

## Primena Ramanove spektroskopije u cilju utvrđivanja uticaja herbicida na sadržaj karotenoida u listovima *Chenopodium album* i *Abutilon theophrasti*

Filip Vranješ<sup>1</sup>, Ilinka Pećinar<sup>2</sup>, Steva Lević<sup>2</sup>, Sava Vrbničanić<sup>2</sup> i Dragana Božić<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Galenika Fitofarmacija, Batajnički drum bb, Beograd, Srbija

<sup>2</sup>Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Nemanjina 6, Zemun- Beograd, Srbija  
e-mail: filipv85@gmail.com

### REZIME

Ramanova spektroskopija se do sada pokazala kao pogodna metoda za analizu karotenoida u širokom spektru biljnih uzoraka. Cilj ovog istraživanja je bio da se utvrdi da li se primenom Ramanove spektroskopije može detektovati uticaj mezotriona na promene sadržaja karotenoida u listovima tretiranih korovskih biljaka, *Chenopodium album* i *Abutilon theophrasti*. Kada su biljke dostigle odgovorajuću fenofazu (*C. album*: četiri lista, odnosno *A. theophrasti*: dva lista), primenjen je preparat Skaut (a.s. mezotrion 480 g L<sup>-1</sup>, SC) u količini od 120 g a.s. ha<sup>-1</sup> uz dodat okvašivač Alteox wet 40 (a.s. mineralno ulje (500 g L<sup>-1</sup>) i polioksi alkohol (500 g L<sup>-1</sup>)) u količini 1 L ha<sup>-1</sup>. Analiza listova, primenom Ramanove spektroskopije, je urađena u četiri termina: prvog, drugog, trećeg i sedmog dana nakon primene (DNP) mezotriona. U dobijenim Ramanovim spektrima analiziran je intenzitet traka na pozicijama 1007, 1155 i 1522 cm<sup>-1</sup> kod kontrolnih i tretiranih biljaka u cilju utvrđivanja relativnog sadržaja karotenoida. Dobijeni rezultati su pokazali da se kod vrste *C. album* mogu utvrditi promene u relativnom sadržaju karotenoida u listovima tretiranih biljaka već trećeg DNP mezotriona u poređenju sa listovima kontrolnih biljka iste starosti, dok je kod vrste *A. theophrasti* utvrđena statistički značajna razlika u istom parametru nešto kasnije u poređenju sa *C. album*, sedmog DNP mezotriona. Ovim istraživanjem je potvrđeno da se Ramanova spektroskopija može koristiti kao adekvatna metoda za brzu detekciju delovanja herbicida na sadržaj karotenoida u listovima tretiranih korovskih vrsta.

**Ključne reči:** Ramanova mikroskopija, relativni sadržaj karotenoida, mezotrion, pepeljuga, Teofrastova lipica.

## UVOD

Reakcije biljaka na primenu i delovanje herbicida se mogu pratiti pomoću velikog broja metoda, koje mogu biti destruktivne, ako podrazumevaju žrtvovanje biljaka tj. razaranje uzorka pre analize, ili nedestruktivne, ako ne zahtevaju prethodnu pripremu uzorka. Parametri koji se prate da bi se ustanovile promene na biljkama izazvane uticajem herbicida zavise od mehanizma delovanja herbicida i uključuju: vizuelnu ocenu, fluorescenciju i sadržaj hlorofila, itd. Mehanizmi reakcije biljaka na različite faktore stresa se, takođe, mogu istraživati primenom analitičkih metoda (spektrofotometrijskim i hromatografskim metodama) kroz analizu sadržaja karotenoida (Brosnan et al., 2011; Rys et al., 2015). Poznato je da karotenoidi predstavljaju grupu sekundarnih metabolita, tetraterpenoida koji se nalaze u gotovo svim delovima biljaka. Najznačajniju ulogu imaju u hloroplastima parenhimskih ćelija gde su prisutni u stromi i tilakoidnim membranama kao deo fotosintetskog aparata (Topolovec, 2008). Karotenoidi, hlorofili i proteini zajedno grade antenske komplekse fotosintetskog aparata koji služe za sakupljanje svetlosne energije i njen prenos na reakcione centre (Nešković i sar., 2003). Značaj karotenoida se ogleda u tome što, uz vršenje funkcije apsorpcije i transporta svetlosne energije, imaju sposobnost zaštite hlorofila od fotooksidacije, odnosno oksidacije reakcionog centra u uslovima visokog inteziteta osvetljenja (Topolovec, 2008). Dominantni karotenoidi u zelenim delovima biljaka su: lutein,  $\beta$ -karoten, violaksantin i neoksantin (Rodriguez-Amaia, 2001), mada zastupljenost karotenoida u listovima značajno varira kod različitih biljnih vrsta (Zeise et al., 2018). Primena analitičkih metoda u analizi karotenoida obično podrazumeva dug vremenski period pripreme uzorka, dugotrajnu ekstrakciju pigmenata, skupu opremu koja se koristi za ekstrakciju i kvantifikaciju pigmenata i primenu velikog broja hemikalija. Takođe, uslovi tokom analize analitičkim metodama obično mogu prouzrokovati strukturne promene i posledično uništavanje pigmenata (Baranski et al., 2005). Za razliku od analitičkih metoda, Ramanova spektroskopija se pokazala kao brza i nedestruktivna metoda za detekciju hemijskog sastava biljnih uzoraka bogatih karotenoidima (Baranski et al., 2005). Čak i u situacijama kada su karotenoidi zastupljeni u malim koncentracijama, manje od 0,1 mg/kg u listovima, zahvaljujući ekscitaciji na talasnoj dužini (532 nm), detekcija karotenoida se može postići primenom rezonantne Ramanove spektroskopije (Skoczovski and Troc, 2013; Zeise et al., 2018). Visoka Ramanova aktivnost karotenoida u kombinaciji sa rezonantnim efektom lasera na 532 nm rezultuje pojačavanjem intenziteta karotenoidnih traka. Promene u sastavu i količini karotenoida u listovima mogu se primetiti na Ramanovim spektrima, gde se promene u intenzitetu dominantnih i specifičnih traka mogu koristiti za izračunavanje relativne koncentracije karotenoida (Hassing et al., 2012). Ramanova spektroskopija se u novije vreme pokazala kao tehnika visokog potencijala za analizu karotenoida u uslovima izlaganja biljaka herbicidima (Vitek et al., 2017).

Mezotrion je herbicid koji pripada hemijskoj grupi triketona i koristi za suzbijanje širokolisnih i pojedinih jednogodišnjih uskolisnih korova u usevu kukuruza. Ovaj herbicid može biti usvojen folijarno ili korenom i ispoljava aktivnost pre i nakon nicanja (Armel et al., 2003). Mezotrion inhibira enzim 4-hidroksifenilpiruvat diokigenasu (4-HPPD), što dovodi

do smanjenja biosinteze karotenoida (Mitchell et al., 2001). Simptomi delovanja mezotriona kod osetljivih biljaka postaju vidljivi u roku od tri do pet dana nakon primene i ispoljavaju se u vidu izbeljivanja listova, a zatim se javlja nekroza (Crech et al., 2004; Joy et al., 2009, Vranjes et al., 2019).

S obzirom da je mehanizam delovanja herbicida mezotrion inhibicija sinteze katotenoida i da Ramanova spektroskopija ima veliki potencijal za analizu sadržaja ovih pigmenata u biljnom materijalu, cilj istraživanja u ovom radu je bio da se ispita mogućnost upotrebe ove nedestruktivne metode u utvrđivanju reakcija korovskih biljaka na mezotrion. Model biljke na kojima je vršeno ovo istraživanje su bile *Chenopodium album* L. i *Abutilon theophrasti* Medik. *Chenopodium album* L. (syn. *Chenopodium vulgare* Gueldenst) je jednogodišnja vrsta iz familije *Amaranthaceae*, u narodu poznata pod različitim imenima (pepeljuga, bela loboda, zelje). Listovi su zeleni s bledom pepeljastom prevlakom i obrasli sitnim dlačicama. Smatra se da voštana prevlaka na površini lista predstavlja barijeru za usvajanje herbicida (Burghardt et al., 2006). Dlake su brojnije na donjoj strani lista, što naličje lista čini svetlijim od lica (Mastebroek, 1996). *C. album* je dominantna korovska vrsta na obradivim površinama, a može se naći na oranicama, pašnjacima, povrtnjacima, vinogradima, voćnjacima, ali i pored puteva (DiTomaso and Healy, 2007). *Abutilon theophrasti* Medik. (syn. *A. avicennae* Gaertn.) je jednogodišnja vrsta iz familije *Malvaceae*, u narodu poznata kao Teofrastova lipica, lipica, žutoslez. Listovi su obrasli gustim beličastim dlakama, prisustvo velikog broja dlaka je naročito izraženo na epidermisu lica. Javlja se kako na obradivim tako i van obradivih površina, tako da je ova vrsta prisutna u okopavijama, povrtnjacima, zasadima voća, lucerištima, urbanim travnjacima i ruderalnim staništima (Vrbničanin i Božić, 2017).

## MATERIJAL I METODE

**Biljni materijal.** Semena biljaka *C. album* i *A. theophrasti* su prikupljena tokom vegetacione sezone 2015. godine sa njive na kojoj je gajen usev suncokreta u okolini Beograda. Sakupljena semena su očišćena i čuvana u mraku na sobnoj temperaturi (20-25°C), a eksperimenti su realizovani u laboratorijama Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu tokom 2016-2017. godine. Za potrebe ogleda biljke *C. album* i *A. theophrasti* su gajene u komori za gajenje biljaka. Ispitivane korovske vrste su posejane u plastične saksije prečnika 10 cm i zapremine 300 ml, ispunjene supstratom Floragard TKS 1<sup>1</sup>. Saksije sa biljkama su potom stavljene u komore za gajenje sa režimom svetlosti (dan/noć) 14 h/10 h i odgovarajućim temperaturama 27°C/22°C. Podešeno je veštačko svetlo intenziteta 1300 fluksa (MH Philips 600W) na visinu od jednog metra od biljaka. Biljke su zalivane svakodnevno zapreminom vode koja je obezbeđivala optimalnu vlažnost zemljišta. Nakon nicanja broj biljaka je ručnim uklanjanjem sveden na četiri biljke po saksiji.

1 „Floragard TKS1” (pH vrednost 5.6 sa sadržajem: 80% nemački beli treset+20% nemački crni treset+kreč+makroelementi N 140 mg l<sup>-1</sup>, P 80 mg l<sup>-1</sup>, K 190 mg l<sup>-1</sup> i mikroelementi (Mg, B, Mn, Mo, Fe, Zn), Nemačka)

Kada su biljke dostigle fazu četiri razvijena lista kod vrste *C. album* i dva razvijena lista kod vrste *A. theophrasti* primenjen je mezotrion. Mezotrion (preparat Skaut<sup>2</sup>) je primenjen u preporučenoj količini od 120 g a.s. ha<sup>-1</sup> uz dodatak 1 L ha<sup>-1</sup> okvašivača Alteox wet 40<sup>3</sup>. Primena herbicida obavljena je leđnom prskalicom uz utrošak 200 L ha<sup>-1</sup> vode. Eksperiment je ponovljen dva puta po potpuno slučajnom blok sistemu sa četiri ponavljanja po tretmanu.

**Ramanova spektroskopija i analiza relativnog sadržaja karotenoida.** Analiza listova primenom Ramanove spektroskopije je urađena u četiri termina: prvi, drugi, treći i sedmi dan nakon primene (DNP) mezotriiona. Analiza Ramanovim spektroskopom je podrazumevala snimanje različitih regiona na licu lista kontrolnih i tretiranih listova obe biljne vrste, izbegavajući tkivo koje se nalazi oko lisnih nerava. Da bi se uzela u obzir moguća nehomogenost uzorka, za svaki uzorak snimljeno je minimum deset Ramanovih spektara, a zatim je korišćen prosečni spektar kao reprezentativni spektar za svaki tretirani i kontrolni uzorak po svakom posmatranom vremenu uzorkovanja. Ramanovi spektri su snimljeni u spektralnom opsegu od 900–1700 cm<sup>-1</sup> XploRA Raman spektrometrom Horiba Jobin Yvon, opremljenim laserom Nd/YAG na talasnoj dužini od 532 nm, sa rešetkom od 1200 gr/mm i pri spektralnoj rezoluciji od 3 cm<sup>-1</sup>. Spektri su obrađeni pomoću OriginePro 8.6 softvera (OriginLab, Northampton, MA, USA). Svi dobijeni spektri su normalizovani maksimalnim intenzitetom trake na poziciji 1522 cm<sup>-1</sup>. Standardi β-karoten i lutein su kupljeni od Sigma-Aldrich-a. Na osnovu spektara snimljenih za čiste karotenoide ustanovljeno je da trake na pozicijama 1007, 1155 i 1522 cm<sup>-1</sup> potiču od karotenoida. Relativni sadržaj karotenoida je prikazan na osnovu izračunavanja parametra intenziteta (*Max height peak*) za trake na pozicijama 1007, 1155 i 1522 cm<sup>-1</sup> kod kontrolnih i tretiranih biljaka u Spectragryph v 1.2.13 softveru (Menges, 2018).

Statistička obrada dobijenih podataka za intenzitete traka na pozicijama 1007, 1155 i 1522 cm<sup>-1</sup> je urađena u statističkom softveru STATISTICA 5.0 pomoću t-testa.

## REZULTATI I DISKUSIJA

Ramanova spektroskopija, pošto ne podrazumeva zahtevnu pripremu uzorka, odabrana je kao pogodna metoda za analizu karotenoida u listovima. Pored toga, ova metoda je neinvazivna jer ne zahteva „žrtvovanje“ biljaka tako da se one mogu koristiti za dalja ispitivanja.

Na slici 1 prikazani su karakteristični spektri karotenoida u listovima vrsta *C. album* i *A. theophrasti* dobijeni primenom Ramanove spektroskopije.

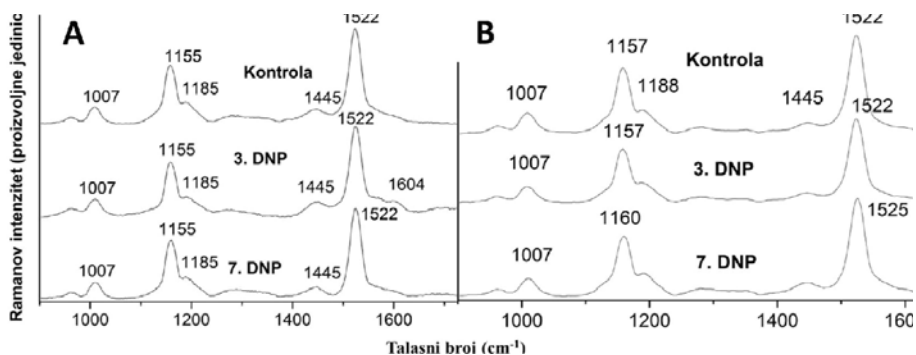
Karakteristične trake koje ukazuju na prisustvo karotenoida su visokih intenziteta zbog efekta snažnog pojačanja usled rezonancije na talasnoj dužini lasera od 532 nm. Identifikovane trake u velikoj meri odgovaraju standardima i potvrđuju prisustvo β-karotena i luteina (Slika 2). Najintenzivnija traka je na 1522/1525 cm<sup>-1</sup> i predstavlja konjugovanu C=C vibraciju koja ukazuje na β-karoten ili lutein, dominantne karotenoide u listovima kod oba biljna predstavnika

2 „Skaut” (mezotrion 480 g l<sup>-1</sup>, SC, Galenika Fitofarmacija, Srbija)

3 „Alteox wet 40” (mineralno ulje (500 g l<sup>-1</sup>)+polioksi sorbitol oleate (300 g l<sup>-1</sup>)+polioksididecil alkohol (200 g l<sup>-1</sup>), Galenika Fitofarmacija, Srbija)

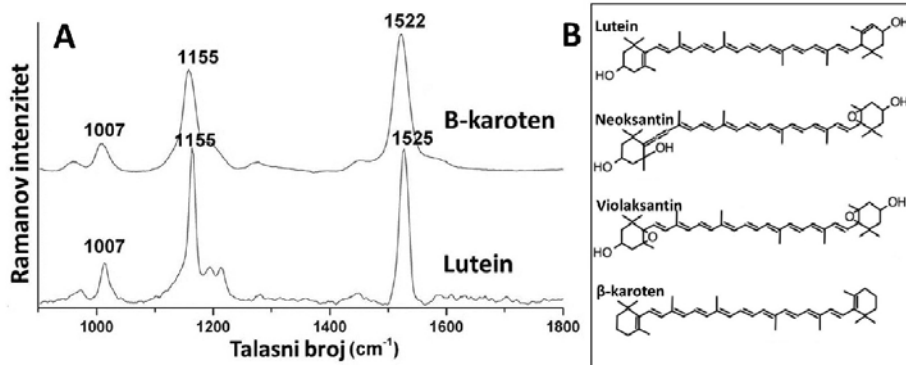
(Slika 1 i 2). Druga traka, srednjeg intenziteta je na poziciji u regionu od 1155-1160  $\text{cm}^{-1}$ , potiče od C-C vibracija koje su vezane sa C-CH<sub>3</sub> ili C-H vibracija iz centralnog dela polienskog lanca karakterističnog za karotenoide (Slika 2B). Treća karakteristična traka je niskog intenziteta i nalazi se na poziciji 1007  $\text{cm}^{-1}$  i potiče od CH<sub>3</sub> grupe koja je pomoću C-C vibracije vezana za polienski lanac (Schulz et al., 2005).

Pozicija traka koje ukazuju na karotenoide je specifična (Slika 2A), ali u velikoj meri zavisi od položaja bočnih grupa i broja konjugovanih veza karotenoida (Slika 2B), tako npr. traka na poziciji 1522  $\text{cm}^{-1}$  ukazuje na dužinu polienskog lanca koji je građen od devet konjugovanih C=C veza (Baranski et al., 2005; Rys et al., 2014). Karakteristične trake na pozicijama 1007,



**Slika 1.** Ramanovi spektri kontrolnih i listova *C. album* (A) i *A. theophrasti* (B) tretiranih mezotrienom (tri i sedam DNP), trake karakteristične za karotenoide su u sledećim regionima 1007, 1155-1160 i 1522-1525  $\text{cm}^{-1}$

**Figure 1.** Raman spectra of untreated and leaves of *C. album* (A) and *A. theophrasti* (B) treated with mesotriene (3<sup>rd</sup> and 7<sup>th</sup> DAT), with carotenoid-specific bands in the following regions: 1007, 1155-1160 and 1522-1525  $\text{cm}^{-1}$



**Slika 2.** Ramanovi spektri dominantnih karotenoida: β-karoten, lutein snimljeni na talasnoj dužini 532 nm (A) i hemijske strukture dominantnih karotenoida u listovima (B)

**Figure 2.** Raman spectra of dominant carotenoids: β-carotene, lutein recorded at 532 nm wavelength (A) and chemical structures of the most dominant carotenoids present in leaves (B)

1155 i 1522  $\text{cm}^{-1}$  ukazuju na prisustvo  $\beta$ -karotena, dok trake na pozicijama 1007, 1155 i 1525  $\text{cm}^{-1}$  se pripisuju luteinu (Slika 2A). Dominantne trake u regionima 1155-1160 i 1522-1525  $\text{cm}^{-1}$  se često koriste da se opišu ukupni karotenoidi u odabranim uzorcima (Schultz et al., 2005; Baranska et al., 2006, 2011; Rys et al., 2014). Dobijeni rezultati intenziteta traka u sledeća tri regiona 1007, 1155-1160 i 1522-1525  $\text{cm}^{-1}$  za *C. album* i *A. theophrasti* su pokazali da postoji statistički značajna razlika između analiziranih uzoraka kontrolnih i biljaka tretiranih mezotrionom tri i sedam DNP herbicida. Kod uzoraka koji su analizirani prvog i drugog DNP nije utvrđena statistički značajna razlika između kontrolnih i biljaka tretiranih mezotrionom (Tabela 1-3).

**Tabela 1.** Uticaj mezotriona na intenzitet trake na poziciji 1007  $\text{cm}^{-1}$  u Ramanovim spektrima listova *C. album* i *A. theophrasti*  
**Table 1.** The effects of mesotrione on the band intensity at position 1007  $\text{cm}^{-1}$  in the Raman spectra obtained from the leaves of *C. album* and *A. theophrasti*

<b>C. album</b>	<b>Intenzitet trake na poziciji 1007 <math>\text{cm}^{-1}</math></b> <b>The band intensity at position 1007 <math>\text{cm}^{-1}</math></b>			
	<b>Prvi DNP</b>	<b>Drugi DNP</b>	<b>Treći DNP</b>	<b>Sedmi DNP</b>
Kontrola	0,2324 $\pm$ 0,053	0,2199 $\pm$ 0,015	0,2040 $\pm$ 0,010	0,2111 $\pm$ 0,057
Tretirano	0,1906 $\pm$ 0,024	0,1866 $\pm$ 0,013	0,189 $\pm$ 0,01	0,1877 $\pm$ 0,01
P*	8,20 <sup>ns</sup>	4,81 <sup>ns</sup>	6,34 <sup>ns</sup>	<b>0,007**</b>
<b>A. theophrasti</b>	<b>Intenzitet trake na poziciji 1007 <math>\text{cm}^{-1}</math></b> <b>The band intensity at position 1007 <math>\text{cm}^{-1}</math></b>			
	<b>Prvi DNP</b>	<b>Drugi DNP</b>	<b>Treći DNP</b>	<b>Sedmi DNP</b>
Kontrola	0,2028 $\pm$ 0,009	0,2004 $\pm$ 0,03	0,2024 $\pm$ 0,012	0,1933 $\pm$ 0,011
Tretirano	0,2053 $\pm$ 0,018	0,2023 $\pm$ 0,02	0,1898 $\pm$ 0,013	0,1891 $\pm$ 0,011
P*	0,409 <sup>ns</sup>	0,365 <sup>ns</sup>	1,07 <sup>ns</sup>	0,07 <sup>ns</sup>

\*P < 0,01\*\* - statistički veoma značajna razlika; 0,01 < P < 0,05\* - statistički značajna razlika; P > 0,05 ns - nema statistički značajnih razlika

Pozicija traka karakterističnih za karotenoide u listovima je ista kod kontrolnih biljaka obe biljne vrste (Slika 1, Tabela 1-3). Pozicija traka karakterističnih za karotenoide je bila ista (pomeraj od 3-5  $\text{cm}^{-1}$ ) kod obe korovske vrste poređenjem listova kontrolnih biljaka sa listovima tretiranim mezotrionom, što ukazuje da se uticaj herbicida ne može zapaziti kroz parametar pozicije karakterističnih traka.

Statistički značajne razlike o uticaju herbicida na karotenoide su zapažene kod *C. album* u intenzitetu traka u terminima trećeg i sedmog DNP herbicida posebno kod trake najvećeg intenziteta na poziciji 1522  $\text{cm}^{-1}$  (Slika 1, Tabela 3). U prethodnim istraživanjima je utvrđeno da vizuelni simptomi delovanja mezotriona na tretirane biljke postaju uočljivi tri do četiri DNP (Vranješ i sar., 2016, Vranješ et al., 2019). Iz tog razloga je sadržaj karotenoida u listovima biljaka *C. album* i *A. theophrasti* tretiranih preporučenom količinom mezotriona (120 g a.s. ha<sup>-1</sup>)

**Tabela 2.** Uticaj mezotriona na intenzitet trake na poziciji 1155-1160  $\text{cm}^{-1}$  u Ramanovim spektrima listova *C. album* i *A. theophrasti*

**Table 2.** The effects of mesotrione on the band intensity at position 1155-1160  $\text{cm}^{-1}$  in the Raman spectra obtained from the leaves of *C. album* and *A. theophrasti*

<b>C. album</b>	<b>Intenzitet trake na poziciji 1155-1160 <math>\text{cm}^{-1}</math></b> <b>The band intensity at position 1155-1160 <math>\text{cm}^{-1}</math></b>			
	<b>Prvi DNP</b>	<b>Drugi DNP</b>	<b>Treći DNP</b>	<b>Sedmi DNP</b>
Kontrola	0,6563 ±0,071	0,6885±0,024	0,6714 ±0,019	0,6419 ±0,070
Tretirano	0,5869 ±0,042	0,6096 ±0,020	0,5841 ±0,024	0,5841 ±0,014
P*	1,35 <sup>ns</sup>	1,74 <sup>ns</sup>	1,25 <sup>ns</sup>	1,04 <sup>ns</sup>
<b>A. theophrasti</b>	<b>Intenzitet trake na poziciji 1155-1160 <math>\text{cm}^{-1}</math></b> <b>The band intensity at position 1155-1160 <math>\text{cm}^{-1}</math></b>			
	<b>Prvi DNP</b>	<b>Drugi DNP</b>	<b>Treći DNP</b>	<b>Sedmi DNP</b>
Kontrola	0,6841 ±0,020	0,6778 ±0,023	0,6783 ±0,022	0,6393 ±0,021
Tretirano	0,6781 ±0,026	0,6738 ±0,029	0,6371 ±0,033	0,6216 ±0,025
P*	0,219 <sup>ns</sup>	0,457 <sup>ns</sup>	6,17 <sup>ns</sup>	<b>0,000**</b>

\*P < 0,01\*\* -statistički veoma značajna razlika; 0,01 < P < 0,05\* - statistički značajna razlika; P > 0,05 ns-nema statistički značajnih razlika

**Tabela 3.** Uticaj mezotriona na intenzitet trake na poziciji 1522-1525  $\text{cm}^{-1}$  u Ramanovim spektrima dobijenih u listova *C. album* i *A. theophrasti*

**Table 3.** The effects of mesotrione on the band intensity at position 1522-1525  $\text{cm}^{-1}$  in the Raman spectra obtained from the leaves of *C. album* and *A. theophrasti*

<b>C. album</b>	<b>Intenzitet trake na poziciji 1522-1525 <math>\text{cm}^{-1}</math></b> <b>The band intensity at position 1522-1525 <math>\text{cm}^{-1}</math></b>			
	<b>Prvi DNP</b>	<b>Drugi DNP</b>	<b>Treći DNP</b>	<b>Sedmi DNP</b>
Kontrola	0,9976 ±0,001	0,9977 ±0,001	0,9978 ±0,001	0,9976 ±0,001
Tretirano	0,9973 ±0,001	0,9977 ±0,001	0,9968 ±0,001	0,9976 ±0,001
P*	0,519 <sup>ns</sup>	0,726 <sup>ns</sup>	0,005**	0,899 <sup>ns</sup>
<b>A. theophrasti</b>	<b>Intenzitet trake na poziciji 1155-1160 <math>\text{cm}^{-1}</math></b> <b>The band intensity at position 1155-1160 <math>\text{cm}^{-1}</math></b>			
	<b>Prvi DNP</b>	<b>Drugi DNP</b>	<b>Treći DNP</b>	<b>Sedmi DNP</b>
Kontrola	0,9978 ±0,000	0,9977 ±0,001	0,9976 ±0,001	0,9975 ±0,001
Tretirano	0,9980 ±0,001	0,9977 ±0,001	0,9978 ±0,001	0,9980 ±0,001
P*	0,374 <sup>ns</sup>	0,993 <sup>ns</sup>	0,518 <sup>ns</sup>	<b>0,035*</b>

\*P < 0,01\*\* -statistički veoma značajna razlika; 0,01 < P < 0,05\* - statistički značajna razlika; P > 0,05 ns-nema statistički značajnih razlika

analiziran primenom Ramanove spektroskopije prvog, drugog, trećeg i sedmog DNP herbicida, kako bi se procenile mogućnosti primene ove metode za praćanje promena u sadržaju ovih pigmentata pre nego što promene postanu i vizuelno jasno uočljive. Kod vrste *C. album* je utvrđeno postojanje statistički značajne razlike između tretiranih i kontrolnih biljaka trećeg i sedmog DNP mezotriona, za trake na pozicijama 1522 i 1007  $\text{cm}^{-1}$  (Tabela 1 i 3), svaki za sebe, dok tokom prvog i drugog DNP nije bilo značajne razlike ni za jedan od tri karakteristična pika za karotenoide (Tabela 1-3).

Kod *A. theophrasti* je utvrđeno postojanje statistički veoma značajne razlike između tretiranih i kontrolnih biljaka za trake na pozicijama 1160 i 1525  $\text{cm}^{-1}$  samo sedmog DNP mezotriona, dok za prvi, drugi i treći DNP nije bilo značajnih razlika (Tabela 2 i 3). Moguće je da se dobijeni rezultati, primenom Ramanove spektroskopije, koji ukazuju na kasniji uticaj mezotriona na promene relativnog sadržaja karotenoida kod *A. theophrasti* mogu pripisati specifičnoj građi epidermisa lica lista, koji ima brojnije dlake u poređenju sa *C. album* gde su se promene mogle zapaziti već trećeg dana nakon primene mezotriona. Sve pomenute površinske strukture lista *A. theophrasti* zajedno doprinose snažnoj barijeri za apsorpciju herbicida preko lisne površine (Sanyal et al., 2006) i posledično kasniji uticaj na relativni sadržaj karotenoida u listovima biljaka tretiranih herbicidima.

Do sada je Ramanova spektroskopija jedino bila primenjivana za procenu uticaja mezotriona, kao i drugih inhibitora biosinteze karotenoida (diflufenikan, klomazon) i amidosulfurona kroz istraživanje sadržaja karotenoida i hlorofila u listovima suncokreta (Vitek i sar., 2017). Saglasno rezultatima ove studije, naša istraživanja ukazuju da je primenom Ramanove spektroskopije moguća jasna detekcija uticaja mezotriona na karotenoide u listovima *C. album* već trećeg DNP herbicida. Imajući u vidu da se mehanizam delovanja mezotriona zasniva na inhibiciji biosinteze karotenoida dobijeni rezultati u ovom istraživanju su bili i očekivani i ukazuju na mogućnosti primene Ramanove spektroskopije, kao brze, nedestruktivne i efikasne metode, za skrining fiziološkog stanja kroz analizu hemijskog profila kako korovskih tako i gajenih biljaka u uslovima različitih vrsta stresa na biljke.

## ZAHVALNICA

Ovaj rad rezultat je rada u okviru projekta 451-03-68/2020-14/200116, Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja R. Srbije.

## LITERATURA

- Armel, G., Wilson, H., Richardson, R., Hines, T.*: Mesotrione alone and in mixtures with glyphosate in glyphosate-resistant corn (*Zea mays*). *Weed Technology*, 17, 680–685, 2003.
- Baranska, M., Baranski, R., Schulz, H., Nothnagel, T.*: Tissue-specific accumulation of carotenoids in carrot roots. *Planta*, 224, 1028–1037, 2006.



- Baranska, M., Baranski, R., Grzebelus, E., Roman, M.:** In situ detection of a single carotenoids crystal in a plant cell using Raman microspectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 56, 166–169, 2011.
- Baranski, R., Baranska, M., Schulz, H.:** Changes in carotenoid content and distribution in living plant tissue can be observed and mapped in situ using NIR-FT-Raman spectroscopy. *Planta*, 222, 448–457, 2005.
- Brosnan, J., Kopsell, D., Elmore, M., Breeden, G., Armel, G.:** Changes in 'Rivera' Bermudagrass (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.) Carotenoids Pigments after Treatment with Three p-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase-inhibiting Herbicides. *Horticultural Science*, 46, 493-498, 2011.
- Burghardt, M., Friedmann, A., Schreiber, L., Riederer, M.:** Modelling the effects of alcohol ethoxylates on diffusion of pesticides in the cuticular wax of *Chenopodium album* leaves. *Pest Management Science*, 62, 137–147, 2006.
- Creech, J., Monaco, T., Evans, J.:** Photosynthetic and growth responses of *Zea mays* L. and four weed species following post-emergence treatments with mesotrione and atrazine. *Pest Management Science*, 60, 1079–1084, 2004.
- DiTomaso, J., Healy, E.:** Weeds of California and other Western States. University of California, Agriculture and Natural Resources, Oakland, California, 2007.
- Gierlinger, N., Schwanninger M.:** The potential of Raman microscopy and Raman imaging in plant research Review. *Spectroscopy*, 21, 69–89, 2007.
- Hassing, S., Jernshoj, K., Christensen, L.:** Raman Spectroscopy: A Non-Destructive and On-Site Tool for Control of Food Quality?, Food Quality, Dr. Kostas Kapisris (Ed.), ISBN: 978-953-51-0560-2, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/food-quality/raman-spectroscopy-a-non-destructive-and-onsite-tool-for-control-of-food-quality> 2012.
- Joy, M., Abit, M., Al-Khatib, K.:** Absorption, Translocation, and Metabolism of Mesotrione in Grain *Sorghum*. *Weed Science*, 57, 563-566, 2009.
- Mastebroek, H., van Soest, L., Siemonsma, J.:** *Chenopodium* L. (grain chenopod). In: Grubben, G.J.H. & Partohardjono, S. (Eds.). *Plant Resources of South-East Asia*, 10, 79–83, 1996.
- Menges, F.:** „Spectragryph - optical spectroscopy software”, Version 1.2.13, 2018, <http://www.ffmpeg2.de/spectragryph/> 2018.
- Mitchell, G., Bartlett, D., Fraser, T., Hawkes, T., Holt, D., Towson, J., Wichert, R.:** Mesotrione: a new selective herbicide for use in maize. *Pest Management Science*, 57, 120-128, 2001.
- Nešković, M., Konjević, R., Čulafić, Lj.:** Fiziologija biljaka. NNK-International, 2003.
- Rodriguez-Amaya, D. B.:** A guide to carotenoids analysis in foods. Washington, D. C. ILSI Press ILSI Human Nutrition Institute. One Thomas Circle, NW, Washington DC, 2005-5802, 64, 2001.
- Rys, M., Juhász, C., Surówka, E., Janeczko, A., Saja, D., Tóbiás, I., Skoczowski, A., Barna, B., Gullner, G.:** Comparison of a compatible and an incompatible pepper-tobamovirus interaction by biochemical and non-invasive techniques: chlorophyll a fluorescence, isothermal calorimetry and FT-Raman spectroscopy. *Plant Physiology and Biochemistry*, 83, 267-278, 2014.
- Ryś, M., Szalaniec, M., Skoczowski, A., Stawoska, I., Janeczko, A.:** FT-Raman spectroscopy as a tool in evaluation the response of plants to drought stress. *Open Chemistry formerly. Central European Journal of Chemistry*, 13, 1091-1100, 2015.
- Sanyal, D., Bhowmil, P. C., Reddy, K. N.:** Influence of Leaf Surface Micromorphology, Wax Content, and Surfactant on Primisulfuron Droplet Spread on Barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) and Green Foxtail (*Setaria viridis*). *Weed Science*, 54, 627–633, 2006.
- Schulz, H., Baranska, M., Baranski, R.:** Potential of NIR-FT-Raman Spectroscopy in Natural Carotenoids Analysis. *Biopolymers*, 77, 212-221, 2005.
- Skoczowski, A., Troc, M.:** Isothermal Calorimetry and Raman Spectroscopy to Study Response of Plants to Abiotic and Biotic Stresses, In *Molecular Stress Physiology of Plants*, Editors: Gyana Ranjan Rout, Anath Bandhu Das, Springer Dordrecht Heidelberg New York London, 2013.
- Topolovec, D.:** Herbicidi i mehanizmi delovanja. *Glasnik zaštite bilja*, 3, 61-66, 2008.

- Vitek, P., Novotna, K., Hodanova, P., Rapantova, B., Klem, K.: Detection of herbicide effects on pigment composition and PSII photochemistry in *Helianthus annuus* by Raman spectroscopy and chlorophyll  $\alpha$  fluorescence. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 170, 234-241, 2017.
- Vranješ, F., Arsenijević, N., Božić, D.: Osetljivost *Chenopodium album* i *Abutilon theophrasti* na mezotriion u zavisnosti od fenofaze razvoja. *Acta herbologica*, 25, 27-34, 2016.
- Vranješ, F., Vrbnicanin, S., Nedeljkovic, D., Savic, A., Bozic, D.: The response of *Chenopodium album* L. and *Abutilon theophrasti* Medik. to reduced doses of mesotrione. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 54, 615-621, 2019.
- Vrbnicanin, S., Božić, D.: *Abutilon theophrasti* Medik. – lipica Teofrastova. *Acta herbologica*, 26, 5-19, 2017.
- Zeise, I., Heiner, Z., Holz, S., Joester, M., Büttner, C., Kneipp, J.: Raman Imaging of Plant Cell Walls in Sections of *Cucumis sativus*. *Plants*, 7(1), 7, 2018.

## Use of Raman spectroscopy for determining the effects of herbicides on the carotenoid content in *Chenopodium album* and *Abutilon theophrasti* leaves

### SUMMARY

Raman spectroscopy has so far proved to be a suitable method for the analysis of carotenoids in a wide range of plant samples. This study aimed to determine whether the influence of mesotrione on the changes in carotenoid content of leaves in treated weed species *Chenopodium album* and *Abutilon theophrasti* can be detected using Raman spectroscopy. When the plants reached the targeted growth stages (*C. album*: 4 leaves, *A. theophrasti*: 2 leaves), Skaut herbicide (a.i. mesotrione 480 g l<sup>-1</sup>, SC) was applied in the amount of 120 g a.i. ha<sup>-1</sup> in the tank mix with the adjuvant Alteox wet 40 (a.i. mineral oil (500 g L<sup>-1</sup>) + polyoxy alcohol (500 g L<sup>-1</sup>)), in the amount of 1 L ha<sup>-1</sup>. Leaf analysis, using Raman spectroscopy, was performed four times: on the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup>, and 7<sup>th</sup> day after the application of mesotrione. The intensity of the bands in the obtained Raman spectra, at positions 1007, 1155, and 1522 cm<sup>-1</sup> in untreated and treated plants was analysed to determine the relative carotenoid content. The obtained results have shown that changes in the relative carotenoid content in the leaves of treated *C. album* plants can be detected as early as 3 days after the application of mesotrione, compared to the leaves of untreated plants of the same age. Meanwhile, a statistically significant difference for the same parameter in the leaves of treated *A. theophrasti* plants was evident at a later stage than in *C. album*, on the 7<sup>th</sup> day after the application of mesotrione. Consequently, this study has confirmed that Raman spectroscopy can be used as an adequate method for the rapid detection of the effect of herbicides on the content of carotenoids in the leaves of treated weed species.

**Keywords:** Raman microscopy, relative carotenoid content, mesotrione, lamb's quarters, Velvetleaf.