

Fiziološki parametri kao osnova razdvajanja rezistentnih od osetljivih populacija *Chenopodium album* L. prema atrazinu

Danijela Pavlović¹, Sava Vrbničanin², Ibrahim Elezović², Dragana Marisavljević¹ i Dragana Božić²

¹ Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd i

² Poljoprivredni fakultet, Beograd – Zemun

REZIME

U radu je ispitivana mogućnost korišćenja fizioloških parametara kao osnove za razdvajanje rezistentnih od osetljivih populacija *Chenopodium album* L. na atrazin. Praćeni su intenzitet transpiracije, otpor prema difuziji i relativni sadržaj ukupnog hlorofila. Semena su prikupljena sa površine na kojoj je atrazin korišćen 10 godina (lokalitet Veliki Črljeni) i sa površine na kojoj nikad nisu primenjivani herbicidi (lokalitet Beograd). Referentna rezistentna populacija dobijena je iz laboratorije iz Velike Britanije. Biljke su gajene u kontrolisanim uslovima i tretirane atrazinom (2, 4 i 8 kg/ha) u fazi 2-4 lista. Promene ispitivanih parametara su merene 7. i 15. dana od primene atrazina.

Dobijeni rezultati su pokazali da kod referentne rezistentne populacije tretirane herbicidom nema značajnih promena na nivou posmatranih parametara. Međutim, kod populacija sa lokaliteta V.Črljeni i Beograd došlo je do značajnog smanjenja intenziteta transpiracije i relativnog sadržaja hlorofila, i do povećanja otpora prema difuziji. Statistička obrada podataka je pokazala da se na osnovu svih parametara može izvršiti razdvajanje osetljivih i rezistentnih populacija *Ch. album* prema atrazinu, s tim što se relativni sadržaj ukupnog hlorofila u poređenju sa druga dva parametra pokazao kao pouzdaniji parametar. Prirodna dnevna dinamika fizioloških procesa i njihova zavisnost od velikog broja činilaca (sadržaja O₂ i CO₂ u vazduhu, vlažnosti vazduha, otvorenosti stoma i sl.) umanjuju pouzdanost intenziteta transpiracije i otpor prema difuziji kao parametara.

Ključne reči: Rezistentnost; otpor prema difuziji; intenzitet transpiracije; sadržaj hlorofila; *Chenopodium album* L.

UVOD

Prve reakcije biljaka na stresni momenat su promene u fiziološkim procesima. Atrazin kao inhibitor fotosinteze blokira transport i akceptore elektrona, razara fotosintetske pigmente, smanjuje produktivnost fotosinteze, intenzitet transpiracije i provodljivost stoma (Moreland, 1980). Kod rezistentnih biljaka se, takođe, oseća pad »fitnesa« (sposobnost preživljavanja, porasta, reproduktivnosti i prilagođavanja) pod uticajem herbicida, ali one, ipak, prežive, odnosno veoma brzo se oporave od stresnog efekta. Dakle, produktivnost fotosinteze se donekle smanjuje iako se metaboličke reakcije ubrzavaju, što dovodi i do strukturnih promena, najčešće na proteinima (zamene amino-kiselina), ali to ipak ne uništava biljku, iako je izložena stresu prouzrokovanom herbicidom (Gronwald i sar., 1989; Yaacoby i sar., 1996; Powles i Shaner, 2001). Veći broj literaturnih izvora ukazuje da se nivo razlika između rezistentnih i osetljivih populacija najpouzdanije utvrđuje merenjem različitih morfoloških (Moss, 1995. i 1999; Beckie, 2000; Smit i Cairns, 2001) i fizioloških parametara (Percival i Baker, 1991; Maxwell i Johnson, 2000).

U ovom radu je ispitivana mogućnost da se na osnovu merenja promena intenziteta transpiracije, otpora prema difuziji i sadržaja ukupnog hlorofila postigne razdvajanje rezistentnih od osetljivih populacija *Chenopodium album* L. u odnosu na atrazin.

MATERIJAL I METODE

Ogled je izveden u kontrolisanim uslovima (staklenik) tokom 2003. godine. Semena testiranih populacija su prikupljena sa površine gde je atrazin korišćen 10 godina (lokalitet Veliki Crljeni) i sa površine na kojoj nikada nisu primenjivani herbicidi (lokalitet Beograd). Biljke *Ch. album* su gajene u plastičnim sudovima (6.3 x 7.6 x 8.3 cm) u supstratu mešavine zemlje (2 x 0.107 m³), perlita (2 x 0.169 m³) i đubriva (oko 4 kg/m³). Dnevna temperatura vazduha je varirala između 28 i 33°C. Dodatno dnevno osvetljenje je obezbeđivano lampama (Sylvania - cool white 115 W i Sylvania 50 W-277V) da bi se postigla dužina dana od 15 sati sa intenzitetom svetlosti od 350 μmol/m²/s. Vlažnost vazduha se kretala od 75-80%. Neophodna vlažnost zemljišta je obezbeđivana zalivanjem kada je to bilo neophodno. Biljke su svakog drugog

dana pomerane da bi se minimiziralo variranje u rastu izazvano različitom ekspozicijom u odnosu na prirodnu svetlost. Atrazin je primenjen pomoću laboratorijske prskalice (Tee-jet 8001-E 200 L/ha) kada su biljke bile u fazi 2-4 lista u količinama 2, 4 i 8 kg/ha. Intenzitet transpiracije i otpor prema difuziji su mereni porometrom Licor 1600, a relativni sadržaj hlorofila spektrofotometrijski na intaktnim biljkama sa aparatom Spad-metar. Eksperiment je urađen po metodi praćenja morfoloških i fizioloških parametara na biljkama u kontrolisanim uslovima (Clark i Moss, 1989; Moss, 1995). Ocena testiranih parametara je rađena 7. i 15. dana od primene atrazina, a dobijene vrednosti su statistički obrađene analizom varijanse (ANOVA) i LSD testom. Step en razlika između populacija je definisan indeksom rezistentnosti (Clark i Moss, 1989). Njegova vrednost se dobija iz odnosa parametara: LD₅₀ rezistentne populacije sa LD₅₀ osetljive populacije. Viši step en pouzdanosti se dobija ako se vrednost indeksa (dobijen poređenjem osetljive i pretpostavljeno rezistentne populacije) uporedi sa vrednošću dobijenom poređenjem pretpostavljeno rezistentne i potvrđeno rezistentne populacije.

REZULTATI

Rezultati izvedenih istraživanja su pokazali da se na osnovu ispitivanih parametara mogu razdvajati rezistentne od osetljivih populacija *Ch. album* na atrazin.

Sve primenjene količine atrazina su uticale na dobijanje značajnih razlika između tretiranih i netretiranih biljaka pretpostavljeno rezistentne - R (lokalitet V. Crljeni) i osetljive - S (lokalitet Beograd) populacije *Ch. album* (Tabela 1). Intenzitet transpiracije se smanjivao, a otpor prema difuziji povećavao, ali ne srazmerno povećanju količine atrazina. Razlike između samih tretmana nisu uvek imale značaja, što se može dovesti u vezu sa prirodom posmatranih parametara, kao i zbog osetljivosti populacija (Tabela 1). Promene ispitivanih parametara tretiranih i netretiranih biljaka referentne rezistentne populacije (RR, lokalitet V. Britanija) nisu imale značaja, što je i očekivano s obzirom na to da je u pitanju potvrđena rezistentna populacija pepeljuge. Međusobno poređenje populacija (RR:R, RR:S, R:S) je pokazalo da se one razlikuju u osetljivosti, odnosno rezistentnosti prema atrazinu (Tabela 2). Međutim,

merenja intenziteta transpiracije i otpora prema difuziji, kod svih posmatranih populacija pokazala su značajna variranja vrednosti koja smanjuju pouzdanost korišćenja ovih fizioloških parametara.

Merenja relativnog sadržaja ukupnog hlorofila su pokazala da su razlike između kontrole i tretmana i između različitih populacija prisutne, statistički

značajne i, prema našem mišljenju, relativno pouzdane budući da se radi o parametru čije vrednosti nisu u funkciji dnevne dinamike (Tabela 1), što se može i videti na slici 1. Razlike između testiranih populacija nisu bile jasno izražene 24 sata posle primene atrazina (Slika 1a) već je potrebno da prođe izvestan period (3 do 6 dana) da bi promene,

Tabela 1. Razlike između tretmana za testirane fiziološke parametre

Table 1. Difference between treatments for testing physiological parameters

Parametri Parameters	Otpor prema difuziji Diffusive resistance		Intenzitet transpiracije Intensity of transpiration		Ukupan sadržaj hlorofila Total content of chlorophyll	
	I	II	I	II	I	II
Ocena (Mark) Tretman (Treatmans)						
K-2 kg/ha	**	NZ	**	NZ	**	**
K-4 kg/ha	**	*	**	**	**	**
K-8 kg/ha	**	**	**	**	**	**
2-4 kg/ha	*	NZ	NZ	**	NZ	**
2-8 kg/ha	NZ	*	**	**	*	**
4-8 kg/ha	**	NZ	NZ	NZ	**	**

$p < 0.01$ **; $p < 0.05$ *; NZ = razlike nemaju značaja; K = kontrola; I = ocena posle 7 dana; II = ocena posle 15 dana

ND = No significant differences; K = Control, I = mark after 7 days; II = mark after 15 days.

Tabela 2. Značajnost razlika između različitih populacija *Chenopodium album* L. tretiranih atrazinom na osnovu fizioloških parametara

Table 2. Significant differences between different populations of *Chenopodium album* L. sprayed with atrazin based on physiological parameters

Parametri Parameters	Otpor prema difuziji Diffusive resistance		Intenzitet transpiracije Intensity of transpiration		Ukupan sadržaj hlorofila Total content of chlorophyll	
	I	II	I	II	I	II
Ocena (Mark) Tretman (Treatmans)						
RR:R	**	NZ	**	**	**	**
RR:S	**	**	**	**	**	**
R:S	**	**	*	**	*	NZ

$p < 0.01$ **; $p < 0.05$ *;

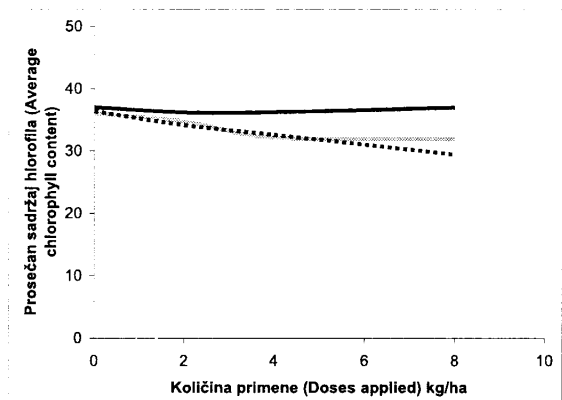
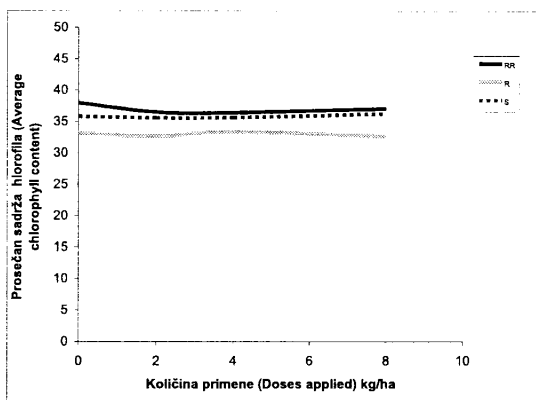
II = ocena posle 15 dana; NZ = razlike nemaju značaja; RR = pop. V. Britanija; K = Control, R = Pop. V. Crljeni,

K = kontrola; R = pop. V. Crljeni; I = Mark after 7 days, S = Pop. Belgrade.

I = ocena posle 7 dana; S = pop. Beograd.

II = Mark after 15 days,

kao rezultat različite osetljivosti prema atrazinu, bile uočljive (Slika 1b). Zbog toga je stepen razlika između ispitivanih populacija izražen indeksom rezistentnosti samo za ukupan sadržaj hlorofila. Visoka vrednost indeksa potvrđuje značajne razlike između rezistentne i ostalih populacija: $IR_{RR,R} = 64$; $IR_{RR,S} = 365$; $IR_{R,S} = 6$. Međutim, razlike između R i S populacija nisu velike ali su prisutne. Nivo rezlika je definisan skalom Moss i saradnici (1999) koja je formirana za morfološke parametre i po kojoj je kod R populacije utvrđena samo početna stopa rezistentnosti.



SI. 1: Sadržaj hlorofila zavisno od vremena i količine primene atrazina: a) 24 sata posle primene; b) 5 dana posle primene; RR = pop. V. Britanija; R = pop. V. Crljeni; S = pop. Beograd.

Fig. 1: Chlorophyll content vs time and doses applied atrazine: a) 24hours after applied; b) 5 days after applied; RR = Pop. G. Britain; R = Pop. V. Crljeni; S = Pop. Belgrade.

DISKUSIJA

Utvrđene razlike između ispitivanih RR, R i S populacija su bile očekivane, s obzirom da su biljke dobijene iz semena iz V. Britanija (RR) potvrđeno rezistentne na atrazin. Iako su sva tri fiziološka parametra (intenzitet transpiracije, otpor prema difuziji i relativni sadržaj hlorofila) potvrdili da razlike postoje, najveću pouzdanost je pokazalo merenje relativnog sadržaja hlorofila. Promene intenziteta transpiracije i otpora prema difuziji su dnevne i zavisne od većeg broja faktora, kao što su otvorenost stoma, odnosno doba dana kada su merenja izvođena, sadržaja vlage, O_2 i CO_2 u vazduhu i sl. Sve to upućuje na konstataciju da dobijene vrednosti nisu apsolutne. Slične konstatacije dali su i Holt i Goffner (1985), uočivši da postoje promene u aktivnosti stoma (kod kontrolnih biljaka *Senecio vulgaris* L.) u periodu od 9-16 sati.

Uočili su tendenciju rasta intenziteta transpiracije i provodljivosti stoma do 13 sati, a zatim opadanje njihove aktivnosti, pri čemu nije bilo razlike između rezistentnih i osetljivih populacija, što se slaže sa našim konstatacijama.

Sadržaj hlorofila, takode, zavisi od niza činilaca: položaja i arhitekture lista, anatomske građe, intenziteta svetlosti, starosti listova, dinamike uporednih procesa sinteze i razgradnje organskih materija i sl., i za razliku od intenziteta transpiracije, ove promene nemaju pravilnu dnevnu dinamiku (ByungJoo i sar., 2001). To se može dovesti u

vezu da su nastale promene u izvesnom stepenu rezultat osetljivosti, odnosno povećane otpornosti različitih populacija na atrazin. Budući da su dobijene relativno male razlike u sadržaju hlorofila između R i S populacija, što je verovatno rezultat činjenice da atrazin ne deluje direktno na hlorofil, već utiče na peroksidaciju lipida u membrani hloroplasta. Razaranjem hloroplasta izliva se sadržaj i dolazi do gubitka hlorofila (Moreland, 1980). Određivanje ukupnog sadržaja hlorofila Spad-metrom je bazirano na principu apsorpcije svetlosti (spektrofotometrija) posebnim hlorofil kompleksima - LHCI i LHCII (Light Harvesting Complex I i II; Nešković i sar., 2003) i vrednosti se porede sa referentnim vrednostima standarda, ili kontrolom. Prednost ovakvog merenja je u tome što se biljke ne žrtvuju i promene se mogu pratiti tokom trajanja eksperimenta. Samo ovim

pokazateljem, nažalost, ne može se determinisati rezistentnost, već samo utvrditi ili potvrditi razlika u osetljivosti / rezistentnosti prema atrazinu. Takođe, samo merenje je nezavisno od spoljašnjih faktora i time je pouzdanije. U relevantnoj literaturi, za sada, nema podataka o korišćenju Spad-metra u svrhu determinisanja rezistentnosti korova prema herbicidima. Njegova primena je do sada bila usmerena za praćenje sadržaja azota u biljkama u cilju planiranja prinosa, ili promena u fotosintezi nastalih promenom intenziteta svetlosti, i sl. (Thomson i sar., 1996; Gaboric, 2000). U našoj laboratoriji su započeta istraživanja u pravcu testiranja mogućnosti korišćenja Spad-metra u cilju determinisanja rezistentnih korova na herbicide. U vezi s tim, Pavlović (2005) potvrđuje pouzdanost merenja Spad-metrom u svrhu razdvajanja osetljivosti različitih populacija *Amaranthus retroflexus* L. i *Abutilon theophrasti* Medic. prema atrazinu.

Dakle, dobijeni rezultati pokazuju da je merenjem fizioloških parametara moguće razdvojiti osetljive, odnosno rezistentne populacije *Ch. album*, ali ne i dokazivati rezistentnost (Tabela 2). U tom smislu, najpouzdaniji fiziološki parametar se pokazao praćenje promena u ukupnom sadržaju hlorofila u odnosu na ostale merene parametre (intenzitet transpiracije, otpor prema difuziji) koji pokazuju dnevnu dinamiku, što dovodi do variranja vrednosti i, samim tim, do nemogućnosti pouzdanog tumačenja rezultata u vezi sa potvrđivanjem da li je testirana populacija razvila, ili nije, rezistentnost na ispitivani herbicid.

Merenja dobijena Spad-metrom mogu obezbediti brzo, lako, nedestruktivno i relativno pouzdano razdvajanje i determinisanje osetljive od rezistentne populacije korova na herbicide čije je primarno mesto delovanja fotosistem II.

LITERATURA

Beckie, H. J., Heap, I. M., Smeda, R. J. and Hall, L. M.: Screening for Herbicide Resistance in Weeds. *Weed Technol.*, 14: 428-445, 2000.
ByungJoo, L., Mikyoung, W., DongHee, L. and DongGi, S.: Changes SPAD chlorophyll value of chrysanthemum by photoperiod and light intensity. *Korean J. of Horticult. Sci. Technol.*, 19: 555-559, 2001.

Clark, J. H. and Moss, S. R.: The distribution and control of herbicide resistant *Alopecurus myosuroides* (black-grass) in central and eastern England. *Proc. Brighton Crop Protection Conference – Weeds*, Brighton, UK, 1989, pp. 301-308.

Gaborick, N.: Chlorophyll concentration (SPAD values) in leaves of *Dactylis glomerata* L. as an indicator of nitrogen concentration and production grassland. *Acta Fytotechn. et Zootechn.*, 3: 21-24, 2000.

Gronwald, J. W., Anderson, R. N. and Yee, C.: Atrazine resistance in velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) due to enhanced atrazine detoxification. *Pestic. Biochem. Physiol.* 34: 149-163, 1989.

Holt, S. J. and Goffner, D. P.: Altered leaf structure and function in triazine-resistant common groundsel (*Senecio vulgaris*). *Plant Physiol.* 699-705, 1985.

Maxwell, K. and Johnson, N. G.: Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J. Exp. Bot.*, 51: 659-668, 2000.

Moreland, D.E.: Mechanisms of action of herbicide. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 31: 597-638, 1980.

Moss, S. R., Clarke, J. H., Blair, A. M., Culley, T.N., Read, M. A., Ryan, P. J. and Turner, M.: The occurrence of herbicide-resistant grass-weeds in the United Kingdom and a news system for designating resistance in screening assays. *Proc. Brighton Crop Protection Conference – Weeds*, Brighton, UK, 1999, pp. 179-184.

Moss, S. R.: Techniques for determining herbicide resistance. *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference – Weeds*, Brighton UK, 1995, pp. 547-556.
Nešković, M., Konjević, R. i Čulafić, M.: Fiziologija biljaka. "NNK-Internacional", Beograd, 2003.

Pavlović, D.: Utvrđivanje rezistentnosti korova prema herbicidima-inhibitorima fotosinteze. *Magistarska teza*, Poljoprivredni fakultet, Beograd-Zemun, 2005.

Percival, P. M. and Backer, N. L.: Herbicides and photosynthesis. In: *Herbicides* (N. R. Baker and M. P. Percival, eds.). Elsevier Science Ch.1: 1991, pp. 1-26.

Powles, S. B. and Shaner, D. L.: Herbicide resistance and world grains. *CRC Press*, London - New York, 2001.

Smit, J. J. and Cairns, A. L. P.: Resistance of *Raphanus raphanistrum* to chlorosulfuron in the Republic of South Africa. *Weed Res.*, 41: 41-47, 2001.

Thomson, J. A., Schweitzer, L. E. and Nelson, R. L.: Association of specific leaf weight, an estimate of chlorophyll concentration with apparent photosynthesis in soybean. *Photosynth. Res.*, 49: 1-10, 1996.

Yaacoby, T., Schonfeld, M. and Rubin, B.: Characteristics of atrazine-resistant biotypes of three grass weeds. *Weed Sci.*, 34: 181-184, 1986.

Physiological Parameters as a Basis for Differentiating between *Chenopodium album* L. Plants Resistant or Susceptible to Atrazine

SUMMARY

A possibility of using physiological parameters for differentiating resistant and susceptible plants was investigated. Intensity of transpiration, diffusive resistance and chlorophyll concentrations were measured. The experiments were carried out in the greenhouse. Seeds were collected from an area continually treated with atrazine over a period of ten years (locality Veliki Crljeni) and from treatment-free fields (locality Belgrade). A referent resistant population was obtained from Great Britain. Atrazine was applied (2, 4 and 8 kg/ha) when plants were in a 2-4 leaf growth stage. Parameters were measured on the 7th and 15th post-treatment days.

The results showed no significant change in the physiological parameters of the treated referent plants. On the other hand, treated plants from the localities of Veliki Crljeni and Belgrade showed a significant decrease in the intensity of transpiration and chlorophyll concentration, and increase in diffusive resistance, compared to untreated plants. Comparing the parameters analyzed, statistically significant differences were found between the domestic populations and the resistant referent population.

Based on the variations found in plant responses to atrazine treatments (intensity of transpiration and diffusive resistance) in the populations investigated, we believe that assessment of these physiological parameters alone cannot provide sufficiently reliable data for differentiating between resistant and susceptible plants.

Keywords: Resistance; Diffusive resistance; Intensity of transpiration; Chlorophyll concentration; *Chenopodium album* L.