

Uporedna mikro-morfološka i anatomska analiza listova gajenog i hibridne forme korovskog suncokreta (*Helianthus annuus*)

Dragana Božić¹, Dragana Rančić¹, Marija Sarić-Krsmanović², Sava Vrbničanin¹

¹Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Nemanjina 6, Zemun- Beograd, Srbija

²Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, Banatska bb, Beograd, Srbija
e-mail: dbozic@agrif.bg.ac.rs

REZIME

U literaturi postoje oprečna mišljenja o značaju morfo-anatomskih parametara listova, kao što su broj stoma, prisustvo dlaka, debljina kutikule, debljina lista i sl. za osetljivost biljaka prema folijarnim herbicidima. S obzirom na to da razlike u osetljivosti hibrida/populacija prema herbicidima mogu da budu posledica razlika u površinskim strukturama i anatomske građi lista, u ovom radu je detaljno analizirana mikro-morfološka i anatomska građa listova tolerantnih i osetljivih formi suncokreta, kako gajenih hibrida tako i populacija hibridnih formi korovskog suncokreta (HFKS). Interesantno je da između rezistentnih i osetljivih populacija HFKS nije bilo statistički značajnih razlika u broju dlaka i stoma na listovima, ali kod hibridnih genotipova jeste. Naime, na naličju lista broj stoma kod osetljivog hibrida je bio statistički značajno veći nego kod tolerantnih, ali su tolerantni hibridi imali statistički značajno više dlaka na listovima od osetljivog, tako da je moguće da veća maljavost onemogućava dospevanje herbicida do površine epidermisa, što za posledicu ima njihovo manje usvajanje. Takođe je pokazano da se biljke različite osetljivosti prema herbicidima razlikuju i u različitim parametrima anatomske građi (debljina palisadnog i suđerastog tkiva, debljina mezofila i debljina lista).

Ključne reči: epidermis, stome, dlake, efikasnost herbicida.

UVOD

Zadržavanje folijarnih herbicida na površini listova biljaka zavisi od površinskih struktura lista kao i od ugla pod kojim kapi na nju padaju, ali pored toga za usvajanje ovakvih herbicida veliki značaj imaju i morfo-anatomske karakteristike listova (Lisek et al., 2002). Iako postoji shvatanje da stome i dlake imaju relativno malu ulogu u usvajanju herbicida usled toga što se

aktivne materije uglavnom apsorbuju direktno kroz kutikulu (Bukovac, 1976), kutikula i voštana prevlaka koja se često nalazi preko nje mogu predstavljati i barijeru za prodiranje herbicida u listove (Ferreira et al., 2002; Zimdahl, 2007). Listovi biljaka koje rastu u senci uglavnom imaju tanju kutikulu od listova biljaka koje rastu pri optimalnoj osvetljenosti, a takođe i mlađi listovi imaju tanju kutikulu od starijih, pri čemu Zimdahl (2007) smatra da je tanja kutikula jedan od razloga, ali ne i jedini, što su mlađe biljke osetljivije prema herbicidima od starijih. Lipofilne supstance, a među njima i pojedini herbicidi se mnogo lakše transportuju kroz kutikulu sa debljom voštanom prevlakom (npr. kod jagode i uljane repice), nego kroz kutikulu sa malom količinom voska, što je uočeno u slučaju šećerne repe i kukuruza (Baker et al., 1992). Ipak, uticaj prisustva i debljine voštane prevlake na usvajanje herbicida može biti različit. Naime, kod nekih sorti graška i pasulja utvrđena je pozitivna korelacija između količine epikutikularnih voskova i tolerantnosti prema herbicidima (King, 1980), dok Lisek i sar. (2002) smatraju da je tolerantnost nekih sorti jagode prema herbicidima u vezi sa debljinom kutikule i količinom epikutikularnih voskova. Osim toga, Daubemire (1970) je pokazao da epikutikularni vosak i njegov raspored imaju značajan efekat na prodiranje herbicida, dok Chamel i Vitton (1996) ističu da epikutikularni voskovi mogu da predstavljaju barijeru za prodiranje herbicida u epidermalne ćelije, a zatim i u floem, usled toga što deluju kao akumulacioni sloj za herbicide.

Glavna funkcija stoma je da svojim otvaranjem i zatvaranjem kontrolišu razmenu gasova između biljaka i spoljašnje sredine, i preko njih se odvija usvajanje folijarnih herbicida (Liu, 2004; Schreiber, 2005; Zimdahl, 2007). Međutim, herbicidi mogu da prodru u biljku preko stoma samo kada su otvorene i to kroz tanku kutikulu prisutnu na površini zidova ćelija koje su u kontaktu sa stominom dupljom (Zimdahl, 2007). Gustina stoma po jedinici površine se menja, odnosno smanjuje sa starenjem listova (Sanyal et al., 2006a, b; Vranješ et al., 2019), što se takođe može dovesti u vezu sa promenama u osetljivosti biljaka prema herbicidima. Ferreira i sar. (2002) su utvrdili da velika gustina stoma na listovima *Nicandra physaloides* (L.) Gaertn. predstavlja barijeru za usvajanje herbicida, dok su nasuprot tome, Taylor i sar. (1980) utvrdili da stome predstavljaju glavni put za prodiranje bentazona u *Chenopodium album* L.. Pokazalo se da sastav surfaktanata, utiče na to kojim putem će herbicid biti usvojen. Naime, Liu (2004) je ispitivao usvajanje glifosata i 2,4-D u prisustvu različitih surfaktanata kod pasulja, pšenice i *C. album* pri čemu je utvrdio da se u prisustvu silikonskih surfaktanata usvajanje herbicida odvija preko stoma, a u odsustvu ovih surfaktanata preko kutikule lista.

Površina listova nekih biljnih vrsta (Ferreira et al., 2002, 2007; Ricotta and Masiunas, 1992; Santos et al., 2001, Vranješ et al., 2019), uključujući i vrste iz familije *Asteraceae* (Grangeot et al., 2006), pokrivena je različitim tipovima dlaka. Kod većine vrsta se uočavaju razlike u broju dlaka na licu i naličju, a veoma često su prisutne i razlike u građi, obliku i dimenzijama (Grangeot et al., 2006; Ferreira et al., 2002, 2007; Vranješ et al., 2019). Dlake koje se nalaze na površini listova štite biljke od UV-zračenja (Skaltsa et al., 1994), stresa suše (Espigares and Peco, 1995), kao i od biljojeda (Valverde et al., 2001) i patogena (Treatter, 2005). Međutim, pored drugih funkcija koje im se pripisuju, dlake su u vezi sa osetljivošću biljaka prema herbicidima, tj. utiču na njihovo usvajanje (Grangeot et al., 2006; Solymosi and Nagy, 1998). Tumačenja veze između dlaka i usvajanja herbicida su često kontradiktorna, pri čemu je uglavnom zastupljenije mišljenje

da dlake ometaju dospevanje herbicidnog rastvora na površinu listova, a time i usvajanje herbicida (DiTomaso, 1999). Ipak, Hull (1970) smatra da je usvajanje herbicida moguće preko dlaka. Dakle, iako dlake na površini listova nekih korovskih vrsta onemogućavaju direktan i brz kontakt kapi herbicidnog rastvora i površine listova, one doprinose usvajanju herbicida u slučaju kada je njihova površina zasićena, tako što smanjuju isparavanje (Zimdahl, 2007). Grangeot i sar. (2006) su utvrdili da samo jedan (koji na površini ima hidrofilni sloj) od tri tipa dlaka na listovima *Ambrosia artemisiifolia* L. utiče na zadržavanje herbicidnog rastvora usled toga što na površini ima hidrofilni sloj.

Poznato je da razlike u osetljivosti populacija prema različitim herbicidima mogu biti posledica razlika u usvajanju i translokaciji herbicida (Ismail et al., 2004), kao i razlika u površinskim strukturama i anatomske građi lista (Ricotta and Masiunas, 1992; Lisek et al., 2002; Tardif et al., 2006; Ferreira et al., 2007). Stoga je u ovom radu urađena detaljna analiza mikro-morfološke i anatomske građe listova suncokreta, kako bi se utvrdilo da li se ovi morfo-anatomski parametri razlikuju kod gajenih hibrida suncokreta i samoniklih populacija hibridnih formi korovskog suncokreta (HFKS) različite osetljivosti prema herbicidima.

MATERIJAL I METODE

Biljni materijal. U ogledu je korišćeno šest genotipova suncokreta. Tri genotipa su komercijalni hibridi: Kazanova (genotip osetljiv prema herbicidima imazamoks i tribenuron-metil), Rimi (genotip tolerantan prema herbicidu imazamoks) i Sumo 1 PR (tolerantan prema herbicidu tribenuron-metil). Semena ovih genotipova su proizvedena u Institutu za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu. Pored komercijalnih genotipova, u ovom ogledu su korišćena i tri genotipa hibridnih formi korovskog suncokreta (HFKS). Osetljiva populacija čija su semena prikupljena sa površine u Padinskoj Skeli za koju se pouzdano zna da herbicidi nikada nisu primenjivani i da je dovoljno udaljena od parcela sa primenom herbicida (Tabela 1) je označena kao populacija S. Semena rezistentnih populacija HFDS su prikupljena sa parcela u Surčinu čiji istorijat primene herbicida je dobro poznat (Tabela 1) i gde su herbicidi ALS inhibitori primenjivani u kontinuitetu 3-6 godina. Ove populacije označene su kao R1 i R2. Ispitivanja su pokazala da postoji značajna razlika između osetljive (S) i rezistentnih populacija (R1, R2) u osetljivosti prema nikosulfuronu (Božić et al., 2019). Sakupljena semena su očišćena i čuvana na sobnoj temperaturi (20-30°C).

Biljni materijal za proučavanje mikro-morfološke i anatomske građe listova obezbeđen je iz poljskog ogleda, koji je izveden na oglednom polju Instituta PKB Agroekonomik u Padinskoj Skeli po slučajnom blok sistemu u 4 ponavljanja, na zemljištu ritska crnica sa aluvijalnim nanosom. Predusev na eksperimentalnoj parceli je bila soja. Veličina eksperimentalne parcele je bila 5 x 4,2 m, pri čemu je setva/pikiranje obavljena na rastojanju 70 x 24 cm. Hibridi suncokreta su posejani početkom maja, dok su populacije HFKS posejane u kontejnere u drugoj polovini aprila, a iznikle biljke su presađene u polje 10 dana nakon setve. Uklanjanje korova je rađeno je ručno u više navrata.

Tabela 1. Osnovi podaci o ispitivanim populacijama HFKS i istorija primene herbicida**Table 1.** General data on the studied weedy sunflower populations and herbicide application history

Vrsta Species	Populacija Population	Lokalitet Locality	Primena herbicida ALS inhibitora (godina) Application of ALS- inhibiting herbicides (year)	Herbicide primenjen u godini prikupljanja semena Herbicide applied in year of seed collection
	S	Padinska Skela	0	-
H. annuus	R1	Surčin I	6	nikosulfuron
	R2	Surčin II	3	nikosulfuron

Mikro-morfološka i anatomska građa listova. Uzorci listova za utvrđivanje broja dlaka i stoma po jedinici površine lica/naličja lista uzeti su sa biljaka iz poljskog ogleda, u fazi kada su biljke imale četiri razvijena lista (uobičajeno vreme primene herbicida). Za svaki ispitivani hibrid suncokreta, odnosno populaciju HFKS, uzeto je po 30 slučajno odabranih listova prvog para. Metodom ljuštenja epidermisa pravljene su mikroskopski preparati na osnovu kojih je urađeno brojanje stoma i dlaka po jedinici površine lica i naličja lista.

Anatomska građa lista (uzorci uzeti iz poljskog ogleda) analizirana je u fazi primene herbicida kako bi se utvrdilo da li se hibridi/populacije različite osetljivosti prema korišćenim herbicidima razlikuju u anatomskoj građi lista. Od svakog hibrida odnosno populacije samoniklog suncokreta uzorkovano je po 8 listova prvog i 8 listova drugog para. Do izrade preparata uzorci su čuvani u 50% etanolu. Mikroskopski preparati su pripremljeni standardnom parafinskom metodom (Ruzin, 1999). Sečenje ukalupljenog materijala je rađeno na mikrotomu LEICA SM 2000 R, a dobijeni preseći debljine 5-15 μm su bojani histološkim bojama toluidin plavom, safraninom i alcijan plavom. Na trajnim preparatima mereni su: debljina lista (DL); visina epidermalnih ćelija lica (ELL) i naličja (ENL) lista; debljina mezofila (DM), palisadnog (DPT) i sunderastog (DST) tkiva; i veličina ćelija omotača provodnog snopića (ĆOPS). Analiza preparata je rađena na svetlosnom mikroskopu LEICA DMLS, fotografisanje sa digitalnom kamerom LEICA DC 300, a merenje je obavljeno pomoću softverskog paketa LEICA IM 1000. Svi parametri su mereni u 30 ponavljanja.

Statistička analiza (t-test) merenih parametara je urađena u softverskom paketu STATISTIKA*5.0.

REZULTATI

Mikro-morfološka građa listova. Obe površine lista (i lice i naličje) ispitivanih gajenih hibrida i HFKS suncokreta su prekrivene dlakama, pri čemu je broj dlaka po jedinici površine iznosio 2,07 - 6,52 dlaka mm^{-2} (Tabela 2). I kod komercijalnih genotipova i kod HFKS broj dlaka po jedinici površine je bio veći na naličju nego na licu lista. U poređnom analizom tolerantnih i osetljivog hibrida suncokreta, kao i rezistentnih i osetljivih populacija HFKS utvrđeno je da se iste ne razlikuju u odnosu na pokrivenost lica lista dlakama, dok je broj dlaka na naličju lista tolerantnih hibrida suncokreta bio statistički značajno veći nego na naličju lista osetljivog hibrida (Tabela 3).

Tabela 2. Prosečan broj dlaka i stoma na licu i naličju listova hibrida suncokreta i populacija hibridne forme korovskog suncokreta**Table 2.** Average trichome and stomata numbers on the abaxial and adaxial leaf surface in sunflower hybrid and weedy sunflower populations

Forma Form	Hibrid/ Populacija Hybrid/ Population	Broj dlaka mm ⁻² / Trichome number mm ⁻²		Broj stoma mm ⁻² / Stomata number mm ⁻²	
		Lice lista	Naličje lista	Lice lista	Naličje lista
		Abaxial leaf surface	Adaxial leaf surface	Abaxial leaf surface	Adaxial leaf surface
Hibridi suncokreta	Rimi	2,07±0,76	3,23±0,8	81,74±22,34	73,27±10,49
	Sumo 1 PR	2,74±1,14	4,63±1,16	88,61±12,54	139,14±28,19
	Kazanova	2,26±0,98	6,52±2,67	94,68±17,36	105,50±17,78
HFKS	S	3,23±1,46	4,73±2,42	129,92±35,73	113,52±39,11
	R1	3,29±1,36	4,58±1,81	128,59±27,79	109,09±18,64
	R2	3,10±1,09	4,43±1,91	130,01±28,63	107,31±16,55

Tabela 3. Statistička značajnost u broju dlaka i stoma između tolerantnih i osetljivog hibrida suncokreta i između osetljivih i rezistentnih populacija hibridne forme korovskog suncokreta**Table 3.** Statistical significance in the differences of the trichome and stomata numbers between tollerant and sensitive sunflower hybrids and between sensitive and resistant weedy sunflower populations

Parametar / Parameter	Forma / Form	Hibrid/Populacija Hybrid/Population	Lice lista Abaxial leaf surface	Naličje lista Adaxial leaf surface
Dlake	Gajeni suncokret	Rimi:Kazanova	0,408005 ^{NZ}	0,00000**
		Sumo 1 PR : Kazanova	0,080331 ^{NZ}	0,000787**
	HFKS	R ₁ : S	0,879472 ^{NZ}	0,779225 ^{NZ}
		R ₂ : S	0,690052 ^{NZ}	0,596110 ^{NZ}
Stome	Gajeni suncokret	Rimi : Kazanova	0,015037*	0,00000**
		Sumo 1 PR : Kazanova	0,125741 ^{NZ}	0,000001**
	HFKS	R ₁ : S	0,872711 ^{NZ}	0,577372 ^{NZ}
		R ₂ : S	0,746021 ^{NZ}	0,426720 ^{NZ}

NZ-nije statistički značajna razlika (p>0,05)

*-statistički značajna razlika (0,01<p<0,05)

**-statistički veoma značajna razlika (p<0,01)

Broj stoma na licu lista je bio veći kod HFKS nego kod hibrida, dok ta pravilnost nije uočena i na naličju listova. Statistički značajne razlike u broju stoma po jedinici površine lica lista (Tabela 3) utvrđene su između hibrida Rimi i Kazanova, dok između Sumo 1 PR i Kazanova tih razlika nije bilo. Broj stoma po mm⁻² naličja lista bio je statistički značajno manji kod hibrida Rimi (73,27±10,49) i značajno veći kod hibrida Sumo 1 PR (139,14±28,19) u odnosu na hibrid Kazanova (105,50±17,78). Međusobnim poređenjem rezistentnih i osetljive populacije HFKS nisu utvrđene značajne razlike u broju stoma lica i naličja listova.

Anatomska građa listova. Listovi suncokreta imaju dorzoventralnu građu. Kao i kod većine terestričnih dikotila na poprečnom preseku lista se jasno diferenciraju epidermis lica lista (ELL), epidermis naličja lista (ENL) i mezofil lista (ML) u kome se nalaze kolateralni zatvoreni provodni snopići. Mezofil je diferenciran na palisadno tkivo (PT) koje je okrenuto prema licu i sunderasto tkivo (ST) okrenuto prema naličju lista. Generalno, vrednosti svih analiziranih parametara anatomske građe listova kod svih ispitivanih hibrida suncokreta i populacija HFKS vrsta su bili veći kod prvog u odnosu na drugi par listova (Tabela 4).

Tabela 4. Prosečne vrednosti parametara anatomske građe 1. i 2. para listova kod hibrida suncokreta i populacija HFKS u vreme primene herbicida

Table 4. Average values of anatomical features of the 1st and 2nd leaf pair in sunflower hybrid and weedy sunflower populations at the time of herbicide application

Forma Form	Parametar (µm) Parameter (µm)	Pozicija listova / Leaf position	Rimi	Sumo 1 PR	Kazanova	
Hibridi suncokreta	ELL	1.par	24,81±6,68	26,76±5,17	29,69±8,67	
		2.par	22,98±3,22	24,04±3,86	22,47±5,60	
	DPT	1.par	211,58±20,97	238,21±22,66	219,97±19,68	
		2.par	141,29±33,94	188,50±16,09	150,98±21,38	
	DST	1.par	169,53±33,42	167,17±24,65	132,21±24,38	
		2.par	96,78±17,39	139,33±18,77	105,66±17,68	
	DM	1.par	381,11±35,80	405,38±35,34	352,19±23,55	
		2.par	238,07±36,90	327,82±25,58	256,64±32,36	
	ENL	1.par	16,54±4,72	19,62±5,43	25,50±8,23	
		2.par	23,56±15,43	20,04±5,13	17,15±3,87	
	ĆOPS	1.par	41,32±7,26	37,66±7,45	35,32±10,66	
		2.par	27,89±8,04	28,71±5,58	28,80±6,35	
	DL	1.par	422,46±34,23	451,75±33,54	407,37±23,85	
		2.par	284,61±35,01	371,90±27,69	296,26±35,66	
				R ₁	R ₂	S
	HFKS	ELL	1.par	24,07±4,57	34,65±8,91	27,18±8,40
2.par			18,56±4,34	21,23±5,61	22,64±6,76	
DPT		1.par	212,90±17,19	246,94±18,81	189,70±46,79	
		2.par	164,62±20,08	176,41±29,73	168,36±27,94	
DST		1.par	124,04±14,98	140,17±17,21	145,37±36,62	
		2.par	92,31±16,70	108,08±16,18	118,62±24,80	
DM		1.par	336,94±21,32	387,11±16,88	335,07±76,72	
		2.par	256,92±28,08	284,49±38,98	286,99±45,39	
ENL		1.par	18,31±7,98	22,59±5,92	21,73±10,51	
		2.par	15,08±3,58	14,87±2,51	15,92±5,08	
ĆOPS		1.par	35,70±6,81	41,31±3,34	39,37±13,65	
		2.par	27,16±5,79	27,73±5,83	35,28±5,23	
DL		1.par	379,32±21,65	444,35±28,99	383,97±85,00	
		2.par	282,88±27,84	320,59±42,02	289,31±122,03	

ELL-visina epidermalnih ćelija lica lista; DPT-debljina palisadnog tkiva; DST-debljina sunderastog tkiva; DM-debljina mezofila; ENL-visina epidermalnih ćelija naličja lista; ĆOPS-ćelije omotača provodnog snopića; DL-debljina lista

Poređenjem anatomske građe listova hibrida Rimi i Kazanova (Tabela 5) utvrđeno je da se u većini analiziranih parametara (DST, DM, ENL i ĆOPS) statistički značajno razlikuju listovi 1. para, dok između listova 2. para razlika nije bilo. Kod listova 1. para parametri DST i DM su bili veći, a parametar ĆOPS je veći kod hibrida Rimi, dok je ENL bio deblji kod hibrida Kazanova. S druge strane, između hibrida Sumo 1 PR i Kazanova (Tabela 5) potvrđene su razlike u anatomske građi na nivou oba para listova. Naime, parametri DL, DPT, DST i DM su bili značajno veći kod listova hibrida Sumo 1 PR nego isti parametri kod hibrida Kazanova, a ENL

Tabela 5. Statistička značajnost u parametrima anatomske građe 1. i 2. para listova između tolerantnih i osetljivog hibrida suncokreta i osetljivih i rezistentnih populacija HFKS**Table 5.** Statistical significance in the differences of anatomical features of the 1st and 2nd leaf pair between the tolerant and sensitive sunflower hybrids and sensitive and herbicide-resistant weedy sunflower populations

Forma Form	Parametar (μm) Parameter (μm)	Pozicija listova / Leaf position	Rimi : Kazanova	Sumo 1 PR : Kazanova
Hibridi suncokreta	ELL	1.par	0,053311 ^{NZ}	0,201882 ^{NZ}
		2.par	0,728391 ^{NZ}	0,309000 ^{NZ}
	DPT	1.par	0,199641 ^{NZ}	0,009866 ^{**}
		2.par	0,286795 ^{NZ}	0,000000 ^{**}
	DST	1.par	0,000254 ^{**}	0,000061 ^{**}
		2.par	0,117573 ^{NZ}	0,000001 ^{**}
	DM	1.par	0,004515 ^{**}	0,017101 [*]
		2.par	0,098754 ^{NZ}	0,000000 ^{**}
	ENL	1.par	0,000145 ^{**}	0,011185 [*]
		2.par	0,079251 ^{NZ}	0,051339 ^{NZ}
	ĆOPS	1.par	0,044238 [*]	0,426139 ^{NZ}
		2.par	0,695732 ^{NZ}	0,963128 ^{NZ}
	DL	1.par	0,114090 ^{NZ}	0,000023 ^{**}
		2.par	0,303651 ^{NZ}	0,000000 ^{**}
			R ₁ : S	R ₂ : S
HFKS	ELL	1.par	0,155147 ^{NZ}	0,009557 ^{**}
		2.par	0,028946 [*]	0,477057 ^{NZ}
	DPT	1.par	0,044186 [*]	0,000010 ^{**}
		2.par	0,629391 ^{NZ}	0,382989 ^{NZ}
	DST	1.par	0,020869 [*]	0,569246 ^{NZ}
		2.par	0,000341 ^{**}	0,119544 ^{NZ}
	DM	1.par	0,916820 ^{NZ}	0,005238 ^{**}
		2.par	0,016105 [*]	0,853174 ^{NZ}
	ENL	1.par	0,253602 ^{NZ}	0,750901 ^{NZ}
		2.par	0,552129 ^{NZ}	0,414211 ^{NZ}
	ĆOPS	1.par	0,289092 ^{NZ}	0,540117 ^{NZ}
		2.par	0,000039 ^{**}	0,000111 ^{**}
	DL	1.par	0,813847 ^{NZ}	0,004664 ^{**}
		2.par	0,819334 ^{NZ}	0,285249 ^{NZ}

ELL-visina epidermalnih ćelija lica lista; DPT-debljina palisadnog tkiva; DST-debljina sunderastog tkiva; DM-debljina mezofila; ENL-visina epidermalnih ćelija naličja lista; ĆOPS-ćelije omotača provodnog snopića; DL-debljina lista
 NZ-nije statistički značajna razlika ($p>0,05$); *-statistički značajna razlika ($0,01<p<0,05$); **-statistički veoma značajna razlika ($p<0,01$)

(samo kod 1. para listova) je bio veći kod hibrida Kazanova, dok su ostali slojevi bili slični po vrednostima merenih parametara kod oba hibrida. Rezistentne populacije HFKS suncokreta (R_1 , R_2) značajno su se razlikovale od osetljive (S) u odnosu na analizirane paramete (Tabela 5), pri čemu su razlike između populacija S i R_1 bile izraženije na nivou 2. para listova (ELL, DM, DST i ĆOPS), a između populacija S i R_2 na nivou 1. para listova (ELL, DPT, DM i DL). Generalno, mereni parametri anatomske građe listova su uglavnom imali manje vrednosti kod R_1 nego kod S populacije, dok je između R_2 i S populacija bilo obrnuto.

DISKUSIJA

Lice i naličje listova hibrida suncokreta (Rimi, Sumo 1 PR, Kazanova) kao i populacija HFKS (S, R₁, R₂) ispitivanih u ovom radu pokriveni su dlakama. Između rezistentnih i osetljivih populacija (R₁:S; R₂:S) nije bilo statistički značajnih razlika u pokrivenosti dlakama na licu i naličju listova. S obzirom na to da je poznato da se ove populacije razlikuju u osetljivosti prema nikosulfuronu (Božić et al., 2019), može se zaključiti da kod njih parametar pokrivenosti listova dlakama nije u korelaciji sa njihovom osetljivošću prema ovom herbicidu. Jedino istraživanje koje ukazuje na slične rezultate, nije potvrdilo korelaciju između broja dlaka na licu i naličju listova i tolerantnosti jagode prema herbicidima (Lisek et al., 2002). Između hibrida suncokreta različite osetljivosti prema imazamoksu (Rimi i Kazanova), odnosno tribenuron-metilu (Sumo 1 PR i Kazanova) konstatovane su razlike u pokrivenosti dlakama naličja listova, pri čemu oba tolerantna hibrida imaju značajno veću brojnost dlaka na listovima od osetljivog, što ukazuje na mogućnost da je reakcija ispitivanih hibrida suncokreta prema odgovarajućim herbicidima povezana i sa brojnošću dlaka na naličju listova. Nasuprot tome, Ismail i sar. (2004) navode da su na listovima populacije *Crassocephalum crepidioides* (Benth.) S., osetljive prema parakvatu, dlake bile značajno brojnije nego kod rezistentne populacije. Međutim, treba imati u vidu da pri primeni herbicida, najveći deo herbicidnog rastvora dospeva na lice lista, što umanjuje značaj naličja u usvajanju herbicida.

Broj i raspored stoma varira od vrste do vrste, iako je generalno kod većine vrsta broj stoma po jedinici površine veći u epidermisu naličja, kod hibrida i populacija HFKS ta pravilnost nije potvrđena. China i Brun (1975) su utvrdili da kod gajenih biljaka broj stoma može značajno da varira između različitih genotipova iste vrste koji rastu pod identičnim uslovima, što je potvrđeno u slučaju hibrida suncokreta Rimi, Sumo 1 PR i Kazanova. Naime, broj stoma po jedinici površine lica i naličja kod hibrida Kazanova je bio značajno veći nego kod hibrida Rimi, što ukazuje na mogućnost da i ovaj parametar doprinosi različitoj osetljivosti ovih hibrida prema imazamoksu. Navedeni rezultati su u skladu sa rezultatima do kojih su došli Ricotta i Masiunas (1992) kada su proučavali ulogu stoma u tolerantnosti sorti paradajza i drugih vrsta iz familije *Solanaceae* prema acilfluorfenu, pri čemu su utvrdili da nivo tolerantnosti ovih vrsta zavisi od broja stoma i u malom stepenu od broja dlaka na listu. Za razliku od hibrida Rimi i Kazanova, odnos broja stoma po jedinici površine lista između hibrida Sumo 1 PR i Kazanova je bio obrnut. Naime, između ova dva hibrida nisu utvrđene razlike u broju stoma na licu listova, a na naličju stome su bile statistički značajno brojnije kod hibrida Sumo 1 PR u poređenju sa hibridom Kazanova. Takođe, nije utvrđena veza između brojnosti stoma i nivoa tolerantnosti/ osetljivosti ovih hibrida prema tribenuron-metilu, što je saglasno sa rezultatima do kojih su došli Lisek i sar. (2002), kao i rezultatima do kojih su došli Vrbničanin i sar. (2004) kada su utvrdili da osetljivost varijeteta *Cirsium arvense* (L.) Scop prema 2,4-D-2EHE, bentazon+dihlorprop-P i bentazon+MCPA nije u korelaciji sa brojem stoma po jedinici površine lista. Uprkos tome, što se pokazalo da je smanjena osetljivost ALS enzima glavni mehanizam koji uslovljava tolerantnost hibrida Sumo 1 PR prema tribenuron-metilu (Bozic et al., 2012), verovatno i stome imaju ulogu u ispoljavanju nivoa njegove tolerantnosti. Naime, moguće je da stome kod

hibrida Sumo 1 PR predstavljaju barijeru za usvajanje tribenuron-metila, kao u slučaju vrste *Nicandra physaloides* (L.) Gaertn. (Ferreira et al., 2002), kao i da se herbicid usvaja i preko stoma, ali da veća maljavost hibrida Sumo 1 PR u odnosu na hibrid Kazanova, onemogućava dospevanje herbicida do površine epidermisa, što vodi ka njihovom manjem usvajanju. Za razliku od broja i rasporeda stoma između tolerantnih i osetljivog hibrida suncokreta, kod rezistentnih i osetljivih populacija HFKS (R_1 : S; R_2 :S) nije bilo statistički značajnih razlika u broju stoma na licu i naličju listova. S obzirom na to da je na osnovu morfoloških parametara, kao i aktivnosti ALS enzima kod HFKS suncokreta (Božić et al., 2019) utvrđeno da su navedene populacije razlikuju u osetljivosti prema nikosulfuronu, može se zaključiti da brojnost stoma po jedinici površine lista nema značajan uticaj na njihovu osetljivost. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima do kojih su došli Lisek i sar. (2002), utvrdivši da raspored stoma na listovima, kao i njihova veličina i građa nemaju značajnu ulogu u apsorpciji kombinacije herbicida fenmedifam + desmedifam + etofumesat kod različitih sorti jagode. Mada ima i suprotnih tvrdnji koje ukazuju da stome imaju značajnu ulogu u usvajanju herbicida i ispoljavanju osetljivosti biljaka prema njima (Ricotta and Masiunas, 1992; Taylor et al., 1980).

Reakcija biljaka prema herbicidima, osim od morfoloških osobina, površinskih struktura, fizioloških i biohemijskih karakteristika biljaka može da zavisi i od njihove anatomske građe. Naime, uloga anatomske građe u ispoljavanju reakcije biljaka na primenu herbicida predstavlja prilično neistraženu oblast, pri čemu su u malom broju slučajeva potvrđene razlike u anatomske građi između biljaka različite osetljivosti prema herbicidima (Ferreira et al., 2007; Tardif et al., 2006). Takođe, Vranješ i sar. (2017) su potvrdili da se sa starenjem biljaka *Chenopodium album* menja anatomska građa listova, što se može dovesti u vezu sa smanjenjem osetljivosti ove vrste prema herbicidu mezotrion. Tardif i sar. (2006) su analizirali anatomske građu populacija *Amaranthus powellii* S.Wats. osetljivih i rezistentnih prema herbicidima ALS inhibitorima, i uočili su da se anatomska građa listova ove dve grupe biljaka razlikovala. Hibridi suncokreta različite osetljivosti prema imazamoksu (Rimi i Kazanova) i tribenuron-metilu (Sumo 1 PR i Kazanova) su se međusobno razlikovali u odnosu na anatomske građu listova. Slično tome, utvrđeno je da se populacije *Amaranthus powellii* S.Wats. i sorte šećerne trske različite osetljivosti prema ALS inhibitorima razlikuju u odnosu na anatomske građu lista (Tardif et al., 2006; Ferreira et al., 2007), što je u suprotnosti sa rezultatima do kojih je došao Vaughn (1986) tvrdeći da između izolacija *Brassica napus* L. osetljivih i rezistentnih prema triazinima nema razlike u anatomske građi listova. Slično kao u slučaju hibrida suncokreta, između populacija HFKS za koje je drugim metodama utvrđeno da se razlikuju u osetljivosti prema nikosulfuronu (Božić et al., 2019), utvrđene su i značajne razlike u anatomske građi listova. Rezultati su kao i u slučaju hibrida suncokreta, takođe u saglasnosti sa rezultatima do kojih su došli Ferreira i sar. (2007), odnosno Tardif i sar. (2006) potvrdivši da se biljke različite osetljivosti prema herbicidima ALS inhibitorima razlikuju i u anatomske građi.

Imajući u vidu da su rezultati ovog rada potvrdili da mikro-morfološka i anatomska građa listova mogu biti u vezi sa osetljivošću biljaka prema herbicidima, kao i to da je literatura iz ove oblasti veoma oskudna i zastarela, buduća istraživanja bi trebalo usmeriti na znatno veći broj različitih korovskih i gajenih vrsta u kombinaciji sa herbicidima različitih mehanizama

delovanja. Očekuje se da bi na taj način uloga površinskih struktura i anatomske građe listova u osetljivosti biljaka prema herbicidima bila detaljnije utvrđena i preciznije razjašnjena.

ZAHVALNICA

Rad je nastao kao rezultat istraživanja u okviru ugovora o realizaciji i finansiranju naučnoistraživačkog rada u 2020. godini između Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu i Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, evidencioni broj ugovora: 451-03-68/2020-14/200116.

LITERATURA

- Baker, E. A., Hayes, A. L., Butler, R. C.:** Physicochemical properties of agrochemicals: their effects on foliar penetration. *Pesticide Science*, 34, 167-182, 1992.
- Baum, S. F., Karanastasis, L., Rost, T. L.:** Morphogenetic effect of the herbicide Cinch on *Arabidopsis thaliana* root development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 17, 107-114, 1998.
- Bayer, D. E., Foy, C. L., Mallory, T. E., Cutter, E. G.:** Morphological and histological effects of trifluralin on root development. *American Journal of Botany*, 54, 945-952, 1967.
- Boutsalis, P., Karotam, J., Powles, S. B.:** Molecular basis of resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in *Sisymbrium orientale* and *Brassica tournefortii*. *Pesticide Science*, 55, 507-516, 1999.
- Božić, D., Saric, M., Malidza, G., Ritz, C., Vrbnicanin, S.:** Resistance of sunflower hybrids to imazamox and tribenuron-methyl. *Crop Protection*, 39, 1-10, 2012.
- Božić, D., Sarić-Krsmanović, M., Matković, A., Vranješ, F., Jarić, S., Vrbničanin, S.:** The response of weedy sunflower (*Helianthus annuus* L.) to nicosulfuron: an examination of vegetative parameters and acetolactate synthase activity. *Archives of Biological Sciences*, 71(2), 305-313, 2019.
- Bukovac, M.:** Herbicide entry into plants. In: L.J. Audus et al. (Eds.) *Herbicides. Physiology, Biochemistry, Ecology*. Academic Prss. London, 1976.
- Chamel, A., Vitton, N.:** Sorption and diffusion of 14C-atrazine through isolated plant cuticles. *Chemosphere*, 33, 995-1003, 1996.
- China, A. J., Brun, W. A.:** Stomatal size and frequency in soybeans. *Crop Science*, 15, 309-313, 1975.
- Daubenmire, R.:** Steppe vegetation of Washington. *Bulletin of the Washington Agricultural Experimental Station*, 62, 80-82, 1970.
- Di Tomaso, J. M.:** Barriers to Foliar Penetration and Uptake of Herbicides. In the *Proceedings of the California Weed Science Society*, 51, 150-155, 1999.
- Espigares, T. Peco, B.:** Mediterranean Annual Pasture Dynamics: Impact of Autumn Drought. *Journal of Ecology*, 83, 135-142, 1995.
- Ferreira, E. A., Procopio, S. O., Silva, E. A. M., Silva, A. A., Rufino, R. J. N.:** Estudos anatomicos de folhas de plantas daninhas. I- *Nicandra physaloides*, *Solanum viarum*, *Solanum americanum* e *Raphanus raphanistrum*. *Planta Daninha*, 2, 159-167, 2002.
- Ferreira, E. A., Ventrella, M. C., Santos, J. B., Barbosa, M. H. P., Silva, A. A., Procopio, S. O., Silva, E. A. M.:** Leaf blade quantitative anatomy of sugarcane cultivars and clones. *Planta Daninha*, 25, 25-34, 2007.
- Fischer, A.J., Bayer, D.E., Carriere, M.D., Ateh, C.N., Yim K.-O.:** Mechanisms of Resistance to Bispyribac- Sodium in an *Echinochloa phyllopogon* accession. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 68, 156-165, 2000.
- Grangeot, M., Chauvel, B., Gauvrit, C.:** Spray retention, foliar uptake and translocation of glufosinate and glyphosate in *Ambrosia artemisiifolia*. *Weed Research*, 46, 152-162, 2006.

- Holt, J. S., Thill, D. C.:** Growth and productivity of resistant plants. In: Powles, S.B., Holtum, J.A.M. (Eds.). *Herbicide resistance in plants. Biology and Biochemistry*. Boca Raton, FL, USA: Lewis Publishers, pp. 299-316, 1994.
- Huang, J. K., Rozelle, S., Pray, C., Wang, Q. F.:** Plant biotechnology in China. *Science*, 295, 674-677, 2002.
- Hull, H. M.:** Leaf structure as related to absorption of pesticides and other compounds. *Residue Reviews*, 38, 1-155, 1970.
- Ismail, B. S., Chuah, T. S., Khatijah, H. H.:** Mechanism of Paraquat Resistance in *Crassocephalum crepidioides* (Benth.) S. Moore During Immature Stage. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 27, 1-10, 2004.
- King, J. M.:** Methods of testing the reaction to herbicides of cultivars of peas (*Pisum sativum* L.), broad beans (*Vicia faba* L. Partum) and dwarf beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and the practical value of the results. Brighton Crop Protection Conference – Weeds, 453-460, 1980.
- Kust, C. A., Struckmeyer, B. E.:** Effects of trifluralin on growth, nodulation and anatomy of soybeans. *Weed Science*, 19, 147-152, 1971.
- Lisek, J., Habdas, H., Gawronski, W. S.:** Relationship between selected morphological, anatomical and cytological characteristics of leaves and the level of tolerance to herbicides in strawberry cultivars. *Acta Physiologiae Plantarum*, 24, 371-378, 2002.
- Liu, Z.:** Effects of surfactants on foliar uptake of herbicides- a complex scenario. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 35, 149-153, 2004.
- Malpassi, R. N.:** Herbicide effects on cuticle ultrastructure in *Eleusine indica* and *Portulaca oleracea*. *Biocell*, 30, 51-56, 2006.
- McWhorter, C. G.:** Control of johnsongrass ecotypes. *Weed Science*, 19, 229-233, 1971.
- Nandula, V. K., Messersmith, C. G.:** Resistance to BAY MKH 6562 in Wild Oat (*Avena fatua*). *Weed Technology*, 15, 343-347, 2001.
- Osuna, M. D., Vidotto, F., Fischer, A. J., Bayer, D. E., Prado, R. D., Ferrero, A.:** Cross- resistance to Bispyribac-sodium and bensulfuron- methyl in *Echinochloa phyllopogon* and *Cyperus difformis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 73, 9-17, 2002.
- Pavlović, D., Vrbničanin, S., Reinhardt, C., Fischer, A.:** Osetljivost vrsta *Conyza canadensis* (L) Cronquist i *Conyza bonariensis* (L) Cronquist na glifosat. *Acta herbologica*, 17, 179-185, 2008.
- Pline, W. A., Viator, R., Wilcut, J. W., Edmisten, K. L., Thomas, J., Wells, R.:** Reproductive abnormalities in glyphosate-resistant cotton caused by lower CP4-EPSPS levels in the male reproductive tissue. *Weed Science*, 50, 438-447, 2002.
- Popova, L.:** Effect of fluridone on plant development, leaf anatomy and plastid ultrastructure of barley plants. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 22, 3-12, 1996.
- Ricotta, J. A., Masiunas, J. B.:** Relationship of leaf surface characteristics to acifluorfen tolerance in tomato (*Lycopersicon esculentum*) and related species. *Weed Science*, 40, 402-407, 1992.
- Ruzin, S. E.:** *Plant Microtechnique and Microscopy*. Oxford University Press, New York, London, 1999.
- Ryerse, J. S., Downer, R. A., Samsons, R. D., Feng, P. C. C.:** Effect of glyphosate spray droplets on leaf cytology in velvetleaf (*Abutilon theophrasti*). *Weed Science*, 52, 302-309, 2004.
- Santos, I. C., Meira, R. M. S. A., Ferreira, F. A., Santos, L. D. T., Miranda, G. V.:** Características anatómicas de duas espécies de trapaeraba e a eficiência do glyphosate. *Planta Daninha*, 20, 1-8, 2002.
- Sanyal, D., Bhowmik, P., Reddy, K.:** Leaf characteristics and surfactants affect primisulfuron droplet spread in three broadleaf weeds. *Weed Science*, 54, 16-22, 2006a.
- Sanyal, D., Bhowmik, P., Reddy, K.:** Influence of leaf surface micromorphology, wax content, and surfactant on pirimisulfuron droplet spread on barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) and green foxtail (*Setaria viridis*). *Weed Science*, 54, 627-633, 2006b.
- Sasaki, S., Kozłowski, T. T.:** Variable photosynthetic responses of *Pinus resinosa* seedlings to herbicides. *Nature*, 209, 1042-1043, 1966.
- Schreiber, L.:** Polar paths of diffusion across plant cuticles: new evidence for an old hypothesis. *Annals of Botany*, 95, 1069-1073, 2005.

- Skaltsa, H., Vervokidou, E., Harvala, C., Karabourniotis, G., Manetasi, Y.:** UV-B protective potential and flavonoid content of leaf hairs of *Quercus ilex*. *Phytochemistry*, 37, 987-990, 1994.
- Solymosi, P., Nagy, P.:** ALS-resistance in *Cirsium arvense* (L.) Scop.: ALS-gatlo herbicidekkel szembeni rezisztencia vizsgalata a *Cirsium arvense* (L.) Scop. Biotipusaiban. *Novenyvedelem*, 34, 353-364, 1998.
- Tardif, F.J., Rajcan, I., Costea, M.:** A mutation in the herbicide target site acetohydroxyacid synthase produces morphological and structural alterations and reduces fitness in *Amaranthus powellii*. *New Phytologist*, 169, 251-264, 2006.
- Taylor, F. E., Cobb, A. H., Davies, L. G.:** The effects of bentazon on stomatal behavior in *Chenopodium album* L. *New Phytologist*, 63, 369-376, 1980.
- Treutter, D.:** Significance of Flavonoids in Plant Resistance and Enhancement of Their Biosynthesis. *Plant Biology* (Stuttg), 7, 581-591, 2005.
- Tuffi Santos, L. D., Sant'Anna-Santos, B. F., Meira, R. M. S. A., Ferreira, F. A., Tiburcio, R. A. S., Machado, A. F. L.:** Leaf anatomy and morphometry in three eucalypt clones treated with glyphosate. *Brazilian Journal of Biology*, 69, 129-136, 2009.
- Valverde, P. L., Fornoni, J. J., Nunez-Farfan, J.:** Defensive role of leaf trichomes in resistance to herbivorous insects in *Datura stramonium*. *Journal of Evolutionary Biology*, 14, 424-432, 2001.
- Vaughn, K. C.:** Characterization of Triazine-Resistant and -Susceptible Isolines of Canola (*Brassica napus* L.). *Plant Physiology*, 82, 859-863, 1986.
- Vranješ, F., Božić, D., Rančić, D., Vrbničanin, S.:** Age-related leaf surface characteristics of *Chenopodium album* and *Abutilon theophrasti*. In the Proceedings of VIII congress on plant protection: Integrated Plant Protection for Sustainable Crop Production and Forestry, Zlatibor, Serbia, pp. 160-161, 2019.
- Vranješ, F., Božić, D., Rančić, D., Anđelković, A., Vrbničanin, S.:** Proučavanje anatomske građe lista *Chenopodium album* u funkciji osetljivosti na herbicide. *Acta herbologica*, 26 (1), 31-39, 2017.
- Zimdahl, R. L.:** Fundamentals of weed science. Academic Press, Elsevier Inc. USA, p. 666, 2007.

Comparative analysis of leaf micromorphology and anatomy in cultivated and weedy sunflower (*Helianthus annuus*)

SUMMARY

There are various opinions in the literature on the importance of morpho-anatomical leaf features, such as the number of stomata, the presence of trichomes, cuticle thickness, cell size, leaf thickness, etc. for the susceptibility of plants to foliar herbicides. Knowing that differences in the plant's sensitivity to herbicides may be due to differences in leaf surface and inner structure of leaves, a detailed micromorphological and anatomical analysis was performed on the leaves of tolerant and susceptible sunflower forms, both in cultivated hybrids and populations of weedy sunflower. It is interesting that while no significant differences in the number of trichomes and stomata between the resistant and susceptible weedy sunflower populations were observed, in commercial sunflower genotypes these numbers were significantly different. Namely, the number of stomata in the sensitive commercial sunflower hybrid was significantly higher than in the tolerant ones, but the tolerant hybrids had significantly more leaf trichomes than the sensitive one. Consequently, it is possible that the higher density of trichomes makes it impossible for the herbicides to reach the surface of the leaf epidermis, resulting in a reduced uptake. It has also been shown that plants with different levels of herbicide susceptibility also differ in various anatomical parameters.

Keywords: epidermis, stomata, trichomes, herbicide efficiency.