluorescenciju hlorofila u mladim listovima

Klon	Tretman	Int. disanja	Int. fotosinteze	Fluorescencija
	10^{-5} M	$\mu\text{mol O}_2 \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$		F_v/F_m
1	Kontrola	129.73 a	119.19 ab	0.756 ab
	Cd	41.71 h	34.31 f	0.745 ab
	Ni	90.58 bc	125.81 a	0.755 ab
	Pb	91.33 bc	145.33 a	0.783 a
	Cd Ni	72.96 cdef	69.96 def	0.739 ab
	Cd Pb	54.12 fgh	61.67 ef	0.743 ab
	Ni Pb	84.85 bcd	116.62 abc	0.751 ab
	Cd Ni Pb	50.12 gh	68.83 def	0.716 b
4	Kontrola	100.19 b	106.58 abcd	0.758 ab
	Cd	85.08 bcd	56.83 ef	0.749 ab
	Ni	65.31 defg	76.94 cde	0.744 ab
	Pb	57.58 efgh	62.67 ef	0.761 ab
	Cd Ni	77.69 cde	61.90 ef	0.741 ab
	Cd Pb	57.00 efgh	49.96 ef	0.775 a
	Ni Pb	49.69 gh	84.19 bcde	0.737 ab
	Cd Ni Pb	61.62 efgh	85.58 bcde	0.758 ab
NZR		19,33	37,46	0,05

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za $p < 0.05$
vrednosti označene bold simbolima su značajno veće u odnosu na isti tretman drugog klona

Inzenzitet disanja u starim listovima je značajno opao na svim tretmanima u odnosu na kontrolu, pod dejstvom koncentracija teških metala od 10^{-5} M (Tabela 22). Kod intenziteta fotosinteze nisu utvrđene značajne razlike između kontrole i tretmana Pb oba klona, odnosno kontrole i tretmana Ni i Ni+Pb klona 4. Intenziteti disanja oba klona opali su više od dva puta u poređenju sa kontrolom na tretmanima Cd+Pb i Cd+Ni+Pb, a intenziteti fotosinteze na tretmanima Cd+Ni i Cd+Pb i kod klona 4 na tretmanu Cd. Značajnih razlika između klonova u okviru istih tretmana nije bilo osim na tretmanu Pb, gde je klon 1 imao veći intenzitet fotosinteze.

Parametar F_v/F_m je imao vrlo mala variranja na različitim tretmanima (Tabela 22).

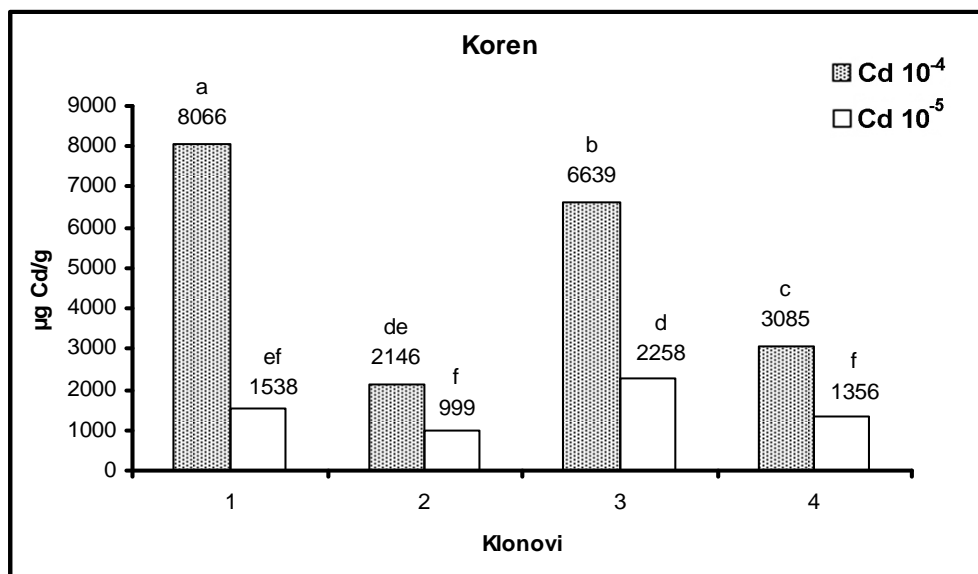
Tabela 22. Uticaj kombinovanih tretmana teških metala koncentracije 10^{-5} M na intenzitet disanja i fotosinteze i fluorescenciju hlorofila u starim listovima

Klon	Tretman	Int. disanja	Int. fotosinteze	Fluorescencija
	10^{-5} M	$\mu\text{mol O}_2 \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$		F_v/F_m
1	Kontrola	106.77 a	110.02 ab	0.766 ab
	Cd	62.90 cdef	59.50 def	0.744 ab
	Ni	65.87 cde	63.87 def	0.735 ab
	Pb	78.33 bc	115.67 a	0.781 a
	Cd Ni	63.53 cdef	54.17 def	0.771 a
	Cd Pb	38.37 g	51.46 def	0.769 ab
	Ni Pb	54.42 defg	63.87 def	0.743 ab
	Cd Ni Pb	52.71 defg	60.29 def	0.747 ab
4	Kontrola	95.04 ab	101.54 abc	0.740 ab
	Cd	55.17 cdefg	34.98 f	0.740 ab
	Ni	61.60 cdefg	74.66 cde	0.731 ab
	Pb	69.50 cd	80.79 bcd	0.752 ab
	Cd Ni	70.29 cd	44.92 ef	0.747 ab
	Cd Pb	40.21 fg	47.75 def	0.749 ab
	Ni Pb	53.75 defg	74.66 cde	0.719 b
	Cd Ni Pb	45.17 efg	60.58 def	0.736 ab
NZR		21,74	31,44	0,05

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za $p < 0.05$
vrednosti označene bold simbolima su značajno veće u odnosu na isti tretman drugog klona

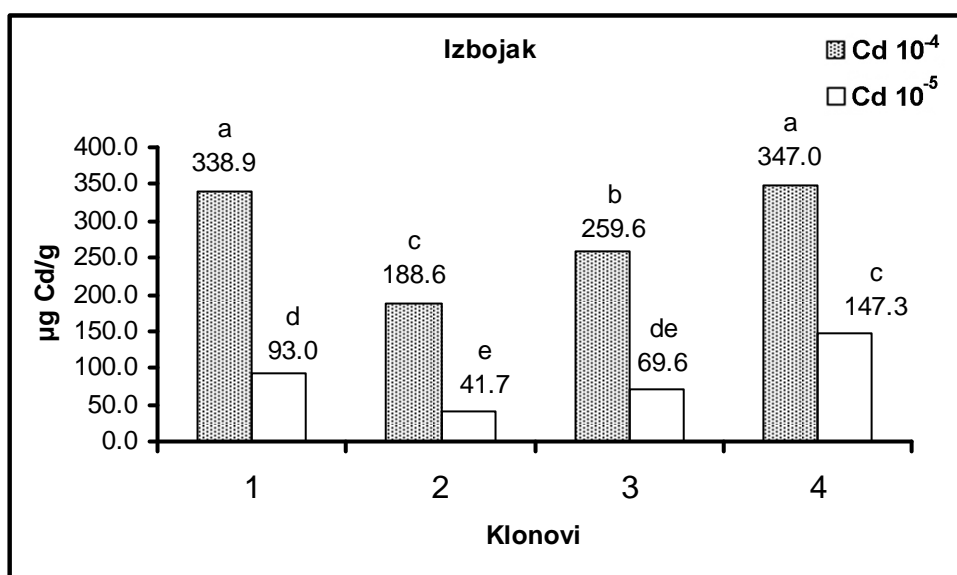
5.5. Akumulacija teških metala

Akumulacija kadmijuma u korenu je zavisila od genotipa (Slika 77). Statistički veće razlike su utvrđene između klonova 1 i 2 (ista vrsta), nego između klonova 1 i 3, ili 1 i 4 (različite vrste). Kod svih klonova, veća primenjena koncentracija (10^{-4} M) uzrokovala je značajno veću akumulaciju Cd u korenu.



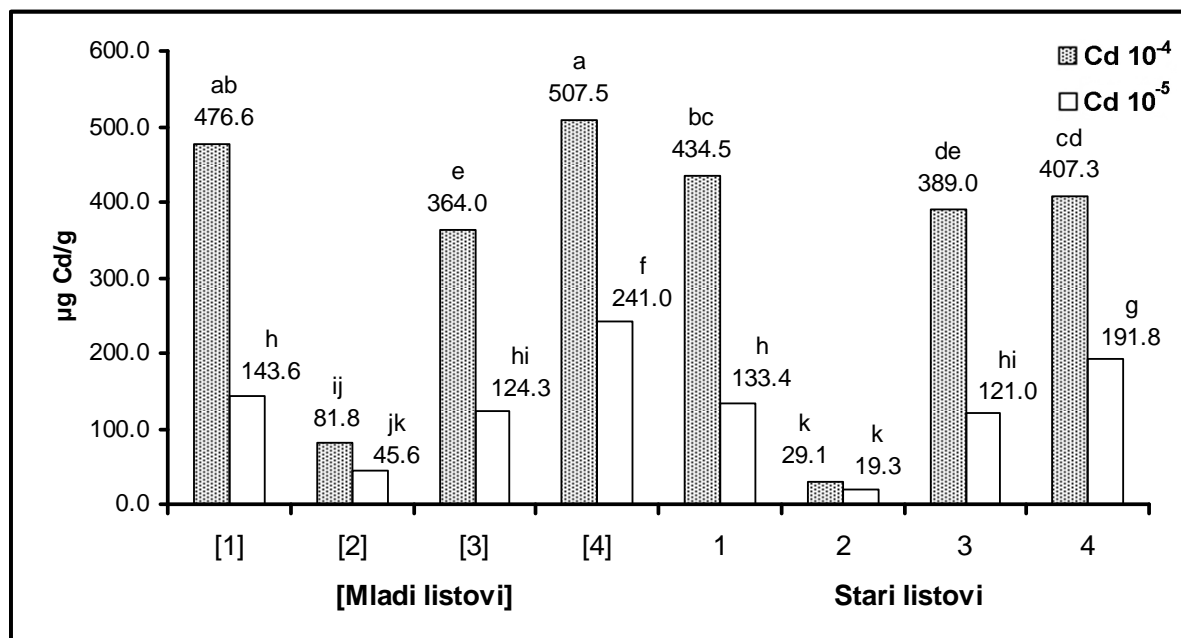
Slika 77. Koncentracija Cd u korenu
(NZR = 715.2)

U odnosu na koren, akumulacija u nadzemnom delu vrba bila je višestruko manja (Slika 77 i 78). Akumulacija Cd u nadzemnim delovima je bila značajno veća pod dejstvom veće primenjene koncentracije (10^{-4} M) u odnosu na manju (10^{-5} M). Najveću količinu Cd u izbojku akumulirao je klon 4 na obe primenjene koncentracije, a najmanju klon 2 (Slika 78).



Slika 78. Koncentracija Cd u izbojku
(NZR = 50.07)

Kao i kod izbojka, najveću sposobnost akumulacije kadmijuma u listovima pokazali su klonovi 4 i 1, a najmanju klon 2 (Slika 79). Mlađi listovi su imali nešto veću koncentraciju Cd u odnosu na starije (značajne razlike postojale su kod klonova 2 i 4).



Slika 79. Koncentracija Cd u listovima
(NZR = 42.47)

Stepen translokacije Cd u nadzemni deo je bio najveći kod klona 4 (odnos koncentracija koren / listovi bio je ispod 10), te je stoga ovaj klon imao i najveću koncentraciju Cd u nadzemnim delovima (Tabela 23). Klon 2 je imao najmanji stepen translokacije (odnos koren : listovi 51.7 i 73.7) i kao posledicu najmanju koncentraciju Cd u listovima.

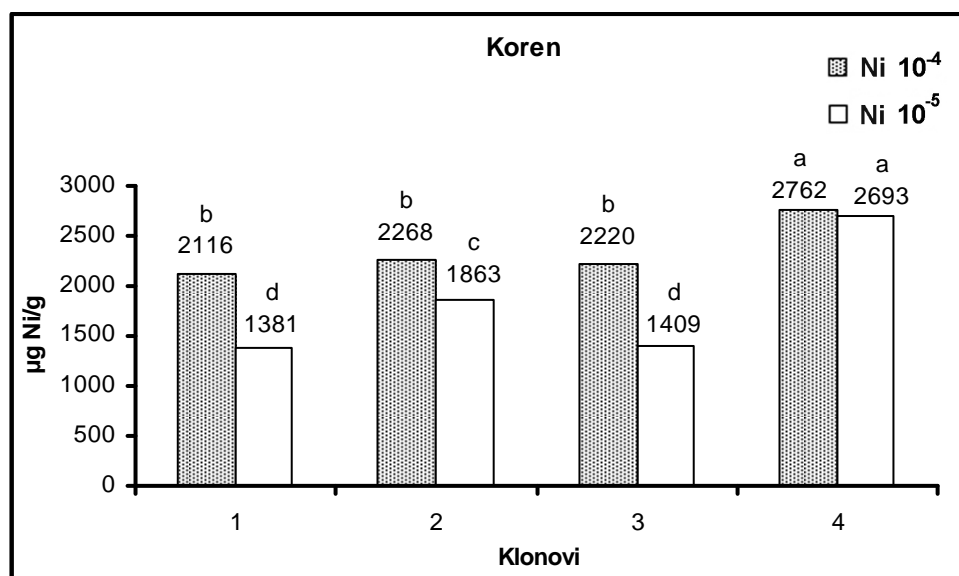
Translokacija Ni u nadzemne delove bila je manja u odnosu na Cd za sve klonove sem za klon 2 (Tabela 23). Stoga je i koncentracija Ni u nadzemnim delovima (28.9-148.6 $\mu\text{gNi/g}$ suve materije) bila manja u odnosu na Cd (121.0-507.5 $\mu\text{gCd/g}$ suve materije). Stepenn translokacije Ni u nadzemni deo je specifično zavisio od primenjene koncentracije. Translokacija je bila više od dva puta veća na koncentraciji 10^{-5} M u poređenju sa koncentracijom 10^{-4} M (Tabela 23).

Tabela 23. Relativni odnos koncentracija akumuliranih teških metala u biljnim organima - koren : izbojak : stari listovi : mladi listovi

Genotip	Organ	Klon 1				Klon 2				Klon 3				Klon 4			
		k.	i.	s.l.	m.l.	k.	i.	s.l.	m.l.	k.	i.	s.l.	m.l.	k.	i.	s.l.	m.l.
Cd	10 ⁻⁴ M/l	23.8	1	1.4	1.3	73.7	6.5	2.8	1	25.6	1	1.4	1.5	8.9	1	1.5	1.2
	10 ⁻⁵ M/l	16.5	1	1.5	1.3	51.7	2.2	2.4	1	32.4	1	1.8	1.7	9.2	1	1.6	1.3
Ni	10 ⁻⁴ M/l	55	1	3.5	3.9	58	1	2.7	2.4	66.7	1	4	2.4	85.5	1	4.6	4
	10 ⁻⁵ M/l	119	1	2.8	4	105.2	1	1.7	2.3	128.1	1	2.8	3.4	202.5	1	2.2	2.4
Pb	10 ⁻⁴ M/l	239	1	2.1	1.2	179	1.2	1.7	1	1179	1	1.4	1	1744	1.3	2.8	1
	10 ⁻⁵ M/l	170	1	2	2.1	266	1	1	1.5	533	1	1.8	1.3	718	1	1.9	2.6

k. – koren i. – izbojak s.l. - stari listovi m.l. – mladi listovi

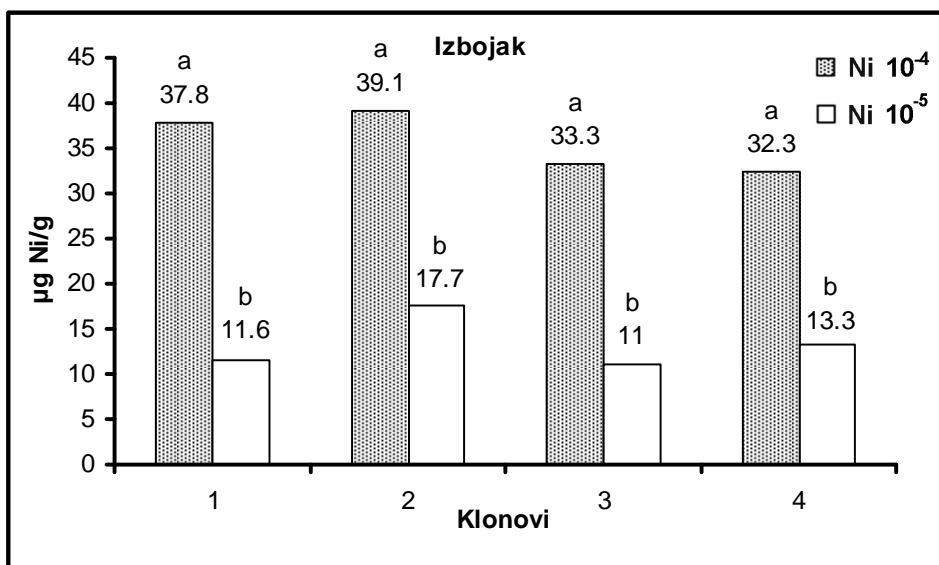
Razlika u koncentraciji akumuliranog Ni u korenu i izbojcima između dve primenjene koncentracije (10⁻⁴ i 10⁻⁵) bila je značajno manja u poređenju sa Cd (Slike 80-81). Odnos između ove dve koncentracije bio je 2.1-6.2 za Cd naspram 1.0-3.0 za Ni.



Slika 80. Koncentracija Ni u korenu
(NZR = 245.6)

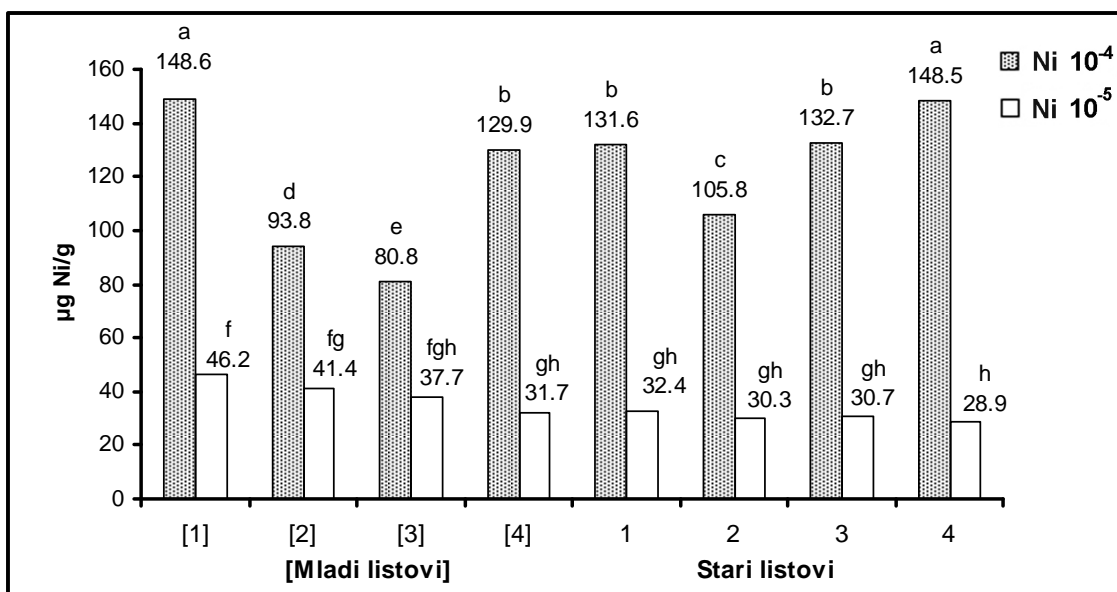
Razlike između sposobnosti klonova za akumulaciju Ni u korenu i izbojku su bile manje izražene u poređenju sa Cd.

Koncentracija nikla u izbojku je bila nekoliko puta manja (1.7-4.6) u poređenju sa listovima (Slike 81 i 82).



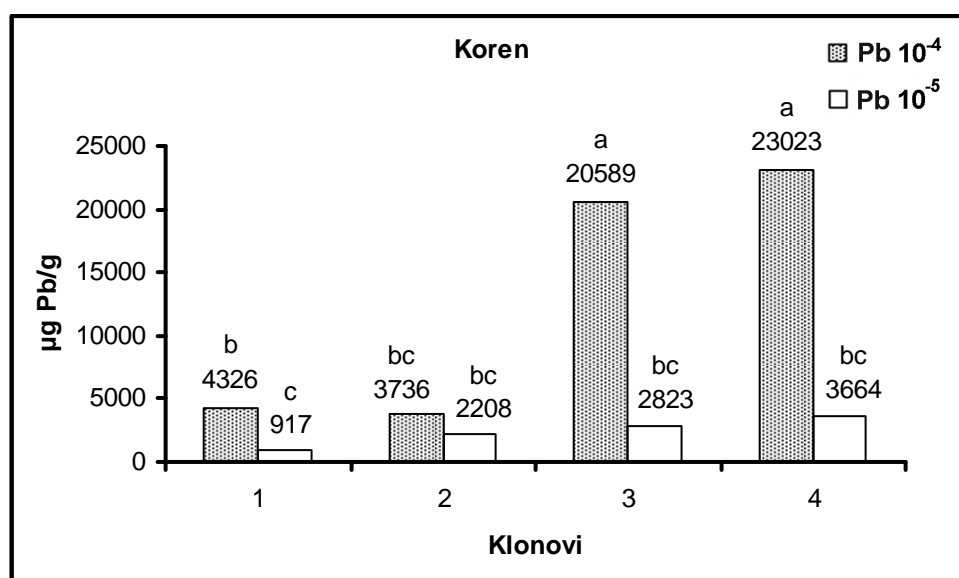
Slika 81. Koncentracija Ni u izbojku
(NZR = 12.26)

U sposobnosti akumulacije nikla u listovima, utvrđene su statistički značajne razlike između klonova na većoj primenjenoj koncentraciji (10^{-4} M), u odnosu na manju (10^{-5} M). Nije uočena razlika u sposobnosti akumulacije nikla između mladih i starih listova (Slika 82).



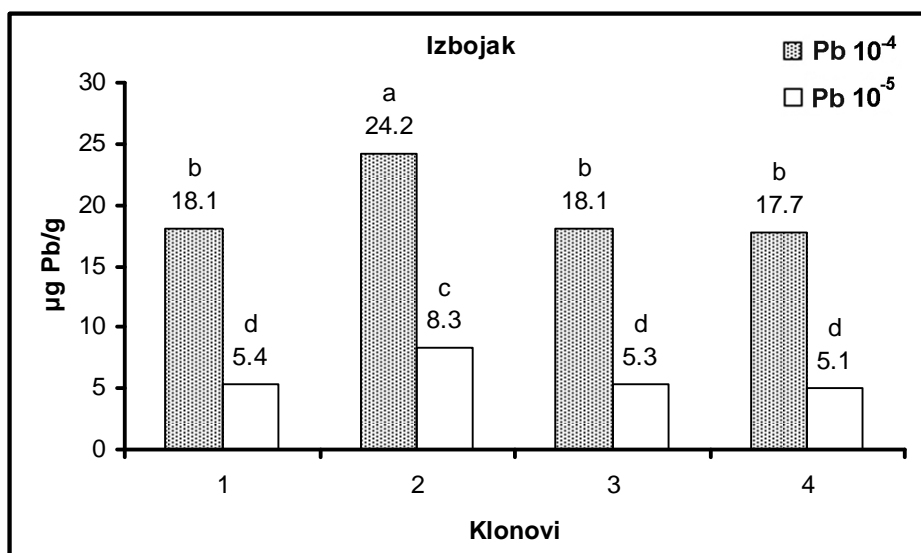
Slika 82. Koncentracija Ni u listovima
(NZR = 11.96)

Koncentracija Pb akumuliranog u biljkama tretiranim Pb-EDTA, bila je značajno veća pod dejstvom veće primenjene koncentracije od 10^{-4} M u odnosu na koncentraciju od 10^{-5} M (Slike 83-85). Odnos u akumulaciji Pb između dve koncentracije (10^{-4} / 10^{-5} M) bio je naročito visok u korenu klonova 3 i 4 (7.3 i 6.3). Koncentracija Pb akumulirana u korenu ova dva klona na koncentraciji 10^{-4} M bila je nekoliko puta veća u poređenju sa koncentracijama Cd i Ni u korenu istih klonova.



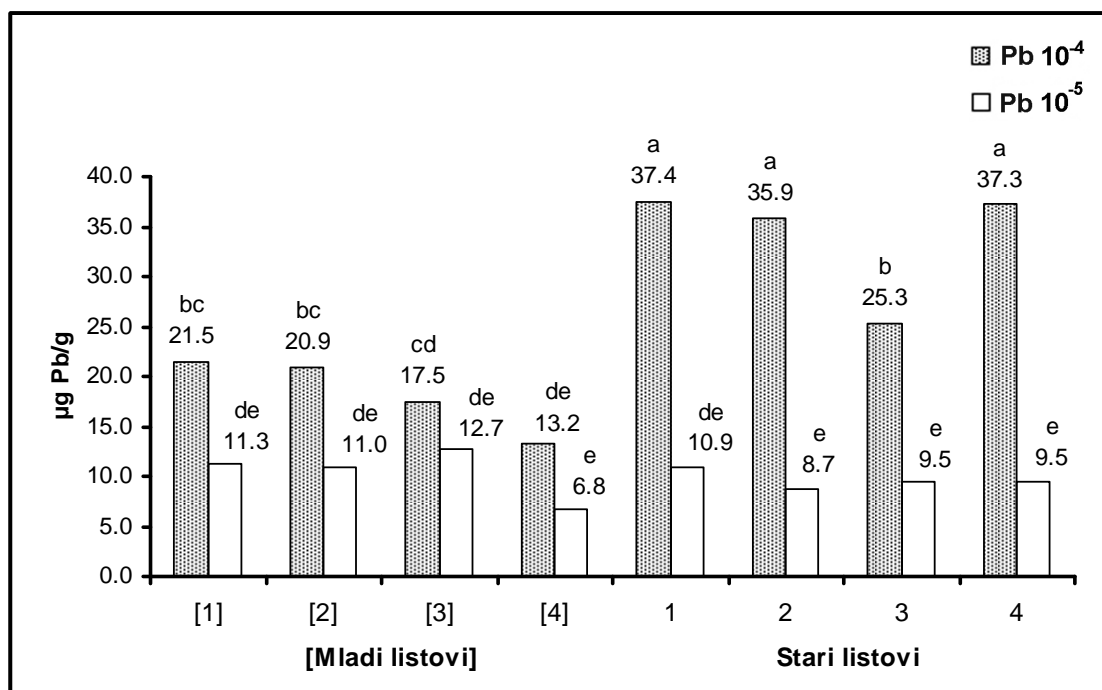
Slika 83. Koncentracija Pb u korenu
(NZR = 3269)

Stepen translokacije u nadzemne delove bio je višestruko manji u poređenju sa Cd i Ni (Tabela 23). Posledica je značajno manja koncentracija Pb u izbojku i listovima u poređenju sa Cd i Ni (Slike 78, 81 i 84).



Slika 84. Koncentracija Pb u izbojku
(NZR = 2.11)

Kao i kod Ni, između genotipova se ne uočavaju razlike u sposobnosti akumulacije Pb u listovima na manjoj primenjenoj koncentraciji (10^{-5} M). Na većoj primenjenoj koncentraciji (10^{-4} M), uočava se da je akumulacija Pb u starim listovima bila značajno veća u odnosu na mlade kod svih istraživanih klonova (Slika 85).



Slika 85. Koncentracija Pb u izbojku
(NZR = 6.66)

5.5.1. Uticaj kombinovanih tretmana teških metala na stepen njihove akumulacije

Akumulacija Cd u pojedinim biljnim organima biljaka gajenih na teškim metalima koncentracije 10^{-4} M prikazana je u tabeli 24. Mada je sadržaj kadmijuma u mladim listovima bio veći u poređenju sa starim, odnosi između tretmana su u korelaciji u obe grupe listova. Značajno najviše Cd akumulirano je na tretmanu Cd, zatim Cd+Pb, Cd+Ni+Pb i Cd+Ni. Isti odnos utvrđen je i u izbojku. Koncentracija Cd u korenu je višestruko premašila koncentracije u nadzemnim delovima biljke (2429,31-12047,74 $\mu\text{g Cd/g}$ suve materije). Sposobnost genotipa u akumulaciji je zavisila od primenjenog tretmana.

Tabela 24. Uticaj kombinovanih tretmana teških metala koncentracije 10^{-4} M na akumulaciju Cd

Klon	Tretman	Koncentracija Cd ($\mu\text{g Cd g}^{-1}$ suve materije)			
		10^{-4} M	Mladi listovi	Stari listovi	Izbojak
1	Cd	291 a	224 a	274 a	8637 c
	Cd Ni	27 h	33 f	33 f	2429 h
	Cd Pb	158 d	135 c	181 c	12048 a
	Cd Ni Pb	79 f	43 ef	79 e	3952 f
4	Cd	246 b	196 b	258 b	6728 d
	Cd Ni	53 g	33 f	76 e	3294 g
	Cd Pb	170 c	112 d	176 c	11299 b
	Cd Ni Pb	108 e	52 e	114 d	4642 e
NZR		12,03	9,77	11,45	284,8

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za $p < 0.05$

Na koncentracijama 10^{-5} M, akumuliranje Cd bilo je manje u odnosu na koncentraciju 10^{-4} M, ali su odnosi između tretmana slični (Tabela 25). U nadzemnim delovima najveća koncentracija Cd je izmerena u pojedinačnom tretmanu Cd, zatim na tretmanima Cd+Pb, Cd+Ni+Pb i Cd+Ni. Mladi listovi su akumulirali više Cd u odnosu na stare. Koren je akumulirao višestruko veće koncentracije od izbojka i listova, mada u manjoj meri u odnosu na tretmane 10^{-4} M. Obe primenjene koncentracije teških metala, uslovile su najveću akumulaciju Cd u korenu na tretmanu Cd+Pb.

Tabela 25. Uticaj kombinovanih tretmana teških metala koncentracije 10^{-5} M na akumulaciju Cd

Klon	Tretman	Koncentracija Cd ($\mu\text{g Cd/g suve materije}$)			
	10^{-5} M	Mladi listovi	Stari listovi	Izbojak	Koren
1	Cd	170 d	153 bc	174 bc	2711 b
	Cd Ni	58 f	45 e	74 e	2149 cd
	Cd Pb	284 a	170 ab	191 b	3342 a
	Cd Ni Pb	138 e	108 d	118 d	1857 e
4	Cd	237 b	164 abc	209 a	2080 de
	Cd Ni	162 d	123 d	129 d	1855 e
	Cd Pb	208 c	176 a	179 b	3615 a
	Cd Ni Pb	211 c	146 c	160 c	2378 c
NZR		13,19	22,07	17,72	278,1

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za $p < 0.05$

Najveća koncentracija Ni, u listovima biljaka tretiranih teškim metalima koncentracije 10^{-4} M, utvrđena je na tretmanu Ni+Cd, zatim na tretmanu Ni (Tabela 26). Klon 1 akumulirao je više Ni na tretmanu Ni+Pb u poređenju sa tretmanom Ni+Cd+Pb, dok je kod klona 4 bilo obrnuto. Nije utvrđena opšta tendencija da su mladi ili stari listovi, međusobno, imali veću koncentraciju Ni.

Tabela 26. Uticaj kombinovanih tretmana teških metala koncentracije 10^{-4} M na akumulaciju Ni

Klon	Tretman	Koncentracija Ni ($\mu\text{g Ni/g suve materije}$)			
	10^{-4} M	Mladi listovi	Stari listovi	Izbojak	Koren
1	Ni	142 cd	141 c	14 d	2971 c
	Ni Cd	241 b	241 b	27 b	1836 d
	Ni Pb	113 e	119 d	20 c	722 g
	Ni Cd Pb	136 d	53 e	16 cd	473 h
4	Ni	144 c	147 c	10 e	4162 a
	Ni Cd	254 a	266 a	72 a	3176 b
	Ni Pb	106 f	118 d	20 c	956 e
	Ni Cd Pb	77 g	62 e	17 cd	833 f
NZR		6,17	14,61	4,66	65,92

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za $p < 0.05$

U poređenju sa Cd, koncentracija Ni u izbojku je u odnosu na listove bila znatno manja. Koncentracija Ni u korenu bila je kod oba klona najveća na pojedinačnom tretmanu Ni (~20-30 puta veća u odnosu na listove), pa zatim na

tretmanima Ni+Cd i Ni+Pb, a najmanja na tretmanu Ni+Cd+Pb (~3-10 puta veća u odnosu na listove).

Razlike između tretmana u sposobnosti akumulacije Ni u listovima su bile manje izražene na koncentracijama teških metala od 10^{-5} M (Tabela 27). U mladim listovima oba klona, značajno najveća vrednost je utvrđena na tretmanima Ni+Cd+Pb. U mladim i starim listovima najmanja statistički značajna koncentracija Ni utvrđena je na tretmanu Ni+Pb. U izbojku je bilo značajno manje Ni u odnosu na listove, sa najmanjom koncentracijom akumuliranog nikla na tretmanu Ni+Pb. Akumulacija Ni je bila najveća u korenu, gde je najmanji stepen akumulacije takođe utvrđen na tretmanu Ni+Pb.

Tabela 27. Uticaj kombinovanih tretmana teških metala koncentracije 10^{-5} M na akumulaciju nikla

Klon	Tretman	Koncentracija Ni ($\mu\text{g Ni /g suve materije}$)			
	10^{-5} M	Mladi listovi	Stari listovi	Izbojak	Koren
1	Ni	101 b	112 a	20 a	1055 b
	Ni Cd	89 bc	115 a	14 bc	853 d
	Ni Pb	78 cd	41 d	5 d	576 e
	Ni Cd Pb	154 a	84 c	16 abc	1045 bc
4	Ni	67 de	90 bc	16 abc	1191 a
	Ni Cd	68 de	96 b	15 bc	1052 bc
	Ni Pb	51 e	48 d	12 c	542 e
	Ni Cd Pb	93 bc	83 c	18 ab	966 c
NZR		17,54	7,79	4,52	86,46

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za $p < 0.05$

Koncentracija Pb akumuliranog u pojedinim organima biljke pod uticajem teških metala koncentracije 10^{-4} M prikazana je u tabeli 28. Koncentracija Pb u listovima bila je značajno manja u poređenju sa Cd i Ni. Najveći stepen akumulacije u listovima utvrđen je na pojedinačnom tretmanu Pb, što je takođe uočeno i kod izbojka. Stari listovi akumulirali su više Pb od mladih. U mladim listovima najmanja koncentracija Pb utvrđena je tretmanu sva tri metala (Pb+Cd+Ni), dok kod starih listova nije bilo statistički značajnih razlika između kombinovanih tretmana. Koncentracija Pb u korenu je bila veoma velika (veća u poređenju sa Cd i Ni), te je stoga stepen translokacije u nadzemne delove bio značajno manji u poređenju sa Cd i Ni. Najmanja koncentraciju Pb u korenu utvrđena je, kod oba klona, na

pojediničnom tretmanu Pb. Klon 4 imao je najveću koncentraciju Pb u korenu na tretmanu Pb+Cd+Ni (46575,04 µg Pb/g suve materije).

Tabela 28. Uticaj kombinovanih tretmana teških metala koncentracije 10^{-4} M na akumulaciju Pb

Klon	Tretman	Koncentracija Pb (µg Pb/g suve materije)			
	10^{-4} M	Mladi listovi	Stari listovi	Izbojak	Koren
1	Pb	39 b	110 b	50 abc	1199 e
	PbCd	25 cd	28 c	22 c	25567 c
	PbNi	29 c	35 c	38 bc	22123 d
	Pb Cd Ni	12 e	44 c	26 c	25986 c
4	Pb	105 a	216 a	67 a	2551 e
	PbCd	20 de	26 c	42 abc	35667 b
	PbNi	15 ef	22 c	56 ab	21600 d
	Pb Cd Ni	10 f	25 c	46 abc	46575 a
NZR		6,59	30,63	28,38	2663

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za $p < 0.05$

Na rastvorima teških metala koncentracije 10^{-5} M, koncentracija olova je u listovima bila najveća na tretmanu Pb+Ni (Tabela 29). Najmanja koncentracija olova u mladim i starim listovima i izbojku utvrđena je na tretmanima koji su sadržali Cd. Koncentracija Pb u korenu je bila značajno manja u odnosu na koncentraciju 10^{-4} M. Najveći stepen akumulacije u korenu je utvrđen na tretmanu Pb+Cd+Ni i Pb+Cd, a najmanji na tretmanu Pb, odnosno Ni+Pb.

Tabela 29. Uticaj kombinovanih tretmana teških metala koncentracije 10^{-5} M na akumulaciju olova

Klon	Tretman	Koncentracija Pb (µg Pb/g suve materije)			
	10^{-5} M	Mladi listovi	Stari listovi	Izbojak	Koren
1	Pb	41 b	27 c	39 c	310 e
	PbCd	19 c	28 c	33 c	4390 d
	PbNi	64 a	82 a	99 a	809 e
	Pb Cd Ni	15 c	35 bc	21 c	8539 b
4	Pb	17 c	29 c	60 b	471 e
	PbCd	12 c	29 c	30 c	7075 c
	PbNi	39 b	43 b	61 b	1139 e
	Pb Cd Ni	19 c	13 d	18 c	12117 a
NZR		13,17	12,62	24,67	1081

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za $p < 0.05$

5.6. Koncentracija kalijuma i fosfora pod uticajem teških metala

Koncentracija K i P se pod uticajem Cd menjala specifično u zavisnosti od ispitivanih genotipova (Tabela 30). Kod klonova 1, 3 i 4 u mladim listovima, koncentracija K je značajno porasla u odnosu na kontrolne biljke. Kod klona 2 tretman 10^{-4} M Cd doveo je do smanjenja koncentracije K. U starim listovima došlo je do smanjenja koncentracije K kod klona 1, 2 i 4 pod uticajem veće koncentracije Cd (10^{-4} M), dok kod klona 3 nisu utvrđene statistički značajne razlike među tretmanima. Koncentracija K u korenu je bila veoma varijabilna. Osim klona 4, kod ostalih klonova došlo je do značajnog povećanja koncentracije K u korenu u odnosu na kontrolne biljke. Sa izuzetkom dva tretmana (10^{-4} M, 1 i 3 klon), koncentracija K je u korenu bila manja ili jednaka u odnosu na listove.

Koncentracija P u listovima je pod uticajem Cd varirala u opsegu od 0,15 – 0,51% (Tabela 30). U mladim listovima do značajne promene koncentracije P u odnosu na kontrolu došlo je jedino kod klona 1. U starim listovima koncentracija P se značajno smanjila kod klonova 1, 2 i 4 u poređenju sa kontrolom. U korenu je samo kod klona 4 došlo do statistički značajnog opadanja koncentracije P, pod uticajem veće primenjene koncentracije Cd (10^{-4} M). Koncentracija P je u korenu bila veća u odnosu na listove i varirala je u opsegu 0,37 – 1,11%.

Tabela 30. Uticaj Cd na koncentraciju K i P

Klon	Tretman Cd (M)	K (%)			P (%)		
		ml. list.	st. list.	koren	ml. list.	st. list.	koren
1	0	2,23 d	3,64 bc	0,92 de	0,33 e	0,43 a	0,66 bcde
	10^{-4}	4,13 b	3,03 de	6,21 a	0,36 de	0,23 f	0,37 e
	10^{-5}	5,16 a	3,38 cd	3,71 c	0,47 ab	0,37 b	0,70 bcde
2	0	3,30 c	3,72 abc	0,78 e	0,45 abcd	0,44 a	0,77 abcd
	10^{-4}	1,56 e	2,70 e	0,73 e	0,37 cde	0,15 g	0,47 de
	10^{-5}	4,39 b	3,31 cd	3,61 c	0,39 bcde	0,46 a	0,93 abc
3	0	3,11 c	4,03 ab	0,91 de	0,51 a	0,37 b	0,87 abc
	10^{-4}	4,51 b	4,06 ab	6,04 a	0,46 abc	0,35 bc	0,63 cde
	10^{-5}	4,45 b	4,23 a	4,49 b	0,51 a	0,33 bcd	0,65 bcde
4	0	3,09 c	4,04 ab	3,24 c	0,41 bcd	0,30 cd	1,00 ab
	10^{-4}	4,66 ab	2,56 e	1,28 de	0,42 bcde	0,24 ef	0,41 de
	10^{-5}	4,76 ab	3,69 abc	1,36 d	0,47 ab	0,29 de	1,11 a
NZR		0,60	0,53	0,53	0,08	0,05	0,34

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za $p < 0.05$

U mladim listovima je pod uticajem tretmana veće koncentracije Ni (10^{-4} M) došlo do značajnog smanjenja koncentracije K kod klona 2. Kod klonova 1 i 3 je

došlo do značajnog porasta koncentracije K pod uticajem manje primenjene koncentracije Ni od 10^{-5} M u odnosu na kontrolne biljke. U starim listovima utvrđeno je značajno opadanje koncentracije K pod uticajem tretmana od 10^{-4} M nikla kod svih ispitivanih genotipova. Osim kod klona 4, koncentracija K u korenu je narasla pod uticajem manje koncentracije Ni od 10^{-5} M u odnosu na kontrolne biljke. Koncentracija K u korenu tretiranim Ni bio je u većini slučajeva manja u odnosu na listove, kao i pri tretmanu Cd.

Koncentracija P se u listovima biljaka tretiranih niklom, kretala u opsegu 0,20 – 0,57% (Tabela 31).

Tabela 31. Uticaj Ni na koncentraciju K i P

Klon	Tretman	K (%)			P (%)		
	Ni (M)	ml. list.	st. list.	koren	ml. list.	st. list.	koren
1	0	2,23 d	3,64 ab	0,92 d	0,33 fg	0,43 ab	0,66 de
	10^{-4}	2,16 d	1,45 f	1,09 d	0,44 bcde	0,20 e	1,10 abc
	10^{-5}	3,11 bc	3,59 ab	3,75 a	0,55 a	0,42 ab	0,57 e
2	0	3,30 bc	3,72 ab	1,08 d	0,45 bcd	0,44 a	0,77 cde
	10^{-4}	2,12 d	2,27 e	1,27 d	0,26 g	0,35 c	1,26 ab
	10^{-5}	3,26 bc	3,05 bcd	3,97 a	0,36 cdefg	0,42 ab	0,94 bcde
3	0	3,11 bc	4,03 a	0,91 d	0,51 ab	0,36 bc	0,87 bcde
	10^{-4}	2,94 c	2,80 cde	1,19 d	0,32 fg	0,24 de	1,43 a
	10^{-5}	4,43 a	3,94 a	3,63 a	0,57 a	0,35 c	1,18 ab
4	0	3,09 bc	4,04 a	3,24 b	0,41bcdef	0,30 cd	1,00 bcd
	10^{-4}	3,66 b	2,78 cde	1,27 d	0,47 abc	0,25 de	0,74 cde
	10^{-5}	3,53 bc	3,48 abc	2,78 c	0,34 defg	0,27 d	0,90 bcd
NZR		0,65	0,68	0,35	0,10	0,06	0,37

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za $p < 0,05$

Variranje koncentracija je bilo zavisno od genotipa. Do značajnog povećanja koncentracije P u odnosu na kontrolu došlo je samo u jednom slučaju kod mladih listova klona 1. Kod klonova 1, 2 i 3 koncentracija P u listovima je pod uticajem koncentracije 10^{-4} M značajno opala u odnosu na kontrolu, dok pri manjoj primenjenoj koncentraciji od 10^{-5} nisu utvrđene statistički značajne razlike. Koncentracija P u korenu je bila veća u odnosu na listove (0,57 – 1,43%). Osim kod klona 4, tretman većom koncentracijom Ni doveo je do značajnog povećanja nivoa P u korenu, u odnosu na kontrolu.

Koncentracija K u listovima vrba je varirala u manjoj meri pod uticajem Pb-EDTA u odnosu na Cd i Ni (Tabela 32). U mladim listovima kod klona 1 došlo je do povećanja koncentracije K na obe primenjene koncentracije Pb-EDTA, dok je kod klona 3 takvo povećanje utvrđeno samo na većoj primenjenoj koncentraciji (10^{-4} M). U

starim listovima je kod svih klonova utvrđeno smanjenje koncentracije K u listu. U korenu je Pb-EDTA uticao na povećanje količine K kod klonova 1, 2 i 3 (i do 8,12% kod klona 3). Kod ovih klonova, koncentracija K je u korenu pod uticajem tretmana bila veća u odnosu na listove, sa izuzetkom klona 1 na koncentraciji od 10^{-5} M.

Koncentracija P se u listovima i korenu, nije značajno menjala pod uticajem tretmana Pb-EDTA, u odnosu na kontrolne biljke (Tabela 32). U listovima se koncentracija P kretala u opsegu 0,27 – 0,57%, a u korenu 0,45 – 1,00%.

Tabela 32. Uticaj Pb-EDTA na koncentraciju K i P

Klon	Tretman Pb-EDTA (M)	K (%)			P (%)		
		ml. list.	st. list.	koren	ml. list.	st. list.	koren
1	0	2,23 c	3,64 abc	0,92 e	0,33 d	0,43 ab	0,66 ab
	10^{-4}	3,35 b	3,01 bcde	5,13 b	0,33 d	0,34 bcd	0,61 ab
	10^{-5}	3,75 b	2,79 de	2,56 cde	0,43 bcd	0,44 a	0,51 b
2	0	3,30 b	3,72 ab	1,08 e	0,45 bc	0,44 ab	0,77 ab
	10^{-4}	3,67 b	2,91 bcde	4,88 b	0,44 bc	0,38 abc	0,53 b
	10^{-5}	3,66 b	2,72 de	8,05 a	0,48 abc	0,42 ab	0,76 ab
3	0	3,11 b	4,03 a	0,91 e	0,51 ab	0,36 abcd	0,87 ab
	10^{-4}	4,65 a	2,46 e	8,12 a	0,57 a	0,27 de	0,65 ab
	10^{-5}	3,66 b	3,49 abcd	3,91 bc	0,47 abc	0,39 abc	0,64 ab
4	0	3,09 b	4,04 a	3,24 bcd	0,41 bcd	0,30 cde	1,00 a
	10^{-4}	3,48 b	2,53 e	1,34 de	0,37 cd	0,30 cde	0,68 ab
	10^{-5}	3,36 b	2,87 cde	2,09 cde	0,39 cd	0,24 e	0,45 b
NZR		0,66	0,79	1,90	0,10	0,09	0,40

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za $p < 0,05$

5.6.1. Uticaj kombinovanih tretmana teških metala na koncentraciju K i P

Koncentracija K u listovima je pod uticajem teških metala koncentracije 10^{-4} M varirala u opsegu 2,25-4,47%, a u korenu u opsegu 0,64-3,41% (Tabela 33). U velikom broju slučajeva koncentracija K u tretiranim biljkama nije opala u odnosu na kontrolu. Mladi listovi klona 1 na tretmanima Cd, Pb, Ni+Pb i stari listovi istog klona na tretmanima Ni, Pb, Cd+Ni, Cd+Ni+Pb nisu imali statistički značajno različitu koncentraciju K u odnosu na kontrolu. Takođe, mladi listovi klona 4 na tretmanima Pb, Cd+Ni, Ni+Pb i stari listovi na tretmanima Cd, Pb, Cd+Ni, Cd+Pb, Ni+Pb nisu imali narušen nivo koncentracije K. U pojedinim slučajevima utvrđen je stimulativni efekat na povećanje koncentracije K. Ova stimulacija je konstatovana kod klona 1 u mladim listovima na tretmanu Cd+Pb i starim listovima na tretmanima Cd i Cd+Pb, a kod klona 4 u mladim listovima na tretmanima Cd, Ni i starim listovima na tretmanu

Ni. Utvrđen je i stimulativan efekat tretmana Pb kod oba klona i Cd+Ni kod klona 1, na povećanje koncentracije kalijuma u korenu. Ostali tretmani doveli su do značajnog sniženja količine K u korenu. Osim pri tretmanu Pb (i Cd+Ni klona 1), koncentracija K u korenu na drugim tretmanima teških metala bila je niža u poređenju sa listovima.

Koncentracija P pod uticajem teških metala u pojedinačnim i kombinovanim rastvorima (10^{-4} M) u mladim listovima kretala se u opsegu 0,29-0,59%, u starim listovima 0,18-0,51%, dok je u korenu bila nešto veća i to u rasponu 0,44-0,86% (Tabela 33).

Tabela 33. Uticaj kombinovanih tretmana teških metala koncentracije 10^{-4} M na koncentraciju K i P

Klon	Tretman 10^{-4} M	K (%)			P (%)		
		ml.list	st.list	koren	ml.list	st.list	koren
1	Kontrola	3,12 cde	2,65 def	2,56 c	0,42 de	0,46 b	0,58 e
	Cd	3,28 c	3,13 b	0,84 gh	0,59 a	0,51 a	0,46 gh
	Ni	2,76 f	2,66 def	1,38 e	0,50 b	0,23 h	0,67 c
	Pb	2,94 def	2,83 cd	3,41 a	0,36 fg	0,33 de	0,50 f
	Cd Ni	2,64 fg	2,72 de	3,04 b	0,41 de	0,37 cd	0,45 gh
	Cd Pb	3,97 b	3,51 a	1,14 ef	0,44 cd	0,38 cd	0,78 b
	Ni Pb	2,86 ef	2,85 cd	1,75 d	0,33 ghi	0,30 efg	0,86 a
	Cd Ni Pb	2,68 fg	2,46 efgh	0,64 h	0,47 bc	0,41 bc	0,62 d
4	Kontrola	3,31 c	2,58 defg	2,55 c	0,40 ef	0,27 fgh	0,56 e
	Cd	4,07 b	2,36 gh	1,30 e	0,38 ef	0,29 efgh	0,47 fgh
	Ni	4,47 a	3,08 bc	1,37 e	0,32 ghi	0,45 b	0,44 h
	Pb	3,25 cd	2,72 de	3,30 a	0,39 ef	0,27 fgh	0,48 fg
	Cd Ni	3,31 c	2,74 de	0,76 gh	0,31 i	0,31 ef	0,44 gh
	Cd Pb	2,88 ef	2,41 fgh	1,21 e	0,29 i	0,25 gh	0,68 c
	Ni Pb	3,17 cde	2,80 d	1,33 e	0,35 fgh	0,18 i	0,65 cd
	Cd Ni Pb	2,35 g	2,25 h	0,94 fg	0,32 hi	0,29 efg	0,47 fgh
NZR		0,32	0,27	0,23	0,039	0,049	0,034

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za $p < 0.05$

Koncentracija P je u listovima porasla kod klona 1 na tretmanima Cd, i u mladim listovima na tretmanima Ni i Cd+Ni+Pb, dok je kod klona 4 povećanje koncentracije P u odnosu na kontrolu utvrđeno jedino u starim listovima na tretmanu Ni. Klon 1 je imao značajno veću koncentraciju P u listovima u poređenju sa klonom 4 na većini tretmana. U korenu je kod oba klona koncentracija P značajno porasla u

odnosu na kontrolu, na tretmanima Cd+Pb i Ni+Pb, a kod klona 1 i na tretmanu Ni. Na ostalim tretmanima koncentracija P u korenu je značajno opala.

Koncentracija K je u biljkama tretiranim teškim metalima koncentracije 10^{-5} M varirala u rasponu 2,40-5,11%, a u korenu 1,85-3,95% (Tabela 34). Sa izuzetkom tretmana Ni+Pb na mladim listovima, dejstvom ostalih tretmana teških metala došlo je do značajnog povećanja koncentracije K u odnosu na kontrolu, ili se koncentracija K nije značajno menjala. Koncentracija K u korenu se povećala u odnosu na kontrolu na tretmanima Pb, Cd+Pb i Ni+Pb kod oba ispitivana klona. U korenu je koncentracija kalijuma bila manja u odnosu na listove sa izuzetkom tretmana Pb i Ni+Pb.

Pod uticajem teških metala koncentracije 10^{-5} M, koncentracija P se u listovima kretala u rasponu 0,22-0,55%, a u korenu 0,44-0,81% (Tabela 34). Koncentracija P je varirala specifično sa genotipom i tretmanima. U mladim listovima utvrđen je stimulativni efekat tretmana kod klona 1 na tretmanima Cd, Cd+Ni i Cd+Pb. Kod klona četiri nije utvrđen stimulativan efekat, ali je koncentracija P bila bez značajnih razlika u odnosu na kontrolu na tretmanima Cd, Cd+Pb i Cd+Ni+Pb, a u starim listovima i na tretmanima Pb, Cd+Ni i Ni+Pb. Koncentracija fosfora u korenu je na svim tretmanima bila veća u odnosu na listove.

Tabela 34. Uticaj kombinovanih tretmana teških metala koncentracije 10^{-5} M na koncentraciju K i P

Klon	Tretman 10^{-5} M	K (%)			P (%)		
		ml.list	st.list	koren	ml.list	st.list	koren
1	Kontrola	3,12 e	2,65 gh	2,56 efgh	0,42 c	0,46 a	0,58 de
	Cd	4,74 b	4,44 a	2,77 defg	0,55 a	0,51 a	0,69 b
	Ni	3,02 e	2,84 fg	2,67 defg	0,36 def	0,30 cdef	0,54 fgh
	Pb	3,04 e	2,68 gh	3,95 a	0,39 cde	0,33 bcd	0,54 efgh
	Cd Ni	4,24 c	3,27 cd	1,92 i	0,48b	0,37 bc	0,61 cd
	Cd Pb	4,56 b	3,78 b	3,68 ab	0,50 b	0,38 b	0,57 efg
	Ni Pb	2,51 f	2,84 fg	3,60 abc	0,39 cd	0,31 cde	0,52 h
	Cd Ni Pb	3,20 e	3,38 c	1,85 i	0,36 defg	0,32 cd	0,81 a
4	Kontrola	3,31 e	2,58 h	2,55 fgh	0,40 cd	0,27 defg	0,56 efgh
	Cd	5,11 a	3,04 ef	2,13 hi	0,42 c	0,32 cd	0,57 def
	Ni	3,15 e	2,46 h	2,25 ghi	0,29 h	0,22 g	0,47 i
	Pb	3,11 e	2,44 h	3,81 a	0,34 fg	0,28 defg	0,53 gh
	Cd Ni	3,27 e	2,96 ef	2,98 def	0,32 gh	0,33 bcd	0,46 i
	Cd Pb	3,82 d	3,15 de	3,17 bcd	0,36 defg	0,30 cdef	0,56 efgh
	Ni Pb	2,40 f	3,01 ef	3,08 cde	0,35 efg	0,25 efg	0,44 i
	Cd Ni Pb	3,21 e	2,95 ef	2,04 hi	0,36 defg	0,25 fg	0,64 c
NZR	0,31	0,22	0,50	0,038	0,061	0,039	

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za $p < 0,05$

5.7. Koncentracija azota i nitrata pod uticajem teških metala

U tabeli 35 prikazane su koncentracije N i NO_3^- u listovima vrba tretiranim Cd, Ni i Pb-EDTA. Koncentracija N u listovima varirala je u opsegu 4,01 – 5,17%. Cd je kod klonova 1 i 2 uzrokovao značajno opadanje količine N u odnosu na kontrolu, a Ni samo kod klona 1. Delovanje Pb-EDTA dovelo je takođe do opadanja nivoa N kod klona 1 i 4, dok je kod klonova 2 i 3 došlo do statistički značajnog povećanja, u poređenju tretmana 10^{-4} M (klon 2), odnosno 10^{-5} M (klon 3) sa kontrolnim biljkama.

Koncentracija NO_3^- je bila relativno stabilna, na većini tretmana bez značajnog variranja pod uticajem primenjenih teških metala. Značajne promene u odnosu na kontrolu utvrđene su pri tretmanu Pb-EDTA kod klonova 1 i 4 (10^{-4} M), te klonova 2 i 3 (10^{-5} M). Utvrđena variranja koncentracije NO_3^- koja su bila statistički značajna, zavisila su od korišćenog genotipa.

Tabela 35. Uticaj Cd, Ni i Pb-EDTA na koncentraciju N i NO_3^- u listovima vrba

Klon	Koncentracija (M)	N (%)			NO_3^- ($\mu\text{g/g}$)		
		Cd	Ni	Pb-EDTA	Cd	Ni	Pb-EDTA
1	0	5.17 a	5.17 a	5.17 a	5399 a	5399 a	5399 abcd
	10^{-4}	4.15 de	4.01 f	4.51 cd	4795 ab	4563 ab	4793 cde
	10^{-5}	4.35 c	4.02 f	4.58 c	4998 ab	4853 ab	4143 de
2	0	4.24 cd	4.24 e	4.24 e	5598 a	5598 a	5598 abcd
	10^{-4}	4.03 e	4.31 cde	5.25 a	4996 ab	5351 a	5432 abcd
	10^{-5}	4.15 de	4.47 bcd	4.61 c	5256 ab	5578 a	6541 a
3	0	4.33 cd	4.33 cde	4.33 e	4566 ab	4566 ab	4566 cde
	10^{-4}	4.21 cde	4.28 de	4.35 e	4253 b	4358 b	5879 abc
	10^{-5}	4.29 cd	4.32 cde	4.80 b	4601 ab	4529 ab	6270 ab
4	0	4.63 b	4.63 b	4.46 d	4992 ab	4992 ab	4992 bcde
	10^{-4}	4.55 b	4.48 bcd	4.11 f	4532 ab	4357 b	6754 a
	10^{-5}	4.61 b	4.46 bcd	4.06 f	4755 ab	4443 b	5533 abcd
NZR		0.181	0.202	0.109	1050	901	1401

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za $p < 0.05$

5.8. Uticaj teških metala na aktivnost nitrat reduktaze

Aktivnost nitrat reduktaze se pod uticajem Cd menjala specifično u zavisnosti od genotipa (Tabela 36). U mladim listovima utvrđeno je značajno smanjenje ove aktivnosti u odnosu na kontrolu, kod klonova 2 (10^{-5} M) i 4 (10^{-4} M). U starim listovima aktivnost ispitivanog enzima se povećala kod klona 1 na obe primenjene

koncentracije Cd, kod klona 2 i 4 na većoj koncentraciji (10^{-4} M), dok je kod klona 3 utvrđeno statistički značajno smanjenje pri koncentraciji 10^{-4} M. Aktivnost nitrat reduktaze u korenu je pod uticajem Cd manje varirala nego u listovima. Značajna razlika između kontrolnih i tretiranih biljaka utvrđena je samo u korenu klona 3.

Tabela 36. Uticaj Cd na aktivnost nitrat reduktaze

Klon	Tretman	Aktivnost nitrat reduktaze ($\mu\text{M NO}_2^- \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)		
	Cd (M)	mladi listovi	stari listovi	koren
1	0	1.45 de	1.06 f	0.53 ab
	10^{-4}	1.53 cde	2.07 de	0.46 abcd
	10^{-5}	1.30 def	1.78 e	0.41 bcd
2	0	2.59 ab	1.96 de	0.38 cde
	10^{-4}	3.10 a	3.15 b	0.49 abc
	10^{-5}	0.77 f	1.76 e	0.42 bcd
3	0	1.68 cde	2.89 bc	0.43 bcd
	10^{-4}	2.06 bc	1.74 e	0.59 a
	10^{-5}	2.06 bc	2.49 cd	0.33 de
4	0	1.85 cd	2.77 bc	0.38 cde
	10^{-4}	1.13 ef	3.79 a	0.33 de
	10^{-5}	1.29 def	3.83 ab	0.26 e
NZR		0.53	0.59	0.13

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za $p < 0.05$

Tretman Ni je uticao na smanjenje aktivnosti nitrat reduktaze u listovima i korenu kod svih istraživanih genotipova (Tabela 37). Smanjenje aktivnosti nije se pokazalo statistički značajnim u poređenju sa kontrolnim tretmanima samo u starim listovima klona 1.

Tabela 37. Uticaj Ni na aktivnost nitrat reduktaze

Klon	Tretman	Aktivnost nitrat reduktaze ($\mu\text{M NO}_2^- \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)		
	Ni (M)	mladi listovi	stari listovi	koren
1	0	1.44 b	1.06 cde	0.53 a
	10^{-4}	0.81 cd	0.98 cde	0.05 c
	10^{-5}	0.96 c	1.17 cd	0.10 c
2	0	2.59 a	1.96 b	0.38 b
	10^{-4}	0.73 cd	1.26 cd	0.07 c
	10^{-5}	1.57 b	0.90 cdef	0.07 c
3	0	1.68 b	2.89 a	0.43 b
	10^{-4}	0.52 de	0.78 def	0.08 c
	10^{-5}	0.55 cde	0.42 f	0.09 c
4	0	1.85 b	2.73 a	0.38 b
	10^{-4}	0.51 de	1.37 c	0.10 c
	10^{-5}	0.16 e	0.61 ef	0.10 c
NZR		0.39	0.50	0.06

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za $p < 0.05$

Tretman Pb-EDTA, nije uticao na aktivnost nitrat reduktaze (Tabela 38). Jedina značajna razlika u odnosu na kontrolu utvrđena je kod klona 4 u starim listovima. U korenu je aktivnost analiziranog enzima bila na ujednačenom niskom nivou na svim tretmanima.

Tabela 38. Uticaj Pb-EDTA na aktivnost nitrat reduktaze

Klon	Tretman	Aktivnost nitrat reduktaze ($\mu\text{M NO}_2^- \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$)		
	Pb-EDTA (M)	mladi listovi	stari listovi	koren
1	0	0.29 a	0.23 ab	0.09 a
	10^{-4}	0.34 a	0.28 ab	0.05 a
	10^{-5}	0.31 a	0.23 ab	0.05 a
2	0	0.16 b	0.26 ab	0.07 a
	10^{-4}	0.17 b	0.27 ab	0.04 a
	10^{-5}	0.17 b	0.21 bc	0.04 a
3	0	0.27 a	0.29 ab	0.09 a
	10^{-4}	0.31 a	0.31 a	0.06 a
	10^{-5}	0.26 a	0.23 bc	0.08 a
4	0	0.19 b	0.31 a	0.07 a
	10^{-4}	0.35 a	0.29 ab	0.06 a
	10^{-5}	0.18 b	0.23 bc	0.08 a
NZR		0.11	0.09	0.05

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za $p < 0.05$

5.8.1. Uticaj kombinovanih tretmana teških metala na aktivnost nitrat reduktaze

Tretman Cd koncentracije 10^{-4} M značajno je povisio aktivnost nitrat-reduktaze kod oba ispitivana klona (Tabela 39). Tretman Cd+Ni u starim listovima klona 4 takođe je stimulatивно delovao na aktivnost ovog enzima. Tretman Ni je smanjio aktivnost nitrat reduktaze ali bez statističke značajnosti. Na ostalim tretmanima aktivnost ispitivanog enzima je bila u istom nivou značajnosti sa kontrolom. Najmanja aktivnost nitrat reduktaze je kod oba klona utvrđena na

tretmanu Cd+Ni+Pb. Na svim tretmanima aktivnost nitrat reduktaze bila je veća u listovima u odnosu na koren.

Tabela 39. Uticaj kombinovanih tretmana teških metala koncentracije 10^{-4} M na aktivnost nitrat reduktaze

Klon	Tretman	Aktivnost nitrat reduktaze ($\mu\text{M NO}_2^- \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)		
	10^{-4} M	Mladi listovi	Stari listovi	Koren
1	Kontrola	0.24 c	0.24 de	0.03 cd
	Cd	0.63 b	0.78 b	0.02 def
	Ni	0.18 cde	0.21 def	0.02 fgh
	Pb	0.19 cde	0.18 efg	0.02 def
	Cd Ni	0.23 cd	0.17 efg	0.01 h
	Cd Pb	0.22 cde	0.28 cd	0.01 gh
	Ni Pb	0.17 cde	0.17 h	0.01 gh
	Cd Ni Pb	0.05 g	0.05 h	0.02 fg
4	Kontrola	0.18 cde	0.24 de	0.03 bc
	Cd	0.96 a	1.36 a	0.04 ab
	Ni	0.15 def	0.18 ef	0.02 efg
	Pb	0.15 def	0.17 efg	0.02 efg
	Cd Ni	0.20 cde	0.33 c	0.05 a
	Cd Pb	0.19 cde	0.23 def	0.02 def
	Ni Pb	0.11 efg	0.18 ef	0.02 ef
	Cd Ni Pb	0.08 fg	0.13 fgh	0.03 cde
NZR		0,08	0,08	0,007

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za $p < 0.05$

Aktivnost nitrat reduktaze u korenu je bila veoma niska i u kontrolnim biljkama i u tretiranim biljkama, pod uticajem obe primenjene koncentracije, što je rezultiralo veoma niskom značajnom razlikom kad je u pitanju ovaj parametar (Tabele 39 i 40).

Takođe je na koncentracijama 10^{-5} M utvrđen stimulatívni efekat tretmana Cd i Cd+Ni u poređenju sa kontrolom, kod oba istraživana genotipa (Tabela 40). Tretman niklom je smanjio aktivnost enzima na svim tretmanima, sa statistički značajnim razlikama utvrđenim kod klona 1. Aktivnost nitrat reduktaze nije značajno izmenjena na drugim tretmanima u odnosu na kontrolne biljke.

Tabela 40. Uticaj kombinovanih tretmana teških metala koncentracije 10^{-5} M na aktivnost nitrat reduktaze

Klon	Tretman	Aktivnost nitrat reduktaze ($\mu\text{M NO}_2^- \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)		
	10^{-5} M	Mladi listovi	Stari listovi	Koren
1	Kontrola	0.24 b	0.24 de	0.03 abcd
	Cd	0.69 a	1.32 b	0.02de
	Ni	0.11 cd	0.12de	0.03 bcde
	Pb	0.21 b	0.23 de	0.03 abcd
	Cd Ni	0.67 a	0.99 c	0.02 de
	Cd Pb	0.24 b	0.31 de	0.03 bcd
	Ni Pb	0.15 bcd	0.17 de	0.03 cde
	Cd Ni Pb	0.13 bcd	0.23 de	0.04 ab
4	Kontrola	0.18 bc	0.24 de	0.03 abcd
	Cd	0.65 a	0.74 a	0.06 cde
	Ni	0.07 cd	0.10 de	0.03 abcd
	Pb	0.17 bc	0.26 de	0.02 de
	Cd Ni	0.58 a	1.11 bc	0.02 de
	Cd Pb	0.23 b	0.33 d	0.01 e
	Ni Pb	0.10 cd	0.15 de	0.04 abc
	Cd Ni Pb	0.16 bcd	0.15 de	0.04 a
NZR		0,12	0,26	0,012

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za $p < 0.05$

5.9. Uticaj teških metala na koncentraciju slobodnog prolina

Sadržaj prolina se pod uticajem Cd menjao vrlo varijabilno bez uniformne tendencije (Tabela 41). U mladim listovima na obe primenjene koncentracije, njegov sadržaj se značajno povećao u klonovima 1 i 4, klonu 2 (10^{-5} M) i klonu 3 (10^{-4} M). U mladim listovima klona 2 je došlo do značajnog opadanja sadržaja prolina pod uticajem veće koncentracije Cd (10^{-4} M). U starim listovima klona 1 je pod uticajem veće koncentracije Cd (10^{-4} M) došlo do značajnog porasta, dok je za klon 2 utvrđeno opadanje sadržaja prolina. Kod ostalih klonova nije bilo značajnih promena. U korenu je Cd uzrokovao opadanje koncentracije prolina u svim slučajevima. Smanjenje koncentracije prolina u korenu nije u svim slučajevima bilo statistički značajno.

Tabela 41. Uticaj Cd na koncentraciju prolina

Klon	Tretman	Koncentracija prolina ($\mu\text{g g}^{-1}$)		
	Cd (M)	mladi listovi	stari listovi	koren
1	0	22.39 ef	9.20 fg	19.18 a
	10^{-4}	64.75 a	13.50 bcde	14.91 b
	10^{-5}	45.25 c	10.57 defg	16.01 b
2	0	29.82 d	15.85 ab	10.18 cd
	10^{-4}	21.69 ef	8.08 g	6.37 fg
	10^{-5}	58.03 b	18.26 a	10.75 c
3	0	14.15 g	13.50 bcde	7.67 ef
	10^{-4}	24.51 de	14.13 bcd	7.13 efg
	10^{-5}	18.03 fg	14.74 bc	5.59 g
4	0	25.78 de	10.52 efg	12.11 c
	10^{-4}	44.61 c	10.84 defg	10.63 c
	10^{-5}	52.28 b	12.18 cdef	8.56 de
NZR		5.76	3.37	1.89

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za $p < 0.05$

Pod uticajem Ni koncentracija prolina je u listovima i korenu u većini slučajeva bila manja u poređenju sa kontrolom (Tabela 42).

Tabela 42. Uticaj Ni na koncentraciju prolina

Klon	Tretman	Koncentracija prolina ($\mu\text{g g}^{-1}$)		
	Ni (M)	mladi listovi	stari listovi	koren
1	0	22.05 cde	9.38 cd	19.12 a
	10^{-4}	29.09 a	8.94 cd	10.58 bc
	10^{-5}	24.71 abc	5.75 e	7.66 de
2	0	20.27 de	15.82 a	10.18 c
	10^{-4}	23.46 bcd	2.23 f	6.07 ef
	10^{-5}	11.83 fg	8.51 d	6.02 ef
3	0	14.15 f	13.67 b	7.67 de
	10^{-4}	12.61 fg	3.03 f	7.93 d
	10^{-5}	8.81 g	8.94 cd	2.77 g
4	0	25.45 abc	10.82 c	12.13 b
	10^{-4}	18.89 e	3.89 ef	5.70 f
	10^{-5}	27.44 ab	9.20 cd	1.92 g
NZR		4.20	2.15	1.76

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za $p < 0.05$

Samo u mlađim listovima klona 1 na koncentraciji od 10^{-4} M Ni, došlo je do značajnog porasta koncentracije prolina. U korenu su razlike između kontrole i tretmana Ni bile značajne sa jednim izuzetkom (klon 3, 10^{-4} M).

Koncentracija prolina je u listovima pod uticajem Pb-EDTA bila manja u tretiranim biljkama u poređenju sa kontrolnim (u većini slučajeva statistički značajno). Izuzetak su klonovi 2 i 3 za koje je utvrđeno signifikantno povećanje koncentracije prolina pod uticajem Pb-EDTA (Tabela 43). U korenu klonova 1, 3 i 4 utvrđeno je značajno smanjenje koncentracije prolina pod uticajem tretmana, dok je za klon 2 na koncentraciji 10^{-4} M utvrđeno povećanje koncentracije prolina za jedan nivo značajnosti.

Tabela 43. Uticaj Pb-EDTA na koncentraciju prolina

Klon	Tretman	Koncentracija prolina ($\mu\text{g g}^{-1}$)		
	Pb-EDTA (M)	mladi listovi	stari listovi	koren
1	0	30.31 a	30.91 a	20.31 c
	10^{-4}	26.29 bc	14.94 cd	22.49 c
	10^{-5}	22.82 de	15.05 cd	16.35 d
2	0	26.25 bc	18.54 c	9.84 f
	10^{-4}	28.92 ab	26.01 b	12.61 e
	10^{-5}	21.76 ef	18.76 c	9.84 f
3	0	25.16 cd	8.51 e	26.82 b
	10^{-4}	21.27 ef	13.73 d	9.85 f
	10^{-5}	19.08 fg	12.39 de	10.80 ef
4	0	21.79 ef	20.75 ab	44.67 a
	10^{-4}	18.94 fg	11.32 de	10.80 ef
	10^{-5}	15.96 g	11.49 de	12.12 ef
NZR		3.01	3.77	2.33

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za $p < 0.05$

Pojedinačnim delovanjem sva tri teška metala (Cd, Ni i Pb-EDTA) u korenu je došlo do opadanja koncentracije prolina u odnosu na kontrolu, sa izuzetkom klona 2, pod uticajem Pb-EDTA (Tabele 41-43). Koncentracija prolina u mladim listovima bila je veća u odnosu na stare listove na svim primenjenim tretmanima.

5.9.1. Uticaj kombinovanih tretmana teških metala na koncentraciju slobodnog prolina

Koncentracija prolina u listovima se pod dejstvom teških metala koncentracije 10^{-4} M uglavnom povećala u poređenju sa kontrolnim biljkama (Tabela 44). Izuzetak je tretman Pb, na kom je koncentracija prolina u listovima opala. Na svim

tretmanima, koncentracija prolina u mladim listovima bila je veća u odnosu na stare listove.

U korenu je takođe na većini tretmana došlo do stimulacije u sintezi prolina (Tabela 44). Opadanje njegovog nivoa je utvrđeno tretiranjem klona 1 kombinacijom Cd+Pb i tretmanu Ni+Pb kod oba klona, ali bez statističke značajnosti.

Tabela 44. Uticaj kombinovanih tretmana teških metala koncentracije 10^{-4} M na koncentraciju prolina

Klon	Tretman	Koncentracija prolina ($\mu\text{g g}^{-1}$)		
	10^{-4} M	Mladi listovi	Stari listovi	Koren
1	Kontrola	12.15 def	5.33 cde	12.72 efgh
	Cd	16.63 cd	7.59 bcd	50.67 b
	Ni	23.45 bc	7.41 bcd	20.33 def
	Pb	7.05 f	3.31 e	25.64 de
	Cd Ni	15.63 de	8.69 bc	10.93 fgh
	Cd Pb	14.43 de	5.32 cde	3.18 h
	Ni Pb	26.77 b	6.49 cde	7.11 fgh
	Cd Ni Pb	23.56 bc	25.81 a	88.46 a
4	Kontrola	10.61 def	7.44 bcd	9.77 fgh
	Cd	34.26 a	10.39 b	43.22 bc
	Ni	16.78 cd	4.53 de	30.81 cd
	Pb	8.58 ef	4.43 de	18.52 defg
	Cd Ni	22.79 bc	6.91 bcd	11.69 fgh
	Cd Pb	9.04 ef	5.01 de	14.43 efgh
	Ni Pb	28.89 ab	7.74 bcd	5.91 gh
	Cd Ni Pb	27.15 b	28.16 a	11.91 fgh
NZR		6,67	3,26	12,56

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za $p < 0.05$

Značajno smanjenje koncentracije prolina u listovima, pod uticajem koncentracija teških metala od 10^{-5} M, utvrđeno je samo u starim listovima na tretmanu Cd+Ni klona 1 i na tretmanu Pb klona 4 (Tabela 45). Na ostalim tretmanima koncentracija prolina je bila slična ili veća u odnosu na kontrolne biljke. Kao i na koncentracijama 10^{-4} M, koncentracija prolina u mladim listovima bila je veća u poređenju sa starim listovima.

U korenu je većina tretmana dovela do povećanja koncentracije prolina (Tabela 45). Izuzetak su tretmani Cd i Cd+Ni klona 1 i Cd i Cd+Ni+Pb klona 4.

Tabela 45. Uticaj kombinovanih tretmana teških metala koncentracije 10^{-5} M na koncentraciju prolina

Klon	Tretman	Koncentracija prolina ($\mu\text{g g}^{-1}$)		
	10^{-5} M	Mladi listovi	Stari listovi	Koren
1	Kontrola	12.15 de	5.33 def	12.72 bcd
	Cd	14.58 cde	2.66 gh	4.78 i
	Ni	23.60 b	7.47 cde	13.61 bc
	Pb	9.22 e	4.41 fg	22.35 a
	Cd Ni	22.78 b	1.19 h	6.74 ghi
	Cd Pb	23.51 b	5.82 def	10.24 cdefg
	Ni Pb	14.84 cde	7.04 cde	21.95 a
	Cd Ni Pb	20.90 bc	25.67 a	10.02 cdefg
4	Kontrola	10.61 de	7.32 cde	9.77 defg
	Cd	17.60 bcd	11.01 b	6.27 hi
	Ni	13.23 cde	8.77 bc	11.15 cde
	Pb	9.62 e	3.99 fg	8.52 efghi
	Cd Ni	16.38 bcde	4.94 efg	10.52 cdef
	Cd Pb	44.76 a	6.01 def	7.06 fghi
	Ni Pb	13.58 cde	7.88 cd	15.52 b
	Cd Ni Pb	13.23 cde	4.94 efg	6.03 hi
NZR		7,34	2,37	3,47

vrednosti označene istim slovom u kolonama ne razlikuju se značajno za $p < 0.05$

5.10. Analiza potencijala klonova u fitoekstrakciji Cd, Ni i Pb

U cilju udruživanja dobijenih podataka u jednu preglednu analizu, izvršena je analiza statističke udaljenosti genotipova korišćenjem vrednosti istraženih parametara. U obzir su uzeti parametri koji se smatraju najvažnijim predispozicijama za efikasnu primenu u fitoekstrakciji i za čije vrednosti je poželjno da budu na što većem nivou: masa korena, zapremina korena, masa izbojka, visina izbojka, masa i površina listova, intenzitet transpiracije, disanja i fotosinteze i akumulacija metala u nadzemnom delu biljke.

Svakom genotipu dodeljena su tri „karaktera“:

„a“ – vrednost parametra za dati genotip je statistički značajno veća od kontrole ili veća od vrednosti drugih genotipova

„b“ – vrednost parametra za dati genotip je statistički jednaka sa kontrolom

„c“ – vrednost parametra za dati genotip je statistički značajno manja od kontrole

U tabelama 46-48 je dat prikaz pojave odgovarajućih parametara po svakom genotipu u zavisnosti od primenjenog teškog metala. Za efikasnu fitoekstrakciju poželjan je što veći broj karaktera a i b, a što manji broj karaktera c. Kvantitet ovako formiranih parametara iskorišćen je za klaster analizu čime je utvrđena statistička bliskost genotipova u njihovom fitoekstrakcionom potencijalu svakog od teških metala pojedinačno. Na grafičkim prikazima klastera (eng. cluster), povećanjem vrednosti statističkog rastojanja (d) između klonova, smanjuje se sposobnost datog klona u fitoekstrakciji (slike 86-88).

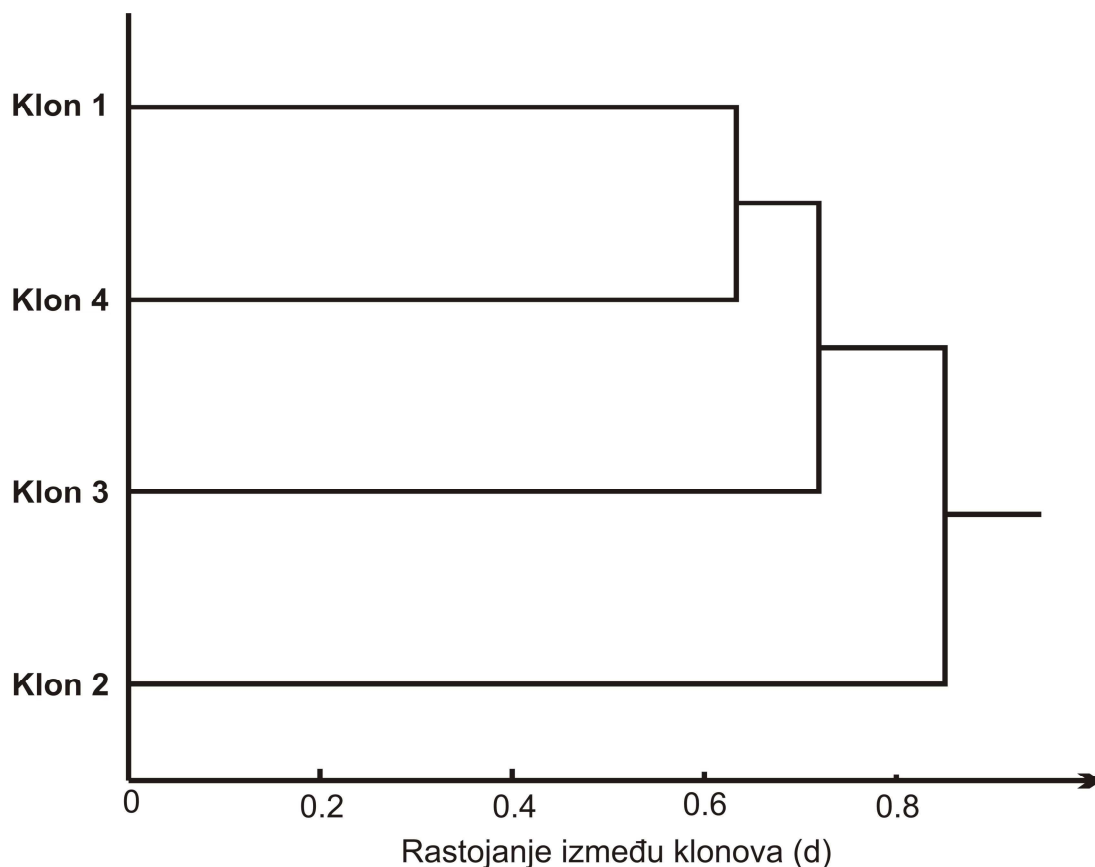
5.10.1. Potencijal klonova u fitoekstrakciji Cd

Svi klonovi imali su najveći broj karaktera „c“, što ukazuje da je Cd delovao kao jak faktor stresa na istražene klonove (Tabela 46). Klon 4 se izdvaja kao klon sa najvećim brojem karaktera „a“ i „b“, što potvrđuje da ovaj genotip ima najveći potencijal u fitoekstrakciji Cd.

Tabela 46. Predispozicija klonova za fitoekstrakciju Cd
podvučen je klon sa najvećim statistički utvrđenim potencijalom u fitoekstrakciji

	a	b	c
Klon 1	8	4	22
Klon 2	0	3	27
Klon 3	2	10	16
Klon 4	18	3	19

Pored klona 4, klon 1 je takođe imao značajan broj parametara koji nisu opali pod uticajem Cd. Ovo potvrđuje i klaster (Slika 86). Po predispoziciji za fitoekstrakciju Cd statistički najbliži su bili klonovi 1 i 4, dok je klon 2 imao najmanju frekvenciju poželjnih parametara, sa najvećim statističkim rastojanjem u odnosu na ostale genotipove.



Slika 86. Statistička sličnost između klonova u zavisnosti od predispozicije za fitoekstrakciju kadmijuma

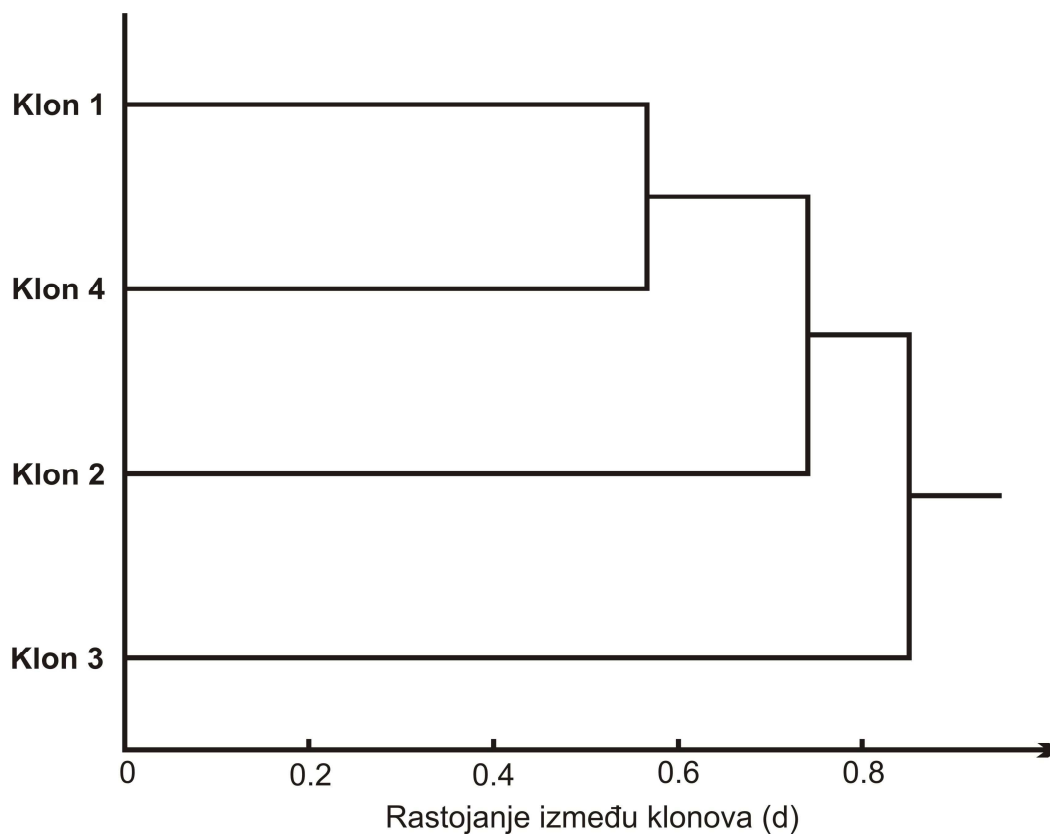
5.10.2. Potencijal klonova u fitoekstrakciji Ni

Kao i u slučaju Cd, veliki broj karaktera „c“ ukazuje da je tretman Ni uzrokovao značajan stres vrba (Tabela 47). Ponovo se kao najefikasniji klonovi u fitoekstrakciji izdvajaju klon 4, odnosno klon 1.

Tabela 47. Predispozicija klonova za fitoekstrakciju Ni
podvučen je klon sa najvećim statistički utvrđenim potencijalom u fitoekstrakciji

	a	b	c
Klon 1	11	6	22
Klon 2	3	8	20
Klon 3	0	9	19
Klon 4	15	10	18

Najveća statistička bliskost izračunata na osnovu poželjnih karaktersitika fitoekstraktora Ni, ponovo je karakteristična za klonove 4 i 1 (Slika 87). Za razliku od Cd, kao najboljši klon u fitoekstrakciji Ni izdvojio se klon 3.



Slika 87. Statistička sličnost između klonova u zavisnosti od predispozicije za fitoekstrakciju Ni

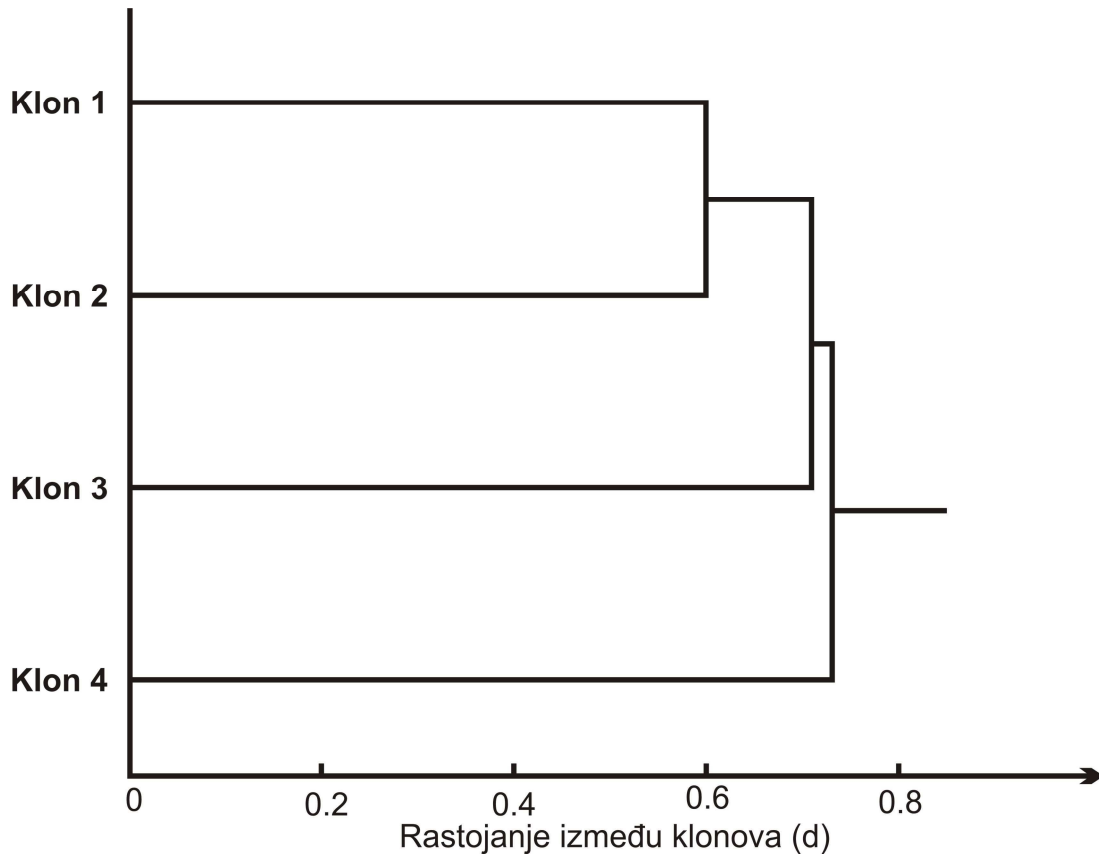
5.10.3. Potencijal klonova u fitoekstrakciji Pb

Najveći broj poželjnih parametara u fitoekstrakciji Pb utvrđen je kod klona 1 (Tabela 48). Za razliku od Cd i Ni, broj karaktera „c“ koji su narušavali bioprodukciju vrba osim kod klona 4, nije premašio broj karaktera koji ukazuju na toleranciju i adaptaciju na stres nastao tretmanom Pb-EDTA, što ukazuje da prisustvo Pb-EDTA u hranljivom rastvoru nije delovalo kao jak stresogeni faktor.

Tabela 48. Predispozicija klonova za fitoekstrakciju Pb
podvučen je klon sa najvećim statistički utvrđenim potencijalom u fitoekstrakciji

	a	b	c
Klon 1	22	13	7
Klon 2	10	18	9
Klon 3	4	13	13
Klon 4	6	8	20

Kao klonovi sa najvećom predispozicijom u fitoekstrakciji Pb izdvojili su se klon 1, odnosno klon 2 (Slika 88). Klon 4, koji se pokazao kao dobar fitoekstraktor Cd i Ni, za Pb je imao najniži nivo poželjnih osobina. Slično se može utvrditi i za klon 3 čije se statističko rastojanje u odnosu na klaster klonova 1 i 2 ($d = 0.71$) vrlo malo razlikovalo u odnosu na rastojanje klona 4 prema klasteru klonova 1, 2 i 3 ($d = 0.73$).



Slika 88. Statistička sličnost između klonova u zavisnosti od predispozicije za fitoekstrakciju Pb

6. Diskusija

6.1. Uticaj teških metala na rast biljaka i produkciju biomase

Svi elementi koji spadaju u grupu teških metala, u većim koncentracijama deluju toksično na biljke, bez obzira na njihovu fiziološku ulogu. Efekti toksičnosti ispoljavaju se usled većeg broja poremećaja. Teški metali menjaju ili inhibiraju aktivnost enzima, oštećuju ćelijske membrane, narušavaju aktivnost fitohormona, usvajanje jona, translokaciju asimilata, dovode do promena u vodnom režimu, stvaraju oksidativni stres, inhibiraju fotosintezu i disanje (Dietz i sar., 1999). Postoje dokazi da ubrzavaju starenje listova (Jana i Choudhuri, 1982; Fuhrer, 1983). Teški metali prihvataju par elektrona iz koordinatnih kovalentnih veza, reagujući sa $-S^-$, $-OH^-$, amino grupama i terminalnim delovima karboksilnih kiselina. Cd i Pb, kao neesencijalni elementi, deluju na SH grupe i N atome proteina, čime ih inaktiviraju (Lambers i sar., 2008). Kada je koncentracija teških metala u blizini ćelijske membrane visoka, ispoljavaju se nekontrolisane redoks reakcije, usled čega se povećava koncentracija slobodnih radikala. Slobodni radikali dovode do lipidne peroksidacije usled čega se narušava selektivna propustljivost membrane (Clemens, 2001). Neki teški metali inaktiviraju enzime tako što preuzimaju aktivacionu ulogu drugih katjona (Van Assche i Clijsters, 1990). Brojne fiziološke, anatomske i morfološke promene, za krajnju posledicu imaju smanjenu produkciju organske materije (Kastori i Maksimović, 2008).

Simptomi toksičnog delovanja suviška teških metala u tkivu vrba ispitivanih u ovoj disertaciji bili su specifični u odnosu na primenjeni tretman. Pod uticajem Cd, hloroza je bila homogena na celoj lisnoj ploči mlađih listova. Nikl je doveo do pojave hloroza na mladim i starim listovima, sa postepenom progresijom od interkostalne ka homogenoj hlorozi. Konstatovano je takođe širenje nekrotičnih površina od oboda liske. Slični morfološki simptomi su utvrđeni na krompiru pod uticajem Ni (Rajni i Rajeev, 2009).

Izraženi hlorotični i nekrotični simptomi na biljkama tretiranim Cd i Ni koncentracije 10^{-4} M, uz smanjenu visinu i masu nadzemnog dela biljaka ukazuju da je dati nivo kontaminacije ova dva metala značajno uticao na smanjenje vijabilnosti istraživanih genotipova. Često su razlike u reakciji bioprodukcije genotipa na

tretmane, bile veće između klona 1 i 2 (pripadaju istoj vrsti) nego između klonova različitih vrsta, što ukazuje na genotipsku specifičnost reakcije na teške metale, odnosno na značaj genotipa u uspešnoj primeni vrba u fitoekstrakciji.

Obe koncentracije Cd dovele su do značajnog opadanja visine i mase izbojka, ukupne mase i površine lista. Takođe je došlo do značajnog smanjenja veličine lista (opadanje prosečne mase i površine pojedinačnog lista). Redukcija biomase je bila značajno više izražena pod uticajem koncentracije 10^{-4} M Cd. Ovi rezultati su u skladu sa ranijim istraživanjima po kojima Cd smanjuje klijanje, rast i organsku produkciju (Lozano-Rodríguez i sar., 1997, Larbi i sar., 2002). Kao genotip sa najvećom bioprodukcijom u uslovima kontaminacije korenskog medijuma kadmijumom, izdvojio se klon 4.

Veća koncentracija Ni (10^{-4} M) je u najvećoj meri redukovala rast klonova u poređenju sa kontrolom, tako da je npr. masa izbojka opala od 2,43 do 6,33 puta u odnosu na kontrolu. Razlike u bioprodukciji između biljaka gajenih na dve različite koncentracije Ni (10^{-4} i 10^{-5} M), bile su izraženije u poređenju sa Cd. Za razliku od Cd i Pb, Ni nije statistički značajno stimulisao rast korena, koji je u manjem broju slučajeva bio redukovan. Klonovi 1 i 4 su se izdvojili kao genotipovi sa najvećom bioprodukcijom na tretmanu Ni.

Prisustvo Pb-EDTA je u najmanjoj meri redukovalo rast ispitivanih genotipova. U poređenju sa kontrolom, većina parametara rasta registrovanih za klonove 3 i 4 je bila jednaka ili niža. Klon 2 je imao najmanje promene rasta pod uticajem zagađenja, dok je kod klona 1 utvrđen stimulativan efekat Pb-EDTA na rast. Reakcija genotipova je bila veoma specifična. Tako npr. klon 2 nije imao manje mase i površine lista po izbojku u odnosu na kontrolu, ali je imao manju prosečnu masu i površinu jednog lista. Ovo ukazuje da je smanjenje veličine lista pratilo povećanje broja listova čime se ukupna masa listova održala na istom nivou kao i kod kontrolnih biljaka. Klon 1 je pokazao značajno povećanje mase i zapremine korena pod uticajem obe primenjene koncentracije Pb-EDTA. Prema tome, EDTA je zaštitila biljke neutralisanjem jona Pb. Slične rezultate dobili su Larbi i sar. (2002) tretirajući šećernu repu povišenim koncentracijama Pb-EDTA, što nije u značajnoj meri redukovalo rast.

Pod uticajem Cd došlo je do porasta korena svih klonova osim klona 2. Povećanje korena pod uticajem Cd i Pb-EDTA je potvrđeno i ispitivanjem kombinovanog uticaja teških metala na rast klonova 1 i 4. Kombinovani tretman

Ni+Pb je takođe doveo do povećanja mase korena, ali bez statističke značajnosti. Slične rezultate u drvenastim vrstama dobio je Gussarson (1994), za nešto niže primenjene koncentracije Cd. Prema ovom autoru akumulacija Cd u kombinaciji sa povećanjem korena, bi mogla biti mehanizam zaštite nadzemnog dela biljke od toksičnog dejstva teškog metala. Po ovoj hipotezi, povećanjem korena stvara se „rezervoar“ koji može da nakupi veće količine teškog metala i izoluje ga od nadzemnih delova, gde bi ispoljavanje njihovih toksičnih dejstava imalo najveće posledice. Tolerancija teških metala na nivou korena, koja ukazuje na očuvanje selektivnosti ćelijskih membrana korena, predstavlja prvi preduslov da se neka biljka može primeniti kao fitoekstraktor. Zacchini i sar. (2009) su istraživali uticaj Cd na 6 klonova vrba i 10 klonova topola. U 50% vrba i 40% topola, tretman povišenim koncentracijama Cd nije doveo do smanjenja dužine korena u odnosu na kontrolu. Wójcik i Tukendorf (1999) su utvrdili povećanje korena kukuruza gajenog 3 sata na $0,5 \times 10^{-4}$ M i $2,5 \times 10^{-4}$ M Cd, za 106,6 - 112,5 %. Lux i sar. (2004) su utvrdili da se genotipovi vrba sa potvrđenom tolerancijom na Cd karakterišu specifičnostima u anatomiji korena. Apoplastni transport Cd u steli korena i uzlazna translokacija značajno su zavisile od anatomije korena. Razvoj endodermalnih kasparijevih traka u klonovima koji su imali visoku toleranciju na Cd se odvijao na većoj udaljenosti od vrha korena u poređenju sa klonovima koji imaju nisku akumulaciju Cd. Takođe, formiranje suberinskih lamela odvijalo se na većoj udaljenosti od vrha korena kod klonova vrba koji se karakterišu većom translokacijom Cd u nadzemne delove. Nikolić (2009) konstatuje genotipsku specifičnost anatomskih promena korena topola izloženih povišenim koncentracijama Cd i Ni. U nekim klonovima topola utvrđeno je povećanje udela korteksa sa istovremenim smanjenjem centralnog cilindra korena. U cilju preciznog utvrđivanja uzroka povećanja korena pod uticajem Cd, odnosno Pb-EDTA u vrbama ispitanim u ovoj disertaciji potrebno je izvršiti dodatna istraživanja. Precizno funkcionalno objašnjenje sličnih povećanja korena pod uticajem teških metala, na molekularnom nivou, još nije poznato u dostupnoj naučnoj literaturi.

Ispitivanje uticaja kombinovanih tretmana teških metala na klonove 1 i 4 pokazalo je da je Pb-EDTA najmanje redukovalo rast ili čak delovalo stimulatивно na genotipove, što ukazuje na zaštitni efekat EDTA. Parametri rasta u kombinovanim rastvorima Cd+Pb-EDTA i Ni+Pb-EDTA su u većini slučajeva bili značajno veći u poređenju sa parametrima rasta izmerenim pod uticajem Cd, odnosno Ni, a manji u odnosu na pojedinačne rastvore Pb-EDTA. Kombinovani tretman Cd+Ni+Pb-EDTA i

tretman Cd+Ni su u najvećoj meri redukovali rast klonova 1 i 4. Nekoliko studija ukazuje da se Ni nalazi češće u citosolu ćelije, dok se Cd češće akumulira u vakuoli, što ukazuje na postojanje odvojenih mehanizama tolerancije za Cd i Ni (Brune i sar., 1995). Antagonizam u njihovom toksičnom dejstvu je u tom slučaju sveden na najmanju moguću meru, čime se može objasniti da je njihovo zajedničko delovanje izazvalo najveće smanjenje svih parametara bioprodukcije u ispitivanim vrbama.

Prisustvo EDTA u hranljivom rastvoru je značajno umanjilo negativne efekte teških metala, pre svega Pb ali i Cd i Ni. Stvaranjem helata teških metala smanjuje se njihova reaktivnost i toksično delovanje. Kako se jon olova nije nalazio u velikim koncentracijama slobodan u biljnim ćelijama, uobičajeni toksični efekti Pb su izostali.

Specifičnost genotipa je potvrđena i analizom bioprodukcije pod uticajem kombinovanog delovanja teških metala u istom rastvoru. Klon 4 je imao značajno veću bioprodukciju u odnosu na klon 1 na većini primenjenih tretmana.

6.2. Uticaj teških metala na intenzitet transpiracije

U brojnim istraživanjima je potvrđen negativan uticaj teških metala na vodni režim biljaka. Ovaj uticaj se najčešće ogleda kroz smanjen intenzitet transpiracije. Smanjeno odavanje vode pod uticajem teških metala nastaje usled direktnih i indirektnih efekata na određene metaboličke procese biljaka. Primer direktnog delovanja je smanjenje stomaterne provodljivosti kroz neposredan uticaj Cd na ćelije zatvaračice (Milone i sar., 2003). Joni žive blokiraju akvaporine čime se redukuje potencijal prolaska vode kroz membranu (Ionenko i sar., 2006). Joni žive, olova i cinka direktno inhibiraju otvaranje stoma (Yang i sar., 2004). Negativnim delovanjem na niz procesa kao što su fotosinteza, disanje, aktivnost enzima, transport jona kroz membranu, redukovana bioprodukcija, teški metali posredno smanjuju i promet vode kroz biljku. Utvrđeno je i da je otpornost biljaka na sušu značajno manja kada su biljke izložene dejstvu teških metala u podlozi.

Uticaj teških metala na intenzitet transpiracije bio je najveći u prepodnevnom periodu (od 7 – 13 h) kada je transpiracija najintenzivnija. U popodnevnom periodu (13 – 19 h) odavanje vode se postepeno smanjivalo, ali su razlike između dejstva različitih teških metala i genotipova bile u korelaciji sa prepodnevnim periodom. U

toku noći (19 – 7 h), nivo transpiracije je opao na zanemarljivo male vrednosti, te stoga uticaj teških metala na vodni režim nije pokazao značajan efekat.

Nikl je u obe primenjene koncentracije u najvećoj meri redukovao intenzitet transpiracije, u odnosu na kontrolu, dok je dejstvom Cd i Pb-EDTA do značajnog smanjenja transpiracije došlo u manjem broju slučajeva. U pojedinim slučajevima došlo je i do blagog povećanja odavanja vode. Potvrđeno je da teški metali delom smanjuju transpiraciju kroz direktnu redukciju apsorpcione površine korena inhibicijom stvaranja korenskih dlaka, redukcijom permeabilnosti membrana korenskih ćelija, broja i dijametra vaskularnih elemenata (Barceló i Poschenrieder, 1990). Manji uticaj Cd i Pb-EDTA na smanjenje transpiracije u odnosu na uticaj Ni i kombinovanih tretmana može se objasniti činjenicom da je rast korena bio najmanje inhibiran upravo na ovim tretmanima. Odavanje vode se pod uticajem teških metala najmanje menjalo kod klona 4 i to ukazuje na tolerantnost ovog genotipa na primenjene tretmane. Kombinovani tretmani Cd+Ni+Pb-EDTA, Cd+Ni i Cd+Pb-EDTA su značajno uticali na smanjenje intenziteta transpiracije, naročito na većoj koncentraciji teških metala (10^{-4} M). Smanjenje transpiracije je pod uticajem Cd potvrđeno, čak i kada je aktivnost fotosintetičkog aparata zaštićena sintezom fitohelatina (Haag-Kerwer i sar., 1999; Gouia i sar. 2000). Mada Vasilev i sar. (2005) navode da su poremećaji u vodnom režimu pod uticajem Cd manje izraženi u hidroponskim eksperimentima u odnosu na zemljišne kulture, klon 4 je pokazao izuzetnu stabilnost vodnog režima u uslovima suviška Cd.

Intenzitet transpiracije je opao u manjoj meri u odnosu na kontrolu pod uticajem kombinovanih rastvora teških metala koncentracije 10^{-5} M, nego što je utvrđeno na koncentracijama 10^{-4} M. Stoga su i razlike između različitih uticaja pojedinih kombinacija teških metala bile statistički manje značajne na koncentracijama 10^{-5} M, što ukazuje da je toksičan efekat teških metala zavisao od nivoa kontaminacije. Zajedničko dejstvo teških metala, obično je imalo veći negativan efekat u odnosu na pojedinačno dejstvo metala. Međutim, utvrđeno povećanje toksičnosti nikada nije bilo potpuno aditivno (duplirano) što ukazuje ili na antagonistički efekat između metala, ili na izraženiju aktivaciju zaštitnih mehanizama pod uticajem većeg broja prisutnih teških metala.

6.3. Uticaj teških metala na koncentraciju pigmenata, fotosintezu i disanje

Teški metali u biljkama, kao faktori stresa, izazivaju čitav niz poremećaja koji dovode i do narušavanja fundamentalnih metaboličkih procesa kao što su fotosinteza i disanje. Veliki broj istraživanja ukazuje da teški metali, direktno ili indirektno, u zavisnosti od vrste i koncentracije, smanjuju intenzitete fotosinteze i disanja i utiču na sintezu i razgradnju biljnih pigmenata. Negativni efekti ogledaju se kroz narušavanje strukture hloroplasta, sinteze hlorofila, karotenoida, plastohinona, destruktivnim delovanjem na pigment-proteinske komplekse, konformaciju i aktivnost enzima, prenos elektrona u transportnim lancima disanja i fotosinteze (Becceril i sar., 1988; Seregin i Ivanov, 2001; Milone i sar., 2003; Pietrini i sar., 2005; Seregin i Kozhevnikova, 2006). Očekivana redukcija merenih fotosintetičkih i respiratornih parametara u ispitivanim vrbama izloženim povišenim koncentracijama teških metala, bila je specifična u zavisnosti od teškog metala i nivoa kontaminacije.

Cd i Ni su doveli do značajnog smanjenja koncentracije pigmenata u listovima, što je bilo izraženije u mladim listovima. Pb-EDTA u većini slučajeva nije smanjilo koncentraciju fotosintetičkih pigmenata u listu, pri čemu je registrovano nekoliko primera stimulacije sinteze pigmenata. Xiang i sar. (2006) su tretirali kineski kupus različitim koncentracijama Pb. U većini slučajeva koncentracija pigmenata je opala, ali je na koncentraciji od 0,4 mmol/kg suve zemlje, utvrđen stimulatívni efekat čistog Pb na koncentraciju hlorofila *b*. Pri tome autori nisu uspeli da utvrde funkcionalni razlog tom povećanju koncentracije pigmenata. Cd je pojedinačno uticao na značajnije smanjenje koncentracije pigmenata nego kombinovani tretman Cd+Ni, ali su svi ostali primenjeni pojedinačni i kombinovani tretmani (osim pojedinačnog tretmana Pb-EDTA) doveli do smanjenja koncentracije pigmenata u odnosu na kontrolu. Genotipska specifičnost u pogledu koncentracije pigmenata bila je veoma izražena, kako u reakciji na pojedinačne tako i na kombinovane tretmane teških metala. Vasilev i sar. (2005) su utvrdili smanjenje koncentracije hlorofila *a*, a posledično i intenziteta fotosinteze u dva klona vrba tretiranih povišenim koncentracijama Cd u vodenim kulturama. Smatra se da Cd direktno narušava enzimatiku aktivnost u Kalvinovom ciklusu, inhibira sintezu pigmenata inhibiranjem prothlorofilid reduktaze i uticajem na ultrastrukturu tilakoida. Povišene koncentracije

Cd stvaraju nedostatak Fe, što utiče na pojavu hloroze listova, poremećaje usvajanja hraniva, funkcionisanja elektron-transportnih lanaca i vodnog režima što udruženo dovodi do opadanja intenziteta fotosinteze i disanja (Becceril i sar., 1988; Hendry i sar., 1992; Wallace i sar., 1992; Barila i sar., 2001; Perfus-Barbeoch i sar., 2002; Milone i sar., 2003; Pietrini i sar., 2005; Dinakar i sar., 2008).

Brzina razmene kiseonika u procesu disanja i fotosinteze je značajno opala pod uticajem pojedinačnog delovanja Cd i Ni. Ovo narušavanje fotosintetičkog i respiratornog procesa je bilo značajnije u mladim listovima i pri primenjenim koncentracijama od 10^{-4} M.

O fotosintetičkoj aktivnosti se delom može zaključivati na osnovu indukcije fluorescencije hlorofila, praćenjem parametra Fv/Fm. U optimalnim životnim uslovima, bez obzira na taksonomsku grupu, ekološko poreklo, ili životnu formu biljaka, ovaj parametar je stabilan i vrednost mu se kreće oko 0,8 (Björkman, 1987; Pajević, 1996). Svaka promena u fluorescenciji hlorofila ukazuje na inhibiciju, odnosno poremećaje u transportu elektrona, čime se dobijaju informacije o eventualnim heterogenostima u antena strukturi PS II i u elektronskom toku do PQ (Bolhár-Nordenkampf i sar., 1989; Karukstis, 1992; Nogués i sar., 1994; Longenberger i sar., 2009). U ovom radu, teški metali nisu uticali na opadanje parametra fluorescencije Fv/Fm ispod 0,7 sem u jednom slučaju, i vrednosti koje su se kretale u opsegu između 0,7 – 0,8 se uglavnom nisu statistički razlikovale u odnosu na kontrolu. To ukazuje da u vrbama nije došlo do narušavanja fotohemijske efikasnosti, te da je smanjenje intenziteta fotosinteze verovatno vezano za smanjenje koncentracije pigmenata. Pravilan fotosintetički i respiratorni metabolizam vrba je pod uticajem Ni i Cd bio najviše narušen u mladim listovima, koji su imali i najizraženije morfološke simptome (hloroze i nekroze), što je delimično posledica veće koncentracije Cd akumuliranog u mladim listovima u odnosu na stare. Nesmanjena transpiracija pod uticajem Cd i činjenica da su metabolički procesi najintenzivniji u mladim formiranim listovima, ukazuju da su postojali dobri uslovi za translokaciju Cd u gornje, mlade listove. Metabolički procesi, disanje i fotosintetička produktivnost dostižu svoj najveći nivo u mladim potpuno formiranim listovima. Taj nivo se zadržava neko vreme, da bi sa starenjem lista počeo da opada, usled čega stari listovi imaju manji doprinos proizvodnji organske materije od mladih (Hirano i sar., 1994).

Prisustvo Pb u organskoj formi (Pb-EDTA) nije uticalo na opadanje intenziteta fotosinteze i disanja, sa nekoliko izuzetaka, niti na narušavanje parametra fluorescencije. Kod klona 3, Pb-EDTA je stimulisalo disanje biljaka. Ovakvi rezultati ukazuju da je EDTA kao helatirajući agens zaštitio metabolizam biljke od toksičnih efekata Pb, što je u skladu sa nekim ranijim istraživanjima (Larbi i sar., 2002).

Efekat kombinovanog dejstva teških metala na fotosintezu i disanje bio je uočljiv pri višim primenjenim koncentracijama, bez narušavanja fotohemijske efikasnosti fotosintetičkog aparata. Kombinacija sva tri teška metala u većini slučajeva dovela je do veće redukcije intenziteta fotosinteze, disanja i koncentracije pigmenata u odnosu na pojedinačne tretmane teškim metalima. Genotipovi su specifično reagovali na tretmane.

S obzirom da je fotohemijska efikasnost fotosistema II nenarušena, dobijeni rezultati ukazuju da je intenzitet fotosinteze opao usled smanjenja koncentracije pigmenata, naročito pod uticajem tretmana Cd i Ni. Potvrđeno je da Cd u listovima uništava tilakoidne membrane i menja enzimsku aktivnost čime se smanjuje sinteza pigmenata i inhibira fotosinteza (Pietrini i sar., 2005). Larbi i sar. (2002) su u šećernoj repi takođe potvrdili smanjenje koncentracije pigmenata pod dejstvom Cd u vodenim rastvorima, ali je i fotohemijska efikasnost bila narušena ($F_v/F_m < 6$). Narušavanje procesa oksidacije i redukcije u fotosistemu II sa posledičnim smanjenjem efikasnosti fotosinteze potvrđeno je i u drugim zeljastim vrstama kao što su kukuruz i soja (Panković i sar., 2000; Pál i sar. 2006). Pod uticajem Cd u biljkama vrste *Brassica juncea* stimulisana je sinteza fitohelatina koji su vezali većinu jona Cd i neutralisali njihovu toksičnost, što je bilo dovoljno da zaštiti fotosintetički aparat, ali je ipak došlo do opadanja intenziteta transpiracije (Haag-Kerwer i sar., 1999). Kako je kod ispitivanih vrba u ovom radu, Cd izazvao opadanje koncentracije pigmenata i intenziteta fotosinteze i disanja, dok u pojedinim slučajevima intenzitet transpiracije nije značajno opao (npr. pod uticajem pojedinačnih tretmana Cd, Slika 62), mala je verovatnoća da su fitohelatini glavni mehanizam zaštite od metala kod ispitivanih genotipova vrba. Ovakav način zaštite je karakterističniji za hiperakumulatorske zeljaste billjne vrste. Izolacija Cd u korenu je tipičan mehanizam drvenastih vrsta kojim one „izbegavaju“ stres u nadzemnom delu. Dobijeni rezultati su u skladu sa istraživanjem Vassilev i sar. (1995) koji takođe nisu utvrdili poremećaje u fluorescenciji pod uticajem Cd i Ni u ječmu, ali je došlo do drugih poremećaja u tilakoidnim membranama i hloroplastima.

Utvrđeno je da Ni u velikim koncentracijama može da zameni centralni atom Mg u molekulu hlorofila, čime se veći deo energije rasipa u formi fluorescencije i toplote (Küpper i sar., 1996). U ovom radu analiza fluorescencije nije pokazala slične poremećaje. Studije koje su se bavile toksičnošću Ni ukazuju da je mogući uzrok hloroze smanjen unos Fe i Mg (Khalid i Tinsley, 1980; Piccini i Malavolta, 1992). Kako ni pod uticajem Ni nije utvrđeno narušavanje parametara fluorescencije, osnovni uzrok utvrđene redukcije intenziteta fotosinteze vezan je za smanjenje sinteze, odnosno koncentracije fotosintetičkih pigmenata. Takođe, usled poremećaja u vodnom režimu, moguće je da je narušen transport produkata fotosinteze sa mesta sinteze do mesta potrošnje, usled čega je smanjen i intenzitet disanja. Teški metali deluju na smanjenje disanja direktno i indirektno. U citoplazmi inhibiraju aktivnost enzima direktne oksidacije glukoze (Hampp i sar., 1973). Utvrđeno je da u mitohondrijama Cd, Ni i Pb u suvišku inhibiraju dalji proces disanja, tj. Krebsov ciklus i transport elektrona u procesu oksidativne fosforilacije (Kastori i sar., 1997). U prisustvu Cd i Cu mitohondrije, naročito kriste, bubre, podstiče se oksidacija metala, piruvata, sukcinata, a posebno NADH, čime se smanjuje nakupljanje ekvivalenata redukcije (Ouzounidou et al., 1995). Stvaranjem reaktivnih oksidativnih produkata narušavanje procesa disanja i fotosinteze moguće je u svim koracima složenih enzimatskih reakcija i transporta intermedijernih metabolita.

6.4. Akumulacija teških metala

Sposobnost akumulacije teških metala u određenim delovima biljnog tkiva zavisi od brojnih činilaca. Teški metal mora biljkama da bude dostupan u rastvornoj formi. Biološka dostupnost teškog metala zavisi od zastupljenosti određenih količina soli, odnosno mineralnih materija u podlozi, hemijske i fizičke forme organskih ostataka, pH vrednosti, aktivnosti mikroorganizama itd. Veličina i forma korenovog sistema je veoma važna da bi se formirala što veća kontaktna zona između biljke i zagađivača (Pilon-Smiths, 2005). Kada uđu u koren, joni teških metala mogu da se transportuju apoplastno i simplastno. Prilikom apoplastnog transporta, fizički veći joni, kao što je olovo, imaju tendenciju jače adsorpcije za slobodne međućelijske površine, te je i njihov transport otežan. U prolasku kroz ćelijske membrane, teški

metali koriste postojeće proteinske transportere koji nemaju apsolutnu specifičnost za određene neophodne nutrijente (Hall, 2002). Unutarćelijski mehanizmi zaštite od stresa koji uzrokuju joni teških metala, specifično se aktiviraju u zavisnosti od biološke forme, vrste i genotipa biljaka (Dietz i sar. 1999). U dosadašnjim istraživanjima drvenastih vrsta, kao što su vrbe, pokazano je da se najčešće veći deo usvojene količine teških metala zadržava u korenu (Greger i sar., 1991; Dos Santos Utmazian i sar., 2007).

Koncentracije teških metala akumulirane u listovima, izbojcima i korenovima istraženih vrba su bile genotipski specifične. Ranija istraživanja takođe ukazuju na genetički determinisanu osobenost u sposobnosti akumulacije teških metala u vrbama. Landberg i Greger (1994) su testirali 94 klonova vrsta *Salix viminalis* i *Salix dasyclados* u hidroponskim eksperimentima. Varijabilnost u toleranciji na teške metale i njihovoj akumulaciji je bila veoma značajna, tako da su se u nekim slučajevima, klonovi međusobno razlikovali i do 80 puta u sposobnosti akumulacije metala. Lux i sar. (2004) potvrđuju da su razlike između predispozicija genotipova u akumulaciji teških metala, delom uzrokovane razlikama u genotipskoj anatomiji korena, pre svega usled razlika u proporciji apoplastnih barijera u korenu i vakuolizaciji ćelija.

Razlike između klonova u akumulaciji metala su bile izraženije u uslovima većih koncentracija teških metala u podlozi (10^{-4} M). Takođe je i statistička varijabilnost u sposobnosti akumulacije, bila više izražena na većim koncentracijama metala. Ovo ukazuje da ispoljavanje genotipske specifičnosti zavisi od nivoa koncentracije teških metala u podlozi. Ovakvo pravilo se potvrđuje činjenicom da je translokacija Ni iz korena u listove bila proporcionalno oko 50% veća na većoj primenjenoj koncentraciji nikla u poređenju sa manjom koncentracijom. Galardi i sar. (2007) ukazuju da korenovi i izdanci vrste *Alyssum bertolonii* reaguju različito i specifično na različite koncentracije Ni, tako da se povećanjem koncentracije Ni u hranljivom rastvoru varijabilnost tolerancije korena na tretman smanjila, a izdanka povećala. Po procenama različitih autora granične vrednosti toksičnosti Ni u listovima su 25-50 mg/kg suve biljne mase (Davis i sar., 1978; Magnicol i Beckett, 1985). Evidentno je da je ova granica u ispitivanim vrstama vrba značajno pređena u tretmanima Ni koncentracije 10^{-4} M, što je za posledicu imalo pojavu toksičnosti.

Dobijeni rezultati za koncentracije teških metala u korenu pokazuju da ukupna količina teških metala akumuliranih u korenu znatno premašuje nadzemni deo.

Translokacija svih ispitivanih teških metala u nadzemni deo je bila veoma slaba (naročito Pb). Mnoge metal-tolerantne vrste imaju ograničenu translokaciju u nadzemne delove (Baker i sar. 1990, Malkowski i sar. 2005, Kurtyka i sar. 2007). Ograničeni transport u nadzemni deo biljke je zaštitni mehanizam, kojim se štiti fotosintetički aparat od negativnih efekata teških metala koji se „izoluju” u korenu (Baker 1981, Stoltz i Greger 2002). Ovaj mehanizam adaptacije na stres izazvan teškim metalima je naročito karakterističan za drvenaste vrste. Smatra se da se transport teških metala u drveću odvija većinom kroz ksilem, gde se mobilnost metala u nadzemni deo značajno smanjuje zbog velikog kapaciteta ćelijskog zida ksilema u izmeni katjona, tj. vezivanju i adsorpciji metala (Komives i Gullner, 2006). Translokacija Pb u nadzemne delove ispitanih biljaka vrba bila je više od deset puta manja u odnosu na Cd i Ni, bez obzira što je Pb bilo kompleksirano sa EDTA, što je trebalo da stimuliše transport i usvajanje Pb. Mnoga istraživanja su potvrdila da neki sintetički helati povećavaju ratvorljivost i mobilnost Pb (i drugih metala) vezanog za različite frakcije zemljišta i njegovu translokaciju i pokretljivost u biljkama (Huang i sar. 1996, 1997, Blaylock i sar. 1997, Vassil i sar. 1998, Wu i sar. 1999, Elles i sar. 2000, Kirkham i sar. 2000, Meers i sar. 2005, Santos i sar. 2006). Huang i sar. (1997) ukazuju da je efektivnost takvih helata za mobilnost Pb u opadajućem nizu sledeća: EDTA > HEDTA > DTPA > EGTA > EDDHA (etilen–diamin–tetrasirćetna kiselina > hidroksietil–diamin–tetrasirćetna kiselina > dietil–triamin–pentasirćetna kiselina > etilen–glikol–tetrasirćetna kiselina > etilen–diamin–dihidroksifenil sirćetna kiselina). Hernández-Allica i sar. (2007) navode da pravilnom upotrebom EDTA može da se smanji fitotoksičnost teškog metala i poveća njegovo usvajanje, povećavajući stepen biološke dostupnosti. Tako je ispitivan uticaj različitih koncentracija EDTA na usvajanje Pb i organsku produkciju kukuruza. Visoke koncentracije EDTA su bile letalne za biljke (2,5 mmol/kg) dok srednje i manje nisu uticale na rast (0,5-1 mmol/kg), ali je na svim tretmanima povećano usvajanje i translokacija Pb u odnosu na kontrolu. Ipak, na svim tretmanima, Pb je akumulirano u višestruko većim koncentracijama u korenu kukuruza u odnosu na izbojak (Hovsepjan i Greipsson, 2005). Mada EDTA ima dokazan potencijal u povećanju efikasnosti fitoekstrakcije, kompleksi teških metala sa EDTA mogu da budu toksični za biljke i mikroorganizme, imaju nisku biorazgradljivost i visoku rastvorljivost, te lako dospevaju u podzemne vode. Takođe, lako formiraju komplekse sa drugim teškim metalima u zemljištu, povećavajući njihovu biološku dostupnost, samim tim i toksičnost, sa mogućim

posledicama na životnu sredinu. Potvrđeno je i da EDTA može da stimuliše usvajanje i translokaciju nekih esencijalnih elemenata, npr. P do toksičnih granica. Stoga se upotreba sintetičkih helata mora koristiti uz izuzetan oprez i stručan nadzor (Hovsepyan i Greipsson, 2005; Meers i sar. 2005, Hernández-Allica i sar. 2007, Hu i sar. 2007).

Malkowski i sar. (2005) navode da se mehanizmi translokacije Pb i Cd iz korena u izdanak razlikuju. Ovi istraživači su utvrdili 10 puta veću akumulaciju Pb u odnosu na Cd u apikalnim segmentima korena kukuruza, dok je translokacija Cd u nadzemni deo bila značajno veća u odnosu na Pb. Autori navode mogućnost da se veće količine Pb vezuju u apoplastu korena (za ćelijske zidove) u poređenju sa Cd. Prema Modelu aktivteta slobodnih jona (MASJ – Free Ion Activity Model), aktivitet određenog jona metala u zemljišnom rastvoru je glavna determinanta njegove biološke dostupnosti (Hough i sar. 2005). Mada bi primena helirajućih agenasa zemljištu (kao npr. EDTA) trebala da poveća aktivitet metalnih jona, uspeh takve aplikacije nije zagarantovan. Jedan od glavnih problema u primeni MASJ-modela, leži u činjenici da u neposrednoj blizini aktivnog dela korena dolazi do smanjenja sadržaja jona, te stoga uslovi u rizosferi korena ne odražavaju opšte uslove u okolnom zemljištu (Zhang i sar. 2001). Stoga, nakon selekcije genotipa sa odgovarajućim karakteristikama u hidroponim eksperimentima, istraživani klonovi moraju biti testirani u spoljašnjim uslovima na zemljištu. Uspeh takve primene mora se procenjivati u zavisnosti od različitih karakteristika zemljišta, ali i specifičnosti genotipa.

Koncentracija Cd u listovima vrste *S. alba* (476,6 µg/g suve materije), *S. matsudana* (389,0 µg/g) i *S. nigra* (507,5 µg/g) i u izbojcima *S. alba* (338,9 µg/g), *S. matsudana* (259,6 µg/g) i *S. nigra* (347,0 µg/g) su među najvećim ikad objavljenim koncentracijama akumuliranim u vrbama gajenim na vodenim kulturama (Borišev i sar., 2009). Pregled istraživanja vrba gajenih u prisustvu teških metala u vodenim kulturama dali su Dos Santos Utmazian i sar. (2007). Po navodima Lux i sar. (2002) i Lunackova i sar. (2003), sadržaj Cd u vrsti *Salix alba* kretao se u rasponu 2,0 – 62,1 u stablu i 3,0 – 160 u listovima i izbojcima (µg/g suve materije). Veće koncentracije Cd u listovima u odnosu na one dobijene u ovoj disertaciji, dobili su Cosio i sar. (2006) u prisustvu 50 µM Cd u vodenim kulturama. Daljim povećanjem koncentracije na 100 µM (100 µM = 10⁻⁴ M = 11,24 µg/ml) i 200 µM, koncentracija akumuliranog Cd u njihovom istraživanju je opao. Zacchini i sar. (2009) su u klonovima belih vrba

(*Salix alba*) gajenim takođe u prisustvu 50 μM Cd u vodenim kulturama, imali najveće do sada potvrđene koncentracije Cd u nadzemnim delovima (srednja vrednost 651 $\mu\text{g/g}$ suve materije). Maksimalne dozvoljene koncentracije Cd u zemljištu u Srbiji su 3 $\mu\text{g/g}$ subog zemljišta (Službeni glasnik Republike Srbije 23/1994). Istraživanja pokazuju da zagađenja Cd u Evropi retko prelaze tu granicu za više od nekoliko puta, a vrlo retko do 20 puta (Lacatusu i sar. 2001, Biernacka i Maluszyński, 2006). Npr. u delovima Poljske pod jakim antropogenim uticajem koncentracije Cd varirale su u rasponu od 4,6-20, izuzetno do 64 $\mu\text{g/g}$ (Biernacka i Maluszyński, 2006). Zacchini i sar. (2009) su testirane klonove vrba na povišenim koncentracijama Cd u hidroponima, klasifikovali kao visoko tolerantne, sa većim stepenom translokacije Cd u odnosu na testirane topole (koje su klasifikovali kao srednje tolerantne). Smatra se da je visoka transpiracija osnovni pokretač translokacije Cd u nadzemne delove biljke (Salt i sar. 1995). Na sličan zaključak navode i rezultati ovog istraživanja. Kod klona 4 koji je imao najveću akumulaciju Cd u listovima, intenzitet transpiracije u tretiranim biljkama nije opao u odnosu na kontrolne biljke. Nenarušena transpiracija verovatno je uzrok veće akumulacije Cd u mladim listovima u odnosu na stare, s obzirom na činjenicu da su metabolički procesi obično najintenzivniji u mladim potpuno formiranim listovima (Kriedeman u Hirano i sar., 1994). Korelaciju između povišene akumulacije Cd u listovima i visoke transpiracije utvrdili su i Vasilev i sar. (2005) ispitujući genotipove vrba u vodenim kulturama. Upotreba genotipova istraživanih u ovoj disertaciji, za potrebe fitoekstrakcije, zavisila bi od karakteristika zemljišta, ali iznete činjenice ukazuju da je njihov potencijal u takvoj primeni značajan, pogotovo kad se uzme u obzir da su do sada u dostupnoj literaturi potvrđena samo dva hiperakumulatora Cd sa nezadovoljavajućom produkcijom mase (*Thlaspi caerulescens* i *Arabidopsis halleri*).

Kombinovani uticaji teških metala su pokazali postojanje specifičnih antagonizama između pojedinih jona. Najveća akumulacija Cd u listovima i izbojku, utvrđena je pod pojedinačnim uticajem Cd i kombinovanim uticajem Cd+Pb. S obzirom da je translokacija Pb u nadzemne delove bila mnogo manja u odnosu na Cd, Pb nije u značajnoj meri ulazilo u kompeticiju sa transporterima koji su prenosili Cd. Takođe, moguće je da je Cd kao manji jon imao veći afinitet za vezivanje sa EDTA čime je istisnuo deo Pb, te da je na taj način dodatkom Pb-EDTA u rastvor stimulisan transport i usvajanje Cd. Slični zaključci se mogu potvrditi kada se razmatra odnos između tretmana Cd+Ni i Cd+Ni+Pb. Dodatkom Pb-EDTA u rastvor,

stimulisala se translokacija Cd u nadzemne delove pa je njegova koncentracija na tretmanu Cd+Ni+Pb bila značajno veća u odnosu na tretman Cd+Ni. Međutim, između Cd i Ni postoji jasan antagonizam kada je u pitanju usvajanje i translokacija Cd. Dodatkom Ni akumulacija Cd u nadzemnim delovima je značajno opala u odnosu na pojedinačan tretman Cd. Takođe, dodatkom Ni u rastvor Cd+Pb, sadržaj Cd opada u odnosu na tretman Cd+Pb bez Ni. Slični odnosi su utvrđeni i u usvajanju Cd korenom, gde je prisustvo EDTA u rastvoru dovelo do povećanja sadržaja Cd u korenu. Antagonistički i sinergistički odnosi teških metala sa drugim elementima su dokazani (Morghan, 1993). Antagonizam se najčešće javlja između jona koji su relativno bliski po radijusu (Seregin i Kozhrvnikova, 2006). Kako su Cd i Ni od ispitivanih teških metala najbliži po radijusu, ova hipoteza objašnjava činjenicu da je dobijeni antagonizam između njih najveći. Pb ima značajno veći radijus te samim tim neće ulaziti u kompeticiju sa Cd i Ni za iste prenosioce. S obzirom da Cd i Pb nemaju korisnu ulogu u biološkim organizmima, oni se u biljkama prenose preko proteinskih transportera koji se sintetišu u cilju transporta jona esencijalnih i korisnih elemenata. Stoga se može pretpostaviti da Pb kao veliki jon ima značajno manji afinitet za takve prenosioce, za razliku od Cd i Ni. Kompeticija Pb sa drugim elementima i njegova translokacija u nadzemne delove biljke je značajno manja u odnosu na Cd i Ni. Takođe, Ni je po radijusu sličniji jonima Mg, Na, Ca, Fe u odnosu na Cd, te je stoga moguće da je u analiziranim eksperimentima „istisnuo“ Cd jer je imao veći afinitet da zameni navedene esencijalne elemente.

Koncentracija Ni u listovima biljaka tretiranih kombinovanim rastvorima teških metala značajno je rasla dodatkom Cd u rastvore, naročito na većim koncentracijama (10^{-4} M). Kako Cd i Ni ulaze u kompeticiju za iste prenosioce, može se zaključiti da Ni ima veći afinitet za prenosioce, te da istiskuje Cd, što je i očekivano s obzirom da je Ni esencijalni element za razliku od Cd. Ipak, na tretmanu Ni+Cd koncentracije Ni u listovima bile su veće nego na čistom tretmanu Ni. Takođe, dodatkom Cd u rastvor Ni+Pb došlo je do povećanja akumulacije Ni u listovima. Moguće objašnjenje je činjenica da je prisustvo Cd u rastvoru u većim koncentracijama (10^{-4} M) posle određenog vremena uslovljavalo pojavu lisne hloroze. Dokazano je da Cd prilikom usvajanja ulazi u kompeticiju sa K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn i Ni (Rivetta i sar., 1997; Sanità di Toppi i Gabbrielli, 1999). Povećane koncentracije jona Cd uslovljavaju pojavu hloroze kao posledica nedostatka Fe i Mg sa kojima su u kompeticiji. Po istraživanju koje su dali Larbi i sar. (2002), nedostatak

Fe kod *Arabidopsis*-a stimuliše sintezu transportera koji prenose Fe kao vid adaptacije. Iste transportere koriste i Cd i Ni, te se u istraživanju navedenih autora navodi da nedostatak gvožđa stimuliše usvajanje Cd. Ovim modelom se može objasniti i povećana akumulacija Ni u ispitivanim vrbama koja je nastala kao rezultat dodavanja Cd. Dodati Cd uslovljava nedostatak Fe, možda i Mg, čime se uslovljava pojava hloroze ali i stimuliše sinteza prenosioca. Povećan broj prenosioca omogućava veće usvajanje Cd i Ni, pri čemu Ni ima veći afinitet i istiskuje Cd. Na ovaj način Ni se usvaja u značajno većoj meri, usled povećanog broja transportera, nego u rastvoru čistog Ni, kada biljka nije stimulisana na njihovu sintezu.

Koncentracija Ni u korenu bila je najveća takođe na tretmanima Ni i Ni+Cd, pri čemu je sadržaj Ni bio značajno veći na čistom tretmanu Ni. Ovo ukazuje da je nedostatak Fe, kao posledica toksičnog dejstva Cd, izazvao povećanu translokaciju i akumuliranje Ni, pre svega u nadzemnom delu biljaka, ne i u korenu.

Opisani odnosi između tretmana su bili ispoljeni u značajno manjoj meri na tretmanima teških metala koncentracije 10^{-5} M, gde između koncentracija Ni u listovima na tretmanima Ni i Ni+Cd nije bilo statistički značajnih razlika. S obzirom da na tretmanima teških metala koncentracije 10^{-5} M nisu ispoljeni morfološki simptomi, opisani efekat povećanja sinteze transportera pod uticajem hloroze izazvane Cd nije bio izražen. Koncentracija Ni u izbojku je bila značajno manja u odnosu na listove što je nepoželjno u primeni ispitanih klonova u fitoremedijaciji s obzirom da većinu mase nadzemnog dela vrba čine drvenasti delovi biljke (Dickinson i Pulford, 2005).

Opisani antagonizmi između teških metala dobro se uočavaju na kombinovanim tretmanima koncentracije 10^{-4} M, kada se prati usvajanje Pb. Najveća koncentracija Pb u nadzemnom delu utvrđena je uvek na pojedinačnom tretmanu Pb. Dodatkom Cd u hranjivi rastvor najviše je opala translokacija Pb, kako u odnosu na individualan tretman Pb-EDTA, tako i u odnosu na kombinovan tretman Pb+Ni. Ovo je u skladu sa dobijenim rezultatima koncentracije i distribucije Cd. Usvajanje Cd bilo je stimulirano dodatkom Pb-EDTA u rastvor što ukazuje da je Cd u antagonizmu sa Pb za vezivanje za EDTA, te da je Cd verovatno istisnuo jone olova i „iskoristio“ EDTA za bolju translokaciju. Antagonizam između teških metala na ćelijskom nivou se odigrava na dva nivoa. Potvrđeno je da se kompeticija između teških metala odvija kako na površini ćelije, odnosno na ćelijskoj membrani, tako i unutar ćelije. Smatra se da se kompeticija odvija istovremeno na oba načina jer se funkcionalne grupe za koje se vezuju metali (karboksilne, sulfhidrilne, porfirinske itd.)

nalaze i na transportnim proteinima membrane i na intracelularnim enzimima i nikad nisu isključivo specifične za samo jednu vrstu metala (Sunda, 1989; Visviki i Rachlin, 1991). Kao i kod pojedinačnih tretmana, na kombinovanim tretmanima Pb se više akumuliralo u donjim, starijim listovima nego u gornjim, mlađim, što ukazuje na slabiju translokaciju u biljci. Koncentracija Pb u korenu je u skladu sa opisanim procesima. Najmanja koncentracija Pb u korenu utvrđena je na pojedinačnom tretmanu Pb, što potvrđuje najveću stimulaciju translokacije. Najveće koncentracije Pb u korenu utvrđene su u rastvorima koncentracije 10^{-4} M u kojima je bio prisutan Cd gde je translokacija Pb u listove bila najslabija. Na kombinovanim tretmanima metala koncentracija 10^{-5} M, potvrđeni su slični odnosi sa nekim izuzecima. Koncentracija Pb je na tretmanu Ni+Pb koncentracije 10^{-5} M bila veća u odnosu na tretman pojedinačnog Pb-EDTA. Ovo ukazuje da antagonizam između teških metala u značajnoj meri zavisi od koncentracija teških metala kojima je biljka izložena. Prema dobijenim rezultatima, antagonizam između primenjenih teških metala je bio više izražen u vrbama izloženim većoj koncentraciji teških metala (10^{-4} M). Slične rezultate dobili su Xin i sar. (2010) izlažući biljke vodenog spanaća (*Ipomoea aquatica*) pojedinačnim i kombinovanim tretmanima Cd i Pb. Na srednjem nivou kontaminacije dodatak Pb u podlogu je stimulisao akumulaciju Cd dok je pri visokim koncentracijama dodatak Pb smanjio akumulaciju Cd, ispoljavajući veći antagonizam na većim koncentracijama.

Navedene teze koje objašnjavaju utvrđene antagonističke odnose između teških metala zahtevaju detaljnije provere. Antagonizam između teških metala je složen proces koji ne zavisi samo od kompeticije za transportere u membrani već i od drugih metaboličkih procesa. Različiti teški metali specifično indukuju aktiviranje adaptacionih mehanizama ćelije kao što je npr. sinteza fitohelatina (Lee i sar., 1996). Teški metali često pokazuju specifično dejstvo na pojedine enzime (Teresa i sar., 2001). Arazi i sar. (1999) su utvrdili da sinteza transportnog proteina NtCBP4 u biljkama duvana dovodi do istovremenog povećanja usvajanja Pb navedenim proteinom i inhibicije usvajanja Ni. Autori zaključuju da je verovatno da navedeni protein direktno inhibira transportere Ni. Složenost sinergističkih i antagonističkih odnosa se ogleda u činjenici da negativno dejstvo toksičnih doza teških metala nikad nema prost aditivan efekat, što je potvrđeno i u ovoj disertaciji.

6.5. Uticaj teških metala na koncentraciju kalijuma i fosfora

Uticaj teških metala na sadržaj hranljivih mineralnih elemenata analiziran je u velikom broju radova. Posledice takvog uticaja, koje se izražavaju u različitim izmenama ćelijskog metabolizma biljke zavise kako od teškog metala, tako i od biljne vrste odnosno genotipa biljke. Veliki uticaj na karakter promena u metaboličkim procesima ima koncentracija određene vrste teškog metala, pH vrednost u podlozi, prisustvo helata, aktivnost mikroorganizama itd. (Fodor, 2002). Teški metali najčešće ulaze u antagonističke ili sinergističke odnose sa drugim elementima tokom usvajanja i translokacije (Morghan, 1993). Deluju na ćelije korena, selektivnost ćelijske membrane, menjaju funkciju ATP-aza i drugih transportera, a promene u sadržaju hranljivih elemenata nastaju i indirektno preko oksidativnih narušavanja metaboličkog balansa (Greger i sar., 1991; Costa i Morel, 1994; Siedleska, 1995). Dobijeni rezultati u ovoj disertaciji ukazuju na dominantan uticaj Cd i Ni na koncentraciju hranljivih elemenata dok je Pb-EDTA uzrokovalo minimalne promene.

6.5.1. Koncentracija kalijuma

Koncentracija K je varirala specifično sa genotipom i primenjenim tretmanom. U mladim listovima Cd je uticao na povećanje sadržaja K naročito pri manjoj primenjenoj koncentraciji. Povećanje K je utvrđeno i u korenu kod klonova 1, 2 i 3. Smanjenje koncentracije K je bilo vezano uglavnom za stare listove pri tretiranju većom koncentracijom Cd. Slični rezultati utvrđeni su u topolama (Nikolić, 2009), gde je veća koncentracija K utvrđena u mladim u odnosu na stare listove, dok je u jednom klonu topole utvrđeno stimulatивно delovanje Cd koncentracije 10^{-5} M na koncentraciju K. Rezultati drugih istraživača su takođe vrlo divergentni. U zeljastoj vrsti *Beta vulgaris* pod uticajem Cd je došlo do smanjenja koncentracije K (Greger i Lindberg, 1987; Greger i sar., 1991). Ciećko i sar. (2004) su u nadzemnim delovima ovsa i korenu kurkuruza utvrdili povećanu koncentraciju K pod uticajem Cd, dok je u žutoj lupini i rotkvici došlo do opadanja nivoa K. Ovi autori navode da je koncentracija K bila u korelaciji sa sadržajem većine drugih makroelemenata i sa organskom produkcijom. Zhao i sar. (2004) su utvrdili da se pod uticajem kalijumovih

đubriva akumulacija Cd u izbojku vrste *Triticum aestivum* povećala za dva puta. Usled veoma varijabilnih rezultata teško je utvrditi tačne metaboličke uzroke variranja koncentracije K pod uticajem Cd.

Koncentracija K je pod uticajem Ni varirala bez uopštene tendencije. Ni je u većini slučajeva doveo do opadanja koncentracije K u listovima, sa izuzetkom mladih listova klonova 1 i 3. U starim listovima koncentracija K je značajno opala na svim tretmanima pod uticajem Ni. U korenu pod uticajem manje primenjene koncentracije došlo je do povećanja koncentracije K, dok je pod uticajem veće koncentracije Ni koncentracija K opala. Veći broj istraživanja potvrdio je značajno opadanje koncentracije pojedinih nutrijenata u biljkama pod uticajem tretmana Ni (Kähkönen i Kairesalo, 1998; Kevrešan i sar., 2001; Pandey i Sharma, 2002; Maksimović i sar., 2007). U klonovima topola takođe je utvrđeno opadanje koncentracije K u nadzemnim delovima biljaka gajenih na povišenim koncentracijama Ni (Nikolić, 2009).

Akumulacija K u korenu ispitivanih biljaka vrba pod uticajem Ni i Cd, ali i na kontrolnom tretmanu, bila je manja u korenu u odnosu na listove. Međutim sa izuzetkom klona 4, Cd i Ni su doveli do povećanja koncentracije K u korenu u odnosu na kontrolu, što ukazuje da su metali uticali na zadržavanje K u korenu i inhibirali njegovu translokaciju. Visoka akumulacija Cd i Ni u korenu mogla je da uslovi značajnije ispoljavanje stresa u korenu u odnosu na listove kao i inhibitorski uticaj na transport K u nadzemne delove biljaka i njegovo uključivanje u metaboličke procese u korenu. Takođe, narušavanje transpiracije moglo je da onemogući optimalan transport K u nadzemne delove.

Variranje koncentracije K je pod uticajem Pb-EDTA bilo značajno manje izraženo u odnosu na Cd i Ni. U mladim listovima i korenu, koncentracija K je bila slična ili čak povišena pod uticajem Pb-EDTA u odnosu na kontrolu dok se koncentracija P nije značajno menjala, što je u skladu sa rezultatima koje navode Hovsepyan i Greipsson (2005), koji su u zavisnosti od primenjene koncentracije EDTA za kompleksiranje Pb, dobili istovremeno i porast i malo opadanje korisnih elemenata u odnosu na netretirane kontrolne biljke. Larbi i sar. (2002) su u šećernoj repi utvrdili da tretman Pb-EDTA nije doveo do opadanja koncentracije N, P i K, a u ređim slučajevima opadanje je utvrđeno u značajno manjoj meri u odnosu na tretman Cd. López i sar. (2005; 2007) su utvrdili zaštitni efekat EDTA u usvajanju P i K u biljci *Medicago sativa* (lucerka). Oni navode da je EDTA zaštitio biljku od

toksičnog dejstva Pb, time što je sprečeno narušavanje usvajanja mikro i makroelemenata korenom. Takođe, pretpostavlja se da EDTA stimuliše translokaciju P i drugih hranljivih elemenata.

U starim listovima je koncentracija K pod uticajem organske forme Pb opala u svim klonovima. S obzirom da je koncentracija akumuliranog Pb bila značajno veća u starim u odnosu na mlade listove, moguće je da je negativan toksičan uticaj Pb bio ispoljen samo u starim listovima. S obzirom da stari listovi imaju najmanje uticaja na ukupnu organsku produkciju (Hirano i sar., 1994), očuvanost bioprodukcije u mladim listovima biljaka vrba rezultirala je stabilnošću parametara rasta pod uticajem Pb-EDTA.

Koncentracija K je bila vrlo varijabilna pod uticajem kombinovanih tretmana teških metala. U najvećem broju tretmana nisu utvrđene promene u odnosu na kontrolu. Koncentracija K u korenu je bila takođe manja u odnosu na listove. U određenom broju tretmana utvrđeno je povećanje, odnosno opadanje koncentracije K u odnosu na kontrolu. Ovakve reakcije su bile genotipski specifične.

6.5.2. Koncentracija fosfora

Većina bazičnih fiziološko-biohemijskih procesa u biljkama ne mogu proteći bez učešća fosfornih jedinjenja. Osnovnu ulogu fosfora jedinjenja imaju u akumulaciji i prenosu energije. Teški metali dovode do disbalansa u mineralnoj ishrani biljaka, što rezultira i u narušavanju brojnih reakcija biosinteze koje zavise od P (Siedleka, 1995; Larbi i sar., 2002; Ciecko i sar., 2004). Stoga je stabilno usvajanje P i njegovo uključivanje u metaboličke procese, koje se ogleda i kroz ukupan sadržaj P u biljnom tkivu, jedan od indikatora otpornosti biljaka na stres izazvan toksičnim uticajem teških metala.

Dobijeni rezultati ukazuju da se koncentracija P pod uticajem Cd, značajno smanjila u odnosu na kontrolu u starijim listovima svih klonova sem klona 3, dok su u mlađim utvrđene statistički značajne promene samo kod klona 1. Pod uticajem obe primenjene koncentracije Ni, koncentracija P se smanjila u listovima klonova 1, 2 i 3. Opadanje koncentracije P je potvrđeno i u drugim biljnim vrstama izloženim dejstvu povišenih koncentracija Cd i Ni (Kähkönen i Kairesalo, 1998; Kevrešan i sar., 2001;

Pandey i Sharma, 2002). Značajno je napomenuti da u literaturi pored većeg broja navoda koji ukazuju na opadanje koncentracije P pod uticajem Cd i Ni, jedan broj istraživanja ukazuje i na mogućnost povećanja koncentracije P, što je specifično zavisno od biljne vrste i ekoloških uslova (Yang i sar. 1996; Palacios i sar., 1998). Koncentracija P u korenu je na tretmanima Cd, Ni i kontroli bila veća u odnosu na listove, što ukazuje na visoku translokaciju P u nadzemne delove. Ni je izazvao statistički značajna povećanja koncentracije P u korenu klonova 1, 2 i 3, dok je Cd doveo do smanjenja koncentracije P u korenu, ali bez utvrđenog statističkog značaja. Ovo ukazuje da je P dobro usvajan korenom ali je Ni istovremeno inhibirao njegovu translokaciju u nadzemne delove, dok je Cd inhibirao i usvajanje P korenom. Slični rezultati slabe translokacije P pod uticajem Ni potvrđeni su u topolama izloženim povišenim koncentracijama Ni (Nikolić, 2009).

Prisustvo helatnog oblika Pb (Pb-EDTA) nije značajno uticalo na koncentraciju P u listovima i korenu, što je u skladu sa rezultatima drugih istraživanja koja su potvrdila zaštitnu ulogu EDTA na bioprodukciju i sadržaj esencijalnih nutrijenata (Larbi i sar. 2002; López i sar. 2005; 2007). Na svim tretmanima koncentracija P je bila veća u korenu u odnosu na listove.

Na kombinovanim tretmanima teških metala koncentracija P u korenu je takođe bila veća u odnosu na listove. Koncentracije P su pod uticajem kombinovanih tretmana teških metala varirale specifično sa genotipom i tretmanima bez uniformne pravilnosti. Kastori i Maksimović (2008) navode da se koncentracija P u većini biljaka kreće u opsegu od 0,1-0,8% u zavisnosti od vrste i ekoloških uslova. Bez obzira što je u pojedinim slučajevima koncentracija P statistički značajno opala u odnosu na kontrolu, može se utvrditi da nivo P u ispitivanim vrbama verovatno nije bio direktni ograničavajući činilac za nesmetanu organsku produkciju, jer njegove koncentracije nisu opale ispod 0,18 % u listovima odnosno 0,44 % u korenu, a tipični simptomi nedostatka P nisu uočeni. Međutim, Jiang i sar. (2007) i Yu i Zhou (2009) navode da fosforna đubriva mogu da smanje toksičnost Cd i Zn, smanjenjem oštećenja membranskog sistema hloroplasta i drugih poremećaja. Značajan deo P koji se nađe u suvišku u podlozi i biljnom tkivu, smanjuje rastvorljivost i mobilnost Cd, stvaranjem hemijskog depozita $Cd_3(PO_4)_2$, čime se minimizuje toksičan uticaj Cd koji se uočava bez fosfatnog đubrenja. Stoga se može zaključiti da postoji mogućnost da je tolerancija istraženih biljaka vrba na teške metale bila smanjena u delovima tkiva koji

su imali manju koncentraciju P od kontrolnih biljaka, mada je količina P u biljkama vrba bila dovoljna da zadovolji osnovne metaboličke potrebe.

Literaturni podaci ukazuju da teški metali deluju veoma različito na sadržaj hranljivih elemenata koji može da poraste ili opadne u zavisnosti od biljne vrste (genotipa), primenjenog teškog metala i eksperimentalnih uslova. Antagonizam, odnosno kompeticija za ista mesta vezivanja između jona sličnih radijusa može da dovede do opadanja sadržaja nutrijenata pod uticajem teških metala. Tako je utvrđena kompeticija jona Ni^{2+} sa jonima Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , odnosno jona Cd^{2+} i Zn^{2+} i Ca^{2+} (Seregin i Kozhrvnikova, 2006). Pb kao jon sa značajno većim radijusom, verovatno ima manji afinitet prema prenosiocima, te je slična kompeticija sa drugim jonima manje izražena. Ovo je takođe jedan od razloga zašto je mobilnost Pb u biljci manja u odnosu na Cd i Ni.

Značajno je napomenuti da bi vremenski period izloženosti biljaka delovanju teških metala, mogao biti značajan faktor u variranju koncentracije hranljivih elemenata. Tako su Hernández i sar. (1998) utvrdili da je Cd (50 $\mu M/l$) značajno smanjio sadržaj Fe u biljkama samo u kratkoročnim eksperimentima, dok je pri produženju eksperimenta došlo do stabilizovanja nivoa Fe u biljkama. Stoga, dobijeno variranje koncentracije hranljivih elemenata u ispitivanim vrstama i genotipovima vrba treba proveriti u zavisnosti od dužine perioda izloženosti teškim metalima.

6.6. Uticaj teških metala na koncentraciju nitrata i azota

Teški metali indukuju disbalans u mineralnoj ishrani biljke kada su prisutni u povećanim koncentracijama, a Cd i Pb i u manjim koncentracijama. Azot je značajan kao jedan od osnovnih sastojaka organske materije. Smanjenje njegovog usvajanja i poremećaji u njegovom transportu imaju direktnu vezu sa narušavanjem optimalne bioprodukcije. U većini istraživanja koja su ispitivala uticaj teških metala na mineralnu ishranu biljaka utvrđeno je da teški metali smanjuju usvajanje N, odnosno NO_3^- i remete njihovo uključivanje u niz metaboličkih procesa (Greger i sar., 1991; Narwal i sar., 1993; Kähkönen i Kairesalo, 1998; Pál i sar., 2006; López i sar., 2007). U mineralnoj ishrani biljaka, veliki značaj ima genotipska specifičnost čije

ispoljavanje nije stabilno, nego zavisno od velikog broja abiotičkih činilaca kao što su fizičko-hemijske karakteristike zemljišta, klimatski činioci i ekstremne vremenske nepogode, pojava određenih sojeva mikroorganizama u podlozi i nivo i vrsta zagađenja (Sarić, 1983).

Koncentracija N je u ispitivanim vrbama varirala u opsegu od 4,01 – 5,17 % pod uticajem Cd, Ni i Pb-EDTA. Statistički značajna smanjenja koncentracije N su utvrđena kod klonova 1 i 2 pod uticajem Cd, odnosno klona 1 pod uticajem Ni, dok kod ostalih klonova nije bilo promena. Pb-EDTA je delovalo različito, pa su tako utvrđena i povećanja i opadanja koncentracije N u odnosu na kontrolu, a u najvećem broju slučajeva nije bilo promena. Boussama i sar. (1999) i Chaffei i sar. (2003; 2004) navode da stres izazvan teškim metalima može značajno da naruši metabolizam N, pri čemu su utvrđeni inhibitorski efekti na aktivnost mnogih enzima uključenih u usvajanje i asimilaciju N, kao što su nitrat i nitrit reduktaza i glutamin sintaza, pri čemu istovremeno dolazi do povećanja aktivnosti enzima koji dovode do tzv. disimilacije tj. oslobađanja N iz organskih jedinjenja. Potvrđeno je i inhibitorsko delovanje teških metala na proces usvajanja N. Međutim, inhibicija usvajanja N i narušavanje metaboličkih procesa zavisi od visine kontaminacije teškim metalima, dužine izloženosti i tolerancije određene biljne vrste (Du i sar., 2009). Granična vrednost sadržaja teških metala, čije prekoračenje počinje da izaziva smanjenje sadržaja N zavisi od biljne vrste odnosno genotipa što je potvrđeno i u analizi ispitivanih vrba. Utvrđeno je da u biljkama pirinča primena različitih koncentracija i hemijskih formi azotnih đubriva može da poveća njihovu toleranciju na teške metale, što ukazuje da je u primeni fitoekstrakcije potrebno obratiti pažnju na stabilnost usvajanja i translokacije azota (Jalloh i sar., 2009). Amonijakna odnosno nitratna forma N, razlikuju se u uticaju koji imaju na rast i hemijski sastav biljaka (Lewis i Chadwick, 1983; Maier i sar., 2002). Razlika između NH_4^+ i NO_3^- forme kojoj se pridaje veliki značaj je činjenica da NO_3^- dovodi do povećanja količine OH^- jona u korenskom medijumu, dok NH_4^+ povećava količinu H^+ jona. Nastale promene pH mogu značajno da utiču na metabolizam biljke. Pored ove, razlike u delovanju NH_4^+ i NO_3^- forme N na biljke utvrđene su i na molekularnom nivou. Kako se teški metali bolje usvajaju u blago kiselim uslovima (pH 4 do 6), hemijska forma dostupnog N ima velik značaj i za interakciju biljaka sa teškim metalima (Hisinger i sar., 2003; Jalloh i sar., 2009)

Koncentracija NO_3^- je u ispitivanim vrbama varirala u opsegu od 4,14 do 6,27%, uglavnom bez statističke značajnosti u odnosu na kontrolu. Značajne promene su utvrđene samo pod uticajem Pb-EDTA u pojedinačnim slučajevima kako u smeru povećanja tako i u smeru opadanja koncentracija u odnosu na kontrolu. Pod uticajem Cd i Ni značajne promene su utvrđene između genotipova ali ne i između tretmana u okviru jednog genotipa. Stabilnost metabolizma N u biljci izloženoj povišenim koncentracijama teških metala je osnovni preduslov uspešne primene fitoekstrakcije. Ispitivane vrbe su pokazale da su nitrati (N se u Hoglandovom hranljivom rastvoru nalazio isključivo u NO_3^- formi) dobro usvajani, jer nije bilo velikih variranja u njihovoj koncentraciji.

Slični rezultati potvrđeni su u klonovima topola izloženim Cd i Ni (Nikolić, 2009). Koncentracija N u istraženim topolama se nije menjala ili je čak došlo do povećanja u odnosu na kontrolu. U listovima topola N je varirao u opsegu od 3,25 do 6,13% a u korenu od 2,38 do 4,35 %. Ovi podaci su u skladu sa rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji, što ukazuje na dobru obezbeđenost N. Epstein (1999) navodi da se 1,5 % N u suvoj biljnoj materiji u većini vrsta još uvek može smatrati optimalnom količinom. Ipak, Sarić i Krstić (1983) navode da je genotipsko variranje koncentracije N u nekim poljoprivrednim zeljastim kulturama, daleko najmanje u poređenju sa drugim elementima (9-13 %). Pošto utvrđeno smanjenje bioprodukcije vrba pod uticajem teških metala, nije bilo limitirano inhibiranjem usvajanja i destabilizovanjem integriteta metabolizma N i NO_3^- , N kao element čiji je sadržaj najstabilniji nije pouzdan indikator stresa izazvanog teškim metalima.

6.7. Aktivnost nitrat-reduktaze u prisustvu teških metala

Nitrat-reduktaza je inducibilan enzim. Prisustvo nitrata u biljnoj ćeliji indukuje transkripciju gena povećavajući sintezu i aktivnost ovog enzima (Stitt, 1999). Smanjena aktivnost nitrat-reduktaze pod uticajem teških metala je više puta potvrđena. Predloženi uzroci smanjene aktivnosti nitrat reduktaze su vodni stres i inhibicija usvajanja nitrata, izazvani toksičnim efektima teških metala (Bhandal i Kaur, 1992; Gouia i sar. 2000; Kevrešan i sar., 2001, Xiong i sar., 2006). Rezultati u ovom radu delimično potvrđuju ove navode. Na kombinovanim tretmanima sva tri

teška metala i na pojedinačnim tretmanima Ni utvrđeno je značajno smanjenje aktivnosti nitrat reduktaze. Poznato je da se transport nitrata odvija kroz simplast, uglavnom aktivnošću H^+ - ATP-aza koje su osetljive na niz sulfhidrilnih reagenasa čije koncentracije se povećavaju dejstvom teških metala, usled čega dolazi do poremećaja u polarizaciji plazmaleme i efluksa protona, te poremećaja usvajanja hranljivih materija (Kennedy i Gonsalves, 1989). Kako pod uticajem Ni nije utvrđeno značajno smanjenje koncentracije NO_3^- , uzrok smanjenja aktivnosti nitrat reduktaze leži na drugom mestu npr. u direktnoj inhibiciji enzima. Xiong i sar. (2006) navode da je moguća direktna inhibicija enzima koja nastaje vezivanjem teških metala za SH grupe u cisteinskim grupama enzima, čime se enzim inaktivira. Još jedan mogući uzrok smanjenoj aktivnosti nitrat reduktaze je endogena akumulacija H_2O_2 indukovana povišenim koncentracijama Ni (Gajewska i Skłodowska, 2007). Značajno je da su intenziteti fotosinteze pod uticajem Ni i kombinovanih tretmana teških metala značajno opali. Matraszek (2008) navodi da smanjena količina redukcionih ekvivalenata, usled opadanja intenziteta fotosinteze, može da dovede do inhibicije redukovanja nitrata jer su za aktivnost nitrat reduktaze redukциони ekvivalenti neophodni kao donori elektrona.

U velikom broju tretmana nije utvrđena statistički značajna razlika u aktivnosti enzima između tretiranih biljaka i kontrole. Pod uticajem tretmana Cd kod većine klonova je čak evidentirano povećanje aktivnosti ovog enzima u listovima. Na pojedinačnim tretmanima Cd, nije utvrđeno smanjenje koncentracije NO_3^- u odnosu na kontrolne biljke, usled čega se transkripcija gena koji kodiraju sintezu nitrat reduktaze, verovatno nesmetano odvijala. Rauser i Dumbroff (1981) navode da je vodni deficit nastao delovanjem Cd čest razlog smanjenja aktivnosti nitrat reduktaze u listovima. U ispitivanim biljkama vrba u većini slučajeva, nije utvrđeno smanjenje intenziteta transpiracije pod uticajem Cd. Stoga nije narušena ni aktivnost redukovanja NO_3^- . Aktivnost nitrat reduktaze nije bila narušena pod uticajem Cd čak ni u korenu u kom je akumulacija Cd višestruko nadmašila akumulaciju u listovima. Moguće je da je veliki deo Cd bio vezan u apoplastu korena ili da su u korenu aktivirani efikasni mehanizmi akumulacije i izolacije Cd, čime bi se mogla objasniti nenarušena aktivnost nitrat reduktaze. Pojedinačan tretman Pb-EDTA nije značajno uticao na aktivnost nitrat reduktaze. Uprkos ranije potvrđenim inhibitornim efektima Pb na asimilaciju NO_3^- (Kumar et al., 1991; Singh et al., 1997; Xiong et al., 2006), rezultati ukazuju da je metabolizam N bio potpuno zaštićen od Pb korišćenjem EDTA

kao helatirajućeg agensa. Takođe, niska translokacija Pb u nadzemne delove biljke potvrđuje da je toksičnost Pb potpuno izostala u listovima. Slične rezultate dobili su Aiken i sar. (2003) ispitujući uticaj većeg broja teških metala na aktivnost nitrat reduktaze u biljkama vrste *Aspergillus niger*. Značajna inhibicija aktivnosti nitrat reduktaze pod uticajem Cr^{3+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} i Zn^{2+} bila je potpuno zaustavljena dodavanjem EDTA u korenski medijum. Luna i sar. (1997) utvrdili su da se utvrđeno smanjenje aktivnosti nitrat reduktaze pod uticajem Cu^{2+} može reverzibilno povećati dodavanjem EDTA.

Nitrati usvojeni korenom se u zavisnosti od biljne vrste redukuju odmah u korenu ili u listovima, ili u oba biljna organa. Takođe, biljke imaju potencijal u magacioniranju nitrata u vakuolama ćelija korena i izdanka. Kako su u listovima redukcioni ekvivalenti i energetska ugljenikova jedinjenja nastala u fotosintezi lako dostupna, kod većine biljnih vrsta utvrđeno je da se veći deo redukcije nitrata odvija u listovima (Cárdenas-Navaro i sar., 1999; Matraszek, 2008). Niska aktivnost nitrat reduktaze u korenovima u odnosu na listove vrba istraženih u ovom radu ukazuje da se asimilacija nitrata odvija većim delom u nadzemnim delovima ispitivanih genotipova vrba. Slični rezultati potvrđeni su u biljkama topola (Nikolić, 2009), i u biljkama pasulja gde se navodi da se 80 % redukcije nitrata odvija u listovima (Andrews, 1986), a takođe i u biljkama vrste *Arachis hypogaea* (kikiriki) (Dinakar i sar., 2008).

6.8. Uticaj teških metala na koncentraciju prolina

Mada je uloga procesa sinteze i akumulacije prolina kao molekula koji ublažava efekte osmotskog stresa dokazana, pod uticajem teških metala njegovo akumuliranje zavisi od većeg broja činilaca, odnosno načina na koji se ceo metabolizam određene biljne vrste prilagođava specifičnom delovanju određenog teškog metala, ali je u većem broju istraživanja utvrđeno da se sadržaj prolina pod uticajem teških metala povećava (Sharma and Dietz, 2006).

Utvrđeno povećanje prolina u ispitanim biljkama vrba pod uticajem teških metala bilo je očekivano. Povećanje koncentracije prolina se pre svega vezuje za vodni stres i fiziološku sušu (Barcelo and Poschenrieder 1990, Hasan et al. 2007).

Teški metali u povišenim koncentracijama dovode do pojava simptoma vodnog stresa. Stoga je akumulacija prolina česta pojava u biljkama koje se nalaze pod uticajem povišenih koncentracija teških metala (Dinakar i sar., 2008). Takođe, smatra se da akumulacija prolina u biljkama izloženim teškim metalima, može da bude direktna posledica delovanja teških metala, pri čemu prolin helatira teške metale, vezuje nastale hidroksilne radikale, vezuje singlet kiseonik i inhibira lipidnu peroksidaciju (Farago and Mullen 1979, Smirnoff and Cumbes 1989, Kastori et al. 1992, Siripornadulsil et al. 2002, Lin and Kao 2007).

Smanjenje koncentracije prolina u vrbama na mnogim od ispitivanih tretmana teškim metalima bilo je neočekivano. Chen *et al.* (2004) utvrdili su opadanje koncentracije prolina pod uticajem povišenih koncentracija Cu. Nađeno je da se prolin premešta i akumulira u vršnim delovima korena kukuruza (Ober and Sharp 1999, Verslues and Sharp 1999). Chen *et al.* (2004) predlažu kao moguću hipotezu to da se translokacijom prolina njegova koncentracija u aktivnim vrhovima korena povećava, čak i ako je ukupna koncentracija prolina u korenu manja, što međutim nije eksperimentalno potvrđeno. Iiyama i sar. (1994) navode da glikoproteini bogati prolinom i hidroksiprolinom učestvuju u stabilizaciji i depoziciji lignina u ćelijskim zidovima, čime se stvara barijera ulaska hidrofilnih komponenti, poput teških metala, što bi mogao biti neki vid adaptacije. Metoda korišćena u ovom istraživanju vrba detektuje samo slobodne molekule prolina dok se proteini ne detektuju jer su izolovani taloženjem. Stoga je moguće da je dodatno formiranje takvih proteina (bogatih prolinom) uzrokovalo utvrđena smanjenja u koncentraciji slobodnog prolina, mada ovakvu hipotezu treba posmatrati sa rezervom. Naime, u sastav ćelijskog zida svakako ulaze prolinom i hidroksiprolinom bogati proteini, među kojima je najbolje proučena familija ekstenzina. Ovi proteini stabilizuju strukturu ćelijskog zida i čine njegov sastavni deo i kada ćelija raste u potpuno normalnim uslovima (Arsenijević-Maksimović i sar., 1997). Pored ekstenzina, u grupu proteina bogatih hidroksiprolinom spadaju i neki nodulini, arabinogalaktanski proteini i lektini, koji svi takođe ulaze u sastav osnovne supstance ćelijskog zida (Kieliszewski i Lamport, 1994). Kako je prolin u ćelijskom zidu prisutan u proteinskom obliku u određenoj količini, nezavisno od interakcije biljke sa teškim metalima, hipoteza koju su predložili Iiyama i sar. (1994) zahteva detaljnije provere. Smanjenje transpiracije i poremećaji u vodnom režimu pod uticajem teških metala se često navode kao osnovni uzrok pojačane akumulacije prolina (Gajewska i Skłodowska, 2008). Međutim, vodni režim

na tretmanima Cd i Pb-EDTA je bio najmanje narušen, sa čak stimulisanim intenzitetom transpiracije kod pojedinih genotipova, te nije postojao inicijalni stimulus za povećanu sintezu prolina.

Bassi and Sharma (1993) su takođe utvrdili promenljivu dinamiku akumulacije prolina u korenu pšenice, pod uticajem povišenih koncentracija Cu i Zn. Utvrđen je proporcionalan rast koncentracije prolina uporedo sa povećanjem koncentracije Cu i Zn, ali do određene granice, preko koje dolazi do progresivnog smanjenja koncentracije prolina. Bassi i Sharma (1993) navode da akumulacija prolina raste dokle god biljka može da održi metaboličke aktivnosti. Ako je koncentracija teških metala suviše visoka, to dovodi do zaustavljanja metabolizma uključujući i formiranje prolina. Kako su ispitivani genotipovi imali smanjenu produkciju biomase, naročito na većoj primenjenoj koncentraciji teških metala (10^{-4} M), značajno narušavanje metaboličkih aktivnosti je takođe moguć uzrok smanjenja koncentracije prolina. Dužina izloženosti teškim metalima takođe ima značaj. Metaelli et al. (2009) navode da je povećanje koncentracije prolina pod uticajem Cu, Cd i Zn u vrsti *Lemna gibba* prolazno, odnosno da sadržaj prolina dostiže vrhunac nakon 4 dana tretmana, što je praćeno opadanjem njegove koncentracije u odnosu na kontrolu nakon šestog dana.

Sun et al. (2007) navode da se slobodan prolin u novootkrivenoj hiperakumulatorskoj vrsti *Solanum nigrum* značajno povećao pod uticajem Cd, dok je naprotiv, u vrsti *Solanum melongena* (plavi patlidžan) koja nije hiperakumulator, koncentracija prolina varirala bez značajnih razlika. Stoga se veći kapacitet za savladavanje oksidativnog stresa povezuje se sa sposobnošću formiranja prolina. Formiranje prolina kao reakcija na stres izazvan teškim metalima mogao bi biti genotipski zavistan mehanizam, izraženiji u biljkama koje su bolje adaptirane na ovakav stres, poput hiperakumulatorskih vrsta.

Geni koji kodiraju većinu enzima uključenih u sintezu i degradaciju prolina su klonirani i delimično okarakterisani, ali faktori koji regulišu ekspresiju ovih gena su još uvek većinom nepoznati.

Mada je uloga prolina u toleranciji na osmotski stres potvrđena, sve njegove uloge u biohemijskim putevima biljaka još uvek nisu sasvim jasne. Dalja istraživanja su neophodna u cilju određivanja preciznih uzroka akumulacije prolina kao adaptivne reakcije na stres izazvan teškim metalima, naročito kada je u pitanju utvrđeno smanjenje sadržaja prolina u ispitivanim genotipovima vrba.

6.9. Predispozicija ispitivanih klonova u fitoekstrakciji

Klaster analiza ispitivanih klonova pokazala je da je klon 4 (*Salix nigra*) pokazao najveći potencijal za fitoekstrakciju Cd i Ni. U istraživanju Kuzovkina i sar. (2004) ova vrsta je takođe pokazala najveću toleranciju i akumulaciju Cd, u odnosu na četiri druge vrste vrba. Klon crne vrbe ispitan u ovoj disertaciji je imao zadovoljavajuće količine Cd i Ni akumuliranih u nadzemnim delovima, što uz održanje visokog nivoa organske produkcije može da dovede do njihove uspešne primene u fitoekstrakciji Cd i Ni. Ipak, primena ovog klona mora se pažljivo isplanirati i kontrolisati s obzirom da je u pitanju alohtona vrsta poreklom sa Američkog kontinenta. Klon 1 je posle klona 4, takođe pokazao značajan potencijal u fitoekstrakciji Cd i Ni. Mada je imao manji broj poželjnih karakteristika u odnosu na klon 4, klon 1 kao genotip autohtone vrste *Salix alba* treba uzeti u obzir u daljim analizama i potencijalnoj primeni remedijacije na zagađenim staništima. Kao autohtona vrsta, ovaj klon je već prilagođen abiotičkim i biotičkim uslovima regiona i njegova primena ne uključuje ekološke rizike ugrožavanja lokalne flore i postojećeg ekvilibrijuma biosfere. Kod unošenja alohtonih vrsta kao što je klon 4 (*Salix nigra*), brojne su opasnosti koje postoje usled narušavanja ekološkog balansa domaće flore koja se kroz odgovarajuće međudnose razvijala milionima godina (Stevanović, 1996). Ipak uz naučno utemeljenu kontrolu, potencijal koji ima klon 4 u fitoekstrakciji Cd i Ni mogao bi se iskoristiti.

Mada je klaster analiza pokazala da su klonovi 1 i 2 pokazali najveće predispozicije za fitoekstrakciju Pb, primena bilo kog ispitivanog klona za remedijaciju staništa zagađenih olovom nema ozbiljan potencijal. Klaster analiza predstavlja relativan odnos među ispitanim genotipovima. Međutim, male koncentracije Pb akumulirane u nadzemnim delovima svih genotipova vrba, ne dozvoljavaju njihovu primenu u fitoekstrakciji Pb koje je najvećim delom ostalo vezano u korenu.

6.10. Vrbe u fitoekstrakciji teških metala u poljskim uslovima

Dobijeni rezultati ukazuju na genotipske karakteristike i specifičnosti istraživanih genotipova koji bi se morali ispoljiti i u poljskim uslovima. Waston i sar. (1999) su testirali reznice 15 klonova vrba koristeći hidroponsku tehniku cirkulisanja hranljivog rastvora (eng. nutrient film technic), sa ciljem izbora genotipova sa visokom organskom produkcijom. Kasnijom primenom u poljskim uslovima utvrđena je zadovoljavajuća korelacija bioprodukcije između hidroponskog i poljski ostvarenog organskog prirasta, što ukazuje na visoku korelaciju između rezultata hidroponskih i poljskih eksperimenata kada su u pitanju karakteristike klonova. Stoga je očekivano da bi klon 4 (*Salix nigra* – klon 0408) verovatno bio najefikasniji fitoekstraktor i u poljskim uslovima. Variranja u uspešnoj primeni fitoekstrakcije vrbama, zavisila bi pre svega od karakteristika zemljišta i analiza dostupnosti teških metala, koji se jednim, većim ili manjim delom, nalaze u nerastvornom obliku u podlozi. Povećanje te dostupnosti moguće je izvesti dodavanjem helatora u zemljište uz prethodnu stručnu procenu rizika po životnu sredinu i pravilnog izbora helirajućeg agensa. U određenim uslovima sličan efekat moguće je postići dodavanjem određenih vrsta đubriva i smanjenjem pH zemljišta (Eriksson i Ledin, 1999). Mogući su i drugi postupci kao npr. manipulacija đubrivom. Zhao i sar. (2004) su utvrdili udvostručavanje akumulacije Cd u izbojku dodavanjem kalijumovih đubriva u zemljište. Uspešna primena zavisi i od kvaliteta i kvantiteta kontaminacije. Dickinson i Pulford (2005) navode da je translokacija Cd u nadzemne delove tkiva manja u visoko kontaminiranim staništima u odnosu na umereno kontaminirane, mada je ukupna akumulacija nešto veća. Po službenom glasniku Republike Srbije, MDK za Cd u zemljištu iznosi 3 mg/kg suve zemlje. Kako su u ovom radu primenjene dve koncentracije Cd 10^{-4} M = 11,24 mg/kg i 10^{-5} M = 1,12 mg/kg, a simptomi toksičnosti su utvrđeni naročito na većoj primenjenoj koncentraciji, može se pretpostaviti da bi se istraženi genotipovi vrba mogli uspešno primeniti na staništima umereno zagađenim Cd, gde zagađenje prelazi do tri puta MDK vrednost (npr. do 10 mg/kg). S obzirom da jedan deo Cd verovatno ne bi bio dostupan u rastvornom obliku, bioprodukcija vrba bi verovatno mogla biti zadovoljavajuća i simptomi toksičnosti bi izostali, uz istovremeno zadovoljavajuću translokaciju Cd u nadzemne delove biljaka.

Uzimajući u obzir da su činioci koji utiču na uspeh ovakve primene fitoremedijacije brojni, raznovrsni i često nepredvidivi, navedene pretpostavke treba uzeti sa rezervom, dok se ne potvrde u realnim uslovima. Prvi rezultati istraživanja ispitivanih vrba u zemljišnim kulturama i na poljskom ogledu koji su u toku, potvrđuju njihov potencijal u remedijaciji staništa sa umerenim zagađenjima Cd.

S obzirom na višestruko veću akumulaciju teških metala u korenu ispitivanih vrba, one se kao i većina drvenastih vrsta mogu ubrojati u tzv. „ekskludere“ (eng. exclude – isključiti), vrste koje ograničavaju usvajanje, unos i translokaciju teških metala, „isključujući“ ih iz metabolizma. Ipak, umerena utvrđena translokacija Cd i Ni ukazuje da bi uz dobru bioprodukciju ispitivane vrbe verovatno mogle da zadovolje potrebe fitoekstrakcije.

Rezultati su potvrdili da je akumulacija Cd, Ni i Pb veća u listovima u odnosu na izbojke. Ovo je dokazano i ranijim istraživanjima, ali kako masa izbojka čini oko 75% nadzemnog dela biljke (Dickinson i Pulford, 2005), košenjem izbojaka u zimskom periodu iznosi se veća količina metala iz podloge u odnosu na sakupljanje listova u jesen. Niz istraživanja ukazao je na različitu stopu akumulacije tokom različitih faza razvića jedne biljke, kako u toku sezone, tako i u toku ontogeneze. Kod drvenastih vrsta brzog rasta, važna pojava je tzv. „biološko razblaživanje“, tj. razblaživanje metala u biljnom tkivu nastalo naglim prirastom biomase. Koncentracija teških metala u biljnom tkivu zavisi od odnosa usvajanja mineralnih elemenata i brzine prirasta biomase. Tako su Dinelli i Lombini (1996) ispitivanjem većeg broja vrsta iz rodova *Salix*, *Silene* i *Populus*, utvrdili da je koncentrovanje metala bilo najveće u ranoj vegetativnoj fazi rasta, kada je usvajanje elemenata veliko, a prirast mase mali. Daljim ulaskom biljaka u fazu naglog rasta, koncentracije metala u biljnom tkivu su se „razblažile“ u nastaloj biomasi, što se održalo sve do faze cvetanja. Takođe, u više navrata, u vrbama gajenim na supstratu sa visokim količinama teških metala, utvrđeno je njihovo koncentrovanje u listovima neposredno pre senescencije, na kraju vegetativne sezone (Riddell-Black, 1994; Hasselgren, 1999), što je tumačeno kao mogući mehanizam detoksifikacije. Stoga se mora voditi računa o pravilnom planiranju vremenske dinamike košenja i iznošenja biomase iz kontaminiranog staništa.

Koncentracije Cd akumulirane u nadzemnim delovima biljaka na kombinovanim tretmanima koje prevazilaze 200 mg/kg, potvrđuju potencijal dva analizirana genotipa (klon 1 *Salix alba* – 68/53/1 i klon 4 *Salix nigra* – 0408) u

fitoekstrakciji Cd. Međutim, njihova primena *in vivo* bi mogla biti ograničena utvrđenim antagonizmom, ukoliko bi zagađenje Cd išlo uporedo sa zagađenjem Ni. Nikl u kompeticiji sa Cd značajno smanjuje njegovo usvajanje. Zajedničke kombinacije sa Pb-EDTA nisu pokazale takve antagonizme, ali se prilikom primene EDTA, ili drugih sintetičkih helata, mora izvršiti detaljna analiza staništa da bi se eliminisali rizici koji postoje prilikom primene tih helirajućih supstanci. Angelova i sar. (2004) navode da su rastvorne i karbonatne frakcije teških metala u zemljištu najviše uticale na akumuliranje metala u biljkama duvana, mada je dostupnost karbonatne frakcije teških metala zadovoljavajuća samo u kiselim pH vrednostima podloge. U istom istraživanju utvrđeno je da je rastvorna frakcija Pb u zemljištu samo 0,8 – 2,0 % ukupne količine Pb, dok je za Cd bila daleko veća (26,2 - 38,3 %). Stoga, čak i u slučaju da se ne koriste helati, verovatno je da bi antagonizam između Pb i Cd u zemljištu izostao, jer je olovo u zemljištu najvećim delom biološki „nevidljivo“. Ipak, u slučaju potencijalne primene u fitoekstrakciji potrebno je obratiti pažnju na antagonizme koji bi mogli da utiču na rezultate remedijacije.

Prema podacima Američke organizacije za zaštitu životne sredine (EPA, 2000), fitoremedijacija je u većini slučajeva 50-80% jeftinija od alternativnih tehnologija. Lokalne i državne vlasti, privatne kompanije i druga pravna tela trebalo bi ohrabriti na primenu fitoremedijacije, naročito kada su fondovi ograničeni, te kad je alternativa izostanak primene bilo kakvog postupka remedijacije. Takođe, mnoga zagađena staništa mogla bi se iskoristiti kao poligoni za eksperimentalne primene fitoremedijacije na obostranu korist vlasnika i istraživača. Na ovaj način, demonstracijom fitoremedijacije, njena komercijalizacija bi se značajno ubrzala i postala uspešnija.

7. ZAKLJUČAK

Cd i Ni u koncentraciji od 10^{-4} M doveli su do ispoljavanja simptoma toksičnosti, koji su se ogledali kroz opadanje vrednosti niza morfoloških i metaboličkih parametara (visine izbojka, mase izbojka, korena i listova, zapremine korena i površine listova). Vrbe gajene na manjoj koncentraciji (10^{-5} M), ispoljile su zadovoljavajuću toleranciju u odnosu na većinu analiziranih parametara.

Pb-EDTA je u najmanjoj meri redukovalo rast ispitivanih genotipova, pre svega usled slabe translokacije Pb u nadzemne delove biljke tako da je toksičnost Pb potpuno izostala. Takođe, joni Pb su bili vezani u organskoj formi, kompleksiranjem sa EDTA, čime je neutralisana njihova destruktivna reaktivnost.

Prisustvo EDTA u hranljivom rastvoru je zaštitilo optimum bioprodukcije vrba od toksičnog uticaja kombinovanih rastvora teških metala.

Cd i Pb-EDTA su stimulisali rast korena većine klonova vrba. Povećanje mase i zapremine korena verovatno je zaštitni mehanizam kojim biljka stvara dodatni prostor u korenu za izolaciju toksičnih metala, čime se štiti nadzemni deo biljke.

Prisustvo Cd i Ni u istom hranljivom rastvoru, imalo je najveći udruženi negativan uticaj na bioprodukciju vrba.

Uticaj teških metala na transpiraciju bio je najveći u prepodnevnom periodu (od 7 do 13 časova) kada su odavanje vode i metabolički procesi u biljkama dostizali najviši nivo. Nikl je u najvećoj meri smanjio intenzitet transpiracije, na obe primenjene koncentracije u odnosu na kontrolu, dok je dejstvom Cd i Pb-EDTA do značajnog smanjenja transpiracije došlo u manjem broju slučajeva, ponekad i sa utvrđenim blagim povećanjem transpiracije. Nesmanjena transpiracija uslovlila je dobru translokaciju Cd u najmlađe listove gde su metabolički procesi najintenzivniji. Stoga su akumulacija Cd i njegov toksičan uticaj bili izraženiji u mladim listovima vrba. Transpiracija klona 4 (*Salix nigra* - klon 0408) je bila najmanje narušena pod uticajem teških metala.

Cd i Ni su, kako pojedinačno tako i u kombinovanim rastvorima, najviše smanjili koncentraciju pigmenata, disanje i fotosintezu, naročito u mladim listovima. Fotohemijska efikasnost utvrđena merenjem fluorescencije nije bila narušena pod uticajem svih primenjenih teških metala, što ukazuje da su utvrđena smanjenja

intenziteta fotosinteze vezana za poremećaje u sintezi pigmenata. Tretman Pb-EDTA nije uslovio smanjenje koncentracije fotosintetičkih pigmenata, intenziteta disanja i fotosinteze.

Akumulacija i translokacija teških metala zavisila je od koncentracije određenog teškog metala i od genotipa. Translokacija svih teških metala iz korena u nadzemne delove je bila slaba, naročito Pb (i više od deset puta manja od Cd i Ni). Ovo utvrđeno nakupljanje teških metala u korenu zaštitilo je nadzemni deo biljke od njihovih negativnih efekata. Koncentracije Cd koje su u izbojcima i listovima dostigle nekoliko stotina mg/kg su među najvećim utvrđenim koncentracijama ikada postignutim u hidroponskim eksperimentima gajenja vrba. Zadovoljavajući transport Cd verovatno je bio dodatno stimulisan održavanjem transpiracionog toka blizu nivoa kontrolnih biljaka. Ova činjenica je najbolje uočljiva kod klona 4 (*Salix nigra* - klon 0408) koji je imao nenarušenu transpiraciju i najveću koncentraciju Cd u nadzemnom delu. Stoga je potencijal ispitanih vrba u fitoekstrakciji Cd značajan, pogotovo kada se ima u vidu da među fitoekstraktornim biljnim vrstama Cd, još nisu nađeni zadovoljavajući predstavnici.

Utvrđeno je ispoljavanje specifičnih antagonizama između teških metala koji se nalaze zajedno u korenskom medijumu. Prisustvo EDTA u rastvoru najviše je stimulisalo translokaciju Cd koji je verovatno delom istisnuo Pb i formiralo kompleks sa EDTA. Između Cd i Ni utvrđen je jak antagonizam u usvajanju i translokaciji Cd pri čemu Ni, kao jon čiji je radijus sličniji radijusu nekih esencijalnih elemenata, verovatno ima veći afinitet za membranske prenosioce u biljci, čime istiskuje Cd. Prisustvo Cd u rastvoru stimulisalo je akumuliranje Ni u listovima i izbojku. Moguće objašnjenje je da je nedostatak Fe i Mg izazvan prisustvom Cd (prisustvo Cd u rastvoru uvek je dovelo do hloroze na većoj koncentraciji 10^{-4} M), stimulisao sintezu njihovih transportera koje istovremeno koristi i Ni kao jon sa najsličnijim radijusom. Isti efekat stimulacije akumuliranja Ni u korenu (gde nije bilo hloroze) je izostao pod uticajem Cd.

Opisani antagonizmi bili su ispoljeni na većim primenjenim koncentracijama teških metala (10^{-4} M), dok su na manjoj koncentraciji (10^{-5} M), gde nije bilo ni simptoma toksičnosti, slični antagonizmi bili značajno manje izraženi.

Sve utvrđene promene sadržaja K, P, N, NO_3^- i aktivnosti nitrat reduktaze su zavisile od koncentracije primenjenih metala i genotipa. Uprkos simptomima hloroze i toksičnosti, koji su na tretmanima Cd i Ni utvrđeni na koncentracijama od 10^{-4} M,

očekivano smanjenje koncentracije ispitanih hranljivih elemenata nije bilo dominantno. Sadržaji K i P su veoma varirali pod uticajem teških metala, naročito kada je u pitanju koncentracija K u listovima. Pod uticajem Cd i Ni u mladim listovima je utvrđeno povećanje a u starim opadanje koncentracije K i P. Cd i Ni su doveli do povećanja koncentracije K u korenu u odnosu na kontrolu, što ukazuje da su metali uticali na zadržavanje K u korenu i inhibirali njegovu translokaciju. Ni je takođe inhibirao i translokaciju P iz korena, dok je Cd inhibirao i neposredno usvajanje P korenom. Pb-EDTA je u najmanjoj meri uticalo na sadržaj K, P, N i NO_3^- , što je i bilo očekivano zbog zaštitnog efekta primenjenog EDTA.

Usvajanje N i NO_3^- nije izmenjeno pod uticajem teških metala. Utvrđeno smanjenje bioprodukcije na nekim pojedinačnim i kombinovanim tretmanima teških metala koncentracije 10^{-4} M nije uzrokovano nedostatkom K, P, N i NO_3^- .

Na aktivnost nitrat reduktaze, najviše je uticao Ni i kombinovani tretmani sva tri teška metala verovatno i usled indirektno inhibicije vezane za utvrđenu hlorozu i nekrozu listova i posledično smanjenje intenziteta fotosinteze. Cd nije pokazao stabilan inhibitoran uticaj na aktivnost nitrat reduktaze, s obzirom da su sadržaj NO_3^- i intenzitet transpiracije u vrbama tretiranim Cd bili stabilni. Veći udeo redukcije NO_3^- do NH_4^+ odvijao se u listovima ispitivanih vrba. Kako je translokacija Pb u nadzemne delove bila veoma niska, toksičan efekat Pb u listovima gde se odvija veći deo aktivnosti nitrat reduktaze nije utvrđen. Takođe, zaštitni efekat EDTA, koji je potvrđen u većem broju analiza ove disertacije, dodatno je stabilizovao redukciju nitrata.

Koncentracija prolina je varirala specifično u zavisnosti od tretmana i genotipa. Kod nekih klonova pod uticajem pojedinačnih tretmana Cd i Pb-EDTA, i većine kombinovanih tretmana, koncentracija prolina se povećala ili ostala na sličnom nivou kao u kontrolnim biljkama. Međutim, očekivano povećanje prolina pod uticajem teških metala nije bilo dominantno na svim tretmanima. Na većini tretmana Ni i nekim tretmanima Cd i Pb-EDTA utvrđeno je smanjenje koncentracije prolina u listovima i korenu. Utvrđeno variranje koncentracije prolina može da zavisi i od dužine perioda izloženosti biljaka teškim metalima i od specifičnosti metaboličkih puteva sinteze, razgradnje i transporta prolina. Stoga je potrebno izvršiti nove analize u cilju utvrđivanja preciznih uzroka ovakvih variranja u akumuliranju prolina.

Specifičnost genotipa bila je karakteristična za sve analize, što ukazuje na selekciju genotipskih mehanizama tolerancije na teške metale na subspecijskom, populacionom nivou. Stoga je izbor adekvatnog klona za potrebe fitoekstrakcije

potrebno izvršiti na nivou genotipa, dok vrsta kao taskonomska jedinica ima manji značaj.

Zajedničko dejstvo teških metala, obično je imalo veći negativni efekat u odnosu na pojedinačno dejstvo metala. Međutim, utvrđeno povećanje toksičnosti nikada nije bilo potpuno aditivno (duplirano) što ukazuje ili na antagonistički efekat između metala, ili na izraženiju aktivaciju zaštitnih mehanizama pod uticajem većeg broja prisutnih teških metala.

Razlike između klonova utvrđene analizom prikazanih fizioloških parametara, bile su više izražene na većim primenjenim koncentracijama teških metala (10^{-4} M). Ovo ukazuje da je ispoljavanje genotipske specifičnosti zavisno od nivoa kontaminacije.

Najbolje predispozicije za fitoekstrakciju Cd i Ni imao je klon 4 (*Salix nigra* - klon 0408). Mada je imao manji broj poželjnih osobina od klona 4, klon 1 (*Salix alba* - klon 68/53/1) takođe zaslužuje pažnju u daljim analizama fitoekstrakcije, s obzirom da pripada autohtonoj vrsti, čime su ekološki rizici njegove primene manji.

Ispitivani klonovi nisu pokazali zadovoljavajući stepen akumulacije Pb da bi se njihova primena u remedijaciji staništa zagađenih Pb mogla smatrati praktičnom.

Primena ispitanih genotipova vrba u poljskim uslovima zavisila bi od karakteristika zemljišta, klime i dostupnosti teških metala na datom staništu. Utvrđene predispozicije klonova bi se morale ispoljiti i u poljskim uslovima, s obzirom na u literaturi već potvrđene pozitivne korelacije između hidroponih i eksperimenata postavljenih u poljskim uslovima. Može se prognozirati da bi primena analiziranih vrba bila uspešna na zemljištima umereno zagađenim Cd i Ni, gde njihova koncentracija prelazi dozvoljene granice najviše tri puta. Pri tome se mora obratiti pažnja da bi takva remedijacija mogla biti ograničena istovremenim prisustvom oba teška metala na istom staništu, usled utvrđenih antagonizama koji se javljaju između Cd i Ni.

7. Literatura

- Adam, G., Duncan, H.J. (1999): Effect of diesel fuel on growth of selected plant species. *Environmental Geochemistry and Health* 21: 353-357.
- Aiken, A.M., Peyton, B.M., Apel, W.A., Petersen, J.N. (2003): *Analytica Chimica Acta* 480: 131-142.
- Alia-Saradhi, P.P. (1991): Proline accumulation under heavy metal stress. *Journal of Plant Physiology* 138: 504–508.
- Alkorta, I., Hernández-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 Bio/Technology* 3: 71–90.
- Andrews, M. (1986): The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants. *Plant Cell and Environment* 9: 511–519.
- Angelova, V., Ivanov, K., Ivanova, R. (2004): Effect of chemical forms of lead, cadmium and zinc in polluted soils on their uptake by tobacco. *Journal of Plant Nutrition* 5: 757-773.
- Aprill, W., Sims, R.C. (1990): Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. *Chemosphere* 20: 253-265.
- Arazi, Z., Sunkar, R., Kaplan, B., Fromm, H. (1999): A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni²⁺ tolerance and Pb²⁺ hypersensitivity in transgenic plants. *The Plant Journal* 20: 171-182.
- Arsenijević-Maksimović, I., Broughton, W.J., Krause, A. (1997): Rhizobia modulate root-hair-specific expression of extensin genes. *MPMI* 10: 95-101
- Awad, F., Römheld, V. (2000): Mobilization of heavy metals from contaminated calcareous soils by plant born, microbial and synthetic chelators and their uptake by wheat plants. *Journal of Plant Nutrition* 23: 1847-1855.
- Baker, A.J.M. (1981): Accumulators and excluders—strategies in response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition* 3: 643–654.
- Baker, A.J.M., McGrath, S.P., Reeves, R.D., Smith, J.A.C. (2000): Metal hyperaccumulator plants: A review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In: Terry, N., Bañuelos, G. (Eds.). *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*, Boca Raton: Lewis, pp. 85-108.
- Baker, A.J.M., Reeves, R.D., McGrath, S.P. (1991): *In situ* decontamination of heavy metal polluted soils using crops of metal accumulating plants – a feasibility study. In: Hinchey, R.E., Olfenbittel, R.F. (Eds.). *In situ Bioreclamation*. Butterworth-Heinemann Publishers, Stoneham, M.A., pp. 539-544.

- Baker, A.J.M., Walker, P.L. (1990): Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. In: Shaw, A.J. (Ed.). Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects, CRC Press, Boca Raton, FL., pp. 155–177.
- Bañuelos, G.S. (2000): Factors influencing field phytoremediation of selenium-laden soils. In: Terry, N., Bañuelos, G. (Eds.). Phytoremediation of contaminated soils and water, Boca raton: Lewis, pp. 41-61.
- Barcelo, J., Poschenrieder, C. (1990): Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. *Journal of Plant Nutrition* 13: 1–37.
- Barneix, A.J., Breteler, H., Geijn, Van de C.S. (1984): Gas and ion exchanges in wheat roots after nitrogen supply. *Physiologia Plantarum* 61: 357-362.
- Baryla, A., Carrier, P., Franck, F., Coulomb, C., Sahut, C., Havaux M. (2001): Leaf chlorosis in oilseed rape plants (*Brassica napus*) grown on cadmium polluted soil: Causes and consequences for photosynthesis and growth. *Planta* 212: 696–709.
- Bassi, R. Sharma, S.S. (1993): Proline accumulation in wheat seedlings exposed to zinc and copper. *Phytochemistry* 33: 1339–1342.
- Becerril, J. M., Munoz-Rueda, A., Aparicio-Tejo, P., Gonzales-Murua, C. (1988): The effects of cadmium and lead on photosynthetic electron transport in clover and lucerne. *Plant Physiology and Biochemistry* 26: 357–363.
- Benett, P.M., Jepson, P.D., Law, R.J., Jones, B.R., Kuiken, T., Baker, J.R., Rogan, E., Kirkwood, J.K. (2001): Exposure to heavy metals and infectious disease mortality in harbour poropises from England and Wales. *Environmental Pollution* 1: 33-40.
- Bhandal, I.S., Kaur, H. (1992): Heavy metal inhibition of nitrate uptake and *in vivo* nitrate reductase activity in roots of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Indian Journal of Plant Physiology* 35: 281-284.
- Bibi, M., Hussain, M., Qureshi, M.S., Kousar, S., Ajaz, S. (2006): Heavy metal and nutrient ion accumulation by two black gram cultivars treated with copper and lead. *Journal of Plant Nutrition* 29: 913-920.
- Biernacka, E., Maluszyński, M.J. (2006): The content of cadmium, lead and selenium in soils from selected sites in Poland. *Polish Journal of Environmental Studies* 2a: 7-9.
- Björkman, O. (1987): High-irradiance stress in higher plants and interaction with other stress factors. In: Biggins, J. (Ed.). *Progress in Photosynthesis Research IV*: 11-18.
- Blaylock, M.J., Huang, J.W. (2000): Phytoextraction of metals. In: Raskin, I., Ensley, B.D. (Eds.). *Phytoremediation of toxic metals. Using plants to clean up the environment*, New York: Wiley, pp. 53-70.
- Blaylock, M.J., Salt, D.E., Dushenkov, S., Zakharova, O., Gussman, C. (1997): Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil applied chelating agents. *Environmental Science & Technology* 31: 860–865.

- Bolhár-Nordenkamp, H.R., Long, S.P., Baker, N.R., Öquist, G., Schreiber, U., Lechner, E.G. (1989): Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Functional Ecology* 3: 497-514.
- Borišev, M., Pajević, S., Nikolić, N., Pilipović, A., Krstić, B., Orlović, S. (2009): Phytoextraction of Cd, Ni, and Pb using four willow clones (*Salix spp.*). *Polish Journal of Environmental Studies* 4: 553-561.
- Boussama, N., Ouariti, O., Suzuki, A., Ghorbla, M. H. (1999): Cd-stress on nitrogen assimilation. *Plant Physiology* 155: 310–317.
- Bringezu, K., Lichtenberger, O., Leopold, I., Neumann, D. (1999): Heavy metal tolerance of *Silene vulgaris*. *Journal of Plant Physiology* 154: 536-546.
- Burken, J.G., Schnoor, J.L. (1997): Uptake and metabolism of atrazine by poplar trees. *Environmental Science & Technology* 31: 1399-1406.
- Burzynski, M., Kolano, E. (2003): In vivo and in vitro effects of copper and cadmium on the plasma membrane H⁺-ATP-ase from cucumber (*Cucumis sativus* L.) and maize (*Zea mays* L.) roots. *Acta Physiologiae Plantarum* 25: 39–45.
- Cárdenas-Navaro, R., Adamowicz, S., Robin, P. (1999): Nitrate accumulation in plants; a role of water. *Journal of Experimental Botany* 50: 613-624.
- Castro-González, M.I., Méndez-Armenta, M. (2008): Heavy metals: Implications associated to fish consumption. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 3: 263-271.
- Chaffei, C., Gouia, H., Ghorbel, H. M. (2003): Nitrogen metabolism in tomato plants under cadmium stress. *Journal of Plant Nutrition* 8: 1617–1634.
- Chaffei, C., Pageau, K., Suzuki, A., Gouia, H., Ghorbel, M. H., Masclaux-Daubresse C. (2004): Cadmium toxicity induced changes in nitrogen management in *Lycopersicon esculentum* leading to a metabolic safeguard through an amino acid storage strategy. *Plant and Cell Physiology* 11: 1681–1693.
- Chaney, R.L. (1983): Plant uptake of inorganic waste. In: Parr, J.E. et al. (Eds.). *Land Treatment of Hazardous Waste*. Noyes Data Corp., Park Ridge, IL. pp. 50-76.
- Chaney, R.L., Li, Y.M., Brown, S.L., Homer, F.A., Malik, M., Chin, M. (2000): Improving metal hyperaccumulator wild plants to develop commercial phytoextraction systems: approaches and progress. In: Terry, N., Bañuelos, G. (Eds.). *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*, Boca Raton: Lewis, pp. 129-158.
- Ciećko, Z., Kalembasa, S., Wyszowski, M., Rolka, E. (2004): Effect of soil contamination by cadmium on potassium uptake by plants. *Polish Journal of Environmental Studies* 13: 333–337.
- Clemens, S. (2001): Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212: 475-486.

- Cosio, C., Vollenweider, P., Keller, C. (2006): Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis* L.). I Microlocalization and phytotoxic effects of cadmium. *Environmental and Experimental Botany* 58: 64-74.
- Costa, G., Morel, J-L. (1994): Water relations, gas exchange and amino acid content in Cd-treated lettuce. *Plant Physiology and Biochemistry* 32: 561–570.
- Cseh, E., Fodor, F., Varga, A., Zárny, G. (2000): Effect of lead treatment on the distribution of essential elements in cucumber. *Journal of Plant Nutrition* 23: 1095-1105.
- Dahl, J. (2000): Chemistry and Behaviour of Environmentally Relevant Heavy Metals in Biomass Combustion and Thermal Ash Treatment Processes. PhD thesis, Institute of Chemical Engineering Fundamentals and Plant Engineering, Technical University of Graz, Austria.
- Davies, K.L., Davies, M.S., Francis, D. (1991): The influences of an inhibitor of phytochelatin synthesis on root growth and root meristematic activity in *Festuca rubra* L. in response to zinc. *New Phytologist* 118: 565-570.
- Davis, L.C., Erickson, L.E., Narayanan, N., Zhang, Q. (2003): Modeling and design of phytoremediation. In: McCutcheon, S.C., Schnoor, J.L. (Eds.). *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*, New York: Wiley, pp. 663-694.
- Davis, R.D., Beckett, P.H.T., Wollan, E. (1978): Critical levels of 20 potentially toxic elements in young spring barley. *Plant and Soil* 49: 395-404.
- De Knecht, J.A., Van Dillen, M., Koevoets, P.L.M., Schat, H., Verkleij, J.A.C., Ernst, W.H.O. (1994): Phytochelatins in cadmium-sensitive and cadmium-tolerant *Silene vulgaris*. Chain length distribution and sulfide incorporation. *Plant Physiology* 104: 1313-1325.
- Dickinson, N.M. (2000): Strategies for sustainable woodland on contaminated soils. *Chemosphere* 41: 259–263.
- Dickinson, N.M., Pulford, I.D. (2005): Cadmium phytoextraction using short-rotation coppice *Salix*: the evidence trail. *Environment International* 31: 609-613.
- Dickinson, N.M., Turner, A.P., Lepp, N.W. (1991): How do trees and other long-lived plants survive in polluted environments? *Functional Ecology* 5: 5-11.
- 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.
- Dinakar, N., Nagajyothi, P.C., Suresh, S., Udaykiran, Y., Damodharam, T. (2008): Phytotoxicity of cadmium on protein, proline and antioxidant enzyme activities in growing *Arachis hypogaea* L. seedlings. *Journal of Environmental Sciences* 20: 199-206.

- Dinelli, E., Lombini, A. (1996): Metal distributions in plants growing on copper mine spoils in Northern Apennines, Italy: the evaluation of seasonal variations. *Applied Geochemistry* 11: 375– 385.
- 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 willows and poplars. *Environmental Pollution* 148: 155-165.
- Du, Q., Chen, M-X., Zhou, R., Chao, Z-Y., Zhu, Z-W., Shao, G-S., Wang, G-M. (2009): Cd toxicity and accumulation in rice plants vary with soil nitrogen status and their genotypic difference can be partly attributed to nitrogen uptake capacity. *Rice Science* 4: 283-291
- Dushenkov, S. (2003): Trends in phytoremediation of radionuclides. *Plant and Soil* 249: 167-175.
- Dushenkov, S., Kapulnik, Y. (2000): Phytofiltration of metals. In: Raskin, I., Ensley, B.D., (Eds.). *Phytoremediation of Toxic Metals. Using Plants to Clean up the Environment*, New York: Wiley, pp. 89-106.
- Ekino, S., Susa, M., Ninomiya, T., Imamura, K., Kitamura, T. (2007): Minamata disease revisited: An update on the acute and chronic manifestation of methyl mercury poisoning. *Journal of the Neurological Sciences* 262: 131-144.
- Elles, M.P., Blaylock, M.J. (2000): Amendment optimization to enhance lead extractability from contaminated soils for phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation* 2: 75-89.
- EPA (2000): *Introduction to Phytoremediation*. Washington: U.S. Environmental Protection Agency, EPA/600/R-99/107.
- Epstein, E. (1999): Silicon. *Annual Review of Plant Physiology. Plant Molecular Biology* 50: 641-664.
- Eriksson, J., Ledin, S. (1999): Changes in phytoavailability and concentration of cadmium in soil following long term *Salix* cropping. *Water Air and Soil Pollution* 114: 171– 184.
- Ernst, W.H.O., Verkleij, J.A.C., Schat, H. (1992): Metal tolerance in plants. *Acta Botanica Neerlandica* 41: 229-248.
- Ferro, A., Chard, J., Kjellgren, R., Chard, B., Turner, D., Montague, T. (2001): Groundwater capture using hybrid poplar trees: evaluation of a system in Ogden, Utah. *International Journal of Phytoremediation* 3: 87-104.
- Ferro, A.M., Rock, S.A., Kennedy, J., Herrick, J.J, Turner, D.L. (1999): Phytoremediation of soils contaminated with wood preservatives: greenhouse and field evaluations. *International Journal of Phytoremediation* 1: 289-306.
- Fleit, E., Lakatos, G. (2003): Accumulative heavy metal patterns in the sediments and biotic compartments of the Tisza watershed. *Toxicology Letters* 140-141: 323-332.

- Fodor, F. (2002): Physiological responses of vascular plants to heavy metals. In: Prasad, M.N.V., Kazimerz, S. (Eds.). *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*. Kluwer Academic Publishers, Springer, pp. 149-177.
- Fodor, F., Cseh, E., Varga, A., Zárny, G. (1998): Lead uptake, distribution, and remobilization in cucumber. *Journal of Plant Nutrition* 21: 1363-1373.
- Foy, C.D., Chaney, R.L., White, M.C. (1978): The physiology of metal toxicity in plants. *Annual Review of Physiology* 29: 511-519.
- Fuhrer, J. (1983): Phytotoxic effects of cadmium in leaf segments of *Avena sativa* L., and the protective role of calcium. *Experientia* 39: 525–526.
- Gajewska, E., Skłodowska, M. (2007): Effect of nickel on ROS content and antioxidative enzyme activities in wheat leaves. *Biometals* 20: 27–36.
- Gajewska, E., Skłodowska, M., Slaba, M., Mazur, J. (2006): Effect of nickel on antioxidative enzyme activities, proline and chlorophyll contents in wheat shoots. *Biologia Plantarum* 4: 653-659.
- Gajewska, E., Skłodowska, M. (2008): Differential biochemical responses of wheat shoots and roots to nickel stress: antioxidative reactions and proline accumulation. *Plant Growth Regulation* 54: 179–188.
- Genuis, S.J. (2008): Toxic causes of mental illness are overlooked. *Neurotoxicology* 6: 1147-1149.
- 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.
- Gerloff, G.C., Krombholz, P.H. (1966): Tissue analysis as a measure of nutrient availability for the growth of aquatic plants. *Limnology and Oceanography* 11: 529-537.
- Ghosh, M., Singh, S. P. (2005). A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its by-products. *Applied Ecology and Environmental Research* 1: 1–18.
- Glass, D.J. (1999): *U.S. and International Markets for Phytoremediation, 1999-2000*. Needham, M.A.D. Glass Association.
- Gouia, H., Ghorbal, M.H., Meyer, C. (2000): Effects of cadmium on activity of nitrate reductase and on other enzymes of the nitrate assimilation pathway in bean. *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 629-638.
- Greger M. (1999): *Salix* as phytoextractor. In: Wenzel, W.W. et al, (Eds.). *Proceedings of the 5th International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements*. Vienna: Boku, pp. 872– 873.
- Greger, M., Brammer, E., Lindberg, S., Larsson, G., Idestam-Almqvist, J. (1991): Uptake and physiological effects of cadmium in sugar beet (*Beta vulgaris*) related to mineral provision. *Journal of Experimental Botany* 6: 729–737.

- Greger, M., Lindberg, S. (1987): Effects of Cd^{2+} and EDTA on young sugar beets (*Beta vulgaris*). II. Net uptake and distribution of Mg^{2+} , Ca^{2+} , and $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$. *Physiologia Plantarum* 69: 81-86.
- Grěman, H., Velikonja-Bolta, Š., Kos, B., and Leštan. D. (2001): EDTA enhanced heavy metal phytoextraction: Metal accumulation, leaching and toxicity. *Plant and Soil* 235: 105–114.
- Gussarsson, M. (1994): Cadmium-induced alterations in nutrient composition and growth of *Betula pendula* seedlings: the significance of fine roots as a primary target for cadmium toxicity. *Journal of Plant Nutrition* 17: 2151-2163.
- Haag-Kerwer, A., Schäfer, H.J., Heiss, S., Walter, C., Rausch, T. (1999): Cadmium exposure in *Brassica juncea* causes a decline in transpiration rate and leaf expansion without effect on photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 50: 1827-1835.
- Hageman, R.H., Reed, A.J. (1980): Nitrate reductase from higher plants. *Methods in Enzymology* 69: 270-279.
- Hall, J.L. (2002): Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 53: 1-11.
- Hammer, D., Kayser, A., Keller, C. (2003): Phytoextraction of Cd and Zn with *Salix viminalis* in field trials. *Soil Use and Management* 3: 19-23.
- Hampp, R., Zigler, H., Zigler, I. (1973): *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 164: 588-595.
- Hansen, D., Duda, P.J., Zayed, A., Terry, N. (1998): Selenium removal by constructed wetlands: role of biological volatilization. *Environmental Science & Technology* 32: 591-597.
- Harms, H., Bokern, M., Kolb, M., Bock, C. (2003): Transformation of organic contaminants by different plant systems. In: McCutcheon, S.C., Schnoor, J.L., (Eds.). *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*, New York: Wiley, pp. 285-316.
- Hart, J.J., Welch, R.M., Norvell, W.A., Sullivan, L.A., Kochian, L.V. (1998): Characterization of cadmium binding, uptake, and translocation in intact seedlings of bread and durum wheat cultivars. *Plant Physiology* 116: 1413-1420.
- Hendry, G. A. F., Baker, A. J. M., Ewart, C. F. (1992): Cadmium tolerance and toxicity oxygen radicals processes and molecular damage in cadmium tolerant and cadmium-sensitive clones of *Holcus lanatus*. *Acta Botanica Neerlandica* 41: 271–281.
- Hernández, L.E., Lozano-Rodríguez, E., Gárate, A., Carpena-Ruiz, R. (1998): Influence of cadmium on the uptake. Tissue accumulation and subcellular distribution of manganese in pea seedlings. *Plant Science* 132: 139-151.

- 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.
- Hinsinger, P., Plassard, C., Tang, C., Jaillard, B. (2003): Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: a review. *Plant and Soil* 248: 43–59.
- Hirano, K., Noda, M., Hasegawa, S., Okamoto, G. (1994): Contribution of lateral and primary leaves to the development and quality of Kyoho grape berry. *Journal of the Japan Society of Horticultural Science* 3: 515-521.
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I. (1950): The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station, circular 347, University of California, Berkeley, California.
- Hong, M.S., Farmayan, W.F., Dortch, I.J., Chiang, C.Y., McMillan, S.K., Schnoor, J.L. (2001): Phytoremediation of MTBE from a groundwater plume. *Environmental Science & Technology* 35: 1231-1239.
- Horne, A.J. (2000): Phytoremediation by constructed wetlands. In: Terry, N., Bañuelos, G. (Eds.). *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*, Boca Raton: Lewis, pp. 13-40
- Hough, R.L., Tye, A.M., Crout, N.M.J., McGrath, S.P., Zhang, H., Young, S.D. (2005): Evaluating a 'Free Ion Activity Model' applied to metal uptake by *Lolium perenne* L. grown in contaminated soils. *Plant and Soil*. 270: 1-12.
- Hovsepyan, A., Greipssom, S. (2005): EDTA-enhanced phytoremediation of lead-contaminated soil by corn. *Journal of Plant Nutrition* 28: 2037-2048.
- Hu, N., Luo, Y., Wu, L., Song, J. (2007): A field lysimeter study of heavy metal movement down the profile of soils with multiple metal pollution during chelate-enhanced phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation* 9: 257-268.
- Huang, C.Y., Bazzaz, F.A., Vanderhoef, L.N. (1974): The inhibition of soybean metabolism by cadmium and lead. *Plant Physiology* 54: 122-124.
- Huang, J.W., Chen, J., Berti, W.R. (1997): Phytoremediation of Pb contaminated soils: Role of synthetic chelates in lead phytoextraction. *Environmental Science & Technology* 31: 800–805.
- Huang, J.W., Cunningham, S.D. (1996): Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation. *New Phytologist* 134: 75–84.
- Hughes, J.B., Shanks, J., Vanderford, M., Lauritzen, J., Bhadra, R. (1997): Transformation of TNT by aquatic plants and plant tissue cultures. *Environmental Science & Technology* 31: 266-271.

- Iiyama, K., Lam, T.B., Stone, B.A. (1994): Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiology* 104: 315–320.
- Ionenko, I.F., Anisimov, A.V., Karimova, F.G. (2006): Water transport in maize roots under the influence of mercuric chloride and water stress: a role of water channels. *Biologia Plantarum* 50: 74–80.
- Jalloh, M.A., Chen, J., Zhen, F., Zhang, G. (2009): Effect of different N fertilizer forms on antioxidant capacity and grain yield of rice growing under Cd stress. *Journal of Hazardous Materials* 162: 1081-1085.
- Jana, S., Choudhuri, M.A. (1982): Senescence in submerged aquatic angiosperms: effects of heavy metals. *New Phytologist* 90: 477–484.
- Jarup, L. (2003): Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin* 68: 167–182.
- Jeffers, P.M., Liddy, C.D. (2003): Treatment of atmospheric halogenated hydrocarbons by plants and fungi. In: McCutcheon, S.C., Schnoor, J.L. (Eds.). *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*, New York: Wiley, pp. 787-804.
- Jentschke, G., Godbold, D.L. (2000): Metal toxicity and ectomycorrhizas. *Physiologia Plantarum* 109: 107-116.
- Jiang, H.M., Yang, J.C., Zhang, J.F. (2007): Effects of external phosphorus on the cell ultrastructure and the chlorophyll content of maize under cadmium and zinc stress. *Environmental Pollution* 147: 750-756.
- Kähkönen, M.A., Kairesalo, T. (1998): The effects of nickel on the nutrient fluxes and on the growth of *Elodea canadensis*. *Chemosphere* 8: 1521-1530.
- Kahle, H. (1993): Response of roots of trees to heavy metals. *Environmental and Experimental Botany* 33: 99-119.
- Kastori, R., Maksimović, I. (2008): *Ishrana biljaka*. Vojvođanska akademija nauka i umetnosti. Novi Sad, s. 237.
- Kastori, R., Petrovic, M., Petrovic, N. (1992): Effect of excess lead, cadmium, copper and zinc on water relations in sunflower. *Journal of Plant Nutrition* 15: 2427–2439.
- Kastori, R., Petrović, N., Arsenijević-Maksimović, I. (1997): Teški metali i biljke. In: Kastori, R. (Ed.). *Teški metali u životnoj sredini*. Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad: 197-257.
- Kastori, R., Petrović, N., Petrović, M. (1996): Effect of lead on water relations, proline concentration and nitrate reductase activity in sunflower plants, *Acta Agronomica Academiae Scientiarum Hungaricae* 44(I): 21-28.
- Kaurkstis, K.K. (1992): Chlorophyll fluorescence analyses of photosystem II reaction center heterogeneity. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 1-2: 63-74

- Kennedy, C.D., Gonsalvez, F.A.N. (1989): The action of divalent Zn, Cd, Hg, Cu and Pb ions on the ATPase activity of plasma membrane fraction isolated from roots of *Zea mays*. *Plant and Soil* 117: 167–175.
- Kevrešan, S., Petrović, N., Popović, M., Kadnrač, J. (2001): Nitrogen and protein metabolism in young pea plants as affected by different concentrations of nickel, cadmium, lead and molybdenum. *Journal of Plant Nutrition* 10: 1633-1644.
- Khalid, B.Y., Tinsley, J.: (1980): Some effects of nickel toxicity on rye grass. *Plant and Soil* 55: 139-144.
- Kieliszewski, M. J., Lamport, D. T. (1994). Extensin: Repetitive motifs, functional sites, post-translational codes, and phylogeny. *Plant Journal* 5:157-172.
- Kirkham, M.B. (2000): EDTA-facilitated phytoremediation of soil with heavy metals from sewage sludge. *International Journal of Phytoremediation* 2: 159-172.
- Kishor, P.B., Hong, Z., Miao, G.H., Hu, C.A., Verma, D.P.S. (1995): Overexpression of $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology* 108: 1387-1394.
- Kjeldahl, J. (1883): A new method for the determination of nitrogen in organic matter. *Zeitschreft fur Analytische Chemie* 22: 366.
- Komives, T., Gullner, G. (2006): Dendroremediation: the use of trees in cleaning up polluted soils. In: Mackova et al. (Eds.). *Phytoremediation Rhizoremediation*, pp. 23-31.
- Kopittke, P.M., Asher, C.J., Menzies, N.W. (2008): Prediction of Pb speciation in concentrated and dilute nutrient solutions. *Environmental Pollution* 153: 548-554.
- Kos, B., Leštan. D. (2003): Influence of a biodegradable ([S,S]-EDDS) and nondegradable (EDTA) chelate and hydrogen modified soil water sorption capacity on Pb phytoextraction and leaching. *Plant and Soil* 253: 403–411.
- Krämer, U., Pickering, I.J., Prince, R.C., Raskin, I., Salt, D.E. (2000): Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and nonaccumulator *Thlaspi* species. *Plant Physiology* 122: 1343–1353.
- Kumar, P., Tewarl, R. K., Sharma, P.N. (2007): Excess nickel-induced changes in antioxidative processes in maize leaves. *Journal of Plant Nutrition and Soil Sciences* 170: 796-802.
- Küpper, H., Küpper, F.C., Spiller, M. (1996): Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. *Journal of Experimental Botany* 47: 259-266.
- Kurtyka, R., Malkowski, E., Kita, A., Karcz, W. (2007): Effect of calcium and cadmium on growth and accumulation of cadmium, calcium, potassium and sodium in maize seedlings. *Polish Journal of Environmental Studies* 1: 51-56.

- Kuzovkina, Y.A., Knee, M., Quigley, F. (2004): Cadmium and copper uptake and translocation in five willow species. *International Journal of Phytoremediation* 3: 269-287.
- Lacatusu, R., Dumitru, M., Risnoveanu, I., Ciobanu, C., Lungu, M., Carstea, S., Kovacsovics, B., Baci, C. (2001): Soil pollution by acid rains and heavy metals in Zlatna region, Romania. In: Stott, D.E., Mohtar, R.H., Steinhardt G.C., (Eds.). *Sustaining the global farm. Selected papers from 10th International soil conservation organization meeting, Purdue University, Indiana*, pp. 817-820.
- Lambers, H., Chapin III, F.S., Pons, T.J. (2008): *Plant physiological ecology*. Springer Science + Business Media, LLC, New York.
- Lambert, M., Pierzynski, G., Erickson, L., Schnoor, J. (1997): Remediation of lead-, zinc- and cadmium-contaminated soils. *Issues in Environmental Science and Technology* 7: 91–102.
- Landberg T, Greger M. (1994): Can heavy metal tolerant clones of *Salix* be used as vegetation filters on heavy metal contaminated land? In: Aronsson ,P., Perttu, K. (Eds.). *Willow vegetation filters for municipal wastewaters and sludges. A biological purification system*. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, pp. 133–144.
- 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.
- Larbi, A., Morales, F., Abadia, A., Gogorcena, Y., Lucena, J.J., Abadia, J. (2002): Effects of Cd and Pb in sugar beet plants grown in nutrient solution: induced Fe deficiency and growth inhibition. *Functional Plant Biology* 29: 1453-1464.
- Lasat, M.M. (2002): Phytoextraction of toxic metals: A review of biological mechanisms. *Journal of Environmental Quality* 31: 109-120.
- Lee, J.G., Ahner, B.A., Morel, F.M.M. (1996): Export of cadmium and phytochelatin by the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Environmental Science & Technology* 30: 1814–1821.
- Lewis, O.A.M., Chadwick, S. (1983): An investigation into nitrogen assimilation in hydroponically-grown barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Clipper) in response to nitrate, ammonium and mixed nitrate and ammonium nutrition. *New Phytologist* 95: 635–646.
- Lewis, S., Donkin, M.E., Depledge, M.H. (2001): Hsp70 expression in *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) exposed to environmental stressors. *Aquatic Toxicology* 51: 277-291.
- Lin, Y.C., Kao, C.H. (2007): Proline accumulation induced by excess nickel detached rice leaves. *Biologia Plantarum* 2: 351-354.

- Lin, Z-Q, Schemenauer, R.S, Cervinka, V., Zayed, A., Lee, A., Terry, N. (2000): Selenium volatilization from a soil-plant system for the remediation of contaminated water and soil in the San Joaquin Valley. *Journal of Environmental Quality* 29: 1048-1056.
- Long, X.X., Yang, X.E., Ni, W.Z. (2002): Current status and perspective on phytoremediation of heavy metal polluted soils. *Journal of Applied Ecology* 13: 757–62.
- Long, X.X., Yang, X.E., Ye, Z.Q., Ni, W.Z., Shi, W.Y. (2002): Differences of uptake and accumulation of zinc in four species of *Sedum*. *Acta Botanica Sinica* 44: 152-157.
- Longenberger, P.S., Smith, C.W., Duke, S.E., McMichael, B.L. (2009): Evaluation of chlorophyll fluorescence as a tool for the identification of drought tolerance in upland cotton. *Euphytica* 166: 25-33.
- López, M. L., Peralta-Videa, J. R., Benitez, T., Gardea-Torresdey J. L. (2005): Enhancement of lead uptake by alfalfa (*Medicago sativa*) using EDTA and a plant growth promoter. *Chemosphere* 61: 595–598.
- López, M.L., Peralta-Videa, J.R., Benitez, T., Duarte-Gardea, M., Gardea-Torresdey, J.L. (2007): Effects of lead, EDTA, and IAA on nutrient uptake by alfalfa plants. *Journal of Plant Nutrition* 30: 1247-1261.
- LQ, M.A., Komar, K.M., Tu, C. (2001): A fern that accumulates arsenic. *Nature* 409: 579.
- Luna, C.M., Casano, L.M., Trippi, V.S. (1997): Nitrate reductase is inhibited in leaves of *Triticum aestivum* treated with high levels of copper. *Physiologia Plantarum* 101: 103-108.
- Lunacková, L., Masarovicová, 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: 576-585.
- Lux, A., Masarovicová, E., Liskova, D., Sotnikova-Stefanovicova, A., Lunackova, L., Marcekova, M. (2002): Physiological and structural characteristics and in vitro cultivation of some willows and poplars. *Proceedings of the Cost Action 837, Bordeaux, 25-27 April 2002.*
- 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.
- Lytle, C.M., Lytle, F.W., Yang, N., Qian, J.H., Hansen, D., Zayed, A., Terry, N. (1998): Reduction of Cr(VI) to Cr(III) by wetland plants: potential for in situ heavy metal detoxification. *Environmental Science & Technology* 32: 3087-3093.
- Magnicol, R.D., Beckett, P.H.T. (1985): Critical tissue concentrations of potentially toxic elements. *Plant and Soil* 85: 107-129.

- Maier, M.A., McLaughlin, M.J., Heap, M., Butt, M., Smart, M.K. (2002): Effect of nitrogen source and calcium lime on soil pH and potato yield, leaf chemical composition and tuber cadmium concentration. *Journal of Plant Nutrition* 25: 523–544.
- Maksimović, I., Kastori, R., Krstić, L., Luković, J. (2007): Steady presence of cadmium and nickel affects root anatomy, accumulation and distribution of essential ions in maize seedlings. *Biologia Plantarum* 3: 589-592.
- Maksimović, I., Pajević, S. (2002): *Praktikum iz fiziologije biljaka*. Univerzitet u Novom Sadu, s. 240.
- Malkowski, E., Kurtyka, R., Kita, A., Karcz, W. (2005): Accumulation of Pb and Cd and its effect on Ca distribution in maize seedlings (*Zea mays* L.). *Polish Journal of Environmental Studies* 14: 203-207.
- Mapanda, F., Mangwayana, E.N., Nyamangara, J., Giller, K.E. (2007): Uptake of heavy metals by vegetables irrigated using wastewater and the subsequent risks in Harare, Zimbabwe. *Physics and Chemistry of the Earth A/B/C* (32) 15-18: 1399-1405.
- Marjanović, N., Krstić, B. (1998): *Instrumentalne metode u biološkim istraživanjima*. Forum, Novi Sad, s. 191.
- Matraszek, R. (2008): Nitrate reductase activity of two leafy vegetables as affected by nickel and different nitrogen forms. *Acta Physiologiae Plantarum* 3: 361-370.
- Maxwell, K., Johnson, G.N. (2000): Chlorophyll fluorescence: a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51: 659–668.
- McElroy, G.H., Dawson, W.M. (1986): Biomass from short-rotation coppice willow on marginal land. *Biomass* 10: 225– 240.
- McGrath, S. P., Zhao, F. J. (2003): Phytoextraction of metals and metalloids. *Current Opinion in Biotechnology* 14: 277–282.
- McGrath, S. P., Zhao, F. J., Lombi, E. (2001): Plant and rhizosphere processes involved in phytoremediation of metal-contaminated soil. *Plant and Soil* 232: 207–214.
- McGrath, S.P., Zhao, F.J., Lombi, E. (2002): Phytoremediation of metals, metalloids, and radionuclides. *Advances in Agronomy* 75: 1-56.
- McIntyre, T. (2003): Phytoremediation of heavy metals from soils. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 78: 97–123.
- 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: 129-142.
- Megatelli, S., Semsari, S., Couderchet, M. (2009): Toxicity and removal of heavy metals (cadmium, copper, and zinc) by *Lemna gibba*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 1774-1780.

- Meharg, A.A. (1993): The role of the plasmalemma in the metal tolerance in agiosperms. *Physiologia Plantarum* 88: 191-198.
- Meharg, A.A., Macnair, M.R. (1992): Genetic correlation between arsenate tolerance and the rate of influx of arsenate and phosphate in *Holcus lanatus*. *Heredity* 69: 336-341.
- Milone, M. T., Sgherri, C., Clijsters, H., Navari-Izzo, F. (2003): Antioxidative responses of wheat treated with realistic concentration of cadmium. *Environmental and Experimental Botany* 50: 265–276.
- Morel, M., Crouzet, J., Gravot, A., Auroy, P., Leonhardt, N., Vavasseur, A., Richaud, P. (2009): AtHMA3, a P_{1B}-ATPase allowing Cd/Zn/Co/Pb vacuolar storage in Arabidopsis. *Plant Physiology* 149: 894-904.
- Morghan, J.T. (1993): Accumulation of Cd and selected elements in flax seed grown on a calcareous soil. *Plant and Soil* 150: 61-68.
- Morikawa, H., Takahashi, M., Kawamura, Y. (2003): Metabolism and genetics of atmospheric nitrogen dioxide control using pollutant-philic plants. In: McCutcheoa, S.C., Schnoor, J.L. (Eds.). *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*, New York: Wiley, pp. 765-786.
- Mueller, E.J., Seger, D.L. (1985): Metal fume fever-A review. *Journal of Emergency Medicine* 4: 271-274.
- Nagoor, S. (1999): Physiological and biochemical responses of cereal seedlings to graded levels of heavy metals. II. Effects on protein metabolism in maize seedlings. *Advances in Plant Science* 12: 425–433.
- Narwal, R. P., Mahendra Singh, Singh, M. (1993): Effect of cadmium and zinc application on quality of maize. *Indian Journal of Plant Physiology* 36: 170–173.
- Nathanail, C.P., Earl, N. (2001): Human health risk assessment: guideline values and magic numbers. In: Hester, R.E., Harrison, R.M. (Eds.). *Assessment and reclamation of contaminated land*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 85–102.
- Negri, M.C., Hinchman, R.R. (2000): The use of plants for the treatment of radionuclides. In: Raskin, I., Ensley, B.D. (Eds.). *Phytoremediation of Toxic Metals. Using plants to Clean Up the Environment*, New York: Wiley, pp. 107-132.
- Nelson, D.W., Sommers, L.E. (1973): Determination of total nitrogen in plant material. *Agronomy Journal* 65: 109-112.
- Neuberger, J.S., Mulhall, M., Pomatto, M.C., Scheverbush, J., Hassanein, R.S. (1990): Health problems in Galena, Kansas: A heavy metal mining superfund site. *Science of the Total Environment* (94) 3: 261-272.
- Neumann, D., Lichtenberger, O., Günther, D., Tschiersch, K., Nover, L. (1994): Heat-shock proteins induce heavy-metal tolerance in higher plants. *Planta* 194: 360-367.

- Neumann, P.M., Chomel, A. (1986): Comparative phloem mobility of nickel in plants. *Plant Physiology* 81: 689-691.
- Newman, L.A., Strand, S.E., Choe, N., Duffy, J., Ekuan, G., Ruszaj, M., Brook Shortleff, B., Wilmoth, J., Heilman, P., Gordon, P.M. (1997): Uptake and biotransformation of trichloroethylene by hibrid poplars. *Environmental Science & Technology* 31: 1062-1067.
- Newsholme C. (1992): *Willows: The Genus Salix*. Batsford. London. Ltd. p. 224.
- Nikolić, N. (2009): Uticaj teških metala na morfo-anatomske i fiziološke karakteristike klonova topola (*Populus spp.*). Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, p.243.
- Nikolić, N., Kojić, D., Pilipović, A., Pajević, S., Krstić, B., Borišev, M., Orlović, S. (2008): Responses of hybrid poplar to cadmium stress: photosynthetic characteristics, cadmium and proline accumulation, and antioxidant enzyme activity. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 50/2: 95-103.
- Nocito, F. F., Pirovano, L., Cocucci, M., Sacchi, G. A. (2002): Cadmium-induced sulphate uptake in maize roots. *Plant Physiology* 129: 1872–1879.
- Ober, E.S., Sharp, R.E. (1994): Proline accumulation in maize (*Zea mays* L.) primary roots at low water potentials. I. Requirement for increased levels of abscisic acid, *Plant Physiology* 105: 981–987.
- Olson, P.E., Reaeson, K.F., Pilon-Smits, E.A.H. (2003): Ecology of rhizosphere bioremediation. In: McCutcheon, S.C., Schnoor, J.L. (Eds.). *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*, New York: Wiley, pp. 317-354.
- Öquist, G., Wass, R. (1988): A portable microprocessor operated instrument for measuring chlorophyll fluorescence kinetics in stress physiology, Technical report. *Physiologia Plantarum* 73: 211-217.
- Padmavathamma, P.K., Li, L.Y. 2007. Phytoremediation technology: Hyper-accumulation metals in plants. *Water Air and Soil Pollution*. On line: DOI 10.1007/s11270-007-9401-5.
- Pajević, S. (1996): Genotipska specifičnost fotosintetičke aktivnosti listova pšenice tokom vegetacije. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, PMF, Institut za biologiju.
- Pál, M., Horváth, E., Janda, T., Páldi, E., Szalal, G. (2006): Physiological changes and defense mechanisms induced by cadmium stress in maize. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 169: 239-246.
- Palacios, G., Gómez, I., Carbonell-Barrachina, A., Navarro, J., Pedreno, J.N., Mataix, J. (1988): Effect of nickel concentration on tomato plant nutrition and dry matter yield. *Journal of Plant Nutrition* 21: 2179-2191.

- Pandey, N., Sharma, C.P. (2002): Effect of heavy metals Co^{2+} , Ni^{2+} and Cd^{2+} on growth and metabolism of cabbage. *Plant Science* 163: 753-758.
- Panković, D., Plesničar, M., Arsenijević-Maksimović, I., Petrović, I. (2000): Effects of nitrogen on photosynthesis in Cd-treated sunflower plants. *Annals of Botany* 4: 841-847.
- Pence, N.S., Larsen, P.B., Ebbs, S.D., Letham, D.L.D., Lasat, M.M., Garvin, D.F., eide, D., Kochian, L.V. (2000): The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97: 4956-4960.
- Perfus-Barbeoch, L., Leonhardt, N., Vavasseur, A., Forestier, C. (2002): Heavy metal toxicity: Cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *The Plant Journal* 32: 539–548.
- Persans, M.W., Nieman, K., Salt, D.E. (2001): Functional activity and role of cation-efflux family members in Ni hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98: 9995–10000.
- Perttu, K.L., Kowalik, P.J. (1997): Salix vegetation filters for purification of waters and soils. *Biomass & Bioenergy* 12: 9–19.
- Piccini, D.F., Malavolta, E. (1992): Effect of nickel on two common bean cultivars. *Journal of Plant Nutrition* 15: 2343-2350.
- 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*. Jodhpur, India: Scientific Publishers. pp. 313–326.
- Pilon-Smiths, E. (2005): Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology* 56: 15-39.
- Prasad, M. N. V., Freitas, H. (2003): Metal hyperaccumulation in plants – Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology*, 6: 275–321.
- Prasad, M.N.V. (1999): Metallothioneins and metal binding complexes in plants. In: Prasad M.N.V., Hagemeyer J. (Eds.). *Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems*. Berlin: Springer-Verlag, pp. 51-72.
- Prasad, M.N.V., (2003): Phytoremediation of metal-polluted ecosystems: Hype for commercialization. *Russian Journal of Plant Physiology*, 5: 686–700.
- Pravilnik o dozvoljenim količinama opasnih i štetnih materija u zemljištu i vodi za navodnjavanje i metodama njihovog ispitivanja. *Službeni glasnik Republike Srbije* 23,1994.

- Pulford, I.D., Riddell-Black, D., Stewart, C. (2002): Heavy metal uptake by willow 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.
- Punshon, T., Dickinson, N.M. (1999): Heavy metal resistance and accumulation characteristics in willows. *International Journal of Phytoremediation* 1: 361 – 385.
- Rajni, S., Rajeev, G. (2009): Excess nickel alters growth, metabolism, and translocation of certain nutrients in potato. *Journal of Plant Nutrition* (32) 6: 1005-1014.
- Raskin, I., Smith, R.D., Salt, D.E. (1997): Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology* 8: 221–226.
- Rauser, W.E. (1995): Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis and function. *Plant Physiology* 109: 1141-1149.
- Rauser, W.E. (1999): Structure and function of metal chelators produced by plants-the case for organic acids, amino acids, phytin and metallothioneins. *Cell Biochemistry and Biophysics* 31: 19-48.
- Rauser, W.E., Dumbroff, E.B. (1981): Effects of excess cobalt, nickel and zinc on the water relations of *Phaseolus vulgaris*. *Environmental and Experimental Botany* 21: 249-255.
- Rivetta, A., Negrini, N., Cocucci, M. (1997): Involvement of Ca²⁺-calmodulin in Cd²⁺ toxicity during the early phases of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination. *Plant Cell and Environment* 20: 600–608.
- Rock, S.A. (2003): Field evaluations of phytotechnologies. In: McCutcheon, S.C., Schnoor, J.L. (Eds.). *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*, New York: Wiley, pp. 905-924.
- Rosenqvist, H. (1997): *Salix*-Kalkylmetoder och lönsamhet. *Silvestria* 24, Swedish University of Agricultural Sciences.
- Saleh, H., Amal, A. (2002): Protein patterns and proline response of anabolic capacities mineral elements to nickel and EDTA stress in *Chorcorus olitorius*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 4: 455-460.
- Salt, D.E., Smith, R.D., Raskin, I. (1998): Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 643-668.
- Sanità di Toppi, L., Gabbrielli, R. (1999): Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 41: 105–130.

- Santos, F.S., Hernández-Allica, J., Becerril, J.M., Amaral-Sobrinho, N., Mazur, N., Garbisu, C. (2006): Chelate-induced phytoextraction of metal polluted soils with *Brachiaria decumbens*. *Chemosphere* 65: 43-50.
- Sarić, M., Kastori, R., Petrović, M., Stanković, Ž., Krstić, B., Petrović, N. (1990): Praktikum iz fiziologije biljaka, Naučna knjiga, Beograd.
- Sarić, M.R. (1983): Theoretical and practical approaches to the genetic specificity of mineral nutrition of plants. *Plant and Soil* 72: 137-150.
- Sarić, M.R., Krstić, B. (1983): Roll of genetic specificity of mineral nutrition of plants in increasing economical production of organic matter. Proceedings of the „Biotech 83“ International Conference on the comercial applications and implications of biotechnology, 4-6 May, London, pp. 973-984.
- Schat, H., Sharma, S.S., Vooijs, R. (1997): Heavy metal-induced accumulation of free proline in a metal-tolerant and a non-tolerant ecotype of *Silene vulgaris*. *Physiologia Plantarum* 101: 477–482.
- Schnoor, J.L., Licht, L.A., McCutcheon, S.C., Wolfe, N.L., Carreira, L.H. (1995): Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. *Environmental Science & Technology* 29: 318A-323A.
- Scullion, J. (2006): Remediating polluted soils. *Naturwissenschaften* 93: 51-65.
- 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. (2006): Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 53: 257-277.
- 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
- Shang, T.Q., Newman, L.A., Gordon, M.P. (2003): Fate of trichloroethylene in terrestrial plants. In: McCutcheon, S.C., Schnoor, J.L. (Eds.). *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*, New York: Wiley, pp. 529-560.
- Sharma, S.S., Dietz, K-J. (2006): The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adpatation to heavy metal stress. *Journal of Experimental Botany* 4: 711-726.
- Siedleska, A. (1995): Some aspects of interactions between heavy metals and plant mineral nutrients. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 3: 265– 272.
- Singh, D.B., Varina, S., Mishra, S.N. (2002): Putrescine effect on nitrate reductase activity, organic nitrogen, protein, and growth in heavy metal and salinity stressed mustard seedlings. *Biologia Plantarum* 45: 605–608.

- Singh, O.V., Labana, S., Pandey, G., Budhiraja, R., Jain, R.K. (2003): Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61: 405-412.
- Singh, R.P., Tripathi, R.D., Sinha, S.K., Maheshwari, R., Srivastava, H.S. (1997): Response of higher plants to lead contaminated environment. *Chemosphere* 34: 2467–2493.
- Siripornadulsil, S., Traina, S., Verma, D.P.S., Sayre, R.T. (2002): Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *The Plant Cell* 14: 1-11.
- Sommerville, A.H.C. (1992): Willows in the environment. *Proceedings of the Royal Society of Edinburg Section B - Biological Sciences* 98: 215–244.
- Srivastava, H.S. (1980): Regulation of nitrate reductase activity in higher plants. *Phytochemistry* 19: 725-731.
- Statistics Sweden (2001): Yearbook of agricultural statistics 2001. Statistics Sweden.
- Stevanović, V. (1996): Biodiverzitet i zaštita životne sredine. Zbornik plenarnih radova. 5. kongres ekologa Jugoslavije, Beograd, pp. 21-33.
- Stitt, M. (1999): Nitrate regulation of metabolism and growth. *Current Opinions in Plant Biology* 2: 178–186.
- Stoltz, E., Greger, M. (2002): Accumulation properties of As, Cd, Cu, Pb and Zn by four wetland plant species growing on submerged mine tailings. *Environmental and Experimental Botany* 3: 271–280.
- Sun, R-L., Zhou, Q-X., Sun, F-H., Jin, C-X. (2007): Antioxidative defense and proline/phytochelatin accumulation in a newly discovered Cd-hyperaccumulator, *Solanum nigrum* L. *Environmental and Experimental Botany* 60: 468-476.
- Sunda, W.G. (1989): Trace metal interactions with marine phytoplankton. *Biological Oceanography* 6: 411–442.
- Teresa, M., Vasconcelos, S.D., Feernanda, M., Leal, C. (2001): Antagonistic interactions of Pb and Cd on Cu uptake, growth inhibition and chelator release in the marine algae *Emiliania huxleyi*. *Marine Chemistry* 75: 123-139.
- Thomine, S., Wang, R., Ward, J.M., Crawford, N.M., Schroeder, J.I. (2000): Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to *Nramp* genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97: 4991-4996.
- Turner, A.P. (1994): The responses of plants to heavy metals. In: Ross, S.M. (Ed.). *Toxic metals in soil-plant systems*. Chichester: Wiley, pp. 153-187.
- Utsunomyia, T. (1980): Japanese Patent Application No. 55-72959.
- Van Assche, F., Clijsters, H. (1990): Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell and Environment* 13: 195-206.

- Vasilev, A., Perez-Sanz, A., Semanem B., Carleer, 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.
- Vassil, A.D., Kapulnik, Y., Raskin, I., Salt, D.E. (1998): The role of EDTA in lead transport and accumulation by Indian mustard. *Plant Physiology* 117: 447–453.
- Vassilev, A., Iordanov, I., Chakalova, E., Kerin, V. (1995): Effect of cadmium stress on growth and photosynthesis of young barley (*H. vulgare* L.) plants. 2. Structural and functional changes in the photosynthetic apparatus. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* 4: 12-21.
- Verslues, P.E., Sharp, R.E. (1999): Proline accumulation in maize (*Zea mays* L.) primary roots at low water potentials. II. Metabolic source of increased proline deposition in the elongation zone. *Plant Physiology* 119: 1349–1360.
- Visviki, I., Rachlin, J.W. (1991): The toxic action and interactions of copper and cadmium to the marine alga *Dunaliella minuta*, in both acute and chronic exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 20: 271–275.
- Walker, D.A. (1987): The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis. U.K., Oxygraphics Limited, University of Sheffield print Unit; p. 145.
- Wallace, A., Wallace, G.A., Cha, J.W. (1992): Some modifications in trace metal toxicities and deficiencies in plants resulting from interactions with other elements and chelating agents. The special case of iron. *Journal of Plant Nutrition* 15: 1589-1598.
- Watmough, S.A., Dickinson, N.M. (1995): Dispersal and mobility of heavy metals in relation to tree survival in an aerially contaminated woodland soil. *Environmental Pollution* 90: 135– 142.
- Watson, C., Pulford, I.D., Riddell-Black, D. (1999): Heavy metal toxicity responses of two willow (*Salix*) varieties grown hydroponically: development of a tolerance screening test. *Environmental Geochemistry and Health* 21: 359– 364.
- Wettstein, D., von (1957): Chlorophyll-letale und der Submikroskopische Formwechsel der Plastiden. *Experimental Cell Research* 3: 427-433.
- Winnike-McMillan, S.K., Zhang, Q., Davis, L.C., Erickson, L.E., Schnoor, J.L. (2003): Phytoremediation of methyl tertiary-butyl ether. In: McCutcheon, S.C., Schnoor, J.L. (Eds.). *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*, New York: Wiley, pp. 805-828.
- Winter Syndor, M.E., Redente, E.F. (2002): Reclamation of high-elevation acidic mine waste with organic amendments and topsoil. *Journal of Environmental Quality* 31: 1528-1537.

- Wójcik, M., Tukendorf, A. (1999): Cd – tolerance of maize, rye and wheat seedlings. *Acta Physiologia Plantarum* 2: 99-107.
- Wu, J., Hsu, F.C., Cunningham, S.D. (1999): Chelate-assisted Pb phytoextraction: Pb availability, uptake, and translocation constraints. *Environmental Science & Technology* 33: 1898–1904.
- Xin, J., Huang, B., Yang, Z., Yuan, J., Dai, H., Qiu, Q. (2010): Responses of different water spinach cultivars and their hybrid to Cd, Pb and Cd-Pb exposures. *Journal of Hazardous Materials* 175: 468-476.
- Xiong, Z-T., Zhao, F., Min-jing, L. (2006): Lead toxicity in *Brassica pekinensis* Rupr.: effect on nitrate assimilation and growth. *Environmental Toxicology* 21: 147-153.
- Yang, H.M., Zhang, X.Y., Wang, G.X. (2004): Effects of heavy metals on stomatal movements in broad bean leaves. *Russian Journal of Plant Physiology* 51: 464–468.
- Yang, X. (1996): Plant tolerance to nickel nutrients toxicity 2. Nickel effects on influx and transport of mineral nutrients in four plant species. *Journal of Plant Nutrition* 19: 265-279.
- Yang, X., Baligar, V. C., Martens, D. C., Clark, R. B. (1996): Cadmium effects on influx and transport of mineral nutrients in plant species. *Journal of Plant Nutrition* 19: 643–656.
- Yang, X., Feng, Y., He, Z., Stoffella, P.J. (2005): Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 18: 339-353.
- Yu, Z., Zhou, Q. (2009): Growth responses and cadmium accumulation of *Mirabilis jalapa* L. Under interaction between cadmium and phosphorus. *Journal of Hazardous Materials* 167: 38-43.
- Zacchini, M., Pietrini, F., Mugnozza, G.S., Iori, V., Pietrosanti, L., Massaci, 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.
- Zhang, H., Zhao, F., Sun, B., Davison, W., McGrath, S.P. (2001): A new method to measure effective soil solution concentration predicts copper availability to plants. *Environmental Science & Technology* 35: 2602-2607.
- Zhao, Z-Q., Zhu, Y-G., Li, H-Y., Smith, S.E., Smith, F.A. (2004): Effects of forms and rates of potassium fertilizers on cadmium uptake by two cultivars of spring wheat (*Triticum aestivum* L). *Environment International* 29: 973– 978.

¹<http://www.atlas-roslin.pl/foto/am/am-s354.jpg>

²http://en.academic.ru/pictures/enwiki/83/Salix_aurita_007.jpg

³http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d3/Salix_caprea_031.jpg

⁴http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/76/Salix_alba_004.jpg

Kratka biografija



MILAN BORIŠEV rođen je u Novom Sadu, gde je završio osnovnu i srednju školu. Studije biologije upisao je 1997. na Prirodno-matematičkom fakultetu, Univerziteta u Novom Sadu. Diplomirao je 2002. u roku, sa prosečnom ocenom 9,28 i stekao zvanje Diplomirani biolog. Magistrirao je 2005. godine, sa prosečnom ocenom 9,87 na usmerenju Taksonomija. Od 2001. učestvovao je u radu laboratorija za Sistematiku i filogeniju kormofita i Fiziologije biljaka. Od 2006. zaposlen je na predmetu Fiziologija biljaka kao istraživač pripravnik, a od 2009. kao asistent. Od 2001. godine učestvuje u izvođenju nastave na Departmanu za biologiju i ekologiju u Novom Sadu, studentima biologije, farmacije, stomatologije i medicine. Tokom svog obrazovanja bio je stipendista Republičkog ministarstva i Fondacije za naučni i umetnički podmladak. Učestvovao je u realizaciji brojnih naučnih projekata, Republičkih, Pokrajinskih i međunarodnih. Boravio je mesec dana na stručnom usavršavanju u Nici (Francuska).

Učestvovao je na većem broju međunarodnih i nacionalnih konferencija, kongresa, i simpozijuma. Ima objavljene 53 naučne reference u koautorstvu, od toga devet radova u međunarodnim časopisima.

Tečno govori, čita i piše engleski jezik.

Kao aktivan sportista i član upravnog odbora Kajak Kanu Kluba "Liman" u Novom Sadu, primio je brojna priznanja. Od 1990. godine aktivno se uključuje u planinarske aktivnosti kao član planinarskog kluba "Železničar" i penjačkog kluba "Adrenalin".

Novi Sad, 11.10.2010.

Mr Milan Borišev

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

Autor: Mr Milan Borišev

AU

Mentor: Prof. dr Slobodanka Pajević

MN

Naslov rada: Potencijal klonova vrba (*Salix spp.*) u fitoekstrakciji teških metala

NR

Jezik publikacije: Srpski

JP

Jezik izvoda: Srpski/Engleski

JI

Zemlja publikovanja: Republika Srbija

ZP

Uže geografsko područje: AP Vojvodina

UGP

Godina: 2010

GO

Izdavač: Autorski reprint

IZ

Mesto i adresa: Novi Sad, Departman za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet,

Trg Dositeja Obradovića 2

MA

Fizički opis rada: (broj poglavlja / strana/ lit.citata/ tabela/ slika/ grafikona / priloga)

(8/182/286/48/88/0/0)

FO

Naučna oblast: Biologija

NO

Naučna disciplina: Fiziologija biljaka

ND

Predmetna odrednica/Ključne reči: teški metali, fitoremedijacija, vrbe, Cd, Ni, Pb

PO

UDK

Čuva se: U biblioteci Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom, Sadu 21000 Novi Sad, Trg D.

Obradovića 3, Srbija

ČU

Važna napomena: Nema

VN

Izvod:

Četiri genotipa vrba *Salix alba* – klon 68/53/1, *Salix alba* – klon 106/54/0, *Salix matsudana* – klon SM 4041, *Salix nigra* – klon 0408 bila su izložena povišenim koncentracijama Cd, Ni i Pb-EDTA u vodenim kulturama. Reznice vrba su tretirane pojedinačnim i kombinovanim rastvorima teških metala. Izveden je niz morfoloških i fizioloških merenja na osnovu kojih je izvršena uporedna statistička analiza klonova i tretmana. Toksični efekat teških metala je specifično zavisio od genotipa i vrste tretmana i najviše se ogledao u smanjenoj organskoj produkciji, poremećajima u sintezi pigmenata i procesima disanja i fotosinteze. Cd i Ni su u povišenim koncentracijama doveli do značajno veće inhibicije organske produkcije u odnosu na Pb-EDTA. Prisustvo EDTA u rastvoru imalo je zaštitni efekat. Akumulacija prolina je bila specifična u zavisnosti od prirode teškog metala, njegove koncentracije i tretiranog klona i nije potvrđena kao pouzdan indikator prisustva teških metala. Genotip *Salix nigra* – klon 0408, pokazao je značajne predispozicije za fitoekstrakciju Cd.

IZ

Datum prihvatanja teme od NN veća: 17.01.2008.

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:

KO

Predsednik: dr Borivoj Krstić, redovni profesor

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

Član (Mentor): dr Slobodanka Pajević, redovni profesor

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

Član: dr Živko Stanković, redovni profesor

Državni Univerzitet u Novom Pazaru, Departman za bio-hemijske i medicinske nauke

Član: dr Ivana Maksimović, redovni profesor

Poljoprivredni fakultet u Novom Sadu

Član: dr Saša Orlović, redovni profesor

Institut za nizijsko šumarstvo i životnu sredinu

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCES
KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Document type: Monograph type

DT

Type of record: Printed text

TR

Contents code: Doctoral thesis

CC

Author: Milan Borišev

AU

Menthor: dr Slobodanka Pajević

MN

Title: Potential of willow clones in phytoextraction of heavy metals (*Salix spp.*)

TI

Language of text: Serbian

LT

Language of abstract: Serbian/English

LA

Country of publication: Republic of Serbia

CP

Locality of publication: AP Vojvodina

LP

Publication year: 2010.

PY

Publisher: Author's reprint

PU

Publication place: Novi Sad, Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, Trg Dositeja Obradovica 2

PP

Physical description: (8/182/286/48/88/0/0)

PD

Scientific field: Biology

SF

Scientific discipline: Plant Physiology

SD

Subject/Key words: heavy metals, phytoremediation, willows, Cd, Ni, Pb

SKW

UC:

Holding data: Faculty of Science Library, 21000 Novi Sad, Trg D. Obradovica 3, Serbia

HD

Note: No

N

Abstract:

Four willow genotypes *Salix alba* – clone 68/53/1, *Salix alba* – clone 106/54/0, *Salix matsudana* – clone SM 4041, *Salix nigra* – clone 0408 were exposed to excessive concentrations of Cd, Ni and Pb-EDTA using water cultures. Willow woody cuttings were treated with individual and combined solutions of heavy metals. Several morphological and physiological analyses were conducted followed by statistical analyses of clones and treatments. Toxic effect of heavy metals was dependent on genotype and treatment. It was most obvious in disturbances of pigment synthesis and reduction of respiration and photosynthesis. Cd and Ni caused significantly stronger inhibition of bioproduction comparing with Pb-EDTA. EDTA presence in the solution confirmed its protective role against negative impact of heavy metal treatment. Proline accumulation was specific and not obligatory as a signal of heavy metal stress. Genotype *Salix nigra* – clone 0408 proved to have strong potential in phytoextraction of Cd.

AB

Accepted by the Scientific Board on: 17th January 2008th
ASB

Defended:

DE

Thesis defend board:

DB (Degree/name/surname/title/faculty)

President: dr Borivoj Krstić, full professor
Faculty of Sciences, Department of Biology and Ecology, Novi Sad

Member (mentor): dr Slobodanka Pajević, full professor
Faculty of Sciences, Department of Biology and Ecology, Novi Sad

Member: dr Živko Stanković, full professor
State University Novi Pazar, Department for Biochemical and Medical
Science

Member: dr Ivana Maksimović, full professor
Faculty of Agriculture, Novi Sad

Member: dr Saša Orlović, full professor
Institute for Lowland Forestry and Environment