

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Dragana S. Bosnić

**Uloga silicijumove kiseline u modulaciji odgovora  
krastavca (*Cucumis sativus* L.) na oksidativni stres  
izazvan toksičnim koncentracijama bakra**

doktorska disertacija

Beograd, 2020.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Dragana S. Bosnić

**The role of silicic acid in modulation of oxidative  
stress responses in cucumber (*Cucumis sativus* L.)  
exposed to toxic copper**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020.

Mentori:

dr Jelena Samardžić, naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

dr Svetlana Radović, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Članovi komisije:

dr Jelena Samardžić, naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

dr Svetlana Radović, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Jelena Pavlović, naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu, Institut za multidisciplinarna istraživanja

Datum odbrane:

*Ova doktorska disertacija realizovana je u Laboratoriji za molekularnu biologiju biljaka Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, u okviru projekta osnovnih istraživanja Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom „Molekularni mehanizmi odgovora biljaka na abiotički stres-uloga transkripcionih faktora i malih RNK i analiza genetičkog diverziteta biljnih kultura od interesa za poljoprivredu i biotehnologiju (173005)“. Zahvaljujem se svima koji su na bilo koji način učestovali u izradi ove doktorske disertacije:*

*mentoru dr Jeleni Samardžić na ukazanom poverenju, posvećenosti, savetima, razumevanju i strpljenju tokom izrade ove doktorske disertacije.*

*mentoru dr Svetlani Radović na podršci i svim korisnim savetima koji su doprineli izradi finalne verzije ove doktorske disertacije;*

*dr Miroslavu Nikoliću na podršci, konstruktivnoj diskusiji i savetima tokom izrade ove doktorske disertacije;*

*dr Jeleni Pavlović na pomoći u eksperimentalnom radu, na kritičkom čitanju rukopisa i sugestijama koje su doprinele finalnom oblikovanju ove disertacije;*

*svim članovima Laboratorije za molekularnu biologiju biljaka, bivšim i sadašnjim, dr Vesni Maksimović na ukazanom poverenju, dr Gordani Timotijević a naročito dr Dragani Nikolić na svoj pomoći u eksperimentalnom radu, savetima i neprocenjivoj diskusiji, dr Miri Milisavljević i dr Miloradu Kojiću na korisnim sugestijama, ostalim članovima dr Jeleni Aleksić, dr Bojani Banović i doktorandima Jeleni P, Ivani i Sofiji na lepom druženju i dobroj atmosferi u Labu;*

*članovima Grupe za ishranu biljaka, Instituta za multidisciplinarna istraživanja za pomoć u eksperimentalnom radu;*

*kolegicama i drugaricama iz Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Kris i Sandri na mentalnoj podršci i ohrabrenju, kao i Vladanki, Danijeli i Jeleni na divnom druženju;*

*mojoj porodici koja me je uvek podržavala, suprugu Predragu i sinu Mihailu i mojim roditeljima kojima posvećujem ovu doktorsku disertaciju.*

**Naslov:** Uloga silicijumove kiseline u modulaciji odgovora krastavca (*Cucumis sativus* L.) na oksidativni stres izazvan toksičnim koncentracijama bakra

**Sažetak:** Bakar (Cu) je esencijalan mikroelement za biljke, dok je prisustvo Cu u višku fitotoksično i izaziva oksidativni stres. Silicijum (Si) ne pripada grupi esencijalnih već korisnih elemenata, a jedini je element koji ispoljava protektivni efekat na biljke izložene stresnim uslovima. Uloga Si u stresu izazvanom toksičnim koncentracijama Cu nije dovoljno istražena. Cilj ovog rada bio je da se ispituju mehanizmi delovanja Si u takvim uslovima kod krastavca, akumulatora Si. Rezultati su pokazali da primena Si povećava toleranciju biljaka na toksičnost Cu. Mehanizmi delovanja Si su usmereni ka snižavanju ekspresije gena odgovornih za usvajanje Cu i, posledično, smanjenju koncentracije Cu u biljkama, kao i ka ublažavanju disbalansa drugih esencijalnih mikroelemenata, pre svega gvožđa. Na taj način, Si je smanjio hlorozu i povećao biomasu listova biljaka. Si je doprineo preraspodeli Cu na nivou ćelija korena, povećavajući imobilizaciju Cu u ćelijskim zidovima. Povećanom akumulacijom liganada koji vezuju Cu, kao što su organske kiseline (citrati i malat u korenu, a akonitat u listu) i aminokiseline (nikocijanamin i histidin u listu), Si je ublažio toksične efekte Cu unutar ćelije. Pored toga, stimulacijom aktivnosti antioksidativnih enzima, smanjen je nivo oksidativnog stresa. Primena Si je uticala na glavne regulatore homeostaze Cu, mikro RNK (miR398 i miR408), čija je snižena ekspresija u korenu omogućila povišenu ekspresiju njihovih targeta: Cu/Zn superoksid-dismutaze 2 (CSD2) i lakaze 3. U skladu sa tim, akumulacija Cu-proteina, CSD2 u korenu i plastocijanina u listu, kao primarnih depoa Cu jona je izraženija kod biljaka gajenih sa Si. Razumevanje mehanizama delovanja Si u biljkama će doprineti njegovoj široj primeni u cilju povećanja tolerancije biljaka na stres.

**Ključne reči:** toksičnost bakra, silicijum, oksidativni stres, organske kiseline, nikocijanamin, histidin, CSD2, plastocijanin, mikro RNK, krastavac (*Cucumis sativus* L.)

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Molekularna biologija biljaka

**Title:** The role of silicic acid in modulation of oxidative stress responses in cucumber (*Cucumis sativus* L.) exposed to toxic copper

**Abstract:** Copper (Cu) is an essential microelement for plants, although it is phytotoxic in excess, causing oxidative stress. Silicon (Si) does not belong to the essential but beneficial elements, and it is the only known element with protective effect to plants exposed to stress. The role of Si in plants exposed to Cu-stress has not been thoroughly studied so far. The aim of this study was to investigate the Si-mediated mechanisms under such conditions in cucumber plants, a Si-accumulating species. The results showed that Si application enhanced plant tolerance to Cu in excess. Si-mediated mechanisms were directed towards downregulation of the genes involved in Cu uptake, thus decreasing Cu concentration in the treated plants, as well as alleviating imbalance of other microelements, particularly Fe. Consequently, Si alleviated chlorosis supporting higher leaf biomass production in these plants. Si contributed to the redistribution of Cu at the root cell level, by increasing the immobilization of Cu in the cell walls. Higher accumulation of Cu-binding ligands such as organic acids (citrate and malate in the roots and aconitate in the leaves) and amino acids (nicotianamine and histidine in the leaves) diminished Cu-toxicity effects inside the cells. Additionally, a decreased level of oxidative stress was achieved by Si-stimulated activities of antioxidative enzymes. Si-application downregulated the expression of micro RNAs (miR398 and miR408), the main regulators of Cu homeostasis, thus enabling higher expression of their target genes: Cu/Zn superoxide dismutase 2 (*CSD2*) and laccase 3. Accordingly, accumulation of Cu-proteins, *CSD2* in the roots and plastocyanine in the leaves, as “buffering sinks” for Cu, was obtained in the plants grown with Si. Understanding the Si-mediated mechanisms in plants will contribute to its broader application with the aim to increase plant tolerance to stress.

**Key words:** Cu toxicity, silicon, oxidative stress, organic acids, nicotianamine, histidine, *CSD2*, plastocyanine, micro RNAs, cucumber (*Cucumis sativus* L.)

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfield:** Plant molecular biology

## Sadržaj

<b>1</b>	<b>Uvod</b>	1
1.1	Mineralni sastav biljaka	1
1.2	Osobine i uloge bakra u biljkama	2
1.2.1	Cu-proteini	2
1.2.2	Uloga bakra u lignifikaciji	5
1.3	Usvajanje, transport i distribucija bakra	6
1.3.1	Transporteri bakra	6
1.3.2	Transport bakra unutar ćelije	8
1.3.3	Transport kroz stablo i distribucija bakra u nadzemnom delu biljke	9
1.4	Regulacija homeostaze bakra kod biljaka	11
1.4.1	Transkripciona regulacija ekspresije gena uključenih u metabolizam bakra	11
1.4.2	Post-transkripciona regulacija genske ekspresije putem mikroRNK	12
1.4.3	Regulacija preraspodele bakra u biljnoj ćeliji	13
1.4.4	Translacioni i post-translacioni mehanizmi regulacije ekspresije gena	15
1.5	Bakar u zemljištu	15
1.6	Bakar u biljkama	16
1.6.1	Deficit bakra u biljkama	17
1.6.2	Toksičnost bakra kod biljaka	18
1.7	Oksidativni stres	19
1.8	Antioksidativna zaštita	20
1.9	Mehanizmi tolerancije viška bakra	22
1.9.1	Jedinjenja koja heliraju bakar	23
1.9.1.1	Metalotioneini	24
1.9.1.2	Fitohelatini	24
1.9.1.3	Organske kiseline	24
1.9.1.4	Aminokiseline	25
1.10	Silicijum u biljkama	26
1.10.1	Usvajanje i transport Si	27
1.10.2	Silicijum kao koristan element za biljke	29
1.10.3	Uloga Si u zaštiti biljaka od faktora abiotičkog stresa	30
1.11	Biljke krastavca kao model sistem	32
<b>2</b>	<b>Ciljevi rada</b>	<b>33</b>

<b>3 Materijal i metode</b> .....	34
3.1 Gajenje biljaka.....	34
3.1.1 Biljni materijal i uslovi gajenja u hidroponičnoj kulturi.....	34
3.1.2 Priprema silicijumove kiseline .....	34
3.1.3 Testiranje efekata različitih koncentracija bakra .....	34
3.1.4 Tretmani biljaka bakrom i silicijumom .....	35
3.1.5 Praćenje rasta i izgleda biljaka .....	35
3.1.6 Priprema biljnog materijala za analize .....	35
3.2 Određivanje sadržaja hlorofila.....	35
3.3 Određivanje mineralnog sastava u biljnim organima .....	36
3.4 Merenje koncentracije Cu u ćelijskim frakcijama .....	36
3.4.1 Frakcionacija biljnih tkiva .....	36
3.4.2 Priprema frakcija za merenje koncentracije Cu.....	36
3.5 Određivanje stepena oštećenja korena.....	37
3.6 Merenje sadržaja ukupnih fenola.....	37
3.7 Histoheмиjsko bojenje lignina u korenu .....	37
3.8 Merenje nivoa peroksidacije lipida.....	38
3.9 Analize proteina.....	38
3.9.1 Ekstrakcija proteina .....	38
3.9.2 Merenje koncentracije proteina .....	38
3.9.3 Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima .....	39
3.9.4 Vertikalna elektroforeza na poliakrilamidnom gelu pod denaturišućim uslovima (SDS-PAGE) ..	39
3.9.5 Transfer proteina na membranu i i imunoheмиjska detekcija proteina (Western blot) .....	40
3.10 Analiza ekspresije gena .....	41
3.10.1 Ekstrakcija ukupne RNK.....	41
3.10.2 Tretman dezoksiribonukleazom .....	41
3.10.3 Sinteza komplementarne DNK (cDNK).....	42
3.10.4 Dizajn prajmera .....	42
3.10.5 Umnožavanje DNK fragmenata metodom lančane reakcije polimeraze (PCR).....	43
3.10.6 Kvantitativni PCR u realnom vremenu.....	44
3.11 Analiza organskih kiselina.....	45
3.11.1 Priprema uzoraka za analizu .....	45
3.11.2 Identifikacija i kvantifikacija organskih kiselina tečnom hromatografijom visokih performansi ..	45
3.12 Analiza aminokiselina .....	46
3.12.1 Ekstrakcija aminokiselina iz lista biljaka .....	46



3.12.2	Kvantifikacija aminokiselina tečnom hromatografijom visokih performansi .....	46
3.13	Statistička obrada podataka .....	46
<b>4</b>	<b>Rezultati</b> .....	<b>47</b>
4.1	Testiranje različitih koncentracija bakra na biljkama krastavca .....	47
4.1.1	Utvrđivanje efekata različitih doza Cu na parametre rasteња .....	47
4.1.2	Utvrđivanje efekata različitih doza Cu na parametar oksidativnog stresa.....	49
4.2	Ispitivanje uticaja Si na fiziološke parametre biljaka u stresu.....	50
4.2.1	Vizuelni simptomi stresa .....	50
4.2.2	Promene u biomasi biljaka .....	51
4.2.3	Analiza sadržaja hlorofila .....	52
4.2.4	Analiza stepena oštećenja korena .....	52
4.2.5	Analiza nivoa lignifikacije i ukupnih fenola .....	53
4.2.6	Analiza ekspresije fenilalanin-amonijum-liaze u korenu .....	53
4.2.7	Analize ekspresije lakaze i miR408 u korenu.....	55
4.3	Ispitivanje uticaja Si na usvajanje, akumulaciju i preraspodelu Cu i drugih mikroelemenata u biljkama krastavca.....	56
4.3.1	Koncentracija bakra u korenu i listovima biljaka.....	56
4.3.2	Analiza ekspresije COPT1 transportera i FRO4 reduktaze .....	57
4.3.3	Ukupan sadržaj mikroelemenata (Cu, Fe, Zn i Mn) u listovima biljaka .....	58
4.3.4	Analiza sadržaja bakra u ćelijskim frakcijama .....	58
4.3.5	Koncentracija Cu u ćelijskom zidu.....	59
4.4	Određivanje efekta Si na antioksidativni status biljaka.....	60
4.4.1	Analiza nivoa lipidne peroksidacije.....	60
4.4.2	Analiza aktivnosti i genske ekspresije antioksidativnih enzima.....	62
4.4.2.1	Ukupna aktivnost superoksid-dismutaze .....	62
4.4.2.2	Analiza genske ekspresije Cu/Zn superoksid-dismutaze 2 i miR398.....	63
4.4.2.3	Aktivnost i genska ekspresija askorbat-peroksidaze .....	65
4.4.2.4	Aktivnost i genska ekspresija katalaze .....	67
4.5	Imunoblot analiza Cu/Zn SOD izoformi .....	68
4.6	Analiza plastocijanina.....	69
4.7	Analiza liganada bakra .....	70
4.7.1	Analiza ekspresije metalotioneina .....	70
4.7.2	Analiza ekspresije fitohelatin-sintaze .....	71
4.7.3	Analiza prisustva organskih kiselina .....	72
4.7.4	Analiza aminokiselina nikocijanamina i histidina .....	76

<b>5</b>	<b>Diskusija</b> .....	79
5.1	Uticao Si na fiziološke parametre stresa kod biljaka izloženih povišenim koncentracijama bakra .....	79
5.2	Uticao Si na ekspresiju lakaze i post-transkripcionog regulatora miR408.....	82
5.3	Uticao Si na usvajanje i distribuciju Cu u biljkama .....	83
5.4	Uticao Si na ekspresiju plastocijanina .....	86
5.5	Uticao Si na antioksidativnu zaštitu .....	87
5.6	Uticao Si na ekspresiju Cu/Zn SOD izoformi i post-transkripcionog regulatora miR398 .....	89
5.7	Uticao Si na sadržaj i distribuciju jedinjenja koja heliraju Cu u biljnim tkivima.....	91
5.8	Uloga Si kod kontrolnih biljaka i primena Si u poljoprivredi .....	95
5.9	Mehanizam delovanja Si na prevazilaženje stresa povišenim koncentracijama bakra kod krastavca....	96
<b>6</b>	<b>Zaključci</b> .....	98
<b>7</b>	<b>Literatura</b> .....	99

## **Biografija autora**

## **Izjava o autorstvu**

## **Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada**

## **Izjava o korišćenju**

# 1 Uvod

## 1.1 Mineralni sastav biljaka

Uloga mineralnih elemenata kao hraniva u rastu i razvoju biljaka otkrivena je pre oko 200 godina što je uslovalo osnivanje nove naučne discipline - mineralne ishrane biljaka, kao i razvoj mineralnih đubriva za unapređenje gajenja biljaka. Proučavanje mineralnih elemenata koji su esencijalni za život biljaka, počinje istraživanjima Justusa von Libiga u 19. veku. Prema definiciji, koju su postavili Arnon and Stout (1939), element je esencijalan za biljke ukoliko ispunjava sledeće kriterijume: a) biljke ne mogu da kompletiraju svoj životni ciklus u odsustvu tog elementa, b) uloga tog elementa ne može biti u potpunosti zamenjena nekim drugim i c) element mora biti direktno uključen u metabolizam biljaka. Postoji 17 elemenata koji potpuno ispunjavaju nabrojane kriterijume (**Slika 1.1**). Prema njihovom sadržaju u biljkama (prema potrebama biljke a ne prema fiziološkoj važnosti) izvršena je podela na makroelemente i mikroelemente. Grupi makroelemenata pripadaju: ugljenik (C), vodonik (H), kiseonik (O), azot (N), fosfor (P), kalijum (K), kalcijum (Ca), magnezijum (Mg) i sumpor (S), dok u grupu mikroelemenata spadaju: gvožđe (Fe), bakar (Cu), cink (Zn), mangan (Mn), molibden (Mo), hlor (Cl), nikel (Ni) i bor (B). Međutim, postoje i drugi elementi koji se mogu naći u biljkama i koji pokazuju povoljno dejstvo na sve ili samo na određene vrste biljaka i označeni su kao korisni elementi. Ovoj grupi pripadaju silicijum (Si), natrijum (Na), kobalt (Co) i selen (Se). Za neke grupe biljaka ili pod posebnim uslovima, ovi elementi su čak esencijalni. Iz toga razloga, Epstein and Bloom (2005) su predložili modifikovanu definiciju esencijalnih elemenata. Prema novoj definiciji, element je esencijalan ako ispunjava jedan ili oba sledeća uslova: a) element je deo molekula koji je suštinska komponenta neke strukture ili nekog metaboličkog puta u biljci, i b) njegov veliki nedostatak uzrokuje abnormalnosti u rastu, razviću ili reprodukciji u poređenju sa biljkama koje imaju manji nedostatak.

Elementi	Hemijski simbol	Koncentracija suve mase	
		ppm,%	µmol/g
<b>Makronutrijenti</b>			
Azot	N	1.5%	1000
Kalijum	K	1%	250
Fosfor	P	0.2%	60
Sumpor	S	0.1%	30
Kalcijum	Ca	0.5%	125
Magnezijum	Mg	0.2%	80
Silicijum	Si	0.1%	30
<b>Mikronutrijenti</b>			
Nikel	Ni	0.05 ppm	0.001
Molibden	Mo	0.1 ppm	0.001
Kobalt	Co	0.1 ppm	0.002
Bakar	Cu	6 ppm	0.1
Cink	Zn	20 ppm	0.3
Natrijum	Na	10 ppm	0.4
Magnezijum	Mn	50 ppm	1.0
Bor	B	20 ppm	2.0
Gvožđe	Fe	100 ppm	2.0
Hlor	Cl	100 ppm	3.0

**Slika 1.1.** Prosečne koncentracije mineralnih elemenata u biljkama. Slika modifikovana prema Epstein and Bloom (2005).

Potrebe biljaka za određenim esencijalnim elementima se razlikuju iako je fiziološka važnost svakog od njih podjednaka. Makroelementi su u biljkama prisutni u relativno visokim koncentracijama koje se mere u mg/g (više od 0,1% suve materije biljke), dok su mikroelementi zastupljeni u značajno manjim količinama, u µg/g (manje od 0,01% suve materije biljke) (**Slika 1.1**). Grupi mikroelemenata pripadaju metali Cu, Fe, Zn i Mn. Oni ulaze u sastav metaloproteina, tj. proteina koji sadrže jone metala kao kofaktore. Procenjuje se da metaloproteini čine oko 30% ukupnih proteina (Waldron et al. 2009). U grupu metaloproteina spadaju metaloenzimi, transkripcioni faktori, kao i proteini koji učestvuju u reakcijama transfera elektrona. Održavanje homeostaze metala u biljkama od suštinske je važnosti za pravilno funkcionisanje biljnih ćelija, a samim tim i cele jedinke.

## 1.2 Osobine i uloge bakra u biljkama

Bakar spada u grupu prelaznih metala, prisutan u dva redoks stanja, oksidovanom  $\text{Cu}^{2+}$  i redukovanom  $\text{Cu}^+$ . Osobina ovog metala da lako prima i otpušta elektrone čini ga idealnim kofaktorom enzima u redoks-reakcijama. Međutim, zbog ovog svojstva bakar se smatra visokoreaktivnim, stoga u ćeliji ne sme postojati niti jedan slobodan jon bakra (Rae et al. 1999). Redoks-ciklus bakra čini ga potentnim katalizatorom u produkciji slobodno-radikalnih vrsta i otuda potiče inherentna potencijalna toksičnost ovog metala. Bakar u obliku  $\text{Cu}^+$  ima visok afinitet prema sumporu, stoga se lako vezuje za tiolne grupe, dok  $\text{Cu}^{2+}$  koordiniše prvenstveno sa kiseonikom u karboksilnoj grupi kao i azotom u imidazolnom ostatku (Koch et al. 1997). U proteinima se najčešće vezuje za aminokiseline cistein, metionin i histidin. Proteini koji sadrže Cu kao kofaktor nazivaju se Cu-proteinima i odlikuju se visokom stabilnošću kompleksa. Smatra se da u biljkama postoji preko sto ovakvih proteina, koji imaju važnu ulogu u ćelijskom metabolizmu (Krämer and Clemens 2005). Cu-proteini učestvuju u reakcijama prenosa elektrona, prvenstveno u procesima fotosinteze i respiracije kao najvažnijim procesima za biljne ćelije. Osim toga, proteini koji sadrže Cu imaju ulogu u N i C metabolizmu, percepciji etilena, metabolizmu reaktivnih kiseoničnih vrsta, kao i u remodelovanju ćelijskog zida (Marschner 1995). Među najvažnije Cu-proteine spadaju: plastocijanin, Cu/Zn superoksid-dismutaza, citohrom-c-oksidaza, lakaza, askorbat-oksidaza, fenol-oksidaza, diamin-oksidaza, receptor za etilen, plantacijanin (Burkhead et al. 2009).

### 1.2.1 Cu-proteini

**Plastocijanin** je komponenta elektron-transportnog lanca fotosistema I (PSI) smeštenog u lumenu tilakoida u hloroplastima fotosintetičkih organizama, gde funkcioniše kao mobilni nosač elektrona (Raven et al. 1999). Za razliku od drugih fotosintetičkih organizama, kao na primer zelenih algi, on je esencijalan protein za biljke i mutacija u genu koji kodira plastocijanin ima letalan efekat, stoga je to najvažniji, ali i jedan od najzastupljenijih Cu-proteina (Shikanai et al. 2003; Weigel et al. 2003). Biosinteza prekursorske forme (apoplastocijanin) sa domenom za transport u organelu odvija se u citosolu, a finalno procesovanje do zrele forme proteina (holoplastocijanin) odvija se u hloroplastu, pri čemu nastaje protein od 10,5 kDa (Merchant and Bogorad 1987). Kofaktorski joni Cu se dodaju u hloroplastu a svaki molekul plastocijanina sadrži jedan atom Cu (Li et al. 1990). Pokazano je da u uslovima nedostatka Cu postoji direktna korelacija između koncentracije Cu u listovima, koncentracije plastocijanina i aktivnosti PSI (Droppa et al. 1984). S obzirom da je esencijalan, u uslovima nedostatka

Cu, plastocijanin ima prioritet u pogledu raspodele dostupnog Cu u ćeliji (Cohu and Pilon 2007; Yamasaki et al. 2007; Abdel-Ghany and Pilon 2008).

**Superoksid-dismutaza (SOD)** je enzim koji učestvuje u antioksidativnoj zaštiti, vršeći detoksifikaciju kiseoničnog radikala, superoksidnog anjona  $O_2^{\cdot-}$ . Ovaj enzim je prisutan kod svih aerobnih organizama i ima značajnu ulogu u preživljavanju u prisustvu kiseonika (Fridovich 1983). Postoji više izoenzima SOD koji se razlikuju po metalnom kofaktoru koji sadrže (mangan, gvožđe, bakar i cink). Cu/Zn SOD izoforma je evoluirala nezavisno od ostalih izoformi SOD (Bannister et al. 1991). Cu/Zn SOD sadrži po jedan atom bakra i cinka, a za detoksifikaciju  $O_2^{\cdot-}$  radikala upravo je odgovoran Cu, dok Zn ima samo strukturnu ulogu i njegova zamena drugim metalom ne utiče značajno na aktivnost ovog enzima (Bordo et al. 1994; Marino et al. 1995). Cu/Zn SOD je u formi dimera, ukupne molekulske mase od 32,5 kDa. Postoje različite izoforme Cu/Zn SOD enzima: citosolna CSD1, plastidna CSD2 i peroksizomalna CSD3 (Kliebenstein et al. 1998). Ekspresija i aktivnost Cu/Zn SOD enzima direktno zavisi od raspoloživosti bakra u ćelijama (Cohu and Pilon 2007; Huang et al. 2012; Boutigny et al. 2014). U uslovima nedostatka Cu, aktivnost Cu/Zn SOD naglo opada i njegovu ulogu preuzimaju funkcionalno komplementarni izoenzimi koji sadrže druge elemente kao kofaktore (Ayala and Sandmann 1988; Burkhead et al. 2009).

**Lakaze (LAC) i lakazama-slične fenol-oksidge** pripadaju superfamiliji enzima oksidoreduktaza koji se nazivaju multi-bakarne oksidge (eng. Multi Copper Oxidase, MCO) (McCaig et al. 2005). MCO enzimi katalizuju oksidaciju širokog spektra supstrata formirajući tako slobodno-radikalne vrste, reaktivne intermedijere, koji mogu da se unakrsno povezuju u dimere, oligomere i polimere i upravo se razlikuju po tipu supstrata koji se oksiduje (fenoli, amini i aromatični amini, kao i neorganski joni), pri čemu se kiseonik redukuje do dva molekula vode (Reinhammar and Malmström 1981; Solomon et al. 1996; Mayer and Staples 2002). Ovakav tip reakcija je prisutan u brojnim biološkim procesima. Lakaza je glikoprotein, veličine oko 60–130 kDa koji se nalazi u ekstracelularnom prostoru, u apoplastu (LaFayette et al. 1999; Ranocha et al. 1999; Morozova et al. 2007). Katalitičko jezgro lakaza čine 4 atoma bakra (Solomon et al. 1996). Iako su ovi enzimi davno otkriveni sve njihove funkcije u biljkama nisu do kraja razjašnjene (Turlapati et al. 2011). Lakaze učestvuju u biosintezi lignina, stoga imaju ulogu u održanje strukture i integriteta ćelijskog zida kao i u odgovoru na stres, zarastanju rana, lignifikaciji semenjače pa tako i zaštiti semena od spoljašnjih uticaja (Sterjiades et al. 1992; Bao et al. 1993; Dean and Eriksson 1994; Ranocha et al. 2002; Pourcel et al. 2005). Lakaze su kodirane multigenskom familijom (LaFayette et al. 1999). Višestruki mutanti za gene koji kodiraju lakaze imaju smanjen sadržaj lignina (Berthet et al. 2011; Zhao et al. 2013). Aktivnost i ekspresija lakaza zavise od sadržaja bakra u biljkama (Abdel-Ghany and Pilon 2008; Liu et al. 2015). Lakaze su rasprostranjene u prirodi; osim kod biljaka ovi enzimi postoje i kod gljiva i bakterija, i imaju biotehnošku primenu (Claus 2004; Riva 2006).

**Citohrom-c-oksidge (CCOX)** je transmembranski proteinski kompleks velike molekulske mase koji se nalazi na unutrašnjoj membrani mitohondrija i ima ulogu terminalne oksidge u elektron-transportnom lancu tokom respiracije (Carr and Winge 2003). Ovaj enzim postoji kod svih eukariota, bakterija i arhea (Castresana et al. 1994). Sadrži 3 atoma bakra kao kofaktora zajedno sa hemom. Najmanje 10 subjedinica čine kompleks citohrom-c-oksidge kod viših biljaka (Cohu and Pilon 2010). Transfer elektrona do kiseonika praćen je izbacivanjem protona u intermembranski prostor odnosno stvaranjem elektrohemijskog gradijenta neophodnog za sintezu ATPa tj. oksidativnu fosforilaciju, stoga kompleks citohrom-c-oksidge, ili kako se još naziva Kompleks IV, ima dualnu ulogu u mitohondrijama (Nešković et al. 2003). Smatra se da je ovaj kompleks glavno mesto regulacije oksidativne fosforilacije (Kadenbach et al. 2000). Snižena aktivnost CCOX povezana je sa izraženim deficitom Cu kod biljaka (Marschner 1995).

**Askorbat-oksidaza (AsO)** takođe pripada MCO grupi enzima i sadrži najmanje 4 atoma Cu (Farver and Pecht 1992). Ovaj glikoprotein je prisutan u apoplastu gde ima ulogu terminalne oksidaze. Katalizuje oksidaciju askorbata do monodehidro-askorbata. Aktivnost askorbat-oksidaze je senzitivni indikator statusa Cu u biljkama (Loneragan et al. 1982; Droppa et al. 1984; Esaka et al. 1992). Smanjena aktivnost AsO dovodi se u vezu sa povećanom tolerancijom na stres, dok povišena ekspresija AsO povećava senzitivnost na stresne faktore usled supresije ciklusa askorbata (Fotopoulos et al. 2006). Pored toga, aktivnost ovog enzima je generalno povezana sa deobom i ekspanzijom ćelija kao i porastom biomase, tako da se smatra da AsO ima ulogu u prenosu signala iz spoljašnje sredine u ćeliju (Stevens et al. 2017).

**Amino-oksidaze (AmO)** su Cu-proteini prisutni kod svih živih organizama. Spadaju u flavoproteine koji sadrže jedan atom bakra (Kumar et al. 1996). Kod biljaka su prisutni u ekstraćelijskom prostoru i katalizuju degradaciju amina do aldehida, amonijaka i vodonik-peroksida (Frébort et al. 2000). Ovi enzimi imaju ulogu u procesu diferencijacije ćelijskog zida ali i u toleranciji na stres - odbrani od napada patogena i u zarastanju rana kod biljaka (Rea et al. 2002; Angelini et al. 2008). Takođe, smatra se da imaju ulogu i u lignifikaciji upravo zbog proizvodnje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koji je neophodan za funkciju peroksidaza (Møller and McPherson 1998).

**Polifenol-oksidaze (PPO)** obuhvataju katehol-oksidaze i tirozinaze čiji su supstrati fenoli a njihovom oksidacijom nastaju o-kvinoni koji su visoko reaktivna jedinjenja i formiraju polimere braon boje (Guyot et al. 1996). Braon obojenost tkiva (enzimsko braonenje) nastaje kada PPO, inače prisutna u plastidima (u lumenu tilakoida), dođe u kontakt sa fenolima iz vakuole usled gubitka subćelijske lokalizacije (kompartimentacije) kao posledica oštećenja biljnih ćelija i tkiva pa se aktivnost ovog enzima vezuje za starenje, povrede, napad patogena, generalno stresne uslove (Steffens et al. 1994). PPO sadrže dva atoma bakra i nisu prisutne u celom biljnom carstvu (Mayer 2006).

**Receptor za etilen**, biljni hormon koji ima ulogu u rasteњу i razviću, starenju biljaka i sazrevanju plodova, je takođe, Cu-protein koji se nalazi na endoplazmatičnom retikulumu. Funkcioniše kao negativni regulator signalnog puta etilena - vezivanje etilena za receptor inhibira njegovu funkciju (Rodriguez et al. 1999; Hirayama and Alonso 2000). Ovi proteini pripadaju histidinskim kinazama i vrlo se razlikuju po strukturi i domenskoj organizaciji (Gallie 2015).

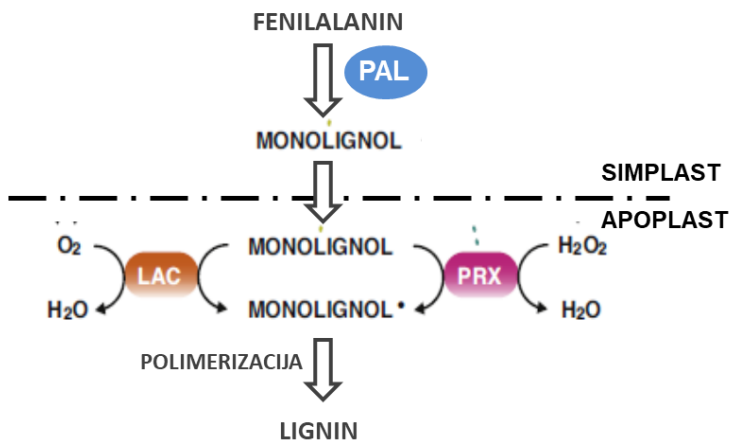
**Fitocijanini** su specifična familija Cu-proteina koji sadrže jedan atom Cu. Strukturno su slični plastocijaninu ali sadrže signalne sekvence za transport u endoplazmatični retikulum ili van ćelije (Cohu and Pilon 2010). Obuhvataju plantacijanin, stelacijanin i uklacijanin (Nersissian et al. 1998). Njihova funkcija nije do kraja razjašnjena ali se smatra da imaju ulogu u odgovoru na stres (Kreps et al. 2002), kao i ulogu u reprodukciji (Dong et al. 2005).

Bakar ima ulogu i u pozicioniranju molibdena kao kofaktora, tako što privremeno zauzima mesto insercije molibdena u Mo-proteinima tokom njihove biosinteze (Kuper et al. 2004). Stoga se Cu povezuje sa ulogom proteina koji imaju molibden kao kofaktor, a to je asimilacija azota i biosinteza biljnih hormona (Mendel 2005). Smatra se da Cu ima ulogu i u formiranju grana tilakoida (Bernal et al. 2006).

## 1.2.2 Uloga bakra u lignifikaciji

Lignin je najzastupljeniji biopolimer posle celuloze, koji čini 20-30% suve materije biljaka (Boerjan et al. 2003; Tobimatsu and Schuetz 2019). Lignin se formira u ćelijskom zidu, u prostoru između mikrofibrila celuloze (Boerjan et al. 2003). To je važan konstituent ksilemskih elemenata čime se obezbeđuje mehanička i strukturna podrška, neophodna za transport vode i hraniva od korena naviše. Takođe, lignifikacija je sastavni deo procesa diferencijacije nekoliko specijalizovanih ćelijskih tipova i ostvarivanja njihove fiziološke uloge, kao što su: ćelije endodermisa korena, endotecijum (unutrašnji sloj ćelija zida antera prašnika), semenjače i ćelija koje su izložene povredama (Barros et al. 2015). Povećanje lignifikacije se javlja kao odgovor na biotički i abiotički stres predstavljajući mehaničku barijeru za prodor patogena kao i difuziju teških metala u endodermisu korena (Campbell and Sederoff 1996; Moura et al. 2010; Frei 2013).

Lignin se sintetiše od fenolnih jedinjenja, monolignola, koji nastaju u fenilpropanoidnom biosintetskom putu od zajedničkog prekursora aminokiseline L-fenilalanina (**Slika 1.2**) (Campbell and Sederoff 1996). Fenilpropanoidni put je pored lignina, izvor širokog spektra sekundarnih metabolita među kojima su flavonoidi, antocijanini i tanini. Ključan enzim u biosintezi fenilpropanoida je fenilalanin-amonijum-liaza (PAL) koja katalizuje prvi korak, deaminaciju L-fenilalanina do trans-cinamata, prekursora svih fenolnih jedinjenja u biljkama (Hanson 1981; Lewis 1999). Stoga je PAL ključni enzim i veza između primarnog metabolizma aminokiselina i produkata sekundarnog metabolizma u biljkama (Dixon and Paiva 1995; Ritter and Schulz 2004). Monomeri lignina se sintetišu u citoplazmi a zatim transportuju u ćelijski zid, gde se vrši njihova oksidacija do radikalskih formi koje se spontano, unakrsno povezuju u polimere (Mayer and Staples 2002; Miao and Liu 2010). Oksidaciju vrše enzimi lakaze pomoću  $O_2$  kao i peroksidaze koje koriste  $H_2O_2$  kao akceptor elektrona (Sterjiades et al. 1992). Mehanizam regulacije prostorno-vremenskog obrasca polimerizacije lignina je i dalje nepoznat (Tobimatsu and Schuetz 2019).



**Slika 1.2.** Uprošćen model biosinteze lignina u biljkama. PAL (fenilalanin-amonijum-liaza), LAC (lakaza) i PRX (peroksidaza) su najvažniji enzimi koji učestvuju u ovom procesu.

S obzirom da je sastavni deo enzima lakaze, koji je direktno uključen u biosintezu lignina, sadržaj bakra u biljkama neposredno utiče na količinu lignina. Pored lakaza, Cu utiče i na aktivnost peroksidaza, jer njihova aktivnost zavisi od drugog Cu-proteina, amino-oksidge koja proizvodi  $H_2O_2$  u apoplastu (Møller and McPherson 1998). Nepravilna lignifikacija ćelijskih zidova je tipična anatomsko

pojava kod biljaka u uslovima nedostatka Cu. Smanjenje lignifikacije se dešava čak i kod umerenog nedostatka Cu, tako da je količina lignina indikator nutritivnog statusa Cu u biljkama (Robson et al. 1981). S druge strane, akumulacija lignina je karakteristična pojava kod biljaka koje rastu u prisustvu bakra u višku (Moura et al. 2010).

## 1.3 Usvajanje, transport i distribucija bakra

Stopa usvajanja Cu spada među najniže u poređenju sa ostalim esencijalnim mikroelementima (Loneragan et al. 1981), dok sam mehanizam usvajanja bakra nije do kraja razjašnjen (Printz et al. 2016). Istraživanja pokazuju da se usvajanje bakra, slično kao usvajanje gvožđa razlikuje kod monokotila i dikotila (Ryan et al. 2013). Smatra se da se usvajanje kod monokotila zasniva na kompleksaciji Cu sa fitosideroforima slično kao kod biljaka sa strategijom II usvajanja Fe (Ryan et al. 2013). Strategija usvajanja Cu kod dikotila, kojima pripada i krastavac, podrazumeva redukciju  $\text{Cu}^{2+}$  forme na plazma-membrani i usvajanje redukovanog oblika  $\text{Cu}^+$  visoko-afinitetnim transporterima, kao što je poznato za Strategiju I usvajanja Fe (Bernal et al. 2012; Jouvin et al. 2012; Ryan et al. 2013). Redukciju gvožđa i bakra obavljaju metaloreduktaze familije FRO (eng. Ferric Reductase Oxidase, FRO) čiji su članovi različito regulisani statusom gvožđa i bakra (Hassett and Kosman 1995; Martins et al. 1998; Mukherjee et al. 2006). Kada je otkriveno da je FRO2 u korenu odgovorna za redukciju gvožđa, pretpostavljena je i uloga ovog enzima u redukciji Cu (Yi and Guerinot 1996; Robinson et al. 1999). Međutim, analizom transkriptoma arabidopsisa pokazano je da FRO4 i FRO5 imaju izrazito povišenu ekspresiju kod biljaka suočenih sa nedostatkom Cu (Bernal et al. 2012). Takođe, regulatorni regioni ovih gena sadrže iste motive kao i drugi geni uključeni u homeostazu Cu. FRO4 i FRO5 funkcionišu na redundantan način i visoko su ekspimirani u vrhovima korenova, dok je u listu FRO4 konstitutivno ekspimiran, a FRO5 snažno indukovano nedostatkom Cu (Bernal et al. 2012).

### 1.3.1 Transporteri bakra

Biljke koriste različite tipove transportera za usvajanje, translokaciju i distribuciju različitih formi Cu (Deng et al. 2013). Najznačajniji transporteri  $\text{Cu}^+$  forme su visoko-afinitetni transporteri COPT (eng. Copper Protein Transporter) koji pripadaju konzervisanoj familiji transportera bakra, prisutnoj kod svih eukariota (Dancis et al. 1994; Puig et al. 2002). Postoji nekoliko članova ove familije koji su locirani na plazma-membrani ali i u unutrašnjim membranama u ćeliji (Sancenón et al. 2003; Puig 2014). Plazma-membranski COPT1 i COPT2 predstavljaju glavne regulatore usvajanja Cu u ćelije dok je COPT5 odgovoran za mobilizaciju Cu iz unutarćelijskih skladišta (Sancenón et al. 2003, 2004). COPT1 je ekspimiran u vršnim regionima korena, u epidermalnim i ćelijama korteksa apikalne zone korena kao i meristemske zone i zoni izduživanja ali i u kotiledonima, trihomama, polenovim zrnima i embrionima. Visoko je specifičan za redukovanu formu ( $\text{Cu}^+$ ) te je, stoga, ovaj transporter ključan za usvajanje Cu iz podloge (Sancenón et al. 2004). Ekspresija COPT1 je negativno regulisana statusom Cu u biljkama. COPT2 je ekspimiran u zelenim tkivima i reproduktivnim organima ali takođe i u zoni diferencijacije korena, u lateralnim korenovima i korenskim dlačicama (Sancenón et al. 2003; Perea-García et al. 2013). Mutanti *copt1* imaju visoko ekspimiran COPT2 ali koji može samo delimično da kompenzuje nedostatak i obezbedi ulazak Cu putem korena (Sancenón et al. 2004). COPT6 je ekspimiran u vaskulaturi stabla, listovima i cvetovima i odgovoran je za distribuciju Cu u



nadzemnom delu, odnosno redistribuciju Cu iz listova ka reproduktivnim organima u uslovima nedostatka Cu (Jung et al. 2012; Garcia-Molina et al. 2013). COPT transporteri takođe učestvuju i u unutarćelijskom transportu Cu. COPT5 se nalazi na tonoplastu i odgovoran je za transport Cu iz vakuole i njegovu distribuciju između organa (Klaumann et al. 2011). Ekspimiran je najviše u korenu ali je prisutan i u izdanku biljke (Garcia-Molina et al. 2011). Vakuolarni eksport ima značajnu ulogu u alokaciji Cu do reproduktivnih organa kao i u homeostazi Cu na nivou cele biljke (Klaumann et al. 2011).

Transporteri familije ZIP (eng. ZRT, IRT-like Protein) transportuju različite dvovalentne katjone (Wintz et al. 2003). Najbolje okarakterisan član ove familije u biljkama je IRT1 (eng. Iron-Regulated Transporter 1) koji je visoko-afinitetni transporter za Fe (Vert et al. 2002). ZIP transporteri predstavljaju glavne medijatore transporta Zn i njihova ekspresija je naročito regulisana statusom Zn (Grotz et al. 1998; Wintz et al. 2003). Međutim, pokazano je da ekspresija ZIP2 u korenu, i ZIP4 u korenu i listovima, zavisi od statusa Cu u biljkama (Wintz et al. 2003). Indukcija ekspresije ZIP2 i ZIP4 pokazana je u uslovima nedostatka Cu, dok je smanjenje ekspresije zapaženo kada je Cu prisutan u višku (Wintz et al. 2003; del Pozo et al. 2010). Tačna uloga ovih transportera u homeostazi Cu još uvek nije do kraja razjašnjena.

Familija transportera NRAMP (eng. Natural Resistance-associated Macrophage Protein) je evoluciono konzervisana, prisutna kod prokariota i kod eukariota (Nevo and Nelson 2006). Po tipu spadaju u grupu simportera, koji pored protona transportuju različite metalne jone. Širok spektar selektivnosti i različita subćelijska lokalizacija ukazuje na njihovu značajnu ulogu u homeostazi metala. Za pojedine predstavnike transportera pokazan je visok afinitet za određen metal, kao što je NRAMP1 u slučaju Mn (Cailliatte et al. 2010). Međutim, afinitet NRAMP transportera može zavisiti ne samo od vrste, nego i od relativne koncentracije dvovalentnih jona metala (Kaiser et al. 2003). Smatra se da su neki predstavnici NRAMP regulisani prisustvom viška metala kao što su Cu i Zn (Thomine and Schroeder 2004).

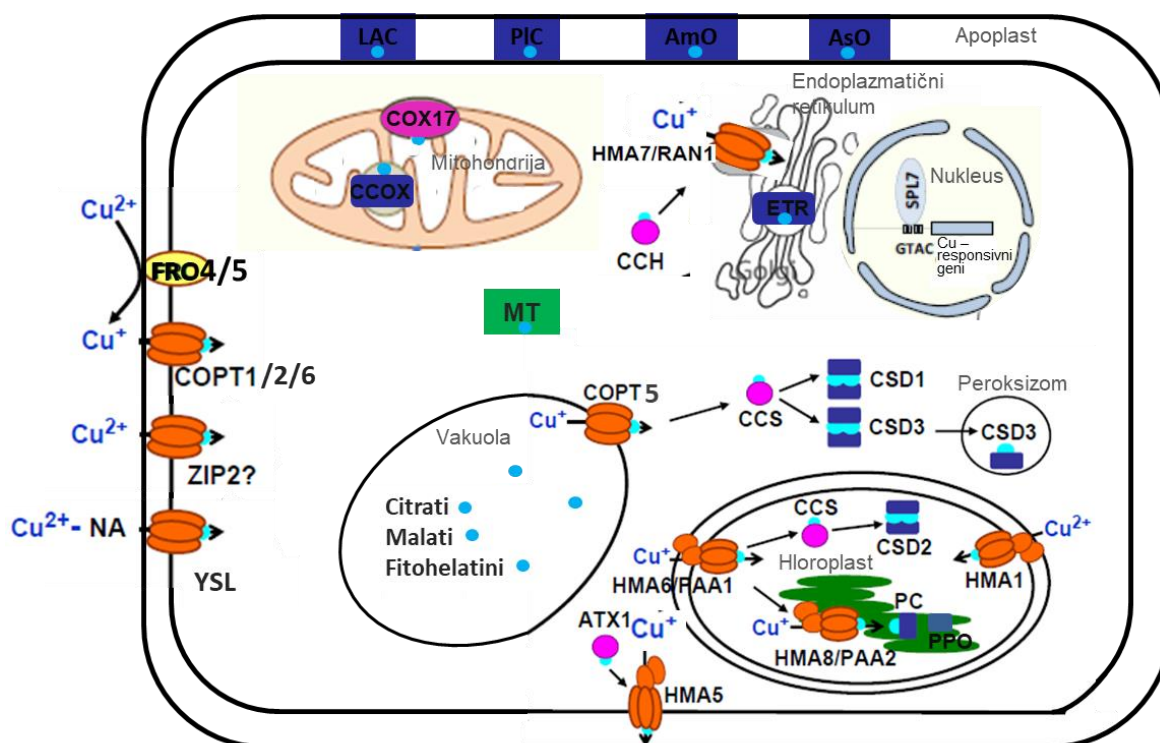
Transporteri ATPaze P-tipa odnosno HMA (eng. Heavy Metal ATPases), mogu da transportuju jedno i dvovalentne metale. Prisutni su kod svih eukariota ali se kod biljaka značajno razlikuju kako po učestalosti tako i po selektivnosti, distribuciji i subćelijskoj lokalizaciji (Axelsen and Palmgren 1998; Williams and Mills 2005). HMA5 transportuje Cu iz ćelije u ekstracelularni prostor i stoga ima važnu ulogu u regulaciji sadržaja Cu u citosolu (Abdel-Ghany et al. 2005b). Visoka ekspresija u korenu ukazala je na ulogu HMA5 u procesu detoksifikacije viška Cu, tako što vrši efluks Cu jona iz ćelija korena (Andrés-Colás et al. 2006; Kobayashi et al. 2008). Takođe, smatra se da je upravo ovaj transporter odgovoran za ubacivanje Cu u ksilem i to u formi  $\text{Cu}^+$  tako da ima ulogu i u translokaciji Cu od korena do listova (Andrés-Colás et al. 2006; Deng et al. 2013). HMA6 odnosno PAA1 (eng. P-type ATPase of Arabidopsis 1) je lokalizovan na membrani hloroplasta i ima ulogu u transportu Cu u hloroplaste (Shikanai et al. 2003). HMA8 (PAA2) se nalazi na membranama tilakoida i odgovoran je za transport Cu do plastocijanina (Abdel-Ghany et al. 2005b). HMA1 se, takođe, nalazi na membrani hloroplasta i omogućava alternativni put za ulazak Cu u hloroplaste a verovatno i vrši remobilizaciju Cu iz hloroplasta tokom sencescencije (Seigneurin-Berny et al. 2006; Boutigny et al. 2014). HMA7 odnosno RAN1 (eng. Responsive-to-Antagonist 1) dostavlja Cu u endoplazmatični retikulum gde je neophodan za formiranje funkcionalnog receptora za etilen (Woeste and Kieber 2000; Chen et al. 2002b).

### 1.3.2 Transport bakra unutar ćelije

S obzirom na visoku reaktivnost jona bakra, sprečavanje nepoželjnih interakcija Cu sa ćelijskim komponentama kao i pravilna distribucija Cu do targetnih proteina zahteva učešće pomoćnih proteina odnosno Cu-šaperona (Harrison et al. 1999; Huffman and O'Halloran 2001). Ovi proteini male molekulske mase vezuju metalne jone i omogućavaju njihovu ugradnju kao kofaktora putem protein-protein interakcija sa ciljnim proteinom (Rosenzweig 2002). ATX1 (eng. Antioxidant Protein 1) je lociran u citosolu ćelija i smatra se da dostavlja Cu do HMA5 i tako učestvuje u efluksu Cu iz ćelija ali i translokaciji do listova (Andrés-Colás et al. 2006; Puig et al. 2007b; Shin et al. 2012). CCH (eng. Copper Chaperone) je nađen u vaskularnom tkivu i pretpostavlja se da ima ulogu u interćelijskom transportu Cu kroz simplast (Himelblau et al. 1998; Puig et al. 2007b). Akumulacija CCH tokom senescencije ukazala je da CCH može da vrši redistribuciju Cu iz senescentnih listova, prenoseći Cu kroz plazmodezme do floema (Mira et al. 2001). Šaperon za SOD, CCS (eng. Cu Chaperone for Superoxide dismutase) doprema Cu do sve tri izoforme Cu/Zn SOD i kolokalizuje sa svojim targetima (Culotta et al. 1997; Chu et al. 2005). Međutim, poznato je i da postoji CCS-nezavisan put aktivacije Cu/Zn SOD koji uključuje glutation i druge, za sada nepoznate faktore (Huang et al. 2012). COX17 (eng. Cytochrome C Oxidase copper chaperone) je visoko konzervisani protein koji doprema Cu od citosola do intermembranskog prostora mitohondrija kako bi se formirao funkcionalan kompleks citohorom-c-oksidge (Balandin and Castresana 2002). Postoje i drugi Cu-šaperoni koji učestvuju u homeostazi Cu u mitohondrijama (Hornig et al. 2004; Radin et al. 2015), međutim, mehanizmi transporta bakra u mitohondrije su do sada malo proučavani i još uvek nisu sasvim razjašnjeni (Printz et al. 2016).

Najvažniji proteini u hloroplastima koji zahtevaju Cu kao kofaktor jesu plastocijanin u lumenu tilakoida i CSD2 u stromi (**Slika 1.3**). Oko 30% ukupnog bakra u biljnoj ćeliji je prisutno u hloroplastima a od toga polovina je vezana za plastocijanin (Shikanai et al. 2003). Plastocijanin je nezamenljiv protein kod biljaka stoga ima prioritet za vezivanje Cu (Molina-Heredia et al. 2003; Weigel et al. 2003). Apoprotein se transportuje u hloroplaste kao nefoldovan polipeptid tako da tek nakon vezivanja Cu u lumenu, protein zauzima svoju konačnu konformaciju i stabilnost (Li et al. 1990). ATPaze PAA1 na unutrašnjoj membrani hloroplasta i PAA2 na membrani tilakoida su neophodne za transport Cu do plastocijanina, dok je za transport Cu do CCS odnosno CSD2 u stromi, neophodno prisustvo samo PAA1 (Tabata et al. 1997; Shikanai et al. 2003; Abdel-Ghany et al. 2005b; Bernal et al. 2007). Dvostruki mutant *paalpa2* ne preživljava upravo zbog nemogućnosti da se Cu dostavi esencijalnom plastocijaninu (Weigel et al. 2003; Abdel-Ghany et al. 2005b). Kako se odvija dopremanje Cu do ovih transportera još uvek nije razjašnjeno ali se smatra da su uključeni dodatni Cu-šaperoni ili drugi organski molekuli (Blaby-Haas et al. 2014; Aguirre and Pilon 2016).

Vakuole u biljnoj ćeliji predstavljaju glavna mesta za skladištenje brojnih neorganskih i organskih jedinjenja ali i potencijalno toksičnih jedinjenja i metala. Istovremeno, vakuola vrši funkciju skladišta esencijalnih elemenata koji se po potrebi, u slučaju nedostatka, remobilišu. Oko 12% ukupnog bakra u ćeliji se nalazi u vakuoli (Klaumann et al. 2011). Još uvek nije poznat transportni put bakra u vakuolu, dok je za transport iz vakuole odgovoran COPT5 (Andrés-Colás et al. 2006; Klaumann et al. 2011). COPT5 olakšava mobilizaciju Cu iz skladišta u korenu do fotosintetičkih i reproduktivnih tkiva (Puig 2014).

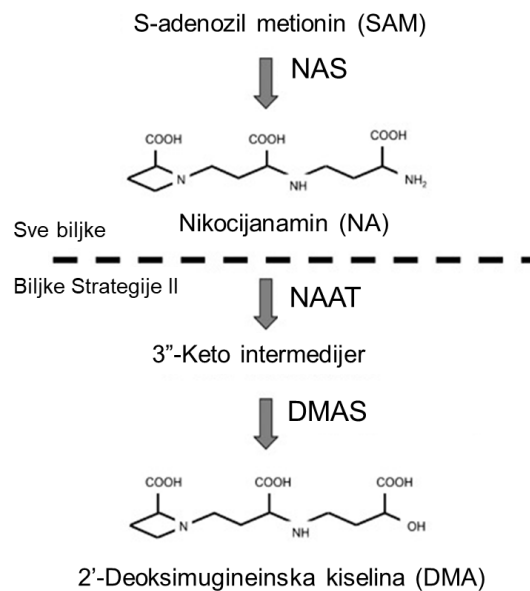


**Slika 1.3.** Shema transportnih puteva i lokalizacija bakra u biljnoj ćeliji. Strelice pokazuju pravac transporta bakra, koji je prikazan kao svetlo plavi krugovi, u različitim ćelijskim kompartmanima. Cu-transporteri su predstavljeni naranžastom bojom (COPT, ZIP, YSL, HMA), Cu-šaperoni ljubičastom bojom (CCS, CCH, ATX, COX17), Cu-proteini plavom bojom (CSD1-citosolna Cu/Zn superoksid-dismutaza; CSD2-hloroplastna Cu/Zn superoksid-dismutaza; CSD3-peroksizomalna Cu/Zn superoksid-dismutaza; PC-plastocijanin; PPO-polifenol-oksida; CCOX-citohrom-c-oksida; ETR-receptor za etilen; LAC-lakaza; PIC-plantacijanin; AmO-amino-oksida; AsO-askorbat-oksida) dok su metalotioneini (MT) označeni zelenom bojom. Slika modifikovana prema Yruela (2009).

### 1.3.3 Transport kroz stablo i distribucija bakra u nadzemnom delu biljke

Regulacija ksilemskog transporta predstavlja ključan mehanizam kontrole translokacije mineralnih elemenata do listova. ATPaza HMA5 je lokalizovana u vaskularnom tkivu korena i smatra se odgovornom za transport Cu u ksilem (Deng et al. 2013). Mutanti *hma5* se odlikuju povećanom akumulacijom Cu u korenu i istovremeno smanjenom translokacijom do listova (Andrés-Colás et al. 2006; Deng et al. 2013). S obzirom da HMA5 transportuje Cu u obliku  $\text{Cu}^+$ , tokom procesa translokacije verovatno se vrši reoksidacija jer je pokazano da se bakar kroz ksilem transportuje u formi  $\text{Cu}^{2+}$  vezan za helator (Ryan et al. 2013). Evidentno je da postoje razlike između dikotila i monokotila kako u usvajanju Cu tako i u transportu do listova. Ulazak bakra u ćelije u listovima dikotila zahteva ponovnu redukciju  $\text{Cu}^{2+}$  do  $\text{Cu}^+$  pomoću FRO4/5 reduktaze a koja prethodi usvajanju  $\text{Cu}^+$  COPT transporterima (Bernal et al. 2012; Ryan et al. 2013). Nasuprot, kod monokotila nisu nađeni redukcionni mehanizmi, stoga se smatra da se transport Cu do listova kao i usvajanje u listovima odvija u vidu  $\text{Cu}^{2+}$  vrste (Ryan et al. 2013). Na osnovu rezultata svojih istraživanja Foy je još 1978. godine pretpostavio da se bakar ksilemom transportuje vezan za tada neidentifikovanu poliaminokarboksilnu kiselinu (Foy et al. 1978). Kasnija istraživanja su pokazala da je nikocijanamin (NA) glavni helator Cu

ne samo u ksilemu nego i u floemu (Stephan et al. 1994; Pich and Scholz 1996). Nikocijanamin je neproteinska aminokiselina koja se sintetiše od S-adenozilmetionina pomoću enzima nikocijanamin-sintaze (NAS). U daljem biosintetskom putu samo kod monokotila, pomoću nikocijanamin-aminotransferaze (NAAT) ali i drugih enzima od NA, nastaje deoksimugineinska kiselina (DMA), primarni predstavnik familije fitosiderofora koje predstavljaju glavne helatore za usvajanje i transport metala kao što su Fe i Cu kod monokotila, tj. biljaka Strategije II (**Slika 1.4**) (Shojima et al. 1989, 1990; Higuchi et al. 1995). U ksilemu pirinča detektovan je Cu-DMA kompleks i upravo se DMA smatra glavnim helatorom Cu u ksilemu kod monokotila (Ando et al. 2013). Pored NA, aminokiselina histidin (His) ima izražen afinitet za vezivanje Cu, što se ogleda u visokoj asocijacionoj konstanti ( $\log K_{17.5}$ ) Cu-His kompleksa (May et al. 1977). Stoga, His može da bude kompetitivni ligand za Cu u ksilemu i floemu (Pich and Scholz 1996). U floemu pirinča su detektovani Cu(II)-NA i Cu(II)-His kompleksi (Ando et al. 2013).



**Slika 1.4.** Biosintetski put nikocijanamina (NA), koji je prisutan kod svih biljaka i deoksimugineinske kiseline koji postoji samo kod biljaka Strategije II. NAS - nikocijanamin-sintaza, NAAT - nikocijanamin-aminotransferaza, DMAS - sintaza deoksimugineinske kiseline. Slika modifikovana prema Haydon and Cobbett (2007).

Za transport metala putem NA-metal, kao i DMA-metal kompleksa odgovorni su YSL transporteri (eng. Yellow Stripe-Like) koji pripadaju familiji transportera simport tipa nađenih kod biljaka, gljiva i bakterija (Yen et al. 2001; Colangelo and Guerinet 2006). Kod arabidopsisa je pokazano da su AtYSL1, AtYSL2 i AtYSL3 eksprimirani u perenhimskim ćelijama vaskularnog tkiva i da imaju ulogu u lateralnom transportu Fe, Zn i Cu ksilemom, distribuciji metala u listovima, remobilizaciji Cu i Zn tokom senescencije kao i snabdevanju semena esencijalnim elementima (DiDonato et al. 2004; Schaaf et al. 2005; Waters et al. 2006; Chu et al. 2010). Kod monokotila je pokazano da je YSL16 specifičan transporter za Cu-NA kompleks koji je neophodan za distribuciju Cu floemom do mladih tkiva u razvoju kao i semena, ali i pravilno sazrevanje polena (Zheng et al. 2012; Zhang et al. 2018).

## 1.4 Regulacija homeostaze bakra kod biljaka

Mnoge ključne komponente koje učestvuju u homeostazi bakra kod biljaka su evolutivno konzervisane. Smatra se da su prvobitni faktori uključeni u taj proces imali ulogu u detoksifikaciji Cu pre nego što je Cu postao esencijalan element u metabolizmu (Burkhead et al. 2009). Postanak Cu u živim sistemima se vezuje za period nastanka aerobnog načina života, kada je povećanje akumulacije kiseonika u atmosferi uslovalo smanjenje rastvorljivih oblika gvožđa, koje je do tada imalo glavnu ulogu u katalitičkim procesima i redoks reakcijama (Harrison and Hoare 1980; Chapman and Schopf 1983). Formiranje nerastvorljivih Fe(III)oksida a s druge strane oslobađanje rastvorljivog  $\text{Cu}^{2+}$  iz nerastvornih soli sulfida, uslovalo je progresivnu zamenu Fe u biološkim molekulima sa Cu, koji može da obavlja slične funkcije (Kaim and Rall 1996). To je razlog zašto mnogi Cu-proteini imaju svoje funkcionalne parnjake koje sadrže Fe kao kofaktor i zašto mogu poslužiti kao zamena u slučaju deficita jednog od ova dva elementa (Merchant et al. 2006; Burkhead et al. 2009). Tokom evolucije pojavile su se kompleksnije uloge Cu u biološkim sistemima a istovremeno i mehanizmi za strogu regulaciju usvajanja, distribuciju i zaštitu od prisustva Cu u višku (Festa and Thiele 2011). Mašinerija za regulaciju homeostaze Cu u biljkama je naročito kompleksna, u poređenju sa drugim carstvima, kako zbog prisustva mitohondrija i hloroplasta tako i zbog sesilnog načina života kao i mnogobrojnih Cu-proteina koji su jedinstveni za biljke (Festa and Thiele 2011).

Mehanizmi za regulaciju usvajanja i distribuciju bakra u biljkama su neophodni kako bi se uskladile trenutne potrebe biljaka za Cu koje zavise od uslova rasta, cirkadijalnog ritma kao i razvojnog stadijuma. Razumevanje regulacije homeostaze Cu proisteklo je iz istraživanja na arabidopsisu u uslovima nedostatka Cu kao i na algama i kvascu kao model sistemima za proučavanje homeostaze Cu. Homeostaza bakra se reguliše promenama u ekspresiji gena i proteina koji su uključeni u metabolizam bakra. Regulacija obuhvata sve nivoe: transkripcioni, preko regulacije količine sintetisanih transkripata, obrade iRNK, post-transkripcioni - putem regulacije stabilnosti i razgradnje iRNK, translacioni i post-translacioni nivo.

### 1.4.1 Transkripciona regulacija ekspresije gena uključenih u metabolizam bakra

Preduslov za transkripcionu regulaciju jeste postojanje Cu-responsivnih elemenata (CuRE) u promotorima gena i transkripcionih faktora (TF) koji prepoznaju te sekvence (Radisky and Kaplan 1999). Najvažniji TF uključen u održavanje homeostaze Cu pripada SPL (eng. SQUAMOSA Promoter-binding protein-Like) familiji TF koji sadrže visoko konzervisane DNK-vezujuće domene i prepoznaju GTAC sekvence u okviru promotra gena koje regulišu (Cardon et al. 1999; Kropat et al. 2005; Yamasaki et al. 2009). SPL7 interaguje sa drugim TF koji su odgovorni za regulaciju fotoreceptora i fotomorfogenezu što potvrđuje da je prostorno-vremenska regulacija Cu homeostaze deo integralnog ćelijskog cirkadijalnog sistema (Perea-García et al. 2010; Zhang et al. 2014). Istraživanja na mutantima arabidopsisa su pokazala da SPL7 reguliše ekspresiju *COPT1*, *COPT2*, *ZIP2* i *YSL2* (Yamasaki et al. 2009). Međutim, treba naglasiti da nisu svi geni koji su uključeni u homeostazu Cu regulisani pomoću SPL7. Generalno, ekspresija gena koji kodiraju Cu-proteine zavisi prvenstveno od statusa Cu u ćelijama. U uslovima nedostatka Cu, povećava se ekspresija gena čiji su proteinski produkti odgovorni za usvajanje Cu a to su *COPT1/2/6* kao i *FRO4/5* dok je nivo ekspresije Cu/ZnSOD izoformi, *CSD1* i *CSD2* kao i nekoliko lakaza snižen (Sancenón et al. 2003; Abdel-Ghany and Pilon 2008; Bernal et al.

2012; Garcia-Molina et al. 2014). Cu-šaperoni su, takođe, regulisani na transkripcionom nivou (Abdel-Ghany et al. 2005a; Puig et al. 2007b). Međutim, ekspresija plastocijanina, esencijalnog gena kod biljaka, nije promenjena u uslovima nedostatka Cu kod arabidopsisa (Abdel-Ghany and Pilon 2008).

HMA5 i COPT1 su suprotno regulisani statusom Cu. Ekspresija *HMA5* je povišena kada je Cu prisutan u višku dok je ekspresija *COPT1* snižena, što ukazuje na postojanje mehanizma povratne sprege koji regulišu unos i izbacivanje Cu iz ćelije (Andrés-Colás et al. 2006). Takođe, višak Cu dovodi do snižene ekspresije *COPT2* dok *COPT5* nije regulisan nivoom Cu kod arabidopsisa (Garcia-Molina et al. 2011; Perea-García et al. 2013; Puig 2014). Ekspresija *CCH* je snižena a *ATX1* povišena kao odgovor na višak Cu (Himelblau et al. 1998; Puig et al. 2007b; Shin et al. 2012). Takođe, ekspresija *CCS* nije promenjena uprkos višku Cu (Trindade et al. 2003; Schiavon et al. 2007), dok su *CSD1* i *CSD2* povišeno ekspimirani (Sunkar et al. 2006; Khandekar and Leisner 2011; Lu et al. 2011; Leng et al. 2017). Nasuprot, pokazano je da je nivo ekspresije transportera *PAA1*, *PAA2* kao i *PC* snižen kod arabidopsisa tretiranog viškom Cu (Bernal et al. 2007; Schiavon et al. 2007).

## 1.4.2 Post-transkripciona regulacija genske ekspresije putem mikro RNK

Mikro RNK (miRNK) su klasa malih, 20-24 nukleotida dugih, nekodirajućih RNK molekula, evolutivno konzervisanih, koji imaju ključnu ulogu u post-transkripcionoj regulaciji genske ekspresije kod eukariota (Jones-Rhoades and Bartel 2004). miRNK obavljaju svoju funkciju putem baznog sparivanja sa komplementarnom iRNK. Za razliku od drugih eukariota, kod kojih se sparivanje dešava u netranslirajućem regionu (3'UTR) i na taj način se blokira translacija, kod biljaka se sparivanje najčešće dešava u protein-kodirajućem segmentu a ciljna iRNK se vodi u degradaciju. Na ovaj način se vrši post-transkripciona regulacija oko 30% inducibilnih biljnih gena, dok se *housekeeping* geni ne regulišu na ovaj način. Regulišući svoje target gene, biljne miRNK ostvaruju ulogu u brojnim biološkim procesima uključujući rast i procese razvića, determinaciju ćelijskog identiteta kao i signalnu transdukciju (Reinhart et al. 2002; Bartel 2004; Bonnet et al. 2004). Pored toga, miRNK su važni regulatori uključeni u odgovor na abiotički stres (Sunkar and Zhu 2004). Pokazano je da čak i tranzijentna promena u ekspresiji miRNK tokom stresa može da ima izrazite fiziološke efekte (Sunkar et al. 2012). miRNK mogu da funkcionišu kao pozitivni i negativni regulatori u zavisnosti od tipa stresa kao i na tkivno-specifičan, genotip-specifičan ili *species*-specifičan način (Patel et al. 2019).

Transkripcioni faktor *SPL7* je uključen u aktivaciju transkripcije specifičnih miRNK koje regulišu ekspresiju gena koji kodiraju mnoge Cu-proteine stoga su one nazvane Cu-miRNK. Kod *spl7* mutanta arabidopsisa, miR397, miR398, miR408 i miR857 nisu detektovane čak ni u uslovima deficita Cu, iako ekspresija ovih miRNK direktno zavisi od bioraspoloživosti Cu (Yamasaki et al. 2009). Cu-miRNK su relativno konzervisane među biljnim miRNK (Axtell and Bowman 2008; Cuperus et al. 2011). Sem pomenutih, postoje i druge miRNK za koje je pokazano da imaju ulogu u metabolizmu Cu u nekim biljnim vrstama (Pilon 2017).

**miR398** je visoko konzervisana u biljkama i to je prva miRNK za koju je potvrđen target kod arabidopsisa (Sunkar and Zhu 2004; Sunkar et al. 2006). Targeti miR398 su: Cu/Zn SOD, citosolna *CSD1* kao i plastidna *CSD2*, *COX5b-1* subjedinična citohrom-c-oksidadze kao i šaperon *CCS* (Bonnet et al. 2004; Jones-Rhoades and Bartel 2004; Sunkar and Zhu 2004; Beauclair et al. 2010). S obzirom da reguliše Cu/Zn SOD, koji je deo antioksidativne zaštite, pokazano je da je miR398 uključena u odgovor na različite biotičke i abiotičke stresore koji izazivaju oksidativni stres, kao što su stres teškim metalima, suša, UV zračenje, stres solima, niska temperatura, ozon ili napad patogena (Sunkar 2010;

Zhu et al. 2011). Kada je količina Cu u ćeliji limitirana, ekspresija miR398 je povišena što rezultuje smanjenjem nivoa targetnih transkriptata (Yamasaki et al. 2007; Abdel-Ghany and Pilon 2008). S druge strane, ekspresija miR398 je snižena u prisustvu Cu u višku, što je važno za indukciju CSD1 i CSD2 u uslovima oksidativnog stresa (Sunkar et al. 2006). Indukcija Cu/Zn SOD u takvim uslovima može biti značajna za uklanjanje viška Cu s obzirom da je ovaj protein jedan od glavnih depoa Cu u ćeliji (Yamasaki et al. 2007; Ding and Zhu 2009). Međutim, CSD2 može biti regulisana nezavisno od miR398. Povišena ekspresija miR398-rezistentene CSD2 rezultovala je povećanjem te forme nasuprot regularnoj, što je dovelo generalno do veće tolerancije arabidopsisa na stres teškim metalima (Sunkar et al. 2006).

**miR408** je visoko konzervisana u biljkama (Sunkar and Zhu 2004; Zhang and Li 2013). Targeti miR408 su lakaze *LAC3*, *LAC12* i *LAC13*, zatim fitocijanini: plantacijanin i uklacijanin (Abdel-Ghany and Pilon 2008). Stoga je uloga ove miRNK u pravilnom vegetativnom razviću kao i odgovoru na različite faktore stresa (Zhang and Li 2013; Zhang et al. 2014; Ma et al. 2015a). Regulacija ekspresije miR408 se odvija ne samo putem SPL7 TF nego i drugih TF tako da miR408 koordinisano reguliše odgovor na raspoloživost bakra i diurnalni ciklus (Zhang et al. 2014). Ova miRNK ima ulogu integratora signala iz spoljašnje sredine u cilju prioritnog dostavljanja Cu hloroplastima (Zhang and Li 2013; Zhang et al. 2014). Istraživanja uloge miR408 u različitim abiotičkim stresovima su pokazala da je miR408 diferencijalno ekspimirana u uslovima izloženosti niskim temperaturama, suši i oksidativnom stresu (Sunkar and Zhu 2004; Trindade et al. 2010; Sunkar et al. 2012; Jovanović et al. 2014). Na osnovu ovih eksperimenata zaključeno je da je funkcija miR408 pre u finom podešavanju genske ekspresije nego kao *on/off* mehanizam (Ma et al. 2015a).

**miR397** je konzervisana kod biljaka. Targeti miR397 su geni koji pripadaju familiji lakaza, pre svega *LAC2*, *LAC4* i *LAC17* (Jones-Rhoades and Bartel 2004). Kod topole je pokazano da ova miRNK može da targetuje čak 29 od 49 gena koje kodiraju lakaze (Lu et al. 2013). Stoga se miR397 smatra negativnim regulatorom sadržaja lignina u biljkama (Lu et al. 2013; Wang et al. 2014).

**miR857** nije široko zastupljena kod biljaka a njen target je, takođe, lakaza, *LAC7* (Fahlgren et al. 2007). miR857 je nađena u vaskularnom tkivu u svim delovima biljke stoga je zaključeno da je njena uloga u formiranju ćelijskog zida vaskularnog tkiva (Zhao et al. 2015).

**miR528** je nađena kod monokotila. Smatra se da ima više targeta koji su uključeni u redoks-procese među kojima su lakaze, askorbat-oksidaze i polifenol-oksidaze (Wu et al. 2017; Sun et al. 2018b; Zhu et al. 2020).

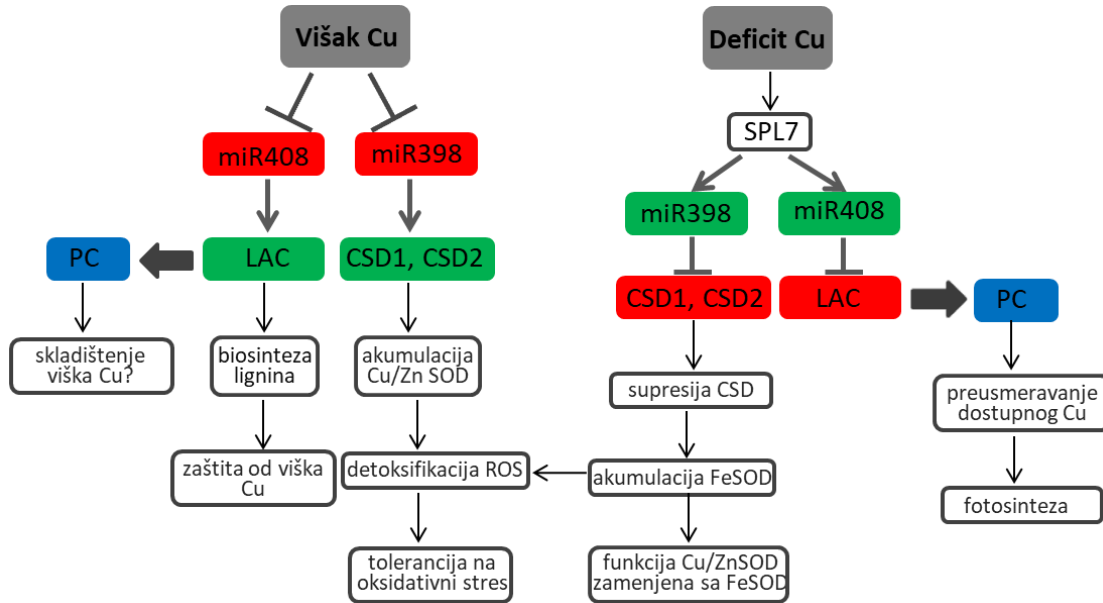
**miR1444** je nađena kod topole a targetuje polifenol-oksidazu (Lu et al. 2005). Najviša ekspresija ove miRNK je nađena u listovima (Lu et al. 2011). Biotički stresni faktori koji uzrokuju oštećenja lista dovode do povećanja ekspresije PPO, dok se u uslovima nedostatka Cu to ne dešava upravo zbog akumulacije miR1444 (Ravet et al. 2011).

### 1.4.3 Regulacija preraspodele bakra u biljnoj ćeliji

miRNK sinhronizovano reguliše ekspresiju gena koji kodiraju Cu-proteine u cilju ekonomične raspodele Cu u uslovima nedostatka ovog elementa (**Slika 1.5**). Naime, snižena ekspresija neesencijalnih Cu-proteina putem miRNK omogućava efikasnije korišćenje ograničene količine Cu i prevashodnu distribuciju Cu do plastocijanina koji ima esencijalnu ulogu u procesu fotosinteze (Cohu



and Pilon 2007; Burkhead et al. 2009). Neesencijalni Cu-proteini se zamenjuju funkcionalnim parnjacima a najbolji primer za to je koordinisano regulisana ekspresija Cu/Zn SOD i Fe SOD izoenzima u zavisnosti od raspoloživosti metala u biljkama (Nagae et al. 2008). Proteinski nivo PC kao i nivo proteina i transkripata Cu/Zn SOD and Fe SOD dobri su indikatori statusa Cu u biljkama (Cohu and Pilon 2007; Abdel-Ghany and Pilon 2008). Kada je Cu u optimalnim koncentracijama, *CSD1* i *CSD2* su eksprimirane u svim delovima biljke. U uslovima nedostatka Cu, ekspresija miR398 je povišena što rezultuje smanjenjem transkripata *CSD1* i *CSD2* a istovremeno gen koji kodira Fe SOD je povišeno eksprimiran (Yamasaki et al. 2007; Abdel-Ghany and Pilon 2008). Regulacija ekspresije neesencijalnih Cu-proteina, čije transkripte targetuje miR408, takođe, utiče na usmeravanje raspoloživog Cu ka plastocijaninu (Zhang et al. 2014).



**Slika 1.5.** Regulatorna mreža Cu-miRNK i njihovih targeta. Regulacija ekspresije ciljnih targeta zavisi od nivoa Cu u ćelijama (zeleni kvadrati označavaju povišenu ekspresiju a crveni sniženu) u cilju preusmeravanja Cu ka plastocijaninu i održavanja njegove funkcije. PC-plastocijanin, LAC-lakaza, CSD1 i CSD2-citosolna i plastidna Cu/Zn SOD.

miR398 i miR408 su sveprisutne u biljkama i pripadaju evolutivno najočuvanijim miRNK (Sunkar et al. 2006; Axtell and Bowman 2008; Zhang and Li 2013), dok su ostale miRNK koje regulišu Cu-proteine nađene ili u pojedinim delovima biljke ili samo kod nekih vrsta (Wang et al. 2014; Zhao et al. 2015). Jasno je da ove miRNK imaju ulogu u homeostazi Cu ali smisao njihovog evolutivnog nastanka još uvek nije razjašnjena (Pilon 2017). Zanimljivo je da ne postoje miRNK koje regulišu metaloproteine čiji su kofaktori Fe, Zn ili Mn. Evolutivni razvoj Cu-miRNK kao i njihova visoka konzervisanost teško da se mogu objasniti kao adaptacija na postojanje zemljišta sa nedostatkom Cu s obzirom da su zastupljenija zemljišta kojima nedostaje Fe ili Zn (Pilon 2017). Čini se verovatnijim da je visoka reaktivnost Cu jona i jake koordinacione veze sa proteinima, uslovlila potrebu za nastankom ovakvog tipa regulacije samo u slučaju Cu.

Količina Cu u biljkama direktno utiče na aktivaciju TF SPL7 koji reguliše ekspresiju miR398 i miR408. Međutim, promenjena ekspresija ove dve miRNK je zabeležena i u drugim abiotičkim i biotičkim stresnim uslovima. Pretpostavlja se da različiti stresori utiču na promenu ćelijskog pula Cu ili putem direktnog uticaja na usvajanje Cu ili indirektnog, usled uticaja na stepen transpiracije ili



promena u rastu tkiva što odvođi do efekta razblaživanja Cu u biljnim tkivima (Pilon 2017). Moguće da su u ovaj proces uključeni i drugi regulatori. Kod arabidopsisa je pokazano da je SPL7 eksprimiran u određenim tipovima ćelija u korenu i listovima i da lokalno detektuje promene u novou Cu a ta informacija se prenosi na susedne ćelije (Araki et al. 2018). miRNK mogu da migriraju kroz plazmodezme i tako prenose informaciju od ćelije do ćelije.

S druge strane, nema mnogo podataka o ulozi miRNK u uslovima viška Cu. S obzirom da je Cu u višku izrazito fitotoksičan i da može istisnuti druge elemente iz svojih aktivnih centara, moguće je da Cu-miRNK učestvuju ne samo u odbrani od oksidativnog stresa nego i povećanju ekspresije Cu-proteina koji predstavljaju depoe Cu u ćelijama i tako uklanjaju višak Cu jona.

#### 1.4.4 Translacioni i post-translacioni mehanizmi regulacije ekspresije gena

Translacioni i post-translacioni mehanizmi regulacije ekspresije gena, uključenih u homeostazu bakra, karakteristični su za sisarske ćelije a podrazumevaju endocitozu i degradaciju proteina koji vrše usvajanje Cu (Rutherford and Bird 2004). Regulacija translacije putem miRNA kod biljaka je novo polje istraživanja (Echevarría-Zomeño et al. 2013). Smatra se miR398 može da vrši inhibiciju translacije *CCS* kao i *CSD2* iRNK (Dugas and Bartel 2008; Beauclair et al. 2010). Inhibicija translacije umesto degradacije iRNK se može dešavati ukoliko komplementarno sparivanje miR-iRNK nije perfektno, što je karakteristično za animalne miRNK (Zhu et al. 2011).

Iako je nivo proteina PC smanjen u uslovima nedostatka Cu, količina transkripta nije promenjena jer se post-transkripciona regulacija ovog gena ne dešava putem miRNK. Podaci ukazuju da akumulacija PC u arabidopsisu zavisi od translacije ili regulacije proteinske stabilnosti (Abdel-Ghany and Pilon 2008).

### 1.5 Bakar u zemljištu

Zastupljenost bakra u zemljinoj kori je u opsegu od 3 do 100 mg/kg (ppm), sa prosečnom koncentracijom od oko 55 mg/kg. To je približno vrednostima za cink (70 ppm), a znatno manje u poređenju sa gvožđem (50 000 ppm), aluminijumom (Al) (81 000 ppm) ili manganom (950 ppm) (Misra 2000). Bakar u zemljišnom rastvoru može biti prisutan u vidu slobodnog jona, kompleksiran u formi izmenjivog katjona ili čvrsto vezan sa organskom materijom i mineralima (Barber 1995; Kabata-Pendias and Pendias 2001). Bioraspoloživost bakra u najvećoj meri zavisi od fizičko-hemijskih osobina zemljišta, kao i bioloških procesa u rizosferi. Obzirom da bakar u zemljištu lako precipitira sa sulfidima, karbonatima i hidroksidima, u zemljištu je najčešće imobilisan tako da je svega 20% ukupnog bakra bioraspoloživo (Marschner 1995; Kabata-Pendias and Pendias 2001). Bakar pokazuje jak afinitet prema organskoj materiji, stoga se zemljišta sa visokim procentom organske materije, kao i peskovita i karbonatna zemljišta odlikuju smanjenom dostupnošću Cu za biljke, odnosno karakterišu se nedostatakom Cu (Martens and Westermann 1991). Na dostupnost svih mikroelemenata (osim molibdena) utiče pH reakcija zemljišnog rastvora. Sa povećanjem pH vrednosti zemljišta (alkalna sredina) dostupnost bakra se smanjuje što je posledica njegovog vezivanja za različite komponente zemljišta. S druge strane, kisela zemljišta povećavaju količinu  $\text{Cu}^{2+}$  jona u zemljišnom rastvoru (Chaignon et al. 2002; Barker and Pilbeam 2007; Bravin et al. 2009). Koncentracija Cu u

poljoprivrednim zemljištima najčešće se kreće u opsegu od 5 do 30 mg/kg (Adriano 2001). Međutim, različite antropogene aktivnosti doprinele su povećanju koncentracije Cu u zemljištu, kao što su industrija, pre svega eksploatacija i prerada ruda i rudna jalovišta, nepravilno odlaganje otpada, različite urbane aktivnosti, upotreba otpadnih voda i stajnjaka u poljoprivredi, prekomerna upotreba veštačkih đubriva, a naročito upotreba fungicida na bazi Cu (Kabata-Pendias and Pendias 2001; Pilon-Smits and Pilon 2002). Kontinuirana upotreba Bordovske mešavine [ $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O} + \text{Ca}(\text{OH})_2$ ] još od 19. veka za suzbijanje biljnih patogena, zbog niske cene i visoke rastvorljivosti u vodi, dovela je do akumulacije Cu u poljoprivrednim zemljištima (Mengel and Rehm 2000; Wayne Richardson 2000). Primena Cu-fungicida je folijarna ali ispiranjem sa listova kao i mineralizacijom ostataka biljne mase, Cu dospeva i akumulira se u zemljištu (Flores-Velez et al. 1996). Upravo iz tog razloga mnoga poljoprivredna zemljišta su dostigla maksimalno prihvatljiv nivo Cu u zemljištu. Naročito učestala praksa koršćenja Bordovske mešavine kao efikasnog sredstva za odbranu vinove loze od pepelnice dovela je do povećanja koncentracije Cu u vinogradima od 200 do 500 mg/kg (Brun et al. 1998), a u nekim Evropskim zemljama dostigla je vrednosti i preko 1000 mg/kg, što predstavlja problem za dalje gajenje vinove loze (Flores-Velez et al. 1996; Chaignon et al. 2003; Alloway 2013). Maksimalne izmerene koncentracije Cu na lokalitetima u tropskim klimatskim uslovima su i preko 3000 mg/kg (Mirlean et al. 2007). Takva zemljišta su postala neadekvatna za dalju upotrebu u vinogradarstvu i stoga napuštena, što ima za posledicu gubitke u ovoj važnoj grani poljoprivrede koja je procenjena na više od 300 milijardi dolara (<https://www.coherentmarketinsights.com/market-insight/wine-market-940>). Napuštanje vinograda naročito na padinama, dovelo je do intenzivne erozije zemljišta a time i disperzije polutanta u životnu sredinu (Fernández-Calviño et al. 2008). Bakar iz površinskih slojeva zemljišta ispiranjem dospeva u dublje slojeve sve do podzemnih voda, što govori o višestrukim ekotoksikološkim posledicama prekomerne upotrebe Cu-fungicida (Komárek et al. 2010).

## 1.6 Bakar u biljkama

Potrebe biljaka za bakrom variraju među različitim vrstama, a čak postoje razlike i između varijeteta iste vrste, a zavise i od stadijuma razvića biljke (Vinit-Dunand et al. 2002; Mantovi et al. 2003). Različiti spoljašnji faktori mogu uticati na varijacije u sadržaju Cu u biljkama, pre svega dostupnost samog Cu ali i drugih esencijalnih elemenata. Prema Epstein and Bloom (2005), koncentracija bakra u biljkama se kreće u opsegu 2-50  $\mu\text{g/g}$  suve mase (ppm), pri čemu je 6  $\mu\text{g/g}$  utvrđeno kao prosečna količina u izdancima. Najčešće, simptomi nedostatka se javljaju kada je koncentracija Cu manja od 5  $\mu\text{g/g}$  u vegetativnom tkivu, dok se toksični efekti uočavaju pri koncentraciji preko 20  $\mu\text{g/g}$  SM i većoj, u tom istom tkivu kod najvećeg broja biljnih vrsta (Thiel and Finck 1973; Von Hodenberg and Finck 1975; Loneragan et al. 1981; Marschner 1995).

Neke biljne kulture su izrazito osetljive na nedostatak Cu, kao što je pšenica, raž ili lucerka dok kukuruz, ječam i šećerna repa pokazuju umerenu osetljivost (Alloway and Tills 1984; Barker and Pilbeam 2007). S druge strane, biljne vrste koje tolerišu visoke koncentracije Cu u svojim tkivima i koje mogu da akumuliraju znatno veće količine Cu pripadaju hiperakumulirajućim vrstama.

Postoji veliki broj vrsta hiperakumulatora metala kao što su kadmijum (Cd), Zn, Ni, Co, koji se u izdancima mogu naći u koncentracijama koje višestruko premašuju toksične granice za druge biljne vrste. Biljke hiperakumulatori metala su evoluirale tako da jako dobro uspeavaju kada je koncentracija metala visoka, i smatra se da je biološki smisao hiperakumulacije zaštita biljaka od herbivora i mikroorganizma (Martens and Boyd 1994; Boyd and Martens 1998; Boyd 2007). Do sada je opisano

svega 24 biljne vrste koje mogu da akumuliraju Cu u koncentraciji od preko 300 µg/g ukupne SM. To su predstavnici familija *Cyperaceae*, *Lamiaceae*, *Poaceae* i *Scrophulariaceae* (Brooks 1998). U centralnoj Africi, u oblastima prirodno bogatim bakrom pronađene su vrste koje mogu da akumuliraju do 4 mg/g Cu (Reeves et al. 2000). Vrsta koja je nađena na kontaminiranom zemljištu u centralnoj Kini, *Elsholtzia splendens* Nakai, može da sadrži i preko 16 mg/g SM i ima izrazit potencijal za fitoremedijaciju (Jie Yang et al. 2002). Međutim, pravi hiperakumulatori koji rastu u uslovima visokih koncentracija Cu, bez simptoma toksičnosti, nisu eksperimentalno dokazani (Lange et al. 2017). Većina Cu-tolerantnih biljka su u ekofiziološkom smislu ekskluderi, jer poseduju ograničenu sposobnost translokacije metala u nadzemni deo, i ne ispunjavaju osnovni princip hiperakumulacije, a to je da akumulacija Cu nije dozno-zavisna, odnosno da ne prati količinu Cu u podlozi (Macnair 1981; Schat et al. 1993; Song et al. 2004; Chipeng et al. 2010; Van der Ent et al. 2013). Imobilizacija Cu putem efikasnog kompleksiranja kao i mehanizmi sekvestracije su u pozadini tolerancije biljaka koje akumuliraju Cu (Lange et al. 2017). Molekularni mehanizmi koji su u osnovi visoke akumulacije Cu nisu sasvim razjašnjeni.

### 1.6.1 Deficit bakra u biljkama

Biljke koje sadrže Cu u koncentracijama koje su niže od optimalnih za njihov rast i razviće, pokazuju morfološke promene koje mogu biti specifične za vrstu i zavise od stepena nedostatka (Reuther and Labanauskas 1966). Simptomi nedostatka bakra kod biljaka javljaju se najpre na mladim listovima i reproduktivnim organima u vidu smanjenja biomase, hloroze mladih listova, sušenja i uvijanja listova po obodu, oštećenje apikalnog meristema, kao i slabog razvoja ploda (Rahimi and Bussler 1973; Brennan and Bolland 2003). Nedostatak Cu smanjuje razvoj i vijabilost polenovih zrna kao i produkciju semena i plodova (Marschner 1995). Sekundarna posledica nedostatka Cu može biti smanjen transport vode uzrokovan smanjenjem lignifikacije ćelijskih zidova nekoliko tipova tkiva, uključujući i ksilem, što za posledicu ima gubitak turgora i venenje uprkos adekvatnoj snabdevenosti vodom (Reuther and Labanauskas 1966; Loneragan et al. 1981). Simptomi nedostatka su u direktnoj vezi sa fiziološkom ulogom Cu u metabolizmu biljaka. Smanjenje fiksacije CO<sub>2</sub>, uticaj na transport elektrona zbog smanjenja količine plastocijanina, dezintegracija tilakoidnih membrana hloroplasta, smanjena aktivnost ili potpun izostanak drugih Cu-proteina: askorbat-oksidaze, polifenol-oksidaze, citohrom-c-oksidaze, diamin-oksidaze i Cu/Zn superoksid-dismutaze, su uobičajeni simptomi nedostatka Cu kod biljaka (Loneragan et al. 1981; Droppa et al. 1984; Yruela 2009). Kao odgovor biljke na nedostatak Cu, dešavaju se višestruke promene na molekularnom nivou. Strategija biljaka obuhvata promene u ekspresiji gena odgovornih za usvajanje Cu, zatim prioritizacija tj. preusmeravanje dostupnog Cu ka esencijalnim metaboličkim putevima, kao i zamena drugim metaloproteinima koji imaju slične ili preklapajuće funkcije (Puig et al. 2007a).

Nedostatak mikroelemenata u jestivim delovima biljaka kod konzumenata, životinja i ljudi, ima za posledicu fenomen koji je pozant kao "skrivena glad" (White and Broadley 2009). Oplemenjivanje biljaka putem konvencionalne selekcije ili genetičkom modifikacijom biljaka u cilju dobijanja genotipova koji su efikasniji u sposobnosti usvajanja i akumulacije Cu kao i upotrebom đubriva koja sadrže Cu mogu se prevazići problemi vezani za nedostatak Cu kod useva.

## 1.6.2 Toksičnost bakra kod biljaka

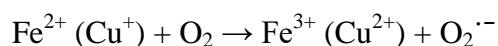
Pre nego što je identifikovan kao esencijalni element, bakar je prepoznat kao toksičan za biljke (Reuther and Labanauskas 1966). Prag toksičnosti varira među različitim vrstama biljaka i utiče na biljna tkiva različito, u zavisnosti od metaboličkih zahteva (Yruela 2009). Fitotoksičnost bakra se uočava na morfološkom, fiziološkom i molekularnom nivou i zapaža se na svim stupnjevima razvoja biljaka. Štetni efekti povećane koncentracije Cu u zemljištu se prvo uočavaju na korenu, što je posledica povećane akumulacije bakra u ovom biljnom organu. Progresivno smanjenje rasta i razvoja korena, bez grananja, kao i zadebljanje korenova i neobična tamna obojenost su tipični simptomi toksičnosti bakra. Simptomi toksičnosti u nadzemnom delu biljaka jesu: inhibicija rasta, hloroza i nekroza listova. Smanjenje lisne mase je praćeno i promenama u reproduktivnim organima što dovodi do smanjene veličine ploda i manje klijavosti semena (Lexmond and Van der Vorm 1981; Ouzounidou et al. 1995; Liu et al. 2001; Alaoui-Sossé et al. 2004; Xu et al. 2006; Wani et al. 2007). Na ćelijskom nivou Cu u visokim koncentracijama indukuje povećanje propustljivosti ćelijske membrane i curenje ćelijskog sadržaja, tzv. "curenje elektrolita" (De Vos et al. 1989, 1991; Murphy et al. 1999). To se odnosi prvenstveno na nekontrolisan izlazak  $K^+$  ali i drugih važnih jona iz ćelija (Demidchik et al. 2014). Bakar u višku remeti balans drugih esencijalnih elemenata. Smanjen sadržaj mikroelementa kao što su Fe, Zn i Mn ali i makroelementa N, P, K, Mg, Ca se dešava kao posledica antagonističkih delovanja Cu na usvajanje drugih esencijalnih jona i njihovu translokaciju (Wallace et al. 1992; Ouzounidou 1994; Ouzounidou et al. 1995; Schmidt et al. 1997; Maksymiec 1998; Alaoui-Sossé et al. 2004; Kopittke and Menzies 2006; Michaud et al. 2008).

Na ćelijskom nivou Cu u višku interferira sa najvažnijim ćelijskim procesima kod biljaka, fotosintezom i respiracijom (Marschner 1995; Prasad and Strzałka 1999; Yruela 2005). Fotosintetski aparat naročito je pogođen prisustvom Cu u višku. Brojne studije su pokazale inhibitorski efekat na funkciju PSI a naročito PSII (Mishra and Dubey 2005; Barker and Pilbeam 2007). Inhibicija akceptorskog i donorskog mesta elektrona na PSII dovodi do blokade transporta elektrona što dalje utiče na stopu fotosinteze. Do inhibicije fotosinteze dolazi i zbog smanjene apsorpcije svetlosne energije usled smanjenja sadržaja hlorofila i karotenoida, a zapažena je i supstitucija jona Mg u centru porfirinskog prstena hlorofila (Küpper et al. 2003; Kupper and Kroneck 2005; Ali et al. 2016). Smanjenje broja i promene u strukturi hloroplasta, naročito degardacija tilakoida strome i grane, kao i pojava intratilakoidnih inkluzija, kao i gubitak skrobnih zrna, nađene su kod nekoliko ispitivanih biljnih vrsta (Baszynski et al. 1988; Lidon and Henriques 1991; Ouzounidou 1994; Ciscato et al. 1997; Pätsikkä et al. 1998; Quartacci et al. 2000; Caldwell 2001; Panou-Filothou et al. 2001).

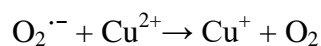
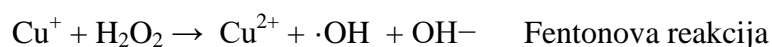
Toksičan efekat Cu jona na makromolekule u ćeliji može biti direktan i indirektan. Usled visokog afiniteta za vezivanje za tiolne, histidil i karboksilne grupe, Cu direktno interaguje sa proteinima, i tako inhibira strukturnu, katalitičku ili transportnu ulogu proteina (Van Assche and Clijsters 1990; Lippard and Berg 1994). Mehanizam delovanja Cu-fungicida je upravo nespecifična denaturacija tiolnih grupa proteina (Ware and Whitacre 2004). Cu joni mogu da izmeste druge esencijalne katjone iz svojih katalitičkih mesta što dovodi do poremećaja njihove funkcije. Najveći broj proteina čiji je kofaktor Cu učestvuje u transportu elektrona ili funkcioniše kao katalizator u redoks-reakcijama koje uključuju kiseonik (Linder and Goode 1991). Sa druge strane, redoks ciklus između  $Cu^+$  i  $Cu^{2+}$  oblika katalizuje produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) (Halliwell and Gutteridge 1984). Stoga, višak redoks-aktivnih Cu jona izaziva oksidativni stres u ćeliji čije su krajnje posledice oštećenje makromolekula (Sharma and Dietz 2009).

## 1.7 Oksidativni stres

Aeroban način života podrazumeva korišćenje  $O_2$  kao terminalnog akceptora elektrona tokom ćelijske respiracije (Dismukes et al. 2001). U toku ovog procesa tokom transfera elektrona dolazi do nepotpune redukcije  $O_2$  i nastanka intermedijarnih reaktivnih molekula i jona koji se nazivaju reaktivne kiseonične vrste (eng. Reactive Oxygen Species, ROS). ROS obuhvataju slobodno-radikalske forme kao što su superoksidni anjon  $O_2^{\cdot-}$ , peroksidni radikal ( $OOH\cdot$ ) i hidrosilni radikal ( $\cdot OH$ ), kao i neradikalske molekule kao što je vodonik-peroksid ( $H_2O_2$ ) i singlet kiseonik ( $^1O_2$ ) (Gutteridge and Halliwell 1989). U biljkama, ROS nastaju tokom fizioloških procesa, u reakcijama transfera elektrona u hloroplastima, mitohondrijama, peroksizomima i plazma-membrani, apoplastu i ćelijskom zidu ili kao nusprodukt metaboličkih puteva u različitim ćelijskim kompartmanima. Povišene koncentracije ROS ne predstavljaju uvek neželjenu posledicu jer su ROS važni medijatori u procesu razvića i diferencijaciji npr. u lignifikaciji, gravitropizmu, zatvaranju stoma, germinaciji semena, hormonskoj regulaciji (Mittler 2002; Scandalios 2005; Halliwell 2006). Prolazno povećanje ROS nakon izlaganja stresu ima ulogu u transdukciji signala i pokretanju odbrambenih mehanizama (Miller et al. 2008). Održavanje balansa između stvaranja i uklanjanja ROS je od esencijalnog značaja za pravilno funkcionisanje ćelija. Antioksidativni sistem ćelije održava koncentraciju ROS u fiziološki prihvatljivim koncentracijama, međutim, stresni faktori mogu narušiti ravnotežu između stvaranja i eliminacije ROS (Noctor and Foyer 1998). Kada nivo ROS prevaziđe kapacitet mehanizama zaštite, ćelije se nalaze u stanju oksidativnog stresa. Prelazni metali kao što su Fe i Cu su redoks-aktivni i iniciraju stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta, što za posledicu ima oksidativni stres u ćelijama. Reakcijom sa molekulskim kiseonikom, nastaje radikalska vrsta - superoksidni anjon:



Vodonik-peroksid, nastao iz superoksid-anjon radikala, u Fentonovoj reakciji reaguje sa jonima prelaznih metala (najčešće  $Fe^{2+}$  i  $Cu^+$ ) pri čemu nastaju hidrosilni radikal ( $\cdot OH$ ) i hidrosilni anjon ( $OH^-$ ). Haber-Vajsova reakcija, takođe, podrazumeva nastanak hidrosilnog radikala a katalizovana je prisustvom prelaznih metala (Gutteridge and Halliwell 1989):



Joni metala u ovim reakcijama služe kao katalizatori procesa u kome homolitičkim raskidanjem vodonik-peroksida nastaju slobodni radikali. Stvaranje hidrosilnog radikala naročito je opasno pošto je to najreaktivnija kiseonična vrsta koja inicira lančane reakcije stvaranja novih formi ROS, što za posledicu ima ireverzibilne modifikacija ćelijskih struktura koje na kraju dovode do ćelijske smrti (Overmyer et al. 2003; Pinto et al. 2003). Pored toga, u ćelijama ne postoje mehanizmi za uklanjanje hidrosilnog radikala.

Reaktivne kiseonične vrste izazivaju mnogostruka oštećenja biomolekula: peroksidaciju lipida, oksidaciju proteina, inhibiciju enzima, oštećenje nukleinskih kiselina i aktivaciju programirane ćelijske

smrti (Dat et al. 2000; Mittler 2002). Lipidna peroksidacija (LP) je jedna od najviše proučavanih posledica delovanja ROS na strukturu i funkciju ćelijske membrane (Gutteridge and Halliwell 1989). Povećanje LP tokom oksidativnog stresa je u direktnoj korelaciji sa povećanom produkcijom ROS tako da predstavlja pouzdan marker stresa (Sharma et al. 2012). Polinezasićene masne kiseline (PUFA), koje su glavni konstituenti membranskih fosfolipida, podložne su peroksidaciji. Proces lipidne peroksidacije sastoji se iz tri faze: inicijacije, propagacije i terminacije. Hidroksilni radikal i singlet kiseonik u reakciji sa PUFA dovode do formiranja konjugovanih diena, lipidnih peroksil-radikala i vodonik-peroksida. Peroksil-radikali su visoko reaktivni i propagiraju lančanu reakciju stvaranja novih lipidnih peroksil-radikala, što rezultuje u poremećaju fluidnosti i permeabilnosti membrana. Malondialdehid (MDA) jedan je od finalnih produkata peroksidacije PUFA (Gutteridge and Halliwell 1989; Shewfelt and Purvis 1995).

Povećani nivo ROS izaziva različita oštećenja proteina (modifikacije aminokiselina, povećanu osetljivost na proteolizu, izmenjenu antigenost, fragmentaciju peptidnih lanaca, agregaciju i sl.), što u nekim slučajevima vodi ka inaktivaciji enzima. ROS na različite načine dovode do oštećenja proteina, npr.  $H_2O_2$  može da oksiduje cisteinske i metioninske rezidue i tako inaktivira tiolne grupe enzima. Superoksidni anjon i hidroksilni radikal koji nastaju u prisustvu redoks-aktivnih metala inhibiraju aktivnost nekih antioksidativnih enzima.  $O_2^{\cdot-}$  inhibira katalazu, a  $\cdot OH$  superoksid-dismutazu (Kono and Fridovich 1982; Stadtman 1986; Gutteridge and Halliwell 1989).

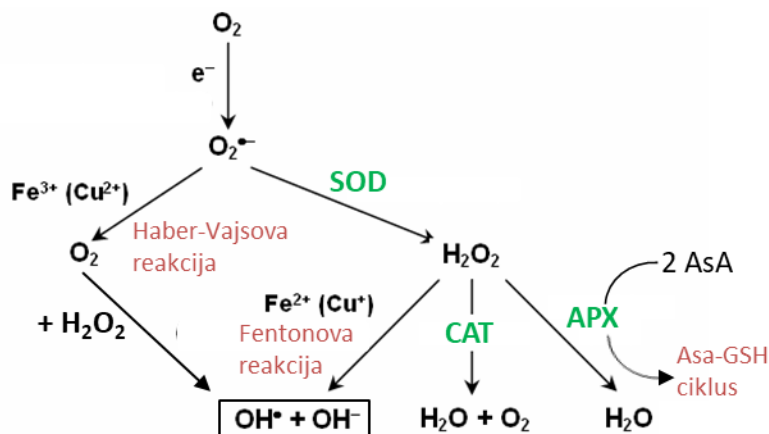
Glavni izvor oštećenja DNK molekula jesu upravo ROS koji nastaju usled dejstva endogenih i egzogenih faktora. Oštećenja koja izazivaju ROS na molekulu DNK, kao što su oksidacija azotnih baza ili saharidne komponente, kao i unakrsno povezivanje sa proteinima preko timin-cistein adukta, imaju za krajnji ishod jednolančane prekide i mutacije (Dizdaroglu et al. 1993; Inzé and Van Montagu 1995). Povećanje degradacije DNK posredovano ROS, pokazano je i kao posledica prisustva toksičnih metala u biljkama (Meriga et al. 2004).

## 1.8 Antioksidativna zaštita

Biljke poseduju kompleksan sistem antioksidativne zaštite koji se sastoji od enzimskih i neenzimskih komponenti. Pošto se ROS produkuju u različitim ćelijskim kompartmentima, tako se i komponente antioksidativne zaštite mogu naći u hloroplastima, mitohondrijama, peroksizomima, citosolu ali i ćelijskom zidu (Sharma and Dietz 2009). U enzimske komponente antioksidativnog sistema spadaju enzimi superoksid-dismutaza (SOD), katalaza (CAT), gvajakol peroksidaza (GPX), enzimi askorbat–glutation ciklusa (AsA-GSH): askorbat-peroksidaza (APX), monodehidroaskorbat-reduktaza (MDHAR), dehidroaskorbat-reduktaza (DHAR) i glutacion-reduktaza (GR).

**Superoksid-dismutaza** ima centralnu ulogu u odbrani od oksidativnog stresa i prisutna je kod svih aerobnih organizama. SOD su metaloenzimi koji katalizuju dismutaciju  $O_2^{\cdot-}$  u  $O_2$  i  $H_2O_2$  (**Slika 1.6**). Izoenzimi SOD koji se razlikuju po metalnom kofaktoru imaju i različitu subćelijsku lokalizaciju. Mn SOD je prisutna u mitohondrijama i peroksizomima, Fe SOD u hloroplastima dok je Cu/Zn SOD prisutna u tri izoforme u citosolu i plastidima, peroksizomima a mogu se čak naći i u apoplastu i nukleusu (Jackson et al. 1978; Bueno et al. 1995; Alscher et al. 2002; Fink and Scandalios 2002; Kim et al. 2008). Nivo aktivnost SOD je često u korelaciji sa stepenom tolerancije biljaka na različite faktore stresa stoga se može koristiti kao kriterijum za selekciju tolerantnih genotipova (Sharma et al. 2012). Prisustvo toksičnih metala utiče različito na izoforme SOD enzima što zavisi od intenziteta stresa, ali i biljne vrste i genotipa (Gill et al. 2015). Naime, aktivnost SOD enzima može biti inhibirana

visokim intenzitetom stresa (Kono and Fridovich 1982; Baum et al. 1983; Kwiatowski and Kaniuga 1986; Alscher et al. 2002). Povišena ekspresija izoformi SOD povećava toleranciju na različite stresove ali razlike postoje u zavisnosti od tipa izoforme i biljne vrste (Tepperman and Dunsmuir 1990; Kwon et al. 2002; Sunkar et al. 2006; Mylona and Polidoros 2010).



**Slika 1.6.** Reaktivne kiseonične vrste (ROS) i antioksidativni sistem zaštite. Produkcija ROS je katalizovana prelaznim metalima (Fe, Cu) u Fentonovoj i Haber-Vajsovoj reakciji. Antioksidativni enzimi: SOD-superoksid-dismutaza, CAT-katalaza, APX-askorbat peroksidaza, AsA - askorbat, AsA-GSH - askorbat-glutation ciklus. Modifikovano prema Barbusiński (2009).

**Katalaza** je prvi otkriven i okarakterisan antioksidativni enzim, prisutan kod svih aerobnih organizama koji katalizuje dekompoziciju dva molekula  $H_2O_2$  do  $H_2O$  i  $O_2$ . Premda postoji nekoliko enzima koji degraduju  $H_2O_2$ , CAT je jedinstvena jer ne zahteva redukujući ekvivalent i odlikuje je veća brzina reakcije ali istovremeno ima i dosta niži afinitet prema  $H_2O_2$  u poređenju sa APX (Scandalios et al. 1997). Peroksidomi su glavna mesta produkcije  $H_2O_2$ , stoga je CAT prisutan u ovoj organeli ali je nađena i u citosolu, hloroplastima i mitohondrijama (Vangronsveld and Clijsters 1994; Lopez-Huertas et al. 2000). Različiti faktori stresa uzrokuju povećanje ili smanjenje aktivnosti CAT što zavisi od intenziteta, trajanja i tipa stresa (Sharma and Dubey 2005; Han et al. 2009; Posmyk et al. 2009). Mutanti kod kojih nema sinteze CAT su povećano osetljivi na stres solima, ozon, sušu ali ne i niske temperature (Willekens et al. 1997). Povećanje CAT aktivnosti se smatra adaptivnom osobinom koja omogućava biljkama da smanje oštećenja nastala delovanjem  $H_2O_2$  (Karuppanapandian et al. 2011). Biljke kod kojih je CAT gen pojačano eksprimiran pokazuju povećanu toleranciju na oksidativni stres (Guan et al. 2009).

**Gvajakol-peroksidaza** je enzim koji uklanja  $H_2O_2$  pri čemu se oksiduju gvajakol i piragalol. Postoji u vakuolama, citosolu i ćelijskom zidu (Asada 1992). Različiti faktori stresa, među njima i teški metali, indukuju aktivnost GPX i u nekim slučajevima se ovaj enzim može koristiti kao biomarker za procenu inenziteta stresa (Radotić et al. 2000).

Askorbat-glutation ciklus podrazumeva oksidaciju i redukciju askorbata (AsA) i glutationa (GSH) koju katalizuju enzimi APX, MDHAR, DHAR i GR (Noctor and Foyer 1998). MDHAR i DHAR su kratkoživeći enzimi koji imaju ulogu u regeneraciji AsA. GR omogućava visok odnos GSH/GSSG u ćelijama što je centralna komponenta u održavanju ćelijskog redoks-stanja (Ushimaru et al. 1997; Sharma et al. 2012). Aktivnost svih enzima Asa-GSH ciklusa je povećana u uslovima stresa (Noctor and Foyer 1998).

**Askorbat-peroksidaza** je centralni enzim Asa-GSH ciklusa i ima esencijalnu ulogu u kontroli intraćelijskog nivoa ROS. APX redukuje  $H_2O_2$  do  $H_2O$  uz pomoć 2 molekula AsA. APX je jedan od najzastupljenijih antioksidativnih enzima u biljnoj ćeliji, nađena je u citosolu, stromi, tilakoidima, mitohondrijama i peroksisomima (Jimenez et al. 1997; Sharma and Dubey 2004). Posедуje mnogo veći afinitet prema  $H_2O_2$  nego CAT, što čini ovaj enzim efikasnim sakupljačem  $H_2O_2$  (Wang et al. 1999). Povećana aktivnost APX je nađena u uslovima stresa solima, suše, hladnoće, toksičnih metala (Cu, Cd, Zn, Co, Ni) i UV radijacije (Sharma et al. 2012). Povišena ekspresija gena APX dovodi do povećane tolerancije biljaka na oksidativni stres (Yabuta et al. 2002).

Zbog kompleksnosti antioksidativne zaštite overekspresija jedne komponente može ali i ne mora uticati na ukupan kapacitet zaštite. Simultana overekspresija kombinacije antioksidativnih enzima ima sinergistički efekat na povećanje tolerancije na višestruke stresne faktore (Aono et al. 1995; Kwon et al. 2002; Lee et al. 2007).

**Neenzimskim antioksidansima** pripadaju: askorbat, glutation, tokoferoli, karotenoidi i fenolna jedinjenja (Noctor and Foyer 1998; Sharma and Dietz 2009). Osim kao učesnici u antioksidativnoj zaštiti, imaju važnu ulogu u rastenju i razviću kao enzimski kofaktori kroz sve ćelijske procese od mitoze i ćelijskog rasta do senescencije i ćelijske smrti (de Pinto and De Gara 2004). Mutanti sa smanjenim sadržajem neenzimskih antioksidanata su hiperzentivni na stres (Sharma et al. 2012). Askorbat ima ključnu ulogu u uklanjanju  $H_2O_2$  putem AsA-GSH ciklusa ali može i direktno da detoksifikuje  $O_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot OH$  i  $^1O_2$  (Noctor and Foyer 1998). Smatra se da predstavlja prvu liniju odbrane u apoplastu od potencijalno opasnih eksternih oksidanata (Smirnoff 2000; Barnes et al. 2002). GSH učestvuje u regeneraciji AsA u AsA-GSH ciklusu. GSH može direktno da reaguje sa  $O_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot OH$  i  $H_2O_2$ . GSH je i prekursor u sintezi fitohelatina, koji heliraju i tako detoksifikuju metale (Noctor and Foyer 1998; Halliwell 2006). Tokoferoli sprečavaju propagaciju lipidne autooksidacije, štite funkcionalnost lipida u membranama, naročito hloroplasta i tako održavaju funkciju PSII (Fryer 1992; Kagan et al. 2000). Karotenoidi kao dodatni pigmenti u hloroplastima, apsorbuju svetlost i prenose energiju na molekule hlorofila. Odgovorni su za utišavanje ekscitiranog molekula hlorofila kako bi se sprečilo formiranje  $^1O_2$  i tako štite fotosintetički aparat (Collins 2001). Fenolna jedinjenja (flavonoidi, tanini, hidroksicinamat estri) su grupa različitih sekundarnih metabolita sa aromatičnim prstenom a koji imaju antioksidativnu sposobnost i veoma su zastupljeni u biljnim tkivima. Ova jedinjenja mogu direktno da vezuju ROS ili da heliraju jone tranzicionih metala (Grace and Logan 2000; Michalak 2006).

## 1.9 Mehanizmi tolerancije viška bakra

Biljke, iako sesilni organizmi pokazuju određenu otpornost na stres, tako što su prirodnom selekcijom favorizovane vrste koje su posebno adaptirane čak i na krajnje nepovoljne uslove. Adaptacije na stres su genetički determinisane i mogu biti morfološke i eko-fiziološke, a njihovo prisustvo omogućava biljkama ne samo da prežive, već i da uprkos stresu budu veoma uspešne. Tolerancija prema stresu je definisana kao urođena sposobnost biljaka da odreaguju na iznenadno prisustvo stresnih faktora, i da pritom ne budu suviše oštećene.

U cilju zaštite od prisustva metala u višku, biljke su razvile mehanizme tolerancije, koji se mogu razlikovati među biljnim vrstama, i zavise od vrste metala i intenziteta stresa (Meharg 1994). Različiti spoljašnji i unutrašnji mehanizmi odbrane usmereni su ka smanjenju akumulacije toksičnih koncentracija slobodnih jona kako bi se sprečila direktna oštećenja ćelijskih konstituenata (Hall 2002; Krämer and Clemens 2005). Spoljašnji mehanizmi tolerancije se odnose na smanjenje usvajanja metala



putem formiranja ektomikorize ili njihovim vezivanjem za ekstraćelijske eskudate koje ćelije korena aktivno izbacuju u rizosferu. Zaštita od toksičnosti Cu putem formiranja mikorize pokazana je kod vrste *Pinus sylvestris* L , mada postoje velike razlike u sposobnosti zadržavanja Cu u zavisnosti od vrste gljive, što ukazuje na postojanje različitih mehanizama u pozadini i koji su specifični za vrstu (Van Tichelen et al. 2001). Biljke putem korena izlučuju u spoljašnju sredinu različite biomolekule kao što su: organske kiseline, fenolna jedinjenja, proteini ili peptidi bogati cisteinom i histidinom koji pre svega olakšavaju usvajanje nutrijenata, ali takođe mogu i inhibirati usvajanje formiranjem kompleksa sa metalima u spoljašnjoj sredini, što zavisi od vrste i koncentracije metala kao i od biljne vrste ili varijeteta. Poznato je da se restrikcija usvajanja Al zasniva na eksternom mehanizmu, formiranjem kompleksa Al sa organskim kiselinama i fenolima (Kochian et al. 2004).

Zadržavanje metala u visokim koncentracijama u korenu i smanjena translokacija u nadzemni deo, karakteristična je za neke metala. Za razliku od Cd, čija je translokacija uslovljena stepenom transpiracije, pa se s toga visok procenat Cd može naći u listovima (Salt et al. 1995; Kováčik et al. 2006; Kováčik and Klejdus 2008), za Cu je karakteristična povišena akumulacija u korenu i ograničavanje translokacije do listova (Jarvis and Whitehead 1981; Whitehead 1987). Često je koncentracija Cu u korenu direktno proporcionalan rastućim dozama Cu u spoljašnjoj sredini, dok kritična toksična koncentracija u listovima možda neće odražavati stanje u hranljivom medijumu, što je naročito bitno ukoliko se upoređuju genotipovi koji se razlikuju u toleranciji na Cu (Marschner 1995).

Unutrašnji, ćelijski mehanizmi tolerancije viška Cu uključuju: a) imobilizaciju u ćelijskom zidu, b) ograničen ulazak u ćelije kroz ćelijsku membranu, c) stimulaciju efluksa iz citoplazme, d) kompartmentaciju u vakuoli, e) intraćelijsko heliranje Cu od strane liganada (organskih kiselina, aminokiselina, fitohelatina i metalotioneina).

Ćelijski zid predstavlja primarno mesto kontakta biljke sa metalima. Imobilizacija Cu u ćelijskom zidu podrazumeva vezivanje Cu za komponente ćelijskog zida, pri čemu joni bivaju metabolički inaktivirani jer ne ulaze u protoplast ćelije već ostaju izvan njega. U ćelijskom zidu bakar se najčešće vezuje za -COOH grupe polisaharida i to pre svega pektina (aliginati i galakturonska kiselina), kao i -SH grupe proteina i -OH grupe polifenola (Dronnet et al. 1996; Kartel et al. 1999; Davis et al. 2003; Krzesłowska 2011). U analizama sadržaja metala u različitim ćelijskim frakcijama utvrđeno je da je oko 60% ukupnog Cu vezano za ćelijski zid (Iwasaki et al. 1990).

Regulacija transporta kroz plazma membranu je bitan momenat u toleranciji biljaka na stres izazvan metalima. Smanjeni inluks kao i povišen efluks Cu iz ćelije se postiže regulacijom ekspresije transporterata odgovornih za ove procese (Sancenón et al. 2003; Burzyński et al. 2005; Andrés-Colás et al. 2006).

### **1.9.1 Jedinjenja koja heliraju bakar**

Kompleksacija metala je odbrambena strategija biljaka u uslovima povišenih koncentracija metala. Sinteza metal-helirajućih liganada je mehanizam kojim se smanjuje koncentracija slobodnih jona u citoplazmi i na taj način vrši detoksifikacija unutar ćelije. Jedinjenja koja sadrže tiolnu grupu kao što su metalotioneini i fitohelatini kao i netiolna jedinjenja kao što su organske kiseline i aminokiseline su najvažniji helatori bakra (Sharma and Dietz 2006; Haydon and Cobbett 2007; Hossain et al. 2012; Anjum et al. 2015).

### 1.9.1.1 Metalotioneini

Metalotioneini (MT) su proteini male molekulske mase (4–8 kDa) bogati cisteinom (Cys), čije tiolne grupe efikasno vezuju metale kao što su  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  ili  $\text{Cd}^{2+}$ , stoga imaju važnu ulogu u održanju homeostaze, ali i toleranciji teških metala (Hamer 1986; Cobbett and Goldsbrough 2002). Dok su kod drugih eukariota visoko konzervirani u odnosu na položaj cisteinskih rezidua, biljni MT su raznovrsniji i podeljeni su u četiri grupe (MT1-4) (Cobbett and Goldsbrough 2002). MT mogu da vrše sekvestraciju viška metala u trihomama, a njihova ekspresija i akumulacija je regulisana prisustvom metala (Guo et al. 2003). MT imaju naročito značajnu ulogu u detoksifikaciji Cu, s obzirom da imaju najveći afinitet za ovaj metal u poređenju sa afinitetom prema ostalim metalima (Ecker et al. 1986; Tommey et al. 1991). Kod arabidopsisa je pokazano da MT1a i MT2b imaju ulogu u remobilizaciju Cu tokom senescencije, dok MT2a i MT3 vrše detoksifikaciju Cu prisutnog u višku (Guo et al. 2003). Višestruki mutant za *MT* gene arabidopsisa (*mt1a/mt2a/mt2b/mt3*) ima poremećenu mobilizaciju Cu iz senescentnih listova kao i smanjenu količinu Cu u semenima ali nije senzitivniji na stres Cu od *wt* što ukazuje da MT nisu uvek presudni za toleranciju na višak Cu (Benatti et al. 2014).

### 1.9.1.2 Fitohelatini

Fitohelatini (PC) su polipeptidi male molekulske mase, koji zahvaljujući mnogobrojnim cisteinima mogu da vezuju jone metala/oida. Sintetišu se od glutationa pomoću enzima fitohelatin-sintaze (PCS) (Cobbett 2000; Vatamaniuk et al. 2000; Osaki et al. 2009). Za razliku od MT, PC nemaju značaja u optimalnim fiziološkim uslovima u biljkama već samo tokom stresa (Leitenmaier and Küpper 2013). MT i PC imaju komplementarnu i kompenzujuću ulogu u odbrani od stresa metalima. Kompleks PC-metal se transportuje u vakuolu i na taj način sekvestrira i detoksifikuje. Do sada su proučavani kompleksi PC sa Cd, Cu, Zn i arsenom (As) (Hartley-Whitaker et al. 2001; Cobbett and Goldsbrough 2002; Song et al. 2014). Dok su PC izuzetno značajni kod toksičnosti Cd, za bakar postoje različiti podaci. U *in vitro* uslovima je pokazano da se formiraju PC-Cu kompleksi i *in vivo* je pokazano da bakar može da aktivira PCS, međutim, mutanti arabidopsisa koji nemaju PCS nisu osetljiviji na izlaganje Cu od *wt* biljaka (Lee and Kang 2005). Zanimljivo je da PC ne učestvuju u toleranciji na metale kod hipertolerantnih biljaka (Leitenmaier and Küpper 2013).

### 1.9.1.3 Organske kiseline

Bakar poseduje visok afinitet prema organskim kiselinama (OK) koji se često označavaju kao O-ligandi metala. Osim kao intermedijeri u TCA ciklusu, kiseline kao što su citrat, malat, akonitat, oksalat, tartarat, malonat su uključene i u procese usvajanja, transporta i detoksifikacije od metala u biljkama (Rauser 1999). Eksudacija karboksilnih kiselina iz korena je neophodna za usvajanje nekih elemenata kao što je P, ali se smatra i eksternim mehanizmom tolerancije biljaka na višak metala, formiranjem kompleksa sa metalima u rizosferi (Neumann and Römheld 1999; Kochian et al. 2004). OK su medijatori transporta i translokacije metala u optimalnim uslovima (von Wirén et al. 1999). Detoksifikacija od viška metala vezivanjem za organske kiseline se unutar ćelije dešava u vakuoli što predstavlja važan mehanizam odbrane biljaka od teških metala (Hall 2002; Haydon and Cobbett 2007). Sekvestracija metala na ovaj način je glavna strategija kod biljaka hiperakumulatora metala kao što su

Zn, Cd, Ni (Krämer et al. 2000; Küpper et al. 2004, 2009). I kod biljaka koje nisu hiperakumulatori Cu, pokazano je da organske kiseline imaju ulogu u detoksifikaciji od Cu (Kishinami and Widholm 1987; Murphy et al. 1999; Chai et al. 2014; Keller et al. 2015).

#### 1.9.1.4 Aminokiseline

Akumulacija slobodnih aminokiselina smatra se aktivnim odgovorom biljaka na stres teškim metalima (Sharma and Dietz 2006). Pokazano je da se u stresu Cu, Ni, Zn, As najviše akumuliraju prolin, histidin, cistein, arginin, glutamat i nikocijanamin, što zavisi od metala i biljne vrste (Kerkeb and Krämer 2003; Irtelli et al. 2008; Richau and Schat 2009; Theriappan et al. 2011; Ahmad and Gupta 2013; Anjum et al. 2014). Aminokiseline formiraju veoma stabilne komplekse sa Cu (Loneragan et al. 1981), a u metabolizmu Cu najznačajnije aminokiseline su nikocijanamin, histidin i prolin (Liao et al. 2000; Irtelli et al. 2008).

**Nikocijanamin** je sveprisutan u biljkama i smatra se glavnim simplastnim helatorom metala kao što su Cu, Fe, Zn i Mn (Noma and Noguchi 1976; Stephan et al. 1994). Zahvaljujući specifičnoj molekularnoj strukturi sa šest funkcionalnih grupa koje formiraju stabilnu oktaedralnu koordinatnu geometriju, nikocijanamin ima visok afinitet za vezivanje metalnih jona (Ripperger 1982). Upoređivanjem konstanti stabilnosti kompleksa NA-metal utvrđeno je da NA ima najveći afinitet prema Cu u poređenju sa drugim dvovalentnim elementima ( $\log K$ ): Cu (18.6) > Zn (14.6) > Fe (12.1) > Mn (8.8) (Beneš et al. 1983). Ispitivanja na mutantu paradajza *chloronerva* koji ne sintetiše NA usled mutacije u *nas* genu, pokazala su da je glavni poremećaj kod ovog mutanta u translokaciji Cu što dovodi do manjka Cu u listovima, koji se manifestuje nedostatkom plastocijanina i Cu/Zn SOD (Pich et al. 1994; Herbig et al. 1996). Stoga, zaključeno je da je NA neophodan za transport Cu od korena do listova, ali ne i drugih metala, pošto njihove koncentracije nisu smanjene u listovima ovog mutanta (Pich et al. 1994; Pich and Scholz 1996). Za razliku od Fe-, Mn- i Zn- kompleksa, Cu-NA kompleks je veoma stabilan na pH vrednostima ksilemskog soka (von Wirén et al. 1999; Rellán-Álvarez et al. 2008). Međutim, NA može da transportuje sve pomenute metale floemskim putem (Stephan et al. 1994), i stoga ima presudnu ulogu u njihovoj distribuciji do listova, cvetova i semena (Takahashi et al. 2003). NA ima jedinstvenu ulogu u homeostazi Cu ali je takođe važan i za metabolizam drugih metala kao i detoksifikaciju od metala prisutnih u višku. Uloga NA u homeostazi Fe je dosta proučavana (Curie et al. 2009). Pored unutrašnjeg transporta Fe u listovima kao i transporta do semena, smatra se da NA ima ulogu i u odgovoru biljaka na nedostatak Fe kao senzor bioraspodjelivosti Fe u biljkama (Curie and Briat 2003; Klatte et al. 2009; Enomoto and Goto 2013). U uslovima toksičnosti Fe pokazano je da dolazi do povećanja NA koji može imati protektivnu ulogu, helirajući višak Fe i na taj način smanjujući oksidativni stres, pošto Fe-NA kompleks nije aktivan u Fentonovoj reakciji (von Wirén et al. 1999). Smatra se da NA detoksifikuje višak Fe, tako što se Fe-NA kompleks sekvstrira u vakuoli (Pich et al. 2001; Aung et al. 2019). Pokazano je da NA učestvuje u detoksifikaciji Ni (Weber et al. 2004; Kim et al. 2005; Pianelli et al. 2005; Callahan et al. 2007), i u hiperakumulaciji Zn kod različitih vrsta hiperakumulatora ovih metala (Deinlein et al. 2012; Cornu et al. 2015). Pored hiperakumulacije, uloga NA u homeostazi Zn je, takođe, dosta proučavana. NA-Zn kompleks je detektovan kod nekoliko biljnih vrsta (Clemens et al. 2013). Pich and Scholz (1996) su sugerisali da NA može imati značajnu ulogu u zaštiti od fitotoksičnosti izazvanoj viškom Cu. Nađeno je da se NA akumulira u ksilemskom soku usled tretmana Cu (Liao et al. 2000). Povišena ekspresija *NAS3* gena kod pirinča omogućava veću toleranciju na metale kao što su Cu, Zn i Ni prisutne u višku, dok mutacija u *OsNAS3* izaziva povećanu senzitivnost na stres teškim metalima (Lee et al. 2009).

**Histidin** u proteinima, zajedno sa cisteinom, ima ključnu ulogu u koordinaciji metala u aktivnom centru metaloproteina (Sarkar and Wigfield 1967). Kao slobodna aminokiselina, histidin (His) je važan ligand metala u ćelijskim kompartmanima u kojima su jači ligandi odsutni (npr. MT) ili su mesta sa većim afinitetom već zauzeta (Leitenmaier and Küpper 2013). His je među najvažnijim aminokiselinama uključenim u hiperakumulaciju metala (Callahan et al. 2006). Hiperakumulacija Ni se ostvaruje isključivo zahvaljujući povišenim koncentracijama His (Krämer et al. 1996). His ima ulogu i u hipertoleranciji metala, što je zasebna funkcija od hiperakumulacije (Ingle et al. 2005; Nguyen et al. 2018). Histidin formira komplekse sa Cu sa visokom konstantom asocijacije ( $\log K_{17.5}$ ) (May et al. 1977), stoga može da bude u kompeticiji sa NA za vezivanje Cu u ksilemu (Pich and Scholz 1996). Povišene koncentracije His su nađene u ksilemskom soku usled tretmana bakrom kod nekoliko biljnih vrsta (Liao et al. 2000; Irtelli et al. 2008). Takođe, potvrđeno je prisustvo His-Cu kompleksa u biljnim tkivima (Collin et al. 2014; Hazama et al. 2015).

**Prolin** je dosta izučavan u kontekstu odgovora biljaka na abiotički stres kao što su suša, stres solima, niske temperature ali i stres teškim metalima (Aspinall 1981; Ashraf and Harris 2004). Uloga prolina u navedenim stresovima je u osmoregulaciji, stabilizaciji makromolekula i signalnoj transdukciji, uklanjanju ROS, kao i heliranju metala (Matysik et al. 2002; Sharma and Dietz 2006). Pored metala kao što su Cd, i Zn, pokazano je da i Cu snažno indukuje akumulaciju prolina u mnogim biljnim vrstama (Saradhi 1991; Chen et al. 2001; Tripathi and Gaur 2004).

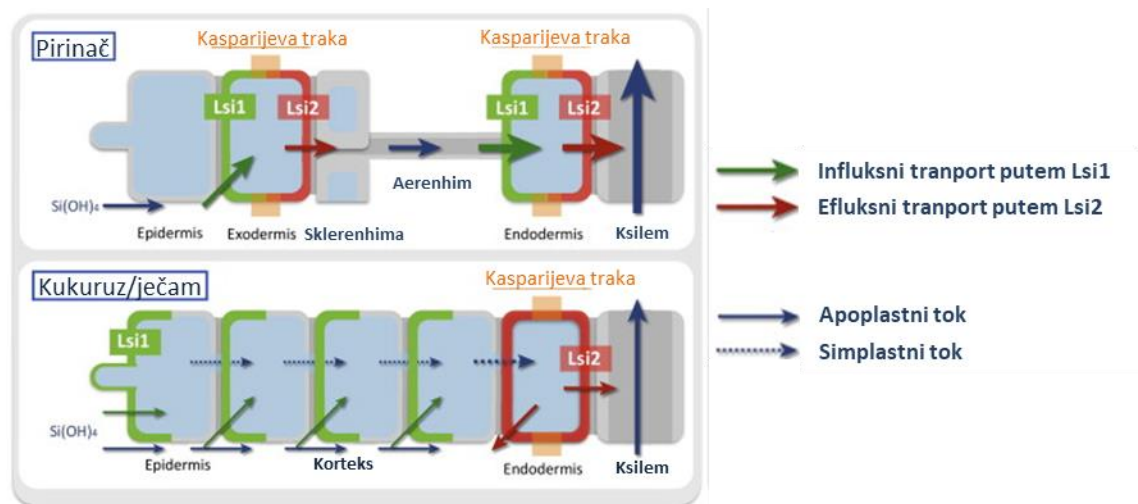
## 1.10 Silicijum u biljkama

Silicijum (Si) je drugi hemijski element po zastupljenosti u zemljinoj kori posle kiseonika. U prirodi je prisutan najčešće u obliku silicijum-dioksida ( $\text{SiO}_2$ ) ili minerala silikata koji osim Si i O sadrže jedan ili više metala. U zemljišnom rastvoru kao i u vodi, gde je pH vrednost ispod 9, Si se nalazi u obliku nenaelektrisane monomerne ortosilicijumove kiseline  $\text{H}_4\text{SiO}_4$  koja pripada slabim kiselinama (Sjöberg et al. 1983; Exley 1998). Koncentracija  $\text{H}_4\text{SiO}_4$  u zemljištu je u opsegu 0.1-0.6 mM što je u rangu zastupljenosti kalijuma ili kalcijuma, i to je jedina forma Si koju biljka može da usvoji (Epstein 1994; Casey et al. 2004). Ispitivanjem sadržaja Si u biljkama, pokazano je da se značajne količine Si mogu naći u biljnim organima, čineći od 0,1% do 10% uskupne suve mase, prevazilazeći tako vrednosti i najzastupljenijih makroelmenata npr. K i N, ali da te koncentracije variraju u zavisnosti od biljne vrste (Epstein 1999). Zapravo koncentracija Si u biljkama varira više nego koncentracije drugih elemenata (Ma et al. 1989). To zavisi ne samo od biodostupnosti Si nego i od filogenetske pozicije biljne vrste (Sangster 1978). Vrste koje su hiperakumulatori Si (>4% SM) su monokotile, naročito trave oštrice, kao i žitarice, među kojima se ističe pirinač. Dikotile generalno sadrže manje Si, ali postoje izuzeci kao što su vrste fam. *Cucurbitaceae* (npr. krastavac), *Asteraceae* (npr. suncokret) i *Urticaceae* (koprive) koje su umereni akumulatori Si (sadrže 2–4%) (Sangster et al. 2001). Ostale vrste sadrže relativno niske koncentracije Si (<0.5%) i pripadaju neakumulatorima, odnosno tzv. ekskluderima kao što su paradajz i arabidopsis (Ma and Takahashi 2002; Hodson et al. 2005). Međutim, određena vrsta ili kultivar koja raste u prisustvu različitih koncentracija Si će sadržati i različite količine Si u svojim organima (Ma and Takahashi 2002; Henriët et al. 2006). Iako je usvajanje Si filogenetska karakteristika, dostupnost Si će uticati na količinu Si apsorbovanu od strane biljaka (Guntzer et al. 2012). Predložena su tri moguća načina usvajanja Si, upoređujući koncentracije Si u ksilemu i u hranljivom medijumu: aktivno (brže nego usvajanje vode), pasivno (blisko usvajanju vode) i tzv. odbijajuće (sporije nego usvajanje vode) (Takahashi 1978). Ovi načini usvajanja mogu

koegzistirati, naročito aktivno i pasivno, a doprinos svakog od ovih procesa zavisi kako od biljne vrste tako i od koncentracije Si u medijumu (Liang et al. 2006; Nikolic et al. 2007).

### 1.10.1 Usvajanje i transport Si

Razlike u akumulaciji Si kod biljaka potiču zapravo od razlika u sposobnosti usvajanja Si putem korena. Za visoku akumulaciju Si kod pirinča odgovoran je aktivan proces usvajanja posredovan transporterima. Veliki napredak u proučavanju usvajanja i transporta Si učinjen je zahvaljujući upotrebi mutanata pirinča. Okarakterisan je gen odgovoran za influks Si u ćelije korena nazvan *Lsi1* (eng. *Low silicon 1*), koji je konstitutivno eksprimiran u korenovima. *Lsi1* kodira membranski protein koji je sličan akvaporinima i pripada NIP (eng. *Noduline-26 major Intrinsic Protein*) podfamiliji transporterata (Ma et al. 2006). *Lsi1* kod pirinča pokazuje polarnu lokalizaciju u ćelijskoj membrani – nalazi se na distalnoj strani epidermisa i endodermalnih ćelija. Za dalje sprovođenje Si iz korena ka nadzemnom delu, odgovoran je efluksni tip transporterata *Lsi2*, koji je kod pirinča, nasuprot *Lsi1*, lokalizovan na proksimalnoj strani, takođe, epidermisa i endodermisa (**Slika 1.7**). Transport silicijuma *Lsi2* transporterom vrši se putem protonskog gradijenta (Ma et al. 2007). Kooperativni transport posredovan *Lsi1* i *Lsi2* je presudan za visoku akumulaciju Si kod pirinča (Ma and Yamaji 2015).

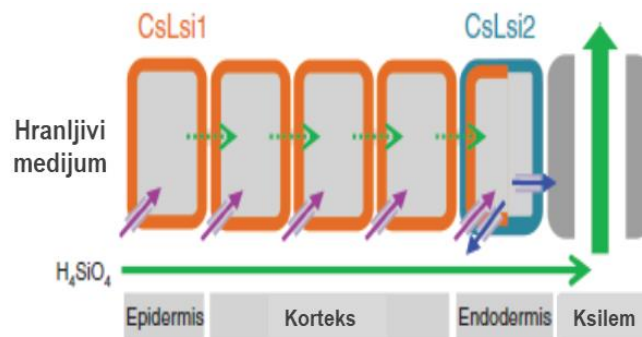


**Slika 1.7.** Shematski prikaz sistema za usvajanje Si kod pirinča kao i kukuruza/ječma. Razlike u lokalizaciji i distribuciji transporterata u različitim tipovima ćelija su odgovorne za efikasniji transport Si kod pirinča nasuprot kukuruzu/ječmu. Lokalizacija *Lsi1* je označena crvenom bojom a *Lsi2* transporterata zelenom bojom. Strelice označavaju pravac kretanja Si a debljina strelica reprezentuje doprinos svakog transportnog procesa, označenog različitim bojama a navedenog u legendi. Preuzeto iz Ma and Yamaji (2015).

Slični transporterati su identifikovani i kod ječma, kukuruza, bundeve i krastavca, međutim, oni ne pokazuju polarnu lokalizaciju u ćelijskoj membrani, a pronađeni su i u drugim tipovima ćelija (Chiba et al. 2009; Mitani et al. 2009b, 2009a, 2011; Sun et al. 2017, 2018a). Upravo razlika u lokalizaciji i polarnosti Si transporterata se smatra odgovornim faktorom za efikasnost usvajanja Si kod biljaka (Ma and Yamaji 2015). Matematičkim modelovanjem je pokazano da polarna lokalizacija ova dva tipa transporterata na egzodermisu i endodermisu predstavlja najbolju kombinaciju odgovornu za visoku efikasnost i ekonomičnost usvajanja Si u korenu pirinča (Sakurai et al. 2015). Kod paradajza,

koji pripada grupi Si-ekskludera, pokazano je da postoji funkcionalan Lsi1 transporter, međutim, Lsi2 efluksni transporter nije funkcionalan, što rezultuje smanjenim sadržajem Si kod ove vrste (Sun et al. 2020).

Usvajanje Si kod krastavca je aktivan proces posredovan transporterima (Liang et al. 2005a; Nikolic et al. 2007). CsLsi1 je smešten na distalnoj strani endodermalnih ćelija, ali i ćelijama korteksa gde ne pokazuje polarnost (Sun et al. 2017). CsLsi2 je uniformno raspoređen na endodermalnim ćelijama (Sun et al. 2018a). Predloženi model usvajanja Si kod krastavca podrazumeva dva načina transporta Si, apoplastnim putem, odnosno difuzijom kroz apoplastni prostor do ksilema, kao i aktivnim transportom pomoću CsLsi1 iz spoljašnjeg rastvora ili apoplasta u epidermalne ćelije ili ćelije korteksa, a zatim simplastnim putem do endodermalnih ćelija (**Slika 1.8**). CsLsi2 lokalizovan na proksimalnoj strani plazma membrane zatim transportuje Si iz endodermalnih ćelija do ksilema (Sun et al. 2018a).



**Slika 1.8.** Proces usvajanja Si u korenu krastavca. Narandžastom bojom je obeležena lokalizacija CsLsi1 inluksnog transportera dok je plavom bojom obeležen CsLsi2, efluksni transporter. Ljubičaste i plave strelice označavaju pravac transporta Si transporterima, dok zelene pune strelice označavaju apoplastni tok a zelene isprekidane strelice simplastni put Si kroz plazmodezme. Slika preuzeta iz Sun et al. (2018a).

Proces transpiracije obezbeđuje protok Si ksilemom. Kod monoktila je otkriven i treći tip transportera Lsi6, koji vrši distribuciju Si iz ksilema u ćelije listova i do cvasti u obliku monosilicijumove kiseline (Yamaji et al. 2008, 2012). Terminalni događaj jeste formiranje depozita silicijuma u vidu silicijumskih tela ili fitolita. Naime, Si u koncentraciji većoj od 2 mM polimerizuje i formira amorfne strukture hidratizanih silikata ( $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ) (Richmond and Sussman 2003). To se dešava u ćelijskom zidu, lumenu ćelija i interćelijskom prostoru. Depoziti Si se najčešće formiraju u epidermisu lista, ali i u endodermisu korena, mehanizmom koji nije do kraja rasvetljen (Sangster et al. 2001; Ponzi and Pizzolongo 2003). Pretpostavlja se da je deponovanje silicijuma specifično za određeni tip ćelija. Smatra se da su evaporacija i dehidratacija ključni faktori za silicifikaciju, ali i uloga bioloških entiteta u tom procesu nije isključena (Parry et al. 1984; Exley 2015; Kumar et al. 2017). Prema najnovijim istraživanjima, depoziti silicijuma u korenu sirka se mogu formirati samo u novonastalim ćelijskim zidovima kao integralni deo zida tokom njegovog formiranja (Soukup et al. 2019). Zanimljivo je da je  $\text{H}_4\text{SiO}_4$  u ksilemskom soku nađena u koncentracijama koje prevazilaze kritične vrednosti za polimerizaciju, što se može objasniti dinamičnom prirodom protočnog ksilemskog sistema (Hartley and Jones 1972; Casey et al. 2004; Liang et al. 2005a, 2006; Mitani et al. 2005). Izvesno je da je pre polimerizacije Si neko vreme prisutan u vidu kiseline, a ne fitolita.



## 1.10.2 Silicijum kao koristan element za biljke

Još 1865. Julius von Sachs je izostavio Si kao esencijalan element za rastenje i razvoj, ali je ukazao na njegovu visoku zastupljenost u biljkama. Hall and Morison (1906) su postavili pitanje uloge Si u biljkama, sumnjajući da element koji je toliko zastupljen u biljnim tkivima nema metaboličku ulogu. Još jedna u nizu anomalija u ponašanju Si jeste da je to jedini element koji ne ispoljava toksičan efekat kada je prisutan u višku (Epstein 1999). Si jeste esencijalan za alge dijatomeje (Darley and Volcani 1969; Lewin and Reimann 1969), kao i primitivne biljne vrste rastaviće (fam. *Equisetaceae*) (Chen and Lewin 1969). Međutim, esencijalnost za sve više biljke još uvek nije eksperimentalno dokazana. Epstein (1994) je zaključio da esencijalnost Si za sve biljke ne može da se dokaže zato što je nemoguće u potpunosti ukloniti Si iz eksperimentalnog hranljivog rastvora, jer i visoko prečišćena voda sadrži izvesne količine Si, stoga je nemoguće dobiti prave Si-deficitne biljke. Tako je isti autor predložio termin kvazi-esencijalnost za mnoge biljne vrste kod kojih apsolutna esencijalnost ne može biti ustanovljena. Element se definiše kao kvazi-esencijalan ukoliko je sveprisutan u biljnom carstvu, i ako deficit ovog elementa može značajno uticati na abnormalnosti u rastenju, razviću, razmnožavanju ili vijabilnosti (Epstein 1999). Zemljišta deficitna u Si su karakteristična za tropske regione, ali i širom sveta postoje obradive površine koje sadrže ograničenu količinu rastvorljivog Si (Meyer and Keeping 2001; Rodrigues and Datnoff 2015). Kontinuirano i intenzivno obrađivanje zemljišta, kao i uklanjanje biljnih ostataka nakon žetve doprinelo je značajnom smanjenju količine biodostupnog Si u zemljištu (Meunier et al. 2008).

Počeci rasvetljavanja uloge Si datiraju od polovine 20. veka kada je pokazano da dodavanje silikatne šljake znatno utiče na rast i produktivnost biljnih vrsta značajnih za poljoprivredu i hortikulturu (Clements 1965; Ayres 1966; Lewin and Reimann 1969). Si je čak deklarisan kao neophodan element u poljoprivredi (ako ne i fiziološki), i to naročito za gajenje pirinča (Lian 1976). Ova biljna vrsta pokazuje izuzetne razlike u prinosu ukoliko se gaji na lokalitetima koja sadrže Si u manjoj meri (Winslow et al. 1997). Naime, koristan efekat Si je naročito primetan kod biljaka izloženim stresu. S obzirom da u prirodi teško možemo naći sredinu u kojoj nije prisutan niti jedan stresni faktor, usvajanje Si se može smatrati adaptivnom osobinom, koje se dešava kao odgovor na spoljašnje faktore sredine i stoga, iako nije nužno esencijalan, za biljke je od fundamentalnog značaja (Hartley 2015; Frew et al. 2018). Poslednjih 25 godina istraživanja su fokusirana na rasvetljavanje mehanizama delovanja Si kod biljaka izloženih biotičkim i abiotičkim faktorima stresa. Razumevanje uloge i mehanizama delovanja Si u stresu će doprineti njegovoj širokoj upotrebi u cilju povećanja rezistencije i tolerancije biljaka na stres.

Biotički stres, kao što je napad herbivora, patogenih gljiva, bakterija i nematoda, može biti sprečen ili ublažen usled prisustva silicijuma. Još polovinom 20. veka primećeno je da silifikacija pruža zaštitu biljkama od pepelnice (Wagner 1940). Zaključeno je da depoziti silicijuma služe kao fizička barijera za ulazak i širenje patogena (Yoshida et al. 1962; McNaughton and Tarrant 1983). Međutim, istraživanja su pokazala da mehanička barijera nije dovoljan razlog da se objasni zaštitni efekat primene Si (Okuda and Takahashi 1965). Stoga je pretpostavljeno da Si ima i drugu ulogu osim pružanja mehaničke zaštite biljkama. Naredna istraživanja su pokazala da Si povećava koncentraciju metabolita (fenola i fitoaleksina) ali i aktivnost enzima uključenih u odbranu kao što su hitinaze i peroksidaze, polifenol-oksidaze kod napadnutih biljaka (Samuels et al. 1991; Chérif et al. 1992, 1994; Fawe et al. 1998). Stoga je zaključeno da Si ima aktivnu ulogu u zaštiti biljaka putem stimulacije odbrambenih mehanizama. Postavljena je i hipoteza da Si ima ulogu sekundarnog glasnika, kao modulator odbrambenog odgovora biljke (Fawe et al. 2001). Kao prajming agens, Si omogućava

biljkama da brže i efikasnije odgovore na napad patogena sa minimalnim metaboličkim ulaganjem (Fauteux et al. 2005; Chain et al. 2009; Van Bockhaven et al. 2013). Međutim, molekularni mehanizmi u pozadini ovakvog efekta su i dalje nepoznanica (Liang et al. 2015). Prema poslednjim mišljenjima, Si sprečava interakciju efekorskog molekula patogena sa receptorskim targetom u biljkama čime sprečava inhibiciju odbrambenog odgovora biljaka od strane patogena, i u krajnjem slučaju, prepoznavanje biljke kao domaćina određenog patogena (Coskun et al. 2019).

### 1.10.3 Uloga Si u zaštiti biljaka od faktora abiotičkog stresa

Silicijum redukuje efekte različitih vidova abiotičkog stresa, uključujući fizički stres (poleganje, suša, niske i visoke temperature, UV zračenje), kao i hemijski stres (stres solima, nedostatak hraniva, toksičnost metala). Mehanička podrška koju silicijum pruža biljkama održava listove u uspravnom položaju i povećava otpornost na poleganje, poboljšava iskorišćavanje sunčeve svetlosti, a time i efikasnost fotosinteze (Ma et al. 2001; Ma and Takahashi 2002). Depoziti Si u kutikuli smanjuju transmisiju UV zračenja na epidermis (Li et al. 2004). Kod biljaka izloženih suši, Si doprinosi održanju funkcije stoma, vodnog potencijala i relativnog sadržaja vode u biljkama, kao i smanjenju gubitka vode transpiracijom usled zadebljanja listova biljaka gajenih sa Si (Hattori et al. 2005; Gao et al. 2006; Ahmed et al. 2011).

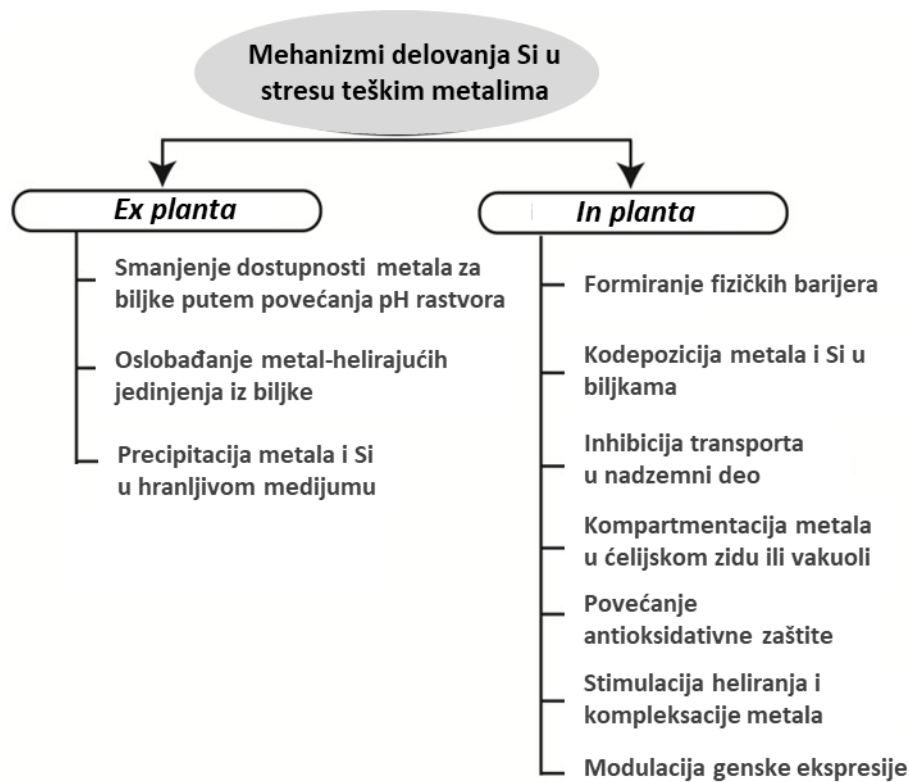
Za razliku od fizičkog stresa, korisni efekti Si na biljke koje se suočavaju sa nedostatkom ili viškom hraniva se ne mogu objasniti samo mehaničkim prisustvom Si. Uticaj Si na biljke suočene sa deficitom P kao jednim od izraženih problema današnjice podrazumeva *ex planta* mehanizme, koji se tiču povećanja dostupnosti P za biljke, ali i olakšanog usvajanja P stimulacijom *in planta* mehanizama (Ma and Takahashi 1990; Kostic et al. 2017). Mehanizmi delovanja Si kod biljaka koje su izložene nedostatku mikroelemenata, kao što su Fe, Zn i Mn, uključuju stimulaciju helirajućih jedinjenja (organske kiseline i fenoli) koji vrše mobilizaciju mikroelemenata iz hranljivog medijuma, kao i efikasnije iskorišćavanje apoplastnih rezervi Fe i Zn (Pavlovic et al. 2013; Bityutskii et al. 2014). Promene u nivou ekspresije gena odogovornih za ove procese su takođe zabeležene (Pavlovic et al. 2013).

Uticaj Si na ublažavanje dejstva toksičnosti teških metala postiže se različitim mehanizmima na nivou korena i/ili lista (**Slika 1.9**), što zavisi od biljne vrste ali i vrste metala, uslova rasta i trajanja stresa (Adrees et al. 2015). Poboljšanje opšteg fiziološkog stanja biljaka, stimulacija rasta biljaka gajenih u prisustvu viška metala kao i smanjenje štetnih efekata metala usled primene Si primećeno je kod različitih biljnih vrsta. Mehanizmi delovanja Si su dosta izučavani kod stresa Mn, Cd, Al, Zn. Williams i Vlamis (1957) su prvi otkrili da primena Si ublažava toksične efekte mangana na ječam tako što višak Mn nije koncentrisan u nekrotičnim tačkama u listovima već je, usled delovanja Si, Mn ravnomerno raspoređen (Williams and Vlamis 1957). Uticaj Si na distribuciju Mn je pokazan i kod drugih biljnih vrsta (Horst and Marschner 1978; Iwasaki et al. 2002; Rogalla and Römheld 2002). Pored toga, Si doprinosi smanjenju oksidativnog stresa izazavnog Mn u višku i utiče na metabolizam fenola (Shi et al. 2005a; Dragišić Maksimović et al. 2007, 2012). Mnogobrojna istraživanja uloge Si u stresu Cd su doprinela rasvetljavanju mehanizama delovanja Si. Pokazano je da akumulacija Si u blizini endodermisa bar delimično fizički blokira apoplastni tok kroz koren i zadržava apoplastni transport Cd, stoga i njegovu translokaciju do listova (Shi et al. 2005b). Razviće barijera za transport Cd u korenu, kao i povećano prisustvo Cd u apoplastu a smanjeno u simplastu je primetno kod biljaka kukuruza gajenih sa Si (Liang et al. 2005b; Vaculík et al. 2009, 2012). Pored toga, povećanje aktivnosti antioksidativnih enzima doprinosi smanjenju oksidativnog stresa kod takvih biljaka (Song et al. 2009;



Shi et al. 2010; Farooq et al. 2013). Uticaj Si na antioksidativnu zaštitu je dominantan mehanizam delovanja Si kod stresa viškom Zn (Song et al. 2011). Si utiče i na samo usvajanje Zn, kao i drugih mineralnih elemenata (Gu et al. 2012; Bokor et al. 2015). U stresu Al, eksterni mehanizmi kao što su formiranje hidroksialuminijum-silikata kao i kompleksa Al sa fenolima oslobođenih iz korena, značajno smanjuju ulazak Al u biljke gajene sa Si (Hammond et al. 1995; Kidd et al. 2001; Vega et al. 2019). Koristan efekat Si je pokazan i kod stresa hromom (Zeng et al. 2011), arsenom (Fleck et al. 2013), natrijumom (Zhu et al. 2004; Bosnic et al. 2018), olovom (Li et al. 2012).

Malobrojne studije koje su se bavile ispitivanjem uloge Si u stresu izazvanom prisustvom viška bakra rađene su na hortikulturnim vrstama kao i arabidopsisu, koji se ne smatraju izrazitim Si-akumulatorima, kao i na monokotilama, pšenici i pirinču, koje usvajaju znatne količine Si. Kako Si reguliše metabolizam dikotila izloženih povišenim koncentracijama bakra, na fiziološkom, biohemijskom i molekularnom nivou, nije do kraja razjašnjeno. Dosadašnja istraživanja su nagovestila da više od jednog mehanizma delovanja Si može biti uključeno u odbrani biljaka izloženih toksičnosti bakra (Khandekar and Leisner 2011).



**Slika 1.9.** Spoljašnji i unutrašnji mehanizmi delovanja silicijuma kod biljaka izloženih stresu teškim metalima. Slika modifikovana prema Wu et al. (2013) i Bhat et al. (2019).

## 1.11 Biljke krastavca kao model sistem

Krastavac (*Cucumis sativus* L.) kao model sistem ima značajnu ulogu u istraživanjima koja se tiču ispitivanja mehanizama delovanja Si u biljkama. Među prvim istraživanjima korisnog efekata Si su bili radovi na biljkama krastavca (Adatia and Besford 1986). Zapravo to je jedna od malobrojnih dikotila koja usvaja Si u značajnim količinama (Hodson et al. 2005). Inluksni i efluksni tip transportera su nedavno funkcionalno okarakterisani u ovoj vrsti (Sun et al. 2017, 2018a). Krastavac, kao model biljka, izuzetno je doprineo rasvetljavanju uloge Si u biotičkom stresu (Chérif et al. 1994; Fawe et al. 1998). Istraživanja uloge Si kod krastavca izloženog toksičnim koncentracijama Mn (Dragišić Maksimović et al. 2007, 2012), kao i stresu solima (Zhu et al. 2004) su pokazala da je ova biljna vrsta pogodna za ispitivanje mehanizma delovanja Si u dikotilama suočenim sa faktorima abiotičkog stresa.

Istovremeno, krastavac pripada biljnim vrstama osetljivim na prisustvo viška bakra, i agronomski je značajna povrtarska kultura koja se gaji u Srbiji.

## 2 Ciljevi rada

Predmet izučavanja ove doktorske disertacije jeste ispitivanje uloge silicijuma u stresu izazvanom povišenim koncentracijama bakra kod biljaka krastavca, kao predstavnika dikotila koje mogu da aktivno usvajaju silicijum u obliku silicijumove kiseline. Opšti naučni cilj ove doktorske disertacije jeste da se različitim eksperimentalnim pristupima pronađu i rasvetle fiziološki i molekularni mehanizmi koji leže u osnovi potencijalnog protektivnog efekta primene silicijuma na biljke krastavca gajene u uslovima stresa izazvanog viškom bakra. U skladu sa tim su definisani specifični ciljevi:

1. Opisati vizuelne promene na biljkama tretiranim bakrom kao i promene u strukturi i funkciji biljnih organa, korena i lista usled primene silicijuma
2. Ispitati uticaj silicijumove kiseline na proces usvajanja bakra, njegov sadržaj u biljnim organima kao i preraspodelu na subćelijskom nivou
3. Utvrditi nivo oksidativnog stresa u biljkama izloženim supraoptimalnim koncentracijama bakra, kao i ispitati aktivnost i ekspresiju enzima antioksidativne zaštite kod biljaka gajenih sa i bez dodavanja silicijuma u hranljivom medijumu
4. Ispitati status helirajućih jedinjenja (organskih kiselina i aminokiselina) uključenih u homeostazu bakra, pod uticajem silicijuma
5. Analizirati uticaj primene silicijuma na ekspresione profile gena uključenih u odgovor na stres, kao i gena i proteina koji sadrže bakar kao kofaktor, zajedno sa miRNK koje su odgovorne za njihovu regulaciju na post-transkripcionom nivou.

## 3 Materijal i metode

### 3.1 Gajenje biljaka

#### 3.1.1 Biljni materijal i uslovi gajenja u hidroponičnoj kulturi

Seme krastavca (*Cucumis sativus* L. cv. Kineski dugi) je sterilisano u 4% natrijum-hipohloritu (NaOCl), a nakon toga, potopljeno je u 1 mM kalcijum-sulfat ( $\text{CaSO}_4$ ) na imbibiciju u aerisanim uslovima, preko noći. Zatim su semena postavljena na naklijavanje između dva sloja filter papira koji su nakvašeni destilovanom vodom, u mraku, na temperaturi od 25 °C. Nakon 5 dana, klijanci su prebačeni u hranljivi rastvor koji je sadržao sve esencijalne makroelemente u sledećim koncentracijama (mM): 0,7  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 0,1 KCl, 2,0  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 0,5  $\text{MgSO}_4$ , 0,1  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , kao i mikroelemente ( $\mu\text{M}$ ): 0,5  $\text{MnSO}_4$ , 0,5  $\text{ZnSO}_4$ , 0,2  $\text{CuSO}_4$ , 0,01  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ , 10  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 20  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{EDTA}$ . U svakoj posudi zapremine 3l gajeno je po 5 biljaka. Hranljivi rastvor je konstantno aerisan i obnavljan na svaka dva dana, a pH rastvora je podešen na 6, što je proveravano svakog dana. Biljke su gajene pod kontrolisanim uslovima temperature 24 °C : 20 °C i fotoperiodom 16 h : 8 h (svetlost : mrak), pri količini svetlosti od 250  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  gustine fluksa fotona u visini biljke, što je obezbeđeno LED lampama (Apollo 8, Cidly Co., Ltd., Šendžen, Kina).

#### 3.1.2 Priprema silicijumove kiseline

Tretman silicijumom podrazumevao je primenu Si u vidu silicijumove kiseline  $\text{Si}(\text{OH})_4$  u koncentraciji od 1,5 mM, premda je po literaturnim podacima to najčešće korištena koncentracija, i imajući u vidu da  $\text{Si}(\text{OH})_4$  u koncentraciji od 2 mM i višoj polimerizuje. Silicijumova kiselina dobijena je iz natrijum-silikata  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  (Merck, Nemačka) upotrebom jono-izmenjivačke smole (Amberlite IR-120,  $\text{H}^+$  form; Fluka, Buchs SG, Švajcarska), koja omogućava da se natrijumovi joni zamene vodonikovim jonima. Propuštanjem natrijum-silikata kroz kolonu ispunjenu jono-izmenjivačkom smolom dobijena je čista silicijumova kiselina, koja je na ovaj način svaki put pripremljena neposredno pre dodavanja u hranljivi rastvor (Nikolic et al. 2007).

#### 3.1.3 Testiranje efekata različitih koncentracija bakra

U cilju odabira umereno toksične koncentracije sa kojom bi se nastavili dalji eksperimenti, testiran je efekat različitih doza bakra na biljke krastavca. Cu je primenjen u obliku bakar-sulfata ( $\text{CuSO}_4$ ) u sledećim koncentracijama: 5, 10, 15, 20 i 30  $\mu\text{M}$ . Na osnovu vrednosti za ukupnu masu biljaka, kao i parametara oksidativnog stresa, odabrana je srednje toksična koncentracija koja je primenjena u svim narednim eksperimentima.

### 3.1.4 Tretmani biljaka bakrom i silicijumom

Svaki eksperiment je podrazumevao gajenje biljaka u prekulturni u trajanju od 7 dana, nakon čega su započeti tretmani bakrom i silicijumom. Biljke su podeljene u dve grupe: kontrolne biljke, koje su gajene pri optimalnoj koncentraciji bakra ( $0,2 \mu\text{M}$ ), i biljke kojima je u hranljivi rastvor dodat  $10 \mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ . U svakoj grupi, polovina biljaka je gajena sa Si, tako što je  $1,5 \text{ mM}$   $\text{Si}(\text{OH})_4$  dodat u hranljivi rastvor, dok je druga polovina gajena bez Si. Ukupno je bilo 4 različite grupe biljaka označene na sledeći način:

- K-Si (kontrolne biljke bez silicijuma)
- K+Si (kontrolne biljke sa silicijumom)
- +Cu-Si (biljke tretirane bakrom bez silicijuma)
- +Cu+Si (biljke tretirane bakrom sa silicijumom)

Analize efekata umereno toksične koncentracije bakra, kao i efekata tretmana silicijumom na biljke krastavca su podrazumevale praćenje opštih fizioloških parametara stanja biljaka, sastav mineralnih elemenata po organima i ćelijskim frakcijama, merenje nivoa oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, analizu proteina koji sadrže bakar kao kofaktor, analizu organskih kiselina i aminokiselina, analizu ekspresije izabranih gena koji učestvuju u svim navedenim procesima.

### 3.1.5 Praćenje rasta i izgleda biljaka

Izgled biljaka zabeležen je na fotografijama tokom različitih faza gajenja biljaka u pretretmanu i od početka tretmana bakrom i silicijumom. Ukupna sveža i suva masa biljaka u prvom eksperimentu merena je nakon tri dana tretmana, dok je masa pojedinačno korena i listova merena nakon jednog i nakon pet dana od početka tretmana na analitičkoj vagi (Sartorius, Nemačka), a prikazani su rezultati srednje vrednost od šest ponavljanja.

### 3.1.6 Priprema biljnog materijala za analize

Biljni materijal je pri uzorkovanju podeljen na koren i listove, i u zavisnosti od tipa analiza svež materijal je trenutno smrzan u tečnom azotu, ili sušen na  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  u trajanju od 72 h. Uzorci su uzimani za analize nakon jednog dana i/ili nakon pet dana od početka tretmana, ukoliko nije drugačije naglašeno. Kratkotrajni tretmani mereni u satima, su uzorkovani u toku prvih 24 h od početka tretmana.

## 3.2 Određivanje sadržaja hlorofila

Sadržaj hlorofila izmeren je nedestruktivnom metodom, pomoću prenosivog uređaja za merenje hlorofila SPAD-502 (Spectral Plant Analysis Diagnostic; Minolta Camera Co., Osaka, Japan). Merenje je izvršeno u dugotrajnom tretmanu nakon razvića trećeg lista, i to na sva tri razvijena lista krastavca.

Analiza je obuhvatila celu površinu lista tako da pojedinačna vrednost predstavlja srednju vrednost sadržaja hlorofila na celoj lisnoj površini, a vrednosti predstavljene na grafiku su rezultat pet ponavljanja na pojedinačnim biljkama u okviru tretirane grupe.

### **3.3 Određivanje mineralnog sastava u biljnim organima**

Priprema za mineralnu analizu podrazumevala je ispiranje korena biljaka sa 1 mM etilen diamin tetra sirćetnom kiselinom (EDTA) i još dva puta bidestilovanom vodom (ddH<sub>2</sub>O), kako bi se uklonili zaostali elementi iz hranljivog rastvora, a koji su adsorbovani na površini korena. Nakon sušenja na 70°C u trajanju od 72 h, uzorci biljnog materijala (korena i lista) usitnjeni su do finog praha, a zatim podvrgnuti digestiji u rastvoru koncentrovane azotne kiseline (HNO<sub>3</sub>) i 30% vodonik-peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) u odnosu 3:2, u teflonskim sudovima u mikrotalasnoj pećnici (Speedwave MWS-3+; Berghof Products + Instruments GmbH, Eningen, Nemačka) na temperaturi od 550 °C u trajanju od 1 h. Nakon razaranja, uzorci su razblaženi ddH<sub>2</sub>O, a sastav elemenata u uzorcima određen je optičkom emisionom spektroskopijom sa induktivno spregnutom plazmom, ICP-OES (SpectroGenesis EOP II, Spectro Analytical Instruments GmbH, Kleve, Nemačka). Koncentracija Cu izražena je u µg/g suve mase biljnog organa (korena i lista) dok je ukupan sadržaj elemenata Cu, Fe, Zn i Mn u listovima izračunat na osnovu koncentracije i ukupne mase listova. Srednja vrednost je dobijena na osnovu četiri ponavljanja.

### **3.4 Merenje koncentracije Cu u ćelijskim frakcijama**

#### **3.4.1 Frakcionacija biljnih tkiva**

Pre početka frakcionacije, koren je ispiran sa 1 mM EDTA a iz listova su odstranjeni glavni nervi. Biljni materijal je izmeren, a zatim smrznut na -20 °C kako bi došlo do pucanja ćelija i oslobađanja tečne frakcije. Nakon odmrzavanja, materijal je centrifugiran u tubama sa filterom za koncentrovanje uzoraka (Amicon ultra-15 Milipore tubes, Merck, Nemačka), na 3000 g u trajanju od 15 min na 4 °C (Centrifuga 5417R, Eppendorf, Nemačka). Zatim je uzorak ispiran ddH<sub>2</sub>O i korak centrifugiranja je ponovljen. Ukupna tečna frakcija je prikupljena i ona predstavlja vodenu frakciju koja potiče od vakuole, simplasta i dela fluida apoplasta. Preostali materijal je homogenizovan i resuspendovan u 1% natrijum dodecil sulfatu (SDS) a zatim centrifugiran na 3000 g u trajanju od 10 min na 20 °C (Centrifuga 5417R, Eppendorf, Nemačka). Supernatant je uzet a talog je tri puta ispiran ddH<sub>2</sub>O sa korakom centrifugiranja između. Ukupan supernatant je sakupljen i on predstavlja proteinsku frakciju koja potiče iz simplasta ćelija. Preostali talog predstavlja frakciju ćelijskog zida.

#### **3.4.2 Priprema frakcija za merenje koncentracije Cu**

Vodena i proteinska frakcija uparene su na 100 °C do suvog ostatka na termo-ploči (Hotplate, Fisher Scientific, SAD) koji je resuspendovan u koncentrovanoj HNO<sub>3</sub> i prebačen u teflonski sud u kojem je dodat 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a zatim je uzorak razoren u mikrotalasnoj pećnici kako je opisano. Talog frakcije ćelijskog zida je osušen, izmeren, a zatim podvrgnut razaranja na isti način. Sastav elemenata

određen je merenjem na ICP-OES-u, a koncentracija Cu izražena je u  $\mu\text{g/g}$  suve mase za svaku frakciju pojedinačno a zatim je izračunata procentualna zastupljenost Cu u svakoj pojedinačnoj frakciji. Uzorak od tri biljke je pulovan i predstavlja jedno ponavljanje a srednja vrednost je dobijena na osnovu tri ponavljanja.

### **3.5 Određivanje stepena oštećenja korena**

U cilju utvrđivanja stepena oštećenja ćelijske membrane u korenu krastavca, merena je količina oslobođenih elektrolita pomoću EC-pH metra (Multi-parameter Meter HI3512; Hanna Instruments, Woonsocket, RI, SAD) u vremenskim intervalima 4, 8, 12 i 24 h od početka tretmana. Nakon ispiranja 1 mM EDTA i dva puta ddH<sub>2</sub>O, koren biljaka je potopljen u određenoj količini dejonizovane vode uz konstantnu aeraciju u trajanju od 1 h. Koren je zatim isečen, izmeren i osušen, dok su elektroliti koji su isticali iz ćelija korena izmereni u dejonizovanoj vodi u kojoj je koren inkubiran. Takođe, za dobijanje rezultata 100% oštećenog korena, uzorci od svakog tretmana su prvo izmereni a nakon merenja smrznuti, kao bi pucanje ćelija pod dejstvom leda izazvalo maksimalno curenje elektrolita kod datog tretmana a zatim su takvi korenovi inkubirani na isti način kao što je opisano. Količina elektrolita izašla iz smrznutog korena predstavlja vrednosti za 100% oštećen koren. Količina isticanih elektrolita preračunata je na masu korena a zatim je za svaki tretman izračunato procentualno oštećenje u odnosu na vrednosti dobijene za 100% oštećen koren za isti tretman.

### **3.6 Merenje sadržaja ukupnih fenola**

Za merenje ukupnih fenola korišćen je Folin-Ciocalteu (FC) reagens koji omogućava kolorimetrijsku reakciju, dok je za preračunavanje sadržaja fenola korišćena galna kiselina (GA) za pravljenje standardne krive (Singleton and Rossi 1965; Ainsworth and Gillespie 2007). Biljni materijal (koren) homogenizovan je u tečnom azotu a ukupni fenoli su ekstrahovani u 75% metanolu. Uzorci su inkubirani u mraku uz mešanje na sobnoj temperaturi u trajanju od 24 h. Nakon centrifugiranja na 13 000 g, 10 min (MiniSpin, Eppendorf, Nemačka), supernatant je sakupljen i dalje korišćen. Reakciona smeša je sadržala FC reagens, uzorak i ddH<sub>2</sub>O do određenog volumena a nakon 3 min dodat je 20% natrijum-karbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) a finalna zapremina je bila 2 ml. Blank bez uzorka kao i standardi GA pripremljeni su na isti način. Nakon dva sata inkubacije na sobnoj temperaturi, merena je apsorbanca na 765 nm na spektrofotometru (Infinite 200 PRO microplate reader, Tecan, Švajcarska). Na osnovu standardne krive izračunat je sadržaj ukupnih fenola i izražen u ekvivalentima GA (mg GAE/g suve mase). Predstavljene su srednje vrednosti od četiri ponavljanja.

### **3.7 Histochemijsko bojenje lignina u korenu**

Bojenje i vizuelizacija lignina su izvršeni po proceduri Lux et al. (2015). Celi korenovi su čuvani u 70 % metanolu na 4 °C do trenutka bojenja koje je podrazumevalo potapanje korenova u rastvor mlečne kiseline a zatim inkubaciju na 60 °C u mraku u trajanju od 1h. Zatim su korenovi isprani u ddH<sub>2</sub>O, a potom je izvršeno bojenje sa 2 % floroglucinolom rastvorenim u 96% etanolu, a posle 2 min je dodata 25% hlorovodonična kiselina (HCl). Celi korenovi su skenirani u cilju vizuelizacije lignina (Epson Expression 10,000 XL scanner, CA, SAD). Takođe, pojedinačni korenovi od svakog

tretmana su posmatrani pod fluorescentnim mikroskopom (Zeiss Axioskop 2 plus epifluorescence microscope, Jena, Nemačka) i slikani digitalnom kamerom (Olympus DP-72). Intenzitet lignifikacije dobijen je na osnovu denzitometrijske analize fotografija u softveru *Image J*.

### **3.8 Merenje nivoa peroksidacije lipida**

Nivo lipidne peroksidacije određen je praćenjem njihovih krajnjih produkata peroksidacije, pre svega malondialdehida (MDA) po metodi Hodges et al. (1999). Biljni materijal (koren i list) homogenizovan je u 20% trihlorsirćetnoj kiselini (TCA) a potom centrifugiran na 14 000 g tokom 20 min na 4 °C (Centrifuga 5417R, Eppendorf, Nemačka). Supernatant je pomešan sa istom količinom 20 % TCA koja je sadržala 0,5 % tiobarbituratnu kiselinu (TBA). Reakciona smeša je zatim inkubirana na 95 °C u termobloku (Biometra, Nemačka) tokom 30 min a reakcija je prekinuta naglim hlađenjem na ledu. Nakon centrifugiranja na 14 000 g, 10 min (Centrifuga 5417R, Eppendorf, Nemačka), merena je apsorbancu na 532 nm i korigovana na nespecifičnu asorbancu izmerenu na 600 nm na spektrofotometru (Ultrospec 3200 pro, GE Healthcare Life Sciences, SAD). Koncentracija MDA izračunata je u nmol po gramu sveže mase koristeći ekstinkcioni koeficijenta 155/mM/cm. Srednje vrednosti su izračunate na osnovu pet ponavljanja.

### **3.9 Analize proteina**

#### **3.9.1 Ekstrakcija proteina**

Biljni materijal (koren i list) samleven je uz pomoć tučka i avana u tečnom azotu a zatim se ekstrakcija razlikovala u zavisnosti da li su uzorci korišćeni za analizu aktivnosti enzima ili detekciju proteina metodom Western blot. Uzorci za analizu aktivnost enzima homogenizovani su u ekstrakcionom puferu koji je sadržao 50 mM kalijum-fosfatni (K-P) pufer pH 7,0; 0,1 mM EDTA i 2% (w/v) polivinilpirolidon (PVP), a zatim centrifugirani na 13 000 g u trajanju od 20 min na 4 °C (Centrifuga 5417R, Eppendorf, Nemačka). Supernatant je sakupljen i korišćen u esejima određivanja aktivnosti enzima.

Za izolovanje proteina koji su analizirani metodom Western blot, korišćen je ekstrakcioni pufer koji je sadržao 25 mM Trisaminometan (Tris) - HCl pH 7,5; 2 mM EDTA i inhibitor proteza fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF) koncentracije 0,1 mM. Nakon snažnog mešanja, uzorci su inkubirani sat vremena na sobnoj temperaturi (ST) a zatim centrifugirani 10 min na 10 000 g (MiniSpin, Eppendorf, Nemačka). Supernatant je korišćen u narednim koracima.

#### **3.9.2 Merenje koncentracije proteina**

Proteini su kvantifikovani metodom prema Bradfordu koja se zasniva na kolorimetrijskoj reakciji upotrebom reagensa "BioRad Protein Assay Dye" (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, SAD). Nakon dodavanja reagensa, uzorci su inkubirani 5 min na sobnoj temperaturi a zatim je merena



apsorbanca na 595 nm na spektrofotometru (Tecan Infinite 200 PRO microplate reader). Koncentracija proteina u uzorku dobijena je na osnovu standardne krive koja je konstruisana upotrebom serije koncentracija govedeg serum albumina BSA (eng. *Bovin Serum Albumin*) kao standarda (Bradford 1976).

### 3.9.3 Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima

Ukupna aktivnost enzima superoksid-dismutase (SOD) određena je na osnovu merenja inhibicije fotohemijske redukcije nitro plavo tetrazolijuma (NBT) po metodi Giannopolitis and Ries (1977). Reakciona smeša sastojala se od 50 mM K-P pufera pH 7,0; 0,1 mM EDTA, 13 mM metionina, 75  $\mu$ M NBT, 2  $\mu$ M riboflavina i određene količine proteinskog ekstrakta (korena i lista) u finalnoj zapremini od 1 ml. Riboflavin je poslednji dodat u reakcionu smešu a sama reakcija inicirana je izlaganjem fluorescentnoj svetlosti. Nakon 15 minuta merena je apsorbanca na 560 nm na spektrofotometru (Infinite 200 PRO microplate reader, Tecan, Švajcarska) i kalibrisana u odnosu na vrednosti za iste uzorke ali koji su inkubirani u mraku. Aktivnost SOD izračunata je po formuli  $V/v-1$ , gde je  $v$  aktivnost uzorka, a  $V$  aktivnost blanka bez enzima i izražena je U/mg proteina.

Aktivnost askorbat-peroksidaze merena je u reakcionoj smeši koja je sadržala 50 mM K-P pufer pH 7,0; 0,1 mM EDTA; 0,25 mM askorbat i 0,5 mM  $H_2O_2$  i određenu količinu proteinskog ekstrakta (korena i lista) u finalnoj zapremini od 1 ml.  $H_2O_2$ -zavisna oksidacija askorbata detektovana je na osnovu smanjenja apsorbanca na 290 nm na spektrofotometru (Ultrospec 3200 pro, GE Healthcare Life Sciences, SAD) a aktivnost enzima je izračunata pomoću ekstinkcionog koeficijenta ( $\epsilon = 2.8/mM/cm$ ) po metodi Nakano and Asada (1981), i izražena U/mg proteina.

Reakciona smeša za merenje aktivnosti katalaze sadržala je 50 mM K-P pufer pH 7,0; 0,1 mM EDTA, 15 mM  $H_2O_2$  i odgovarajuću količinu proteinskog ekstrakta lista u finalnoj zapremini od 1 ml. Reakcija je inicirana dodavanjem  $H_2O_2$ , a aktivnost enzima je dobijena praćenjem kinetike smanjenja apsorbanca merene na 240 nm na spektrofotometru (Ultrospec 3200 pro, GE Healthcare Life Sciences, SAD), kao posledice razlaganja  $H_2O_2$ , i izračunata na osnovu ekstinkcionog koeficijenta ( $\epsilon = 0.036/mM/cm$ ) po metodi Havir and McHale (1987), i izražena u U/mg proteina.

### 3.9.4 Vertikalna elektroforeza na poliakrilamidnom gelu pod denaturišućim uslovima (SDS-PAGE)

SDS-PAGE omogućava razdvajanja proteina prema molekularnoj masi. Denaturišući SDS poliakrilamidni gel sastoji se iz gela za koncentrovanje uzorka (eng. *stacking gel*) i gela za razdvajanje uzoraka (eng. *running gel*). 15% poliakrilamidni SDS gel za razdvajanje uzoraka je sadržao 0,1% SDS, pripremljen u puferu 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, pomoću 0,1% amonijumpersulfata (APS) kao inicijatora i 0,01% tetrametiletilendiamina (TEMED) kao katalizatora polimerizacije. Za pripremanje 5% poliakrilamidnog SDS gela za koncentrovanje uzoraka korišćen je pufer 0,5 M Tris HCl pH 6,8. Uzorci su neposredno pre nanošenja na gel pomešani sa denaturišućim puferom za uzorak (0,063 M Tris HCl pH 6,8; 2% SDS; 10% glicerol; 5%  $\beta$ -markaptoetanol) koji je sadržao boju (0,25%, brom-fenol plavo, 0,25% ksilen-cijanol, 30% glicerol), a zatim denaturisani na 70°C u trajanju od 5 min. Radi određivanja

veliĉine proteina, korišćeni su komercijalni proteinski markeri (PageRuler, ThermoFisher Scientific, SAD).

Proteinski ekstrakti su elektroforetski razdvojeni u TGB puferu (25 mM Tris, 250 mM glicin, 0,1% SDS u ddH<sub>2</sub>O) pri naponu od 90 V dok su uzorci putovali kroz gel za koncentrovanje, i naponu od 150 V dok su uzorci putovali kroz gel za razdvajanje uzoraka. Uspešnost elektroforeze je proverena bojenjem gela Comassie brilliant blue bojom R-250 (0,25%) rastvorenom u smeši koja je sadržala 45% metanola, 45% vode i 10% sirćetne kiseline u cilju vizuelizacije razdvojenih proteina.

### 3.9.5 Transfer proteina na membranu i imunoheмиjska detekcija proteina (Western blot)

Transfer proteina sa gela na polivinil-difluoridnu (PVDF) membranu sa porama veliĉine 0,45 µm (Immobilone-P, Millipore, MA, SAD) trajao je 30 min pri jaĉini struje od 4 mA po cm<sup>2</sup> membrane i izveden je u aparatu za polusubi transfer (Biometra, Nemaĉka). Nakon završenog transfera, membrana je inkubirana 2 min u rastvoru Ponceau S (0,1% Ponceau S boja; 1% sirćetna kiselina), koji omogućava reverzibilno boljenje membrane radi potvrde da je transfer uspešno i ravnomerno obavljen. Membrana je zatim nekoliko puta ispirana u puferu PBS-T (80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, 20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4 i 0,1% Tween 20) radi potpunog odbojavanja.

U cilju blokiranja nespecifiĉnog vezivanja antitela, membrana je zatim inkubirana u 5% BSA rastvorenom u puferu PBS-T u trajanju od 1h na ST nakon ĉega je membrana 2 puta kratko isprana ddH<sub>2</sub>O.

Imunoheмиjska detekcija proteina od interesa obavljena je u narednim koracima koji podrazumevaju inkubaciju membrane sa primarnim i sekundarnim antitelima. Inkubacija sa primarnim antitelom (Agrisera Antibodies, Svedska) koje je specifiĉno za ciljni protein (izoforme Cu/Zn SOD i plastocijanin) kao i endogenu kontrolu (aktin) izvršena je pod odgovarajućim uslovima prema specifikaciji proizvođaĉa, u trajanju od 1h na sobnoj temperaturi (ST) ili preko noći (ON) na 4 °C, zavisno od vrste antitela (**Tabela 3.1**).

Zatim je membrana temeljno ispirana u PBS-T puferu, jednom u trajanju od 15 min i tri puta po 5 min. Inkubacija sa odgovarajućim sekundarnim antitelom specifiĉnim za primarno antitelo, trajala je 1h na sobnoj temperaturi (**Tabela 3.1**). Nakon temeljnog ispiranja membrane na opisan naĉin usledila je hemiluminiscentna detekcija proteina pomoću ECL sistema (Immobilon™Western, Millipore, SAD). Pošto je sekundarno antitelo konjugovano sa peroksidazom rena (HRP), dodavanjem komponenti ECL sistema prema uputstvu proizvođaĉa, oslobađa se hemiluminiscentni signal ĉiji je intenzitet proporcionalan koliĉini proteina u uzorku. Detekcija signala se vrši u mraĉnoj komori, pomoću radiografskih filmova (Kodak, Rochester, NY, SAD). Ekspozicija filmova je trajala od nekoliko sekundi do nekoliko minuta, nakon ĉega se pristupilo razvijanju fotografija. Intenzitet signala je dobijen denzitometrijskom analizom fotografija u softveru *Image J*. Koliĉina proteina Cu/Zn SOD i plastocijanina odreĉena je relativno u odnosu na endogenu kontrolu (aktin) a promene u koliĉini proteina u tretmanima predstavljene su u odnosu na kontrolne netretirane uzorke (K-Si).

**Tabela 3.1.** Primarna i sekundarna antitela korišćena u Western blot analizi.

Primarno antitelo	Razblaženje	Uslovi inkubacije	Sekundarno antitelo	Razblaženje	Uslovi inkubacije
Mišji Anti-Aktin	1:2000 u 2% BSA	1 h na ST	HRP-konjugovano anti-mišji IgG	1:5000 u 1% BSA	1h na ST
Pileći Anti-Cu/Zn SOD	1:1500 u 5% BSA	ON na 4 °C	HRP-konjugovano anti-pileći IgY	1:5000 u 1% BSA	1h na ST
Zečji Anti-Plastocijanin	1:100000 u 1% BSA	ON na 4 °C	HRP-konjugovano anti-zečji-IgG	1:20000 u 1% BSA	1h na ST

## 3.10 Analiza ekspresije gena

### 3.10.1 Ekstrakcija ukupne RNK

Biljni materijal (koren i list) samleven je u tečnom azotu a zatim homogenizovan u ekstrakcionom puferu koji je sadržao 8 M guanidin hidrohlorid, 20 mM 2-(N-morfolino) etansulfonsku kiselinu (MES), 20 mM EDTA i 2%  $\beta$ -merkaptioetanol. Nakon dužeg mešanja, dodata je jednaka zapremina fenola pH 5,2 a zatim su uzorci centrifugirani 10 min na 12 000 g (MiniSpin, Eppendorf, Nemačka), na ST. Fenol denaturiše proteine, što dovodi do njihovog odvajanja od nukleinskih kiselina, i doprinosi razdvajanju organske i vodene faze. Gornja vodena faza, u kojoj se nalaze nukleinske kiseline, izdvojena je i pomešana sa jednakom zapreminom smeše fenola i SEVAG-a (hloroform: izoamil alkohol u odnosu 24:1). Nakon snažnog mešanja i centrifugiranja 2 min na 12 000 g, na ST, gornja, vodena faza je uzeta i ponavljen je predhodni korak. Zatim je gornja faza pomešana sa SEVAG-om u odnosu 1:1 pa je centrifugirana 2 min pod istim uslovima. Sledio je korak alkoholne precipitacije, gde je gornja, vodena faza pomešana sa 2 volumena apsolutnog etanola i dodata je 1/20 ukupog volumena 4M Na-acetata, pH 5,2. Nakon blagog mešanja, rastvor je inkubiran 30 minuta na -20 °C. Nakon centrifugiranja u trajanju od 10 min na 12 000 g (MiniSpin, Eppendorf, Nemačka), istaložena RNK je ispirana u hladnom 70% etanolu, koji je nakon centrifugiranja od 5 min odliven i uparen u vakuum uparivaču. Talog je rastvoren u vodi bez nukleaza (eng. *RNase Free Water*) a koncentracija RNK je izmerena na spektrofotometru NanoVue™ (GE Healthcare Life Sciences, SAD). RNK je čuvana na -80 °C.

### 3.10.2 Tretman dezoksiribonukleazom

Nakon izolovanja RNK, zaostala genomska DNK se uklanja enzimom dezoksiribonukleazom (DNazom) I (Ambion DNA-free kit). Reakciona smeša koja se sastojala od 5  $\mu$ g RNK, 2 U rekombinantne DNaze I i odgovarajućeg pufera (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>) u finalnoj zapremini od 50  $\mu$ l, inkubirana je na 37°C u termobloku (Biometra, Nemačka) u

trajanju od 30 min. Reakcija je zaustavljena dodavanjem inaktivatora DNaze I a nakon inkubacije od 2 min na ST, smeša je centrifugirana na 10 000 g u trajanju od 1,5 min (MiniSpin, Eppendorf, Nemačka). Supernatant je izdvojen a koncentracija RNK je izmerena na spektrofotometru NanoVue™ (GE Healthcare Life Sciences, SAD).

### 3.10.3 Sinteza komplementarne DNK (cDNK)

Za sintezu prvog lanca cDNK korišćen je RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific, SAD). Reakciona smeša sadržala je 1 µg RNK i 100 pmol nasumičnih heksamernih prajmera odnosno 20 pmol specifičnih „*stem-loop*“ prajmera koji omogućavaju reverznu transkripciju (RT) miRNK (**Tabela 3.2**). Prvi korak čini vezivanje prajmera za matricu koje se odvijalo na 65°C u termobloku (Biometra, Nemačka) u trajanju od 5 min, a potom su uzorci ohlađeni na ledu 2 min. U reakcionu smešu su zatim dodate sledeće komponente: reverzna transkriptaza (200 U), smeša dNTP (1 mM), inhibitor RNaze (20 U) i reakcioni pufer (50 mM Tris-HCl pH 8,3; 50 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub> i 50 mM ditiotritol (DTT)), u finalnoj zapremini od 20 µL, po uputstvu proizvođača. Nakon inkubacije 10 min na ST, reakcija je nastavljena na 42 °C u termobloku u trajanju od sat vremena a potom je reakcija prekinuta inkubacijom 10 min na 70 °C.

**Tabela 3.2** Sekvence „*stem-loop*“ prajmera za reverznu transkripciju miRNK

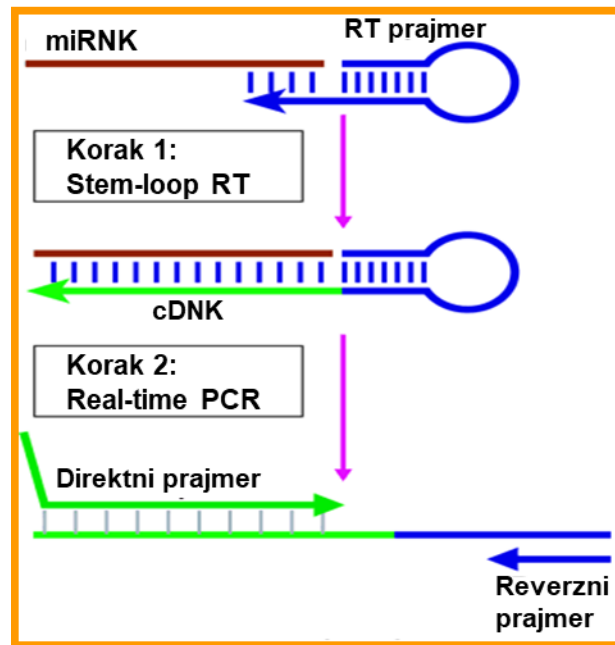
miRNK	Sekvenca „ <i>stem-loop</i> “ prajmera (5'-3')
RTmiR398	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCAGGGG
RTmiR408	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGCCAGG

### 3.10.4 Dizajn prajmera

Prajmeri za analizu ekspresije gena su dizajnirani u programu Primer3plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) na osnovu sekvenci iz baze podataka za krastavac (<http://cucurbitgenomics.org/>), NCBI baze podataka, kao i baze sekvenci miRNK (<http://www.mirbase.org/>).

„*Stem-loop*“ prajmeri za analizu ekspresije miRNK (**Tabela 3.2**) su dizajnirani tako da obezbeđuju visoku specifičnost prema individualnim miRNK zahvaljujući prisustvu 6 nukleotida (nt) na 3' kraju koji je reverzno komplementaran nizu od 6 nt na 3' kraju odgovarajuće miRNK, a osatak sekvence čini region koji formira petlju, zahvaljujući intramolekularnoj komplementarnosti sekvence (Varkonyi-Gasic et al. 2007). Za amplifikaciju miRNK dizajnirani su direktni prajmeri specifični za miR398 odnosno miR408 (**Tabela 3.3**) dok je reverzni prajmer univerzalan, odnosno vezuje se u regionu petlje obe miRNK (**Slika 3.1**). Direktni prajmer praktično predstavlja celu miRNK sekvencu

sa izuzetkom niza od 6 nukleotida na 3' kraju miRNK, a 5' kraj bogat GC nukleotidima dodaje se svakom direktnom prajmeru da bi se povećala temperatura topljenja ( $T_m$ ) (Varkonyi-Gasic et al. 2007).



**Slika 3.1.** Shematski prikaz „stem-loop“ reverzne transkripcije (RT) miRNK i amplifikacije produkata RT u real-time PCR reakciji sa specifičnim direktnim prajmerima i univerzalnim reverznim prajmerom. Slika modifikovana prema Varkonyi-Gasic et al. (2007).

Za svaki par prajmera urađena je efikasnost PCR reakcije i izračunata po formuli  $E = 10^{-1/\text{nagib}-1}$ . Prihvatljiva efikasnost je bila između 90 i 110% ( $-3.6 > \text{nagib} > -3.1$ ). Sekvence direktnih i reverznih prajmera kao i pristupni brojevi analiziranih gena navedeni su u **Tabeli 3.3**.

### 3.10.5 Umnožavanje DNK fragmenata metodom lančane reakcije polimeraze (PCR)

Za umnožavanje DNK fragmenata metodom PCR korišćen je enzim Taq polimeraza (Fermentas) i PCR aparat (Professional Thermocycler, Biometra). Reakciona smeša sadržala je sledeće komponente: 10 ng matrice DNK; 0,2 mM smeša dNTP, po 0,2  $\mu\text{M}$  specifičnih prajmera (direktnog i reverznog); 2,5 U Taq polimeraze kao i odgovarajući pufer (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1% Triton X-100; 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$ ) u zapremini od 25  $\mu\text{l}$ . Program PCR odvijao se u sledećim koracima: inicijalna denaturacija 5 min na 95 °C, 40 ciklusa koji obuhvataju denaturaciju 30 sekundi na 95 °C, vezivanje prajmera 30 sekundi na 60 °C i ekstenziju 30 sekundi na 72 °C, i na kraju finalna ekstenzija 10 min na 72 °C. PCR produkti su provereni elektroforetskim razdvajanjem na 2% gelu od agaroze u TAE puferu (0,04 M Tris-acetat i 1 mM EDTA) pri naponu od 100 V i vizuelizovani bojenjem etidijum bromidom uz upotrebu BioDocAnalyze sistema (Biometra, Nemačka).

**Tabela 3.3** Sekvence prajmera korišćenih u radu.

<b>Gen</b>	<b>Direktan prajmer (5'-3')</b>	<b>Reverzni prajmer (5'-3')</b>	<b>Pristupni broj iz baze sekvenci</b>
<i>ACT</i>	GCTGGCATATGTTGCTCTTG	CGATGGTGATGACTTGTCCA	AB010922
<i>F-box</i>	ATCAGCGGAGAGATTTGAGTG	ACAACCAGCAATCCAAGACC	XM_031885920.1
<i>COPT1</i>	CCGATTGATTAAGGAAGATTCG	AAATCCCAAGCAATGTCCAC	XM_004145227.3
<i>FRO4</i>	TGGCCATCTTTCCAATCTTC	TAGCAATCACTCCTGCAACG	XM_011652875.2
<i>PAL1</i>	CTTTGCATGGAGGCAACTTT	GCTCGGGTTTCTACTTGCAG	AF475285
<i>LAC3</i>	TCGAGCCACTGTCTATGG	CTCCGGTAAAAAGTGCTT	XM_004153642.3
<i>CSD2</i>	ACGCCTTAGGTGACACAA	TGCCATCTTCACCAACGA	NM_001280768.1
<i>APX</i>	CTCTGGTGGTCACACATT	GTCTGATGCCAACTGCAG	KC839995.1
<i>CAT</i>	GGATTCGCCGTCAAATTC	GTTGGGTTTAAAGGCACG	FJ609169.1
<i>PC</i>	GGGGAGAAAATCACGTTCAA	TCGAGATCTTTCCCACATCA	XM_004136318.3
<i>MT3</i>	CTGTTCCGACAAGACCCA	CTGCACTTGTCGTTGTGC	GQ487332.1
<i>PCS</i>	ACGGTCCCCTACGTTAGCTT	TCACTGGGTTCCACTTACCC	XM_031886577.1
<i>NAS1</i>	GGAGTTCGAGGTGGTGTTTC	CCACCACCGGATAAACAAC	XM004158701
<i>YSL3</i>	TCCATGCTTTTAAGCCAA	CGGGACCTTGTA CTCACC	XM_031880336.1
<i>U6</i>	GGGACATCCGATAAAATT	TTTCTCGATTTGTGCGTG	XR_004216382.1
<i>miR398</i>	GCGGCGGTGTGTTCTCAGGTGC		MIMAT0026174
<i>miR408</i>	GCCCCGATGCACTGCCTCTTC		MIMAT0026153
<i>UnivRev-miR</i>		GTGCAGGGTCCGAGGT	Preuzeto iz Varkonyi-Gasic et al. (2007)

### 3.10.6 Kvantitativni PCR u realnom vremenu

Za kvantitativni PCR u realnom vremenu korišćen je Maxima SYBR Green/ROX qPCR master mix (2x) (Thermo scientific) koji sadrži polimerazu i sve neophodne komponente za PCR, a dodata je

matrica cDNK u količini od 10 ng kao i po 0,2  $\mu$ M specifičnih prajmera u finalnom volumenu reakcije od 20  $\mu$ l. Kvantitativni PCR urađen je na pločama sa 96 bunarića (MicroAmp™ Optical, Applied Biosystems, SAD) u aparatu ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems) u sledećim koracima: 2 min na 50 °C, 10 min na 95 °C i 40 ponovljenih ciklusa: denaturacije na 95 °C, 15 s, i ekstenzije na 60 °C u trajanju od 1 min. Rezultati su analizirani u softveru 7500 System Software (Applied Biosystem) i prikazani kao relativna kvantifikacija u odnosu na referentne gene (F-box i aktin, kao i U6 za miRNK) i kontrolne, netretirane uzorke tj. po metodi  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

## **3.11 Analiza organskih kiselina**

### **3.11.1 Priprema uzoraka za analizu**

Sastav organskih kiselina analiziran je u korenu, listu i ksilemskom soku. Uzorci korena i lista su samlevani u tečnom azotu a zatim su organske kiseline ekstrahovane u 75% metanolu. Ksilemski sok je sakupljen eksudacijom nakon odsecanja nadzemnog dela biljaka 2 cm iznad osnove korena. Meka silikonska creva su pričvršćena preko odsečenog dela i ksilemski sok je sakupljan tokom 1 h, nakon odbacivanja eksudata sakupljenih tokom prvih par minuta. Ksilemski sok je pomešan sa metanolom u odnosu 50 : 50. Uzorci su profiltrirani kroz 0,22  $\mu$ m najlonske špric filtere (Phenomenex, Torrance, CA, SAD), pre injektovanja na kolonu.

### **3.11.2 Identifikacija i kvantifikacija organskih kiselina tečnom hromatografijom visokih performansi**

Analiza organskih kiselina izvršena je tečnom hromatografijom visokih performansi (HPLC) (20 AB Prominence Shimadzu HPLC system) u sistemu povezanom sa fotodiodnim detektorom (LC-20AB, Shimadzu, Kyoto, Japan) i pomoću kolone za organske kiseline (Rezex ROA) dimenzija 300  $\times$  7.8 mm, 8  $\mu$ m (Phenomenex, Torrance, CA, SAD). Izokratski elucioni gradijent je formiran sa 95% 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i 5% acetonitrilom, pri brzini protoka od 0,2 mL/min u prvih 45 min i 0,5 mL/min od 45 do 60 min, na 25 °C prema metodi Lin et al. (2011). Hromatogrami su detektovani na 200 nm, a specifične organske kiseline su identifikovane na osnovu retencionih vremena i poređenjem njihovih spektara sa spektrima autentičnih standarda kao i metodom standardnog dodatka. Kvantifikacija je izvršena primenom linearne regresije na odnos ukupne površine ispod pika i koncentracije u poređenju sa standardnom krivom, upotrebom softvera Shimadzu LC Solution software (Shimadzu, Kyoto, Japan).

## 3.12 Analiza aminokiselina

### 3.12.1 Ekstrakcija aminokiselina iz lista biljaka

Listovi biljaka su homogenizovani u tečnom azotu a zatim za analizu nikocijanamina, uzorci su ekstrahovani u vodi i inkubirani 30 min na 80 °C. Nakon centrifugiranja na 16 000 g u trajanju od 10 min, na ST, supernatant je sakupljen i korišćen u narednim koracima. Ekstrakcija histidina je izvršena u 50% metanolu a nakon centrifugiranja na 16 000 g, 10 min, na 4 °C (Centrifuga 5417R, Eppendorf, Nemačka), supernatant je sakupljen. Svi uzorci su filtrirani kroz 0,45 µm najlonski membranski filter (Millex, Millipore) pre analize na HPLC.

### 3.12.2 Kvantifikacija aminokiselina tečnom hromatografijom visokih performansi

Analiza aminokiselina (AK) nikocijanamina (NA) i histidina (His) izvršena pomoću derivatizacije sa o-ftalaldehidom i 3-merkaptopropionskom kiselinom (OPA/MPA). Uzorci su derivatizovani sa OPA/MPA u trajanju od 5 min i odmah naneti na reverzno-faznu kolonu Luna C18 dimenzija 5.0 µm, 250 × 4.6 mm (Phenomenex Ltd., Torrance, CA, SAD) na HPLC sistemu (20 AB Prominence Shimadzu HPLC system, Kyoto, Japan). Elucioni gradijent je formiran pomoću rastvora A: natrijum acetat i rastvora B: acetat–acetonitril–metanol (46:44:10) pri brzini protoka od 1.2 ml/min na 40 °C, kao što je opisano u radu Vasanits et al. (2000). Intenzitet fluorescencije derivata OPA/MPA/AK izmeren je na talasnoj dužini od 454 nm nakon ekscitacije na 337 nm, upotrebom fluorescentnog detektora RF-10-AXL (Prominence, Shimadzu, Japan). Kvantifikacija NA i His zasnivana je na obradi površine pika derivata i izračunata na osnovu standardnih krivi konstruisani upotrebom standarda NA (Toronto Research Chemicals, North York, Kanada) i His (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD).

## 3.13 Statistička obrada podataka

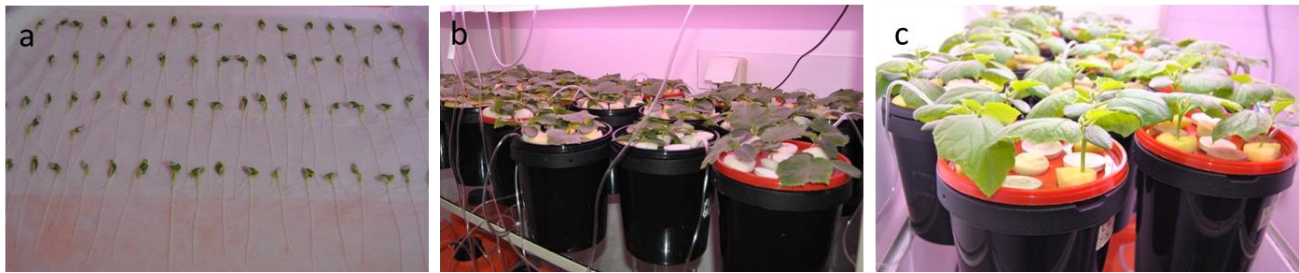
Statistička obrada podataka urađena je uz pomoć statističkog paketa SPSS 21.0 (IBM, Armonk, NY, SAD). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ± standardna devijacija (SD), dobijene u više ponavljanja. Za analizu statističke značajnosti razlika srednjih vrednosti korišćen je Takijev *post hoc* test, a vrednosti parametra *p* manja od 0,05 je smatrana statistički značajnom. Grafičko predstavljanje rezultata je obavljeno u softveru Sigma Plot 12 (Systat Software Inc., Erkrat, Nemačka).



## 4 Rezultati

### 4.1 Testiranje različitih koncentracija bakra na biljkama krastavca

Optimalni uslovi za gajenje biljaka krastavca u hidroponičnoj kulturi obezbedili su ujednačeno rastenje i razviće biljaka, te s toga, sve uočene promene na biljkama se mogu pripisati primenjenim tretmanima (**Slika 4.1**). U cilju utvrđivanja umereno toksične koncentracije koja nema letalan efekat i koja ne dovodi do izrazitog zaostajanja u rastenju sprovedeno je testiranje uticaja različitih koncentracija Cu na biljke krastavca i definisana je doza bakra koja je korišćena u daljem eksperimentalnom radu. Određivanje umereno toksične koncentracije Cu bilo je naročito značajno kako bi tretirane biljke imale adekvatan prinos biomase neophodan za dalja istraživanja. Paralelno, ispitivan je efekat delovanja silicijuma u kombinaciji sa različitim koncentracijama bakra. Analizirani su parametri rastenja biljaka (ukupna biomasa) i parametri oksidativnog stresa koji je glavni simptom prisustva povišenih koncentracija bakra u biljkama.



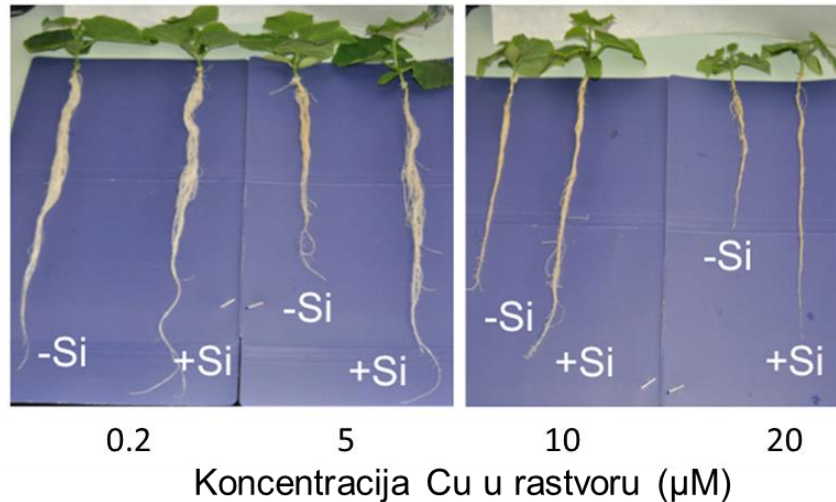
**Slika 4.1.** Gajenje biljaka krastavca u hidroponičnoj kulturi: (a) klijanici stari 7 dana, (b) i (c) biljke stare dve nedelje.

#### 4.1.1 Utvrđivanje efekata različitih doza Cu na parametre rastenja

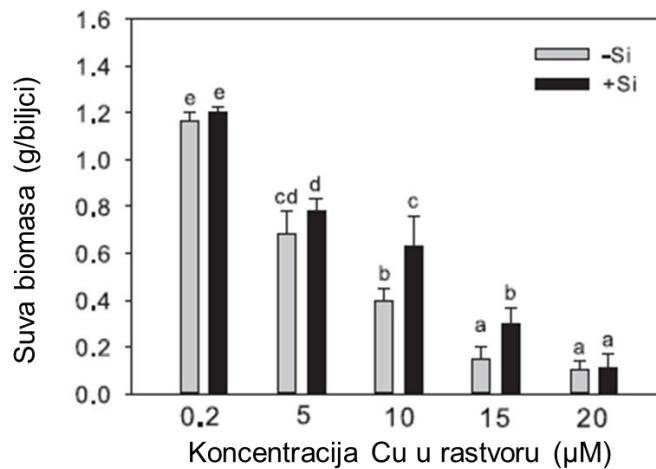
Sve primenjene koncentracije Cu (5, 10, 15 i 20  $\mu\text{M}$ ) imale su inhibirajući efekat na rastenje biljaka u poređenju sa biljkama gajenim u optimalnim koncentracijama Cu (0,2  $\mu\text{M}$ ) (**Slika 4.2**). Koncentracija od 5  $\mu\text{M}$  Cu, dovela je do smanjenja ukupne biomase ali znatno manje nego ostale primenjene koncentracije. Koncentracija od 10  $\mu\text{M}$  Cu značajno je smanjila biomasu, za oko 60 % u odnosu na kontrolu, dok su više koncentracije (15 i 20  $\mu\text{M}$  Cu) imale još izraženiji efekat na smanjenje ukupne biomase biljaka (**Slika 4.3**). Bakar u koncentraciji od 30  $\mu\text{M}$  Cu imao je letalan efekat na biljke već sat vremena nakon početka tretmana (rezultati nisu prikazani niti su bili predmet daljeg razmatranja).

Primena Si u kombinaciji sa svim ispitivanim koncentracijama Cu, dovela je do povećanja biomase u odnosu na tretman istom koncentracijom Cu ali bez Si (**Slika 4.2**). U tretmanu 5  $\mu\text{M}$  Cu, Si je neznatno povećao biomasu biljaka dok je u tretmanu sa 10  $\mu\text{M}$  Cu doveo do povećanja biomase za 50% u odnosu na tretman 10  $\mu\text{M}$  Cu - Si. Takođe, biljke tretirane 15  $\mu\text{M}$  Cu + Si imale su za 50% veću

biomasu u poređenju sa tretmanom 15  $\mu\text{M}$  Cu - Si. U tretmanu 20  $\mu\text{M}$  Cu, primenjeni Si nije doveo do promene u ukupnoj biomasi s obzirom na to da je ova koncentracija Cu pokazala najizraženiji toksični efekat u poređenju sa drugim ispitivanim dozama (**Slika 4.3**).



**Slika 4.2.** Efekat primene Si na biljke krastavca gajene sa različitim koncentracijama Cu (0.2, 5, 10 i 20  $\mu\text{M}$  Cu) u trajanju od tri dana.

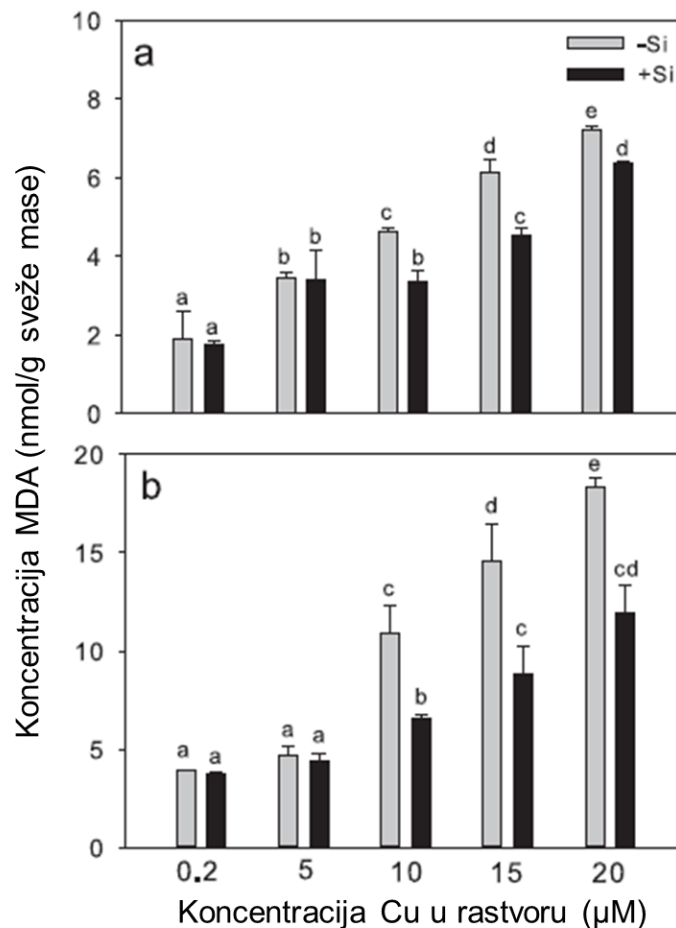


**Slika 4.3.** Uticaj primene Si na ukupnu biomasa biljaka (suva biomasa) tretiranih različitim koncentracijama Cu (5, 10, 15 i 20  $\mu\text{M}$  Cu) u trajanju od tri dana kao i biljaka gajenih u optimalnoj koncentraciji Cu (0,2  $\mu\text{M}$ ). Rezultati predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  SD. Statistički značajne razlike između tretmana su označene različitim slovima na osnovu Takijeveg testa ( $p < 0.05$ ).

## 4.1.2 Utvrđivanje efekata različitih doza Cu na parametar oksidativnog stresa

Nivo lipidne peroksidacije izražen kroz koncentraciju krajnjeg produkta peroksidacije, malondialdehida (MDA) ukazao je na razlike u stepenu toksičnosti ispitivanih doza Cu. Tretman 5  $\mu\text{M}$  Cu doveo je do povećanja lipidne peroksidacije u korenu, međutim, ta koncentracija Cu nije izazvala povećanje koncentracije MDA u listu (Slika 4.4). Tretman 10  $\mu\text{M}$  Cu povećao je koncentraciju MDA, kako u korenu, tako i u listu, dok su više koncentracije (15 i 20  $\mu\text{M}$  Cu) dodatno uticale na povećanje nivoa lipidne peroksidacije (Slika 4.4).

Primena Si nije imala efekat kod tretmana 5  $\mu\text{M}$  Cu, dok je Si značajno smanjio nivo lipidne peroksidacije kod biljaka tretiranih 10  $\mu\text{M}$  Cu, kako u korenu tako i u listu. Takođe, Si je uticao na smanjenje koncentracije MDA i pri višim primenjenim koncentracijama Cu (15 i 20  $\mu\text{M}$ ) u oba biljna organa (Slika 4.4).



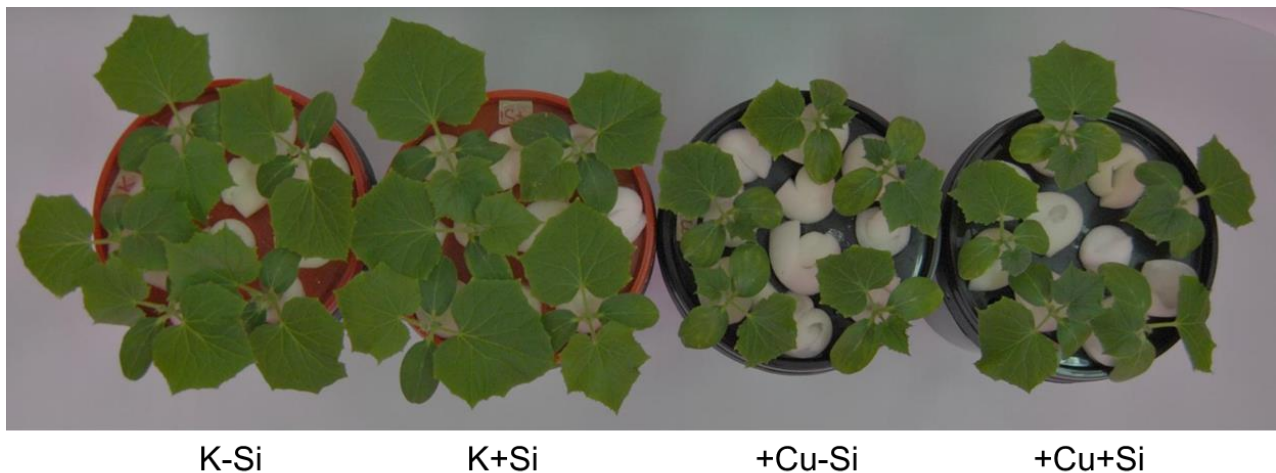
**Slika 4.4.** Uticaj Si na nivo lipidne peroksidacije izražene preko koncentracije malondialdehida (MDA) u korenu (a) i listu (b) kod biljaka gajenih sa različitim koncentracijama Cu (0.2, 5, 10, 15 i 20  $\mu\text{M}$  Cu) u trajanju od tri dana. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  SD. Statistički značajne razlike između tretmana su označene različitim slovima na osnovu Takijeveg testa ( $p < 0.05$ ).

Uzimajući u obzir prethodno navedene rezultate, izvodi se zaključak da koncentracija od 5  $\mu\text{M}$  Cu spada u nisko toksične za biljke krastavca jer iako ispoljava efekat na rast biljaka, ne dovodi do oksidativnog stresa u listu. Koncentracija od 20  $\mu\text{M}$  Cu pokazala se kao visoko toksična za biljke krastavca jer je tretman ovom koncentracijom doveo do izrazitog smanjenja biomase biljaka kao i visokog nivoa oksidativnog stresa stoga u ovom slučaju ublažavajući efekat Si na biomasu nije primećen, iako je nivo oksidativnog stresa bio smanjen. Primena Si u kombinaciji sa koncentracijama od 10 i 15  $\mu\text{M}$  Cu imala je sličan efekat u pogledu povećanja biomase i smanjenja novoa oksidativnog stresa. Ipak, tretman sa 15  $\mu\text{M}$  Cu značajno je uticao na smanjenje biomase biljaka krastavca, stoga ova koncentracija nije bila predmet daljeg razmatranja. Zaključno, koncentracija od 10  $\mu\text{M}$  Cu pokazala je umereno toksičan efekat na biljke krastavca, pa je stoga primenjena u svim narednim eksperimentima.

## 4.2 Ispitivanje uticaja Si na fiziološke parametre biljaka u stresu

### 4.2.1 Vizuelni simptomi stresa

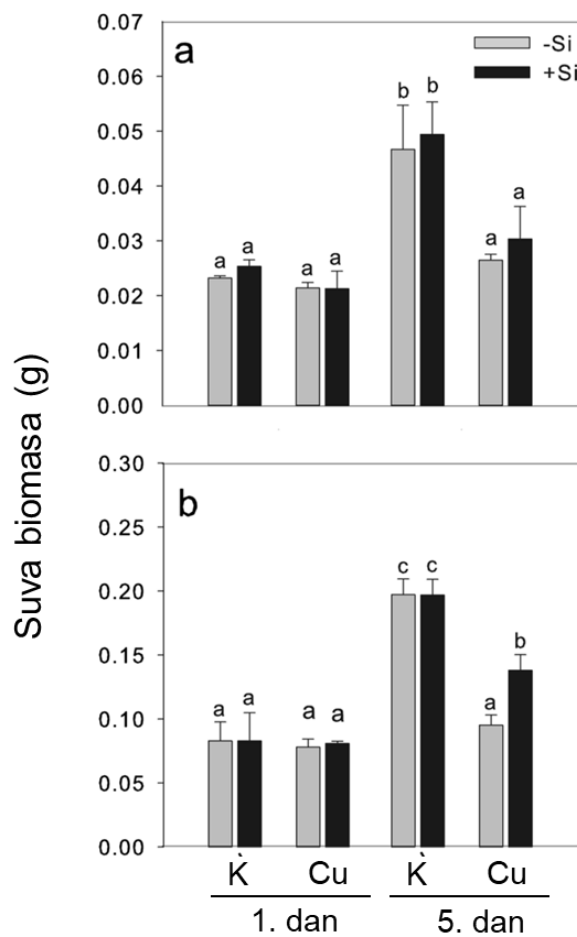
Vizuelni simptomi prisustva bakra u višku bili su приметni kako na korenu tako i na listovima biljaka krastavca. Koren tretiranih biljaka imao je karakterističnu braon obojenost, dok je na korenovima biljaka gajenih sa Si приметno manje izraženo braonenje (**Slika 4.2**). Posmatrajući izdanak, tretman +Cu-Si najviše je uticao na najmlađe, novoformirane listove biljaka, inhibirajući njihovo rastenje. Na listovima nisu primećene nekrotične pege kao simptom prisustva Cu u višku dok je umerena hloroza listova bila приметna (**Slika 4.5**). Stepен hloroze je bio manje izražen kod biljaka gajenih sa Si (+Cu+Si).



**Slika 4.5.** Vizuelni izgled biljaka krastavaca gajenih u optimalnim koncentracijama Cu (0,2  $\mu\text{M}$ ) bez Si (K-Si) i sa Si (K+Si) kao i biljaka nakon pet dana tretmana 10  $\mu\text{M}$  Cu bez Si (+Cu-Si) ili tretmana u kombinaciji 10  $\mu\text{M}$  Cu i Si (+Cu+Si).

## 4.2.2 Promene u biomasi biljaka

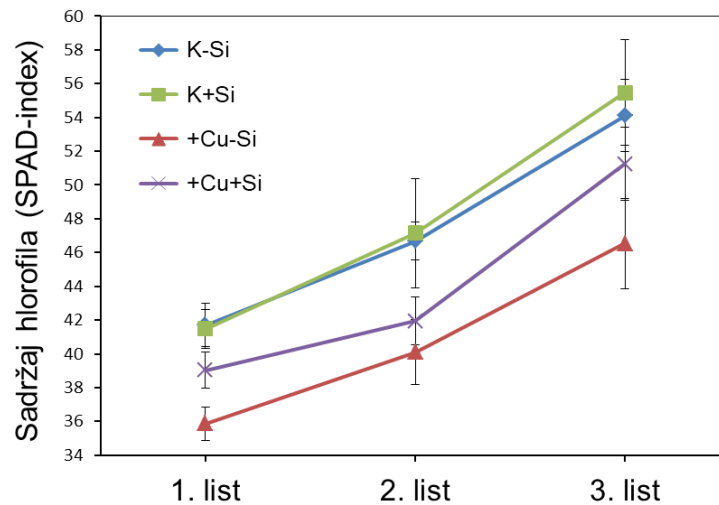
Tretman 10  $\mu\text{M}$  Cu doveo je do smanjenja ukupne biomase biljaka krastavca (**Slika 4.2**), a praćen je uticaj i na pojedinačne organe i to u dve vremenske tačke (**Slika 4.6**). Nakon jednog dana od početka tretmana, nije zabeležena razlika u biomasi korena i lista bez obzira na prisustvo Cu, odnosno Si. Međutim, nakon 5. dana tretmana bakrom (+Cu-Si) zabeleženo je smanjenje biomase (oko 50%) kako korena tako i lista, u odnosu na kontrolne biljke. Dodavanje Si biljkama tretiranim viškom Cu (+Cu+Si), značajno je povećalo biomasu lista, za oko 45% u odnosu na +Cu-Si biljke, dok je povećanje biomase korena bilo neznatno (**Slika 4.6**). Si nije imao efekat na biomasu biljaka gajenih u optimalnoj koncentraciji Cu (K+Si).



**Slika 4.6.** Uticaj primene Si na suhu biomasu korena (a) i lista (b) kod kontrolnih biljaka gajenih u optimalnoj koncentraciji Cu (K) kao i biljaka tretiranih 10  $\mu\text{M}$  Cu (Cu) nakon jednog dana i nakon pet dana tretmana. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  SD a statistički značajne razlike između tretmana su označene različitim slovima na osnovu Takijevog testa ( $p < 0.05$ ).

### 4.2.3 Analiza sadržaja hlorofila

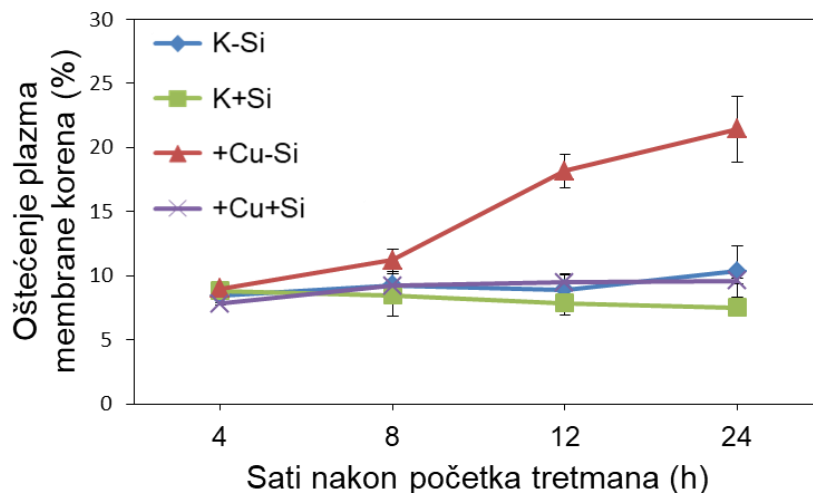
Relativan sadržaj hlorofila dobijen SPAD metodom, bio je smanjen kod +Cu-Si tretmana u odnosu na kontrolu, kod sva tri formirana lista. Za razliku od njih, kod +Cu+Si biljaka sadržaj hlorofila bio je viši, čak se i vrednosti za prvi list nisu razlikovale od kontrolnih biljaka. Dodavanje Si biljkama gajenim u optimalnoj koncentraciji Cu (K+Si) nije imalo značajnijeg efekata na relativan sadržaj hlorofila (Slika 4.7).



**Slika 4.7.** Relativan sadržaj hlorofila u listovima određen SPAD metodom u dugotrajnom tretmanu nakon razvika najmlađeg lista (3. list) kao i u najstarijem (1. list) i drugom formiranom (2.list) listu biljaka krastavca gajenih u optimalnoj koncentraciji Cu bez Si (K-Si) i sa Si (K+Si), kao i biljaka tretiranih 10  $\mu$ M Cu bez Si (+Cu-Si) ili sa Si (+Cu+Si).

### 4.2.4 Analiza stepena oštećenja korena

Ispitivanje stepena oštećenja plazma-membrane ćelija korena putem merenja količine oslobođenih elektrolita u okolni rastvor ukazalo je da je već nakon osam sati od početka tretmana, količina ispuštenih elektrolita kod +Cu-Si biljaka bila povećana, a u narednim satima ovaj efekat se intenzivirao. Kod biljaka u tretmanu +Cu+Si, nije došlo do značajnijeg oštećenja plazma membrana ćelija korena u toku prvih 24 h (Slika 4.8).



**Slika 4.8.** Uticaj Si na stepen oštećenja plazma-membrane ćelija korena. Efekat “curenja elektrolita” iz korena biljaka krastavca gajenih u optimalnoj koncentraciji Cu bez Si (K-Si) i sa Si (K+Si) kao i biljaka tretiranih 10  $\mu$ M Cu bez Si (+Cu-Si) ili sa Si (+Cu+Si) praćen je u 4 vremenske tačke u toku prvih 24h sata od početka tretmana. Rezultati su predstavljeni procentualno u odnosu na 100% oštećen koren odgovarajućeg tretmana. Prikazane su srednje vrednosti  $\pm$  SD.

#### 4.2.5 Analiza nivoa lignifikacije i ukupnih fenola

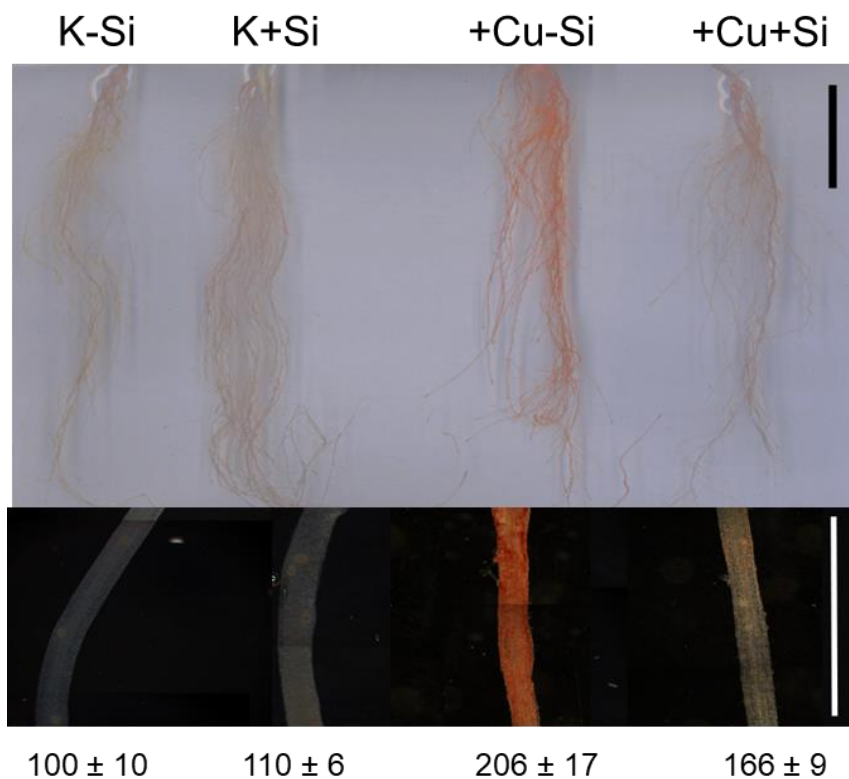
Bojenje lignifikovanih struktura u korenu omogućilo je vizuelizaciju i semikvantitativno određivanje stepena lignifikacije. Intenzitet boje je proporcionalan količini lignina u tkivima i relativna kvantifikacija sadržaja lignina je pokazala da je nivo lignifikacije korena bio znatno izraženiji kod +Cu-Si biljaka (dva puta viši u odnosu na kontrolne biljke) u poređenju sa +Cu+Si biljakama (za oko 60% viši od kontrole) nakon pet dana tretmana (**Slika 4.9**).

Sadržaj ukupnih fenola u korenu bio je oko 20% viši 1. dana odnosno 30% 5. dana kod +Cu-Si biljaka u odnosu na kontrolu (**Slika 4.10 b**). Kod +Cu+Si biljaka sadržaj fenola se nije razlikovao od kontrolnih biljaka 1. dana dok je 5. dana bio oko 20% viši u odnosu na vrednosti kontrolnih biljaka, što je niže u poređenju sa biljkama tretiranim bakrom ali bez dodatog Si (+Cu-Si) (**Slika 4.10 b**).

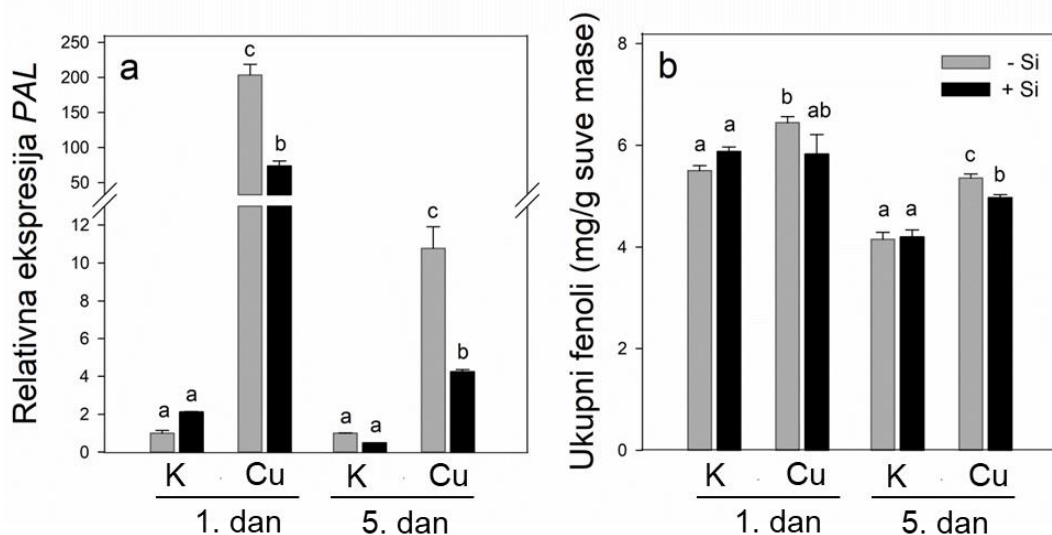
#### 4.2.6 Analiza ekspresije fenilalanin-amonijum-liaze u korenu

Fenilalanin-amonijum-liaza je prvi enzim u biosintetskom putu fenolnih jedinjenja, prekursora lignina. Relativna ekspresija *PALI*, bila je oko 200 puta viša u odnosu na vrednosti kontrolnih biljaka već nakon jednog dana tretmana bakrom (**Slika 4.10 a**). Kod +Cu+Si biljaka, nivo ekspresije je takođe bio povišen u odnosu na kontrolu ali tri puta niži u poređenju sa tretmanom +Cu-Si 1. dana. Isti obrazac ekspresije *PALI* gena primećen je i 5. dana tretmana, međutim, nivo ekspresije *PALI* kod tretiranih biljaka bio je 20 puta niži nego 1. dana (**Slika 4.10 a**). Biljke gajene sa Si u optimalnim koncentracijama bakra (K+Si) nisu se razlikovale od kontrolnih biljaka u pogledu sadržaja lignina, ukupnih fenola i relativne ekspresije *PALI*.





**Slika 4.9.** Uticaj Si na intenzitet lignifikacije korena kod biljaka gajenih u optimalnoj koncentraciji Cu (K) kao i biljaka nakon pet dana tretmana  $10 \mu\text{M}$  Cu (Cu). Relativna kvantifikacija predstavljena je kao srednja vrednost  $\pm$  SD u odnosu na kontrolne vrednosti (ispod slike). Skala na gornjoj slici je 5 cm a na donjoj 0,5 cm.



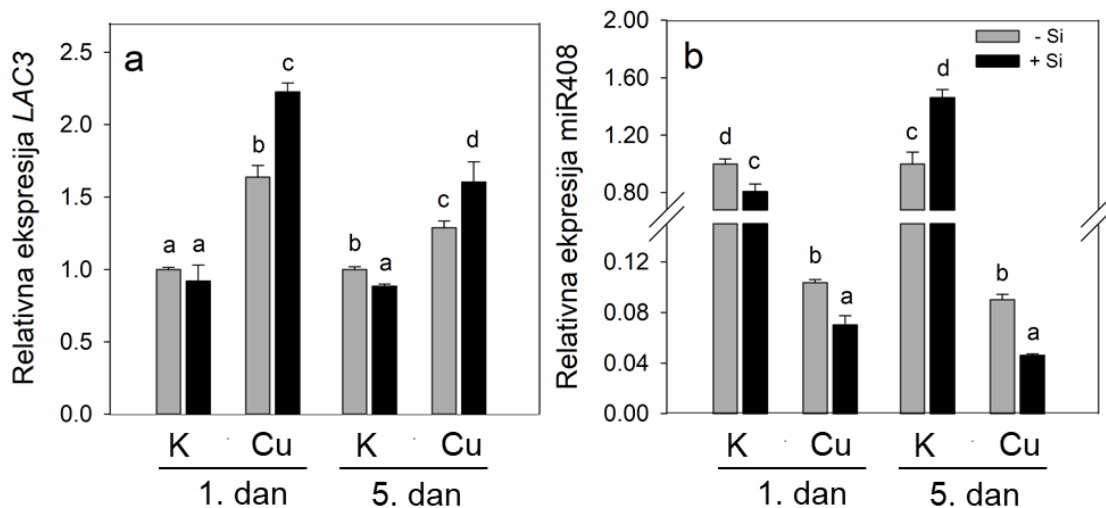
**Slika 4.10.** Uticaj primene Si na ekspresiju fenilalanin-amonijum-liaze (*PAL*) (a) i sadržaj ukupnih fenola u korenu (b) kod biljaka gajenih u optimalnoj koncentraciji Cu (K) kao i biljaka tretiranih  $10 \mu\text{M}$  Cu (Cu) nakon jednog dana i nakon pet dana tretmana. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  SD a statistički značajne razlike između tretmana su označene različitim slovima na osnovu Takijevog testa ( $p < 0.05$ ).



## 4.2.7 Analize ekspresije lakaze i miR408 u korenu

Relativna ekspresija lakaze 3 (*LAC3*), koja učestvuje u polimerizaciji prekursora lignina, bila je promjenjena kod biljaka tretiranih Cu i Si u obe analizirane vremenske tačke (**Slika 4.11 a**). Biljke tretirane bakrom bez Si (+Cu-Si) imale su za 60% višu ekspresiju *LAC3* u korenu od kontrolnih biljaka, dok je kod +Cu+Si biljaka, nivo relativne ekspresije bio 2,2 puta viši od nivoa kontrolnih biljaka prvog dana tretmana. Takođe, i nakon pet dana tretmana, relativna ekspresija *LAC3* bila je viša kod +Cu+Si biljaka (za 60% u odnosu na kontrolu) nego kod +Cu-Si biljaka, koje su imale 30% višu ekspresiju u poređenju sa kontrolom. Kod K+Si biljaka, nivo ekspresije *LAC3* imao je tendenciju smanjenja u odnosu na kontrolu, dostižući vrednosti za 12% niže u petom danu (**Slika 4.11 a**).

Profil ekspresije miR408 koja je odgovorna za post-transkripcionu regulaciju ekspresije *LAC3*, je u saglasnosti sa ekspresijom svog targeta. Tretman bakrom (+Cu-Si) značajno je smanjio nivo ekspresije miR408, oko 10 puta oba analizirana dana (**Slika 4.11 b**). Kod biljaka gajenih sa Si i tretiranih Cu, nivo ekspresije je bio dodatno snižen, oko 14 puta prvog dana i 22 puta petog dana u odnosu na kontrolu. Kod kontrolnih biljaka sa Si, nivo transkripata miR408 bio je snižen za 20% prvog dana, dok je petog dana bio povišen za 45% u odnosu na kontrolu bez Si (**Slika 4.11 b**).

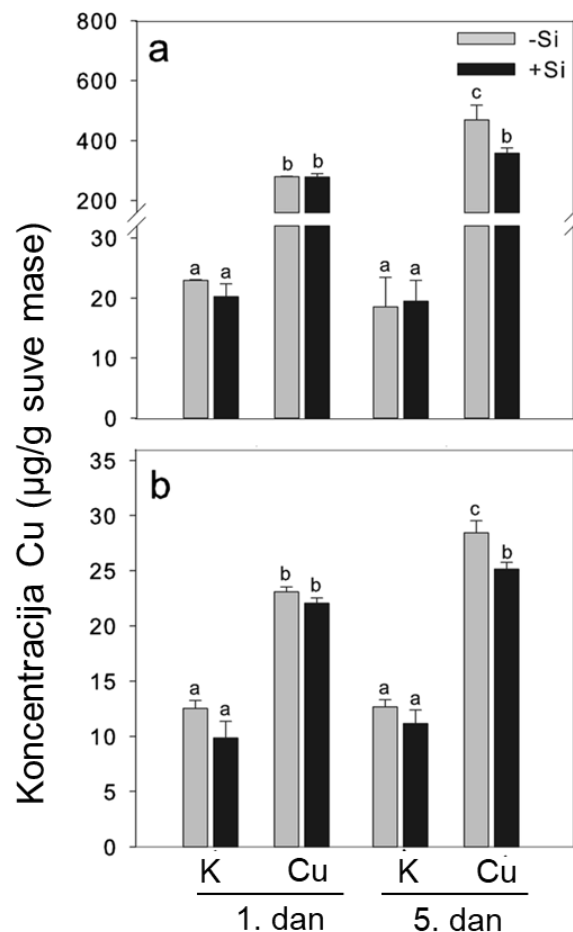


**Slika 4.11.** Uticaj primene Si na ekspresiju lakaze 3 (*LAC3*) (a) i miR408 (b) u korenu biljaka gajenih u optimalnoj koncentraciji Cu (K) kao i biljaka tretiranih 10  $\mu$ M Cu (Cu) nakon jednog dana i nakon pet dana tretmana. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  SD a statistički značajne razlike između tretmana su označene različitim slovima na osnovu Takijevog testa ( $p < 0.05$ ).

## 4.3 Ispitivanje uticaja Si na usvajanje, akumulaciju i preraspodelu Cu i drugih mikroelemenata u biljkama krastavca

### 4.3.1 Koncentracija bakra u korenu i listovima biljaka

Merenje koncentracije bakra ukazalo je na povećanu akumulaciju Cu u korenu biljaka krastavca u poređenju sa listovima. Već prvog analiziranog dana, koncentracija Cu u korenu u tretmanima +Cu-Si i +Cu+Si dostigla je 12 puta veće vrednosti nego kod kontrolnih biljaka. U produženom tretmanu, količina akumuliranog bakra u korenu bila je još veća, dok je primena Si dovela do značajnog smanjenja koncentracije Cu u korenu kod +Cu+Si biljaka, oko 25% u odnosu na +Cu-Si biljke. Dodavanje Si kontrolnim biljkama (K+Si) nije imalo uticaja na koncentraciju Cu u korenu (Slika 4.12 a).



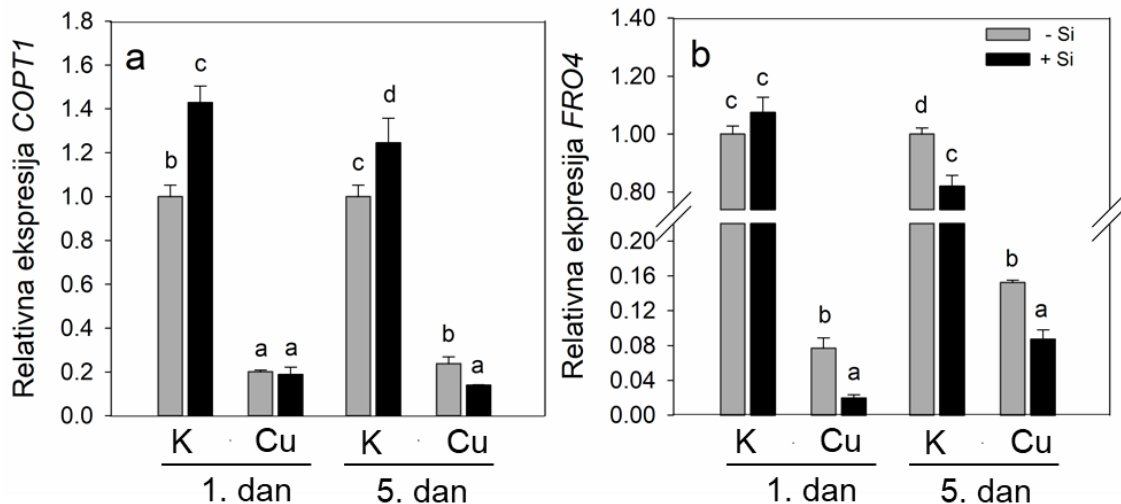
**Slika 4.12.** Uticaj primene Si na koncentraciju Cu u korenu (a) i listu (b) kod biljaka gajenih u optimalnoj koncentraciji Cu (K) kao i biljaka tretiranih 10 µM Cu (Cu) nakon jednog dana i nakon pet dana tretmana. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti ± SD a statistički značajne razlike između tretmana su označene različitim slovima na osnovu Takijeveg testa ( $p < 0.05$ ).

Iako je translokacija Cu ka listovima bila limitirana, oko dva puta veće vrednosti koncentracije Cu izmerene su u listovima tretiranih biljaka krastavca već prvog dana kako kod +Cu-Si tako i kod +Cu+Si tretiranih biljaka u odnosu na kontrolne. U produženom tretmanu, akumulacija Cu u listovima je bila još intenzivnija nego prvog dana kod +Cu-Si biljaka, dok je primena Si smanjila koncentraciju Cu u listovima za 12%. K+Si biljke nisu imale statistički značajnu razliku u koncentraciji Cu u listu u odnosu na kontrolne biljke K-Si (Slika 4.12 b).

### 4.3.2 Analiza ekspresije COPT1 transportera i FRO4 reduktaze

Prisustvo bakra u višku uticalo je na relativnu ekspresiju gena koji učestvuju u procesu usvajanju bakra u korenu, *COPT1* i *FRO4*. Pet puta niža ekspresija *COPT1* dobijena je bez razlike kod +Cu-Si i kod +Cu+Si biljaka, u prvom danu tretmana. Petog dana, ekspresija *COPT1* je održana na istom nivou kod +Cu-Si biljaka dok je kod +Cu+Si biljaka bila dodatno snižena, oko sedam puta niža u odnosu na kontrolne biljke. Dodavanje Si kontrolnim biljkama (K+Si) rezultovalo je povećanjem relativne ekspresije *COPT1*, oko 40% prvog dana i 25% petog dana u odnosu na kontrolne biljke K-Si (Slika 4.13 a).

Relativna ekspresija *FRO4* takođe je bila snižena kod biljaka tretiranih bakrom u odnosu na kontrolne biljke, i to oko 13 puta kod +Cu-Si a čak 50 puta kod +Cu+Si biljaka prvog analiziranog dana. U produženom tretmanu, isti trend je zabeležen, s tim što je kod +Cu-Si biljaka relativna ekspresija *FRO4* bila šest puta niža a kod +Cu+Si oko 11 puta niža u odnosu na kontrolne biljke (Slika 4.13 a). Smanjenje ekspresije *FRO4* od 18% petog dana dobijeno je kod K+Si biljaka u odnosu na kontrolne (K-Si).



**Slika 4.13.** Uticaj primene Si na ekspresiju transportera *COPT1* (a) i reduktaze *FRO4* (b) u korenu biljaka gajenih u optimalnoj koncentraciji Cu (K) kao i biljaka tretiranih 10  $\mu$ M Cu (Cu) nakon jednog dana i nakon pet dana tretmana. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  SD a statistički značajne razlike između tretmana su označene različitim slovima na osnovu Takijevog testa ( $p < 0.05$ ).

### 4.3.3 Ukupan sadržaj mikroelemenata (Cu, Fe, Zn i Mn) u listovima biljaka

Merenje ukupnog sadržaja mikroelemenata: Cu, Fe, Zn i Mn u listovima ukazalo je da pored visoke akumulacije Cu dolazi do smanjenja sadržaja drugih esencijalnih mikroelemenata. Ukupan sadržaj Cu u listovima nije se razlikovao kod +Cu-Si i +Cu+Si biljaka, i bio je za 80% povećan u odnosu na kontrolne biljke (**Tabela 4.1**).

Ukupan sadržaj Fe, Zn i Mn u listovima krastavca bio je oko tri puta smanjen kod +Cu-Si tretmana. Tretman +Cu+Si doveo je do povećanja sadržaja drugih mikroelemenata (Fe, Zn i Mn) u odnosu na +Cu-Si biljke za oko 40%. Dodavanje Si kontrolnim biljkama, povećalo je sadržaj Fe dok na ostale elemente nije imalo uticaj (**Tabela 4.1**).

**Tabela 4.1.** Uticaj Si na ukupan sadržaj mikroelemenata ( $\mu\text{g}$ ) u listovima biljaka krastavca gajenih u optimalnim koncentracijama Cu (K) kao i biljkama nakon pet dana tretmana  $10 \mu\text{M}$  Cu (Cu).

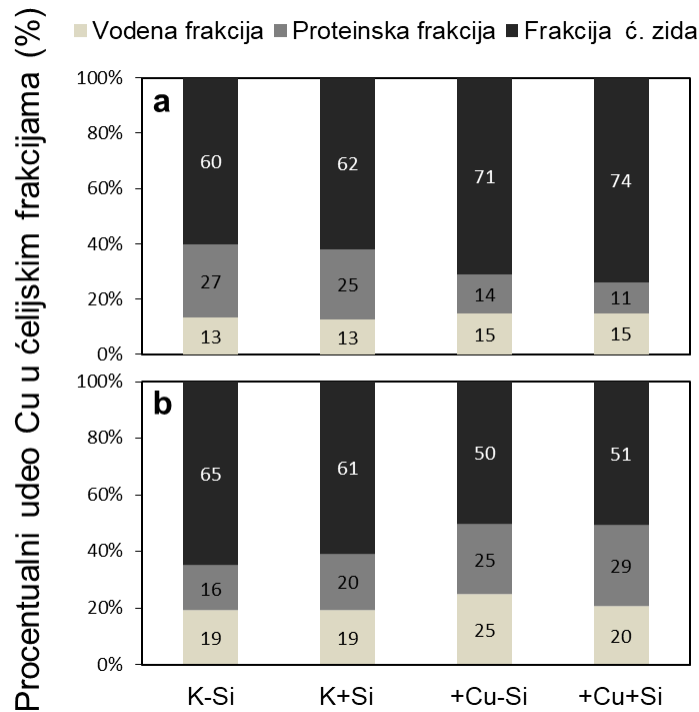
Tretman	Cu	Fe	Zn	Mn
K-Si	$2,64 \pm 0,03$ a	$25,69 \pm 0,58$ c	$20,15 \pm 1,79$ c	$10,95 \pm 0,12$ c
K+Si	$2,65 \pm 0,05$ a	$26,75 \pm 0,28$ d	$19,43 \pm 0,35$ c	$11,00 \pm 1,07$ c
+Cu-Si	$5,17 \pm 0,16$ b	$9,38 \pm 1,92$ a	$7,41 \pm 0,50$ a	$3,75 \pm 0,07$ a
+Cu+Si	$4,94 \pm 0,20$ b	$13,09 \pm 1,17$ b	$10,23 \pm 1,28$ b	$4,96 \pm 0,36$ b

Rezultati predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  SD, a statistički značajne razlike između tretmana su označene različitim slovima na osnovu Takijevog testa ( $p < 0.05$ ).

### 4.3.4 Analiza sadržaja bakra u ćelijskim frakcijama

Iz biljnih tkiva su serijom centrifugiranja izdvojene vodena, proteinska i frakcija ćelijskog zida a zastupljenost bakra u svakoj od frakcija je nakon merenja izražena u  $\mu\text{g/g}$  suve mase, a zatim predstavljena kao procentualni udeo po biljnim organima, korenu i listovima. Procentni sadržaj bakra u korenu u vodenoj, proteinskoj i frakciji ćelijskog zida kontrolnih biljaka bio je u odnosu 13:27:60. Kod K+Si biljaka, odnos po navedenim frakcijama se neznatno razlikovao, 13:25:62. Međutim, tretman bakrom uticao je na povećanje sadržaja Cu u frakciji ćelijskog zida i vodenoj frakciji a smanjenje u proteinskoj frakciji korena, tako da je procentualna zastupljenost Cu u navedenim frakcijama redom kod +Cu-Si biljaka bila 15:14:71 a kod +Cu+Si biljaka 15:11:74. Sumarno, tretman +Cu+Si je doveo do povećanja sadržaja Cu u frakciji ćelijskog zida nasuprot proteinskoj frakciji dok nije bilo razlike u procentualnoj zastupljenosti Cu u vodenoj frakciji između +Cu-Si i +Cu+Si tretmana (**Slika 4.14 a**).

Frakciona analiza listova pokazala je da je procentualna zastupljenost Cu kod kontrolnih biljaka krastavca (K-Si) u vodenoj, proteinskoj i frakciji ćelijskog zida bila sledeća (%): 19:16:65 a kod K+Si biljaka 19:20:61. Tretman +Cu-Si povećao je sadržaj Cu u vodenoj (25%) i proteinskoj frakciji (25%) a smanjio u frakciji ćelijskog zida (50%) u odnosu na kontrolne biljke. Dodavanje Si biljkama tretiranim bakrom (+Cu+Si), rezultovalo je smanjenjem prisustva Cu u vodenoj frakciji (20%) a povećanjem u proteinskoj (29%) u odnosu na +Cu-Si biljke, dok je zastupljenost Cu u frakciji ćelijskog zida bila slična kao kod +Cu-Si biljaka (51%) (Slika 4.14 b).

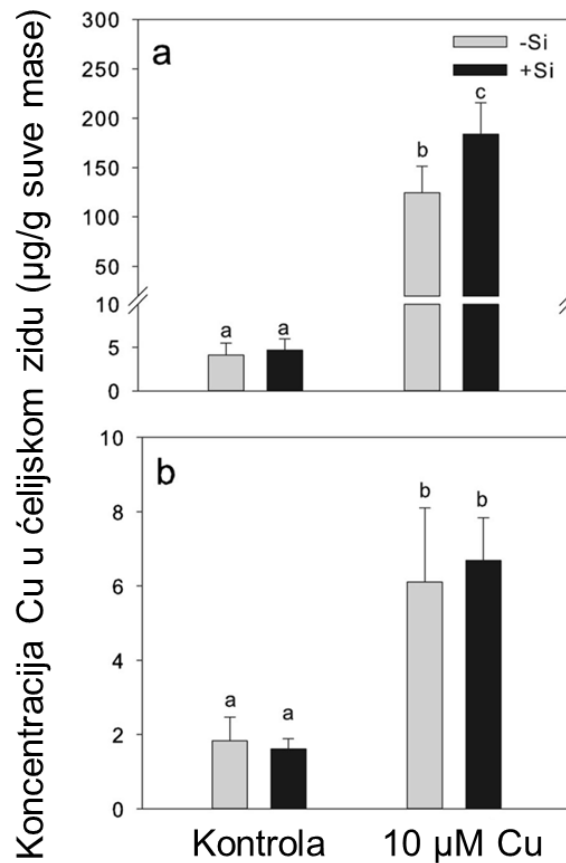


**Slika 4.14.** Procentualna zastupljenost Cu u ćelijskim frakcijama (vodenoj, proteinskoj i frakciji ćeljskog zida) u korenu (a) i listu (b) biljaka gajenih u optimalnoj koncentraciji Cu (K) kao i biljaka nakon pet dana tretmana 10µM Cu, bez i sa primene Si.

### 4.3.5 Koncentracija Cu u ćelijskom zidu

S obzirom na to da je frakciona analiza pokazala da je zastupljenost Cu najveća u frakciji ćelijskog zida, predstavljena je zasebno koncentracija Cu (µg/g suve mase) u ovoj frakciji. Kod tretmana +Cu-Si, koncentracija Cu u ćelijskom zidu bila je 30 puta povećana u odnosu na kontrolne biljke, dok je tretman +Cu+Si doveo do još veće akumulacije Cu u ćelijskom zidu korena, rezultujući u 30% većem sadržaju Cu u ćelijskom zidu u odnosu na +Cu-Si biljke (Slika 4.15 a). Koncentracija bakra u ćelijskim zidovima u listovima +Cu-Si i +Cu+Si biljaka bila je tri puta veća u odnosu na

kontrolne biljke, a dodavanje silicijuma nije imalo uticaj na vezivanje Cu za ćelijske zidove u listovima biljaka izloženih stresu prisustvom Cu u višku (**Slika 4.15 b**).



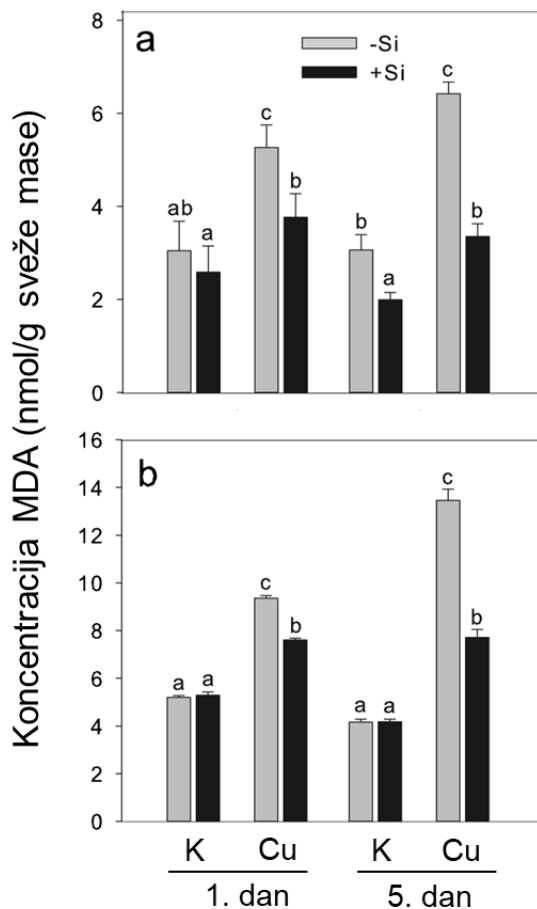
**Slika 4.15.** Uticaj primene Si na koncentraciju Cu u ćelijskom zidu u ćelijama korena (a) i lista (b) biljaka krastavca gajenih u optimalnoj koncentraciji Cu (kontrola) kao i biljkama nakon pet dana tretmana 10 μM Cu. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti ± SD a statistički značajne razlike između tretmana su označene različitim slovima na osnovu Takijevog testa ( $p < 0.05$ ).

## 4.4 Određivanje efekta Si na antioksidativni status biljaka

### 4.4.1 Analiza nivoa lipidne peroksidacije

Nakon jednog dana tretmana, nivo koncentracije MDA bio je povišen u korenu +Cu-Si biljaka za 73%, dok je petog dana izmerena dvostruko viša koncentracija MDA u odnosu na kontrolu. Kod biljaka tretiranih Cu i gajenih sa Si (+Cu+Si), nivo lipidne peroksidacije u korenu nije se razlikovao od vrednosti kontrolnih biljaka (K-Si) niti u prvom niti u petom analiziranom danu. Dodavanje Si biljkama

gajenim u optimalnoj koncentraciji Cu (K+Si) rezultovalo je smanjenjem koncentracije MDA u petom danu za 35%, ispod nivoa kontrolnih biljaka (K-Si) (Slika 4.16 a).



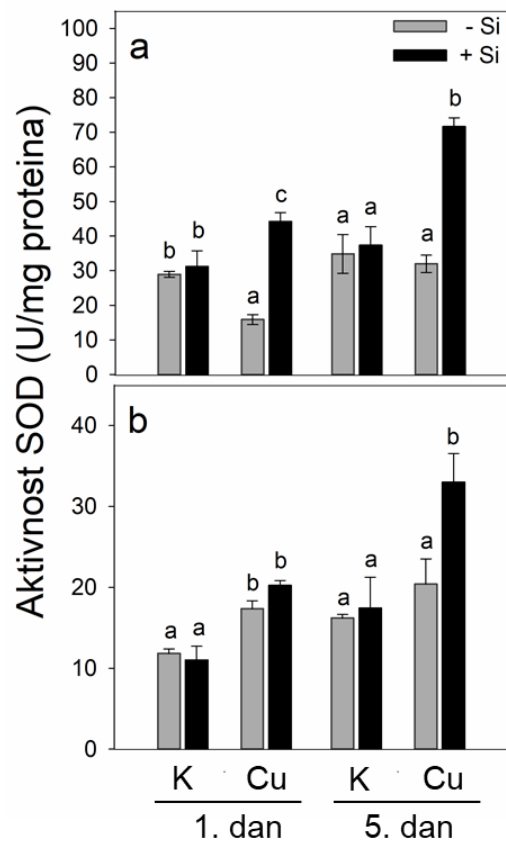
**Slika 4.16.** Uticaj primene Si na koncentraciju malondialdehida (MDA) u korenu (a) i listu (b) kod biljaka gajenih u optimalnoj koncentraciji Cu (K) kao i biljaka tretiranih 10  $\mu$ M Cu (Cu) nakon jednog dana i nakon pet dana tretmana. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  SD a statistički značajne razlike između tretmana su označene različitim slovima na osnovu Takijevog testa ( $p < 0.05$ ).

U listu je takođe zabeležen visok nivo lipidne peroksidacije već u prvom danu kod +Cu-Si biljaka (povišen za 80%), koji se značajno povećao petog dana, čak tri i po puta više u odnosu na kontrolu. Kod +Cu+Si tretmana, koncentracija MDA u prvom danu bila je povećana ali za 20% niža nego kod +Cu-Si, dok je u petom danu ta razlika bila još izraženija: koncentracija MDA u listu bila je za 43% niža kod +Cu+Si nego kod +Cu-Si tretiranih biljaka. Nije bilo razlike u koncentraciji MDA između K+Si biljaka i kontrolnih u listu krastavca (Slika 4.16 b).

## 4.4.2 Analiza aktivnosti i genske ekspresije antioksidativnih enzima

### 4.4.2.1 Ukupna aktivnost superoksid-dismutaze

U prvom analiziranom danu, ukupna aktivnost SOD enzima u korenu +Cu-Si biljaka bila je smanjena za oko 50% u odnosu na kontrolne vrednosti, dok je kod +Cu+Si biljka, ukupna aktivnost SOD u korenu bila za 50% povećana u odnosu na vrednosti kontrolnih biljaka (K-Si) (**Slika 4.17 a**). U petom danu, aktivnost SOD u korenu kod +Cu-Si biljaka bila je na nivou kontrolnih vrednosti dok je kod +Cu+Si tretmana bila viša nego prvog dana, dostižući dva puta više vrednosti od kontrolnih biljaka. Kontrolne biljke sa Si (K+Si) imale su isti nivo ukupne aktivnosti SOD kao i K-Si u korenu (**Slika 4.17 a**).



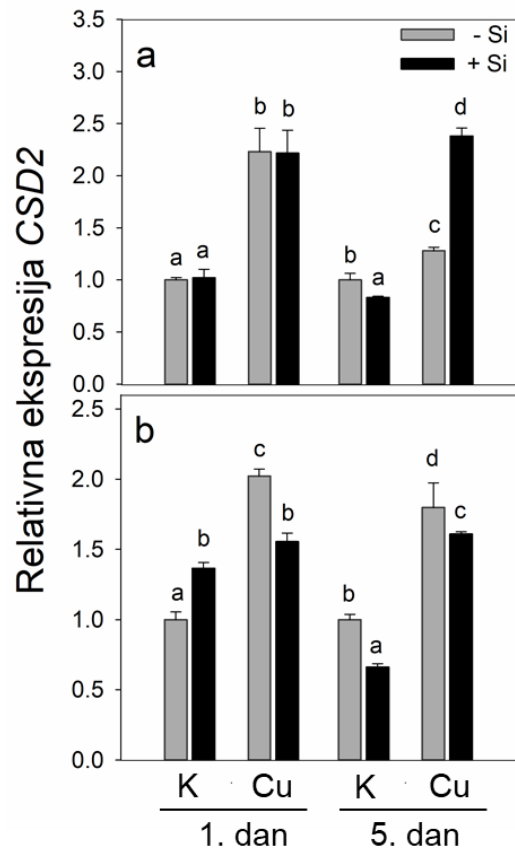
**Slika 4.17.** Uticaj primene Si na ukupnu aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) u korenu (a) i listu (b) kod biljaka gajenih u optimalnoj koncentraciji Cu (K) kao i biljaka tretiranih 10 μM Cu (Cu) nakon jednog dana i nakon pet dana tretmana. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti ± SD a statistički značajne razlike između tretmana su označene različitim slovima na osnovu Takijevog testa (p<0.05).



Nasuprot korenu, u listovima +Cu-Si biljaka, aktivnost SOD enzima bila je povećana za oko 45%, dok je kod +Cu+Si biljaka izmerena za 70% veća aktivnost SOD u odnosu na kontrolu prvog dana tretmana. U produženom tretmanu (5. dan), aktivnost SOD kod +Cu-Si biljaka nije se razlikovala od kontrolnih vrednosti za list, dok se kod +Cu+Si aktivnost SOD enzima dodatno povećala, dostižući dva puta veće vrednosti od kontrolnih biljaka (Slika 4.17 b).

#### 4.4.2.2 Analiza genske ekspresije Cu/Zn superoksid-dismutaze 2 i miR398

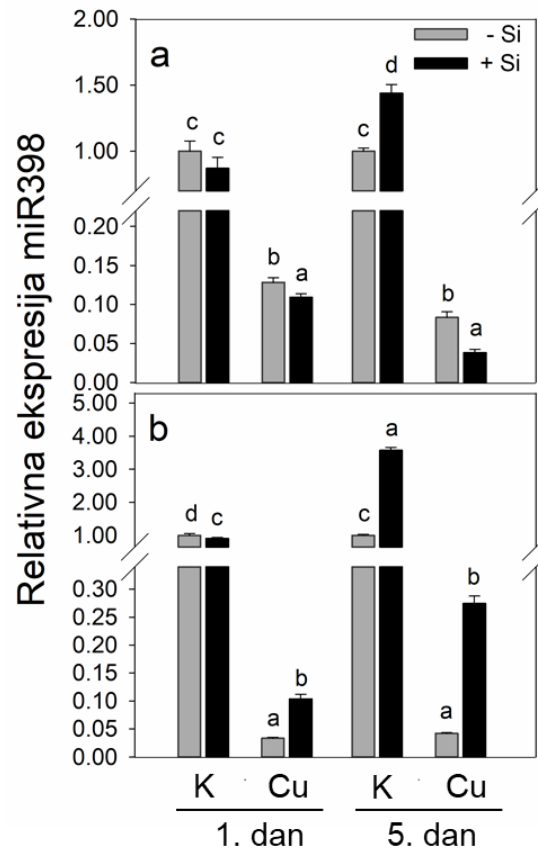
Relativna ekspresija gena koji kodira *CSD2* u prvom danu bila je oko 2,2 puta viša kod biljaka tretiranih bakrom, bez obzira na prisustvo Si. U produženom tretmanu, nivo ekspresije je u odnosu na kontrolu bio za oko 30% viši kod +Cu-Si, dok je u odnosu na njih relativna ekspresija *CSD2* bila za 85% viša kod +Cu+Si biljaka. U prvom danu, ekspresija *CSD2* kod K+Si biljaka bila je nepromenjena dok je u petom danu bila za 17% niža u odnosu na kontrolne biljke (Slika 4.18 a).



**Slika 4.18.** Uticaj primene Si na relativnu ekspresiju Cu/Zn superoksid dismutaze2 (*CSD2*) u korenu (a) i listu (b) kod biljaka gajenih u optimalnoj koncentraciji Cu (K) kao i biljaka tretiranih 10  $\mu$ M Cu (Cu) nakon jednog dana i nakon pet dana tretmana. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  SD a statistički značajne razlike između tretmana su označene različitim slovima na osnovu Takijevoeg testa ( $p < 0.05$ ).

Profil ekspresije *CSD2* izoforme u listu bio je sličan u prvom i petom danu. Kod +Cu-Si biljaka relativna ekspresija *CSD2* bila je viša nego kod +Cu+Si biljaka, dostižući dva puta veće vrednosti od kontrolnih u prvom danu, a u petom danu povećanje nivoa ekspresije *CSD2* u odnosu na kontrolu je bilo za 80%. Relativna ekspresija *CSD2* kod +Cu+Si biljaka bila je za oko 55% viša od kontrolnih vrednosti oba analizirana dana. Kod K+Si biljaka, nivo ekspresije u prvom danu bio je povišen a u petom danu snižen u odnosu na kontrolne biljke (K-Si), u oba slučaja za vrednosti od oko 35% (Slika 4.18 b).

Ekspresija *CSD2* je post-transkripciono regulisana putem miR398, čija je ekspresija takođe analizirana. Smanjenje ekspresije miR398 zabeleženo je u prvom i u petom danu kod +Cu-Si i +Cu+Si biljaka u odnosu na kontrolne, kako u korenu tako i u listu (Slika 4.19). U prvom danu, nivo ekspresije miR398 je bio 7,8 puta niži u korenu kod +Cu-Si biljaka, a kod +Cu+Si biljaka 9,2 puta niži u odnosu na kontrolne biljke. Petog dana tretmana, relativna ekspresija miR398 bila je snižena oko 12 puta kod +Cu-Si, odnosno 26 puta kod +Cu+Si biljaka. Dodavanje Si kontrolnim biljkama (K+Si) dovelo je do povećanja relativne ekspresije miR398 u korenu za 44% u odnosu na kontrolu u petom danu (Slika 4.19 a).

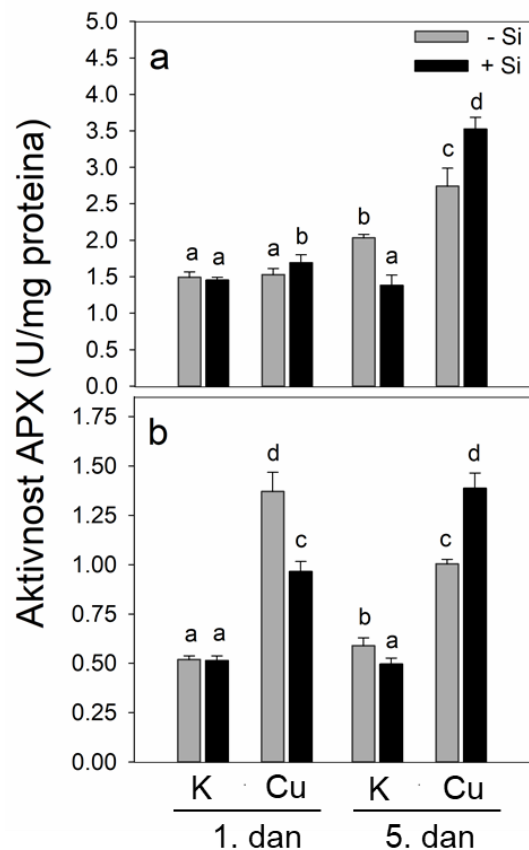


**Slika 4.19.** Uticaj primene Si na relativnu ekspresiju miR398 u korenu (a) i listu (b) kod biljaka gajenih u optimalnoj koncentraciji Cu (K) kao i biljaka tretiranih 10  $\mu$ M Cu (Cu) nakon jednog dana i nakon pet dana tretmana. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  SD a statistički značajne razlike između tretmana su označene različitim slovima na osnovu Takijevog testa ( $p < 0.05$ ).

U listu, relativna ekspresija miR398 bila je snižena 30 puta kod +Cu-Si, a 10 puta kod +Cu+Si biljaka nakon jednog dana tretmana, u poređenju sa vrednostima kontrolnih biljaka. U produženom tretmanu (5. dan), takođe, je dobijeno izrazito smanjenje ekspresije (24 puta) kod +Cu-Si biljka, dok je kod +Cu+Si nivo ekspresije miR398 bio četiri puta niži u odnosu na kontrolne vrednosti. Kod K+Si biljaka u petom danu je zabeleženo povećanje relativne ekspresije miR398, od oko četiri puta, u odnosu na K-Si biljke (Slika 4.19 b).

#### 4.4.2.3 Aktivnost i genska ekspresija askorbat-peroksidaze

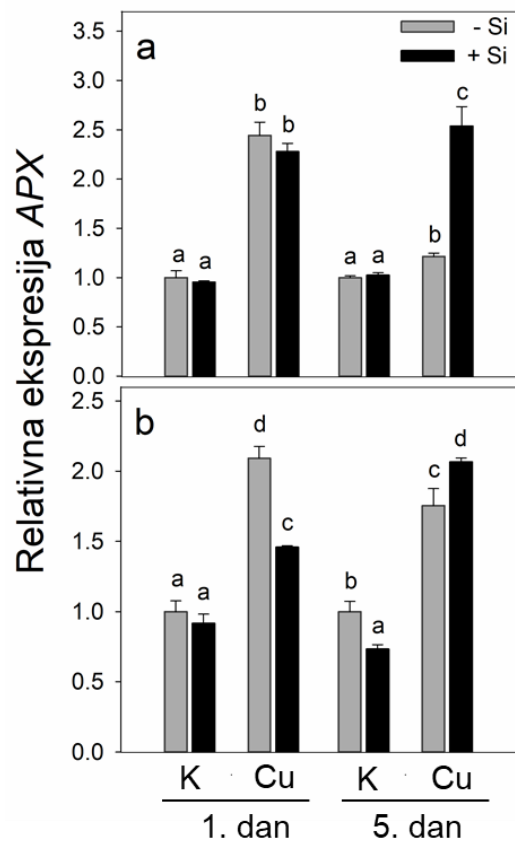
Prvog dana tretmana bakrom u višku, aktivnost APX bila je povećana (za 13%) u korenu jedino kod +Cu+Si biljaka. U petom danu, aktivnost APX kod +Cu-Si tretmana bila je za 35% veća u odnosu na kontrolu, dok je kod +Cu+Si biljaka dobijeno povećanje aktivnosti od 73% u poređenju sa kontrolnim vrednostima za koren. Kod K+Si biljaka, nije bilo razlike u aktivnosti APX u prvom danu dok je u petom danu dobijeno smanjenje od 32% u odnosu na kontrolu bez Si (Slika 4.20 a).



**Slika 4.20.** Uticaj primene Si na aktivnost askorbat-peroksidaze (APX) u korenu (a) i listu (b) kod biljaka gajenih u optimalnoj koncentraciji Cu (K) kao i biljaka tretiranih 10  $\mu$ M Cu (Cu) nakon jednog dana i nakon pet dana tretmana. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  SD a statistički značajne razlike između tretmana su označene različitim slovima na osnovu Takijevog testa ( $p < 0.05$ ).

Aktivnost APX u listu bila je povećana 2,6 puta kod +Cu-Si biljaka, dok je kod +Cu+Si bila povećana oko dva puta u odnosu na kontrolu, prvog analiziranog dana. U produženom tretmanu zabeležen je suprotan trend enzimske aktivnosti; viša aktivnost izmerena je kod +Cu+Si biljaka, 2,3 puta nego kod kontrolnih, dok je kod +Cu-Si aktivnost APX bila povećana za 70%. Aktivnost APX kod K+Si biljaka bila je ista kao kod kontrolnih biljaka u prvom danu dok je u petom danu dobijeno smanjenje od 15% (Slika 4.20 b).

Relativna ekspresija APX bila je povišena oko 2,4 puta kod biljaka tretiranih bakrom, bez obzira na prisustvo Si, u odnosu na kontrolu, u korenu prvog analiziranog dana. Nivo ekspresije u petom danu kod +Cu-Si biljaka bio je niži nego prvog dana, ali za 20% viši od kontrole, dok je kod +Cu+Si biljaka nivo ekspresije APX bio na istom nivou kao i prvog dana. Relativna ekspresija APX u korenu K+Si biljaka ostala je nepromenjena (Slika 4.21 a).



**Slika 4.21.** Uticaj primene Si na relativnu ekspresiju askorbat-peroksidaze (APX) korenu (a) i listu (b) kod biljaka gajenih u optimalnoj koncentraciji Cu (K) kao i biljaka tretiranih 10  $\mu$ M Cu (Cu) nakon jednog dana i nakon pet dana tretmana. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  SD a statistički značajne razlike između tretmana su označene različitim slovima na osnovu Takijevog testa ( $p < 0.05$ ).

Profil relativne ekspresije APX u listu u u potpunoj je saglasnosti sa dobijenim profilom aktivnosti APX. Transkripcija ovog gena pokazuje trend smanjenja kod +Cu-Si biljaka posmatrajući od prvog ka petom analiziranom danu, dok je kod +Cu+Si zabeležen trend povećanja genske ekspresije, sa

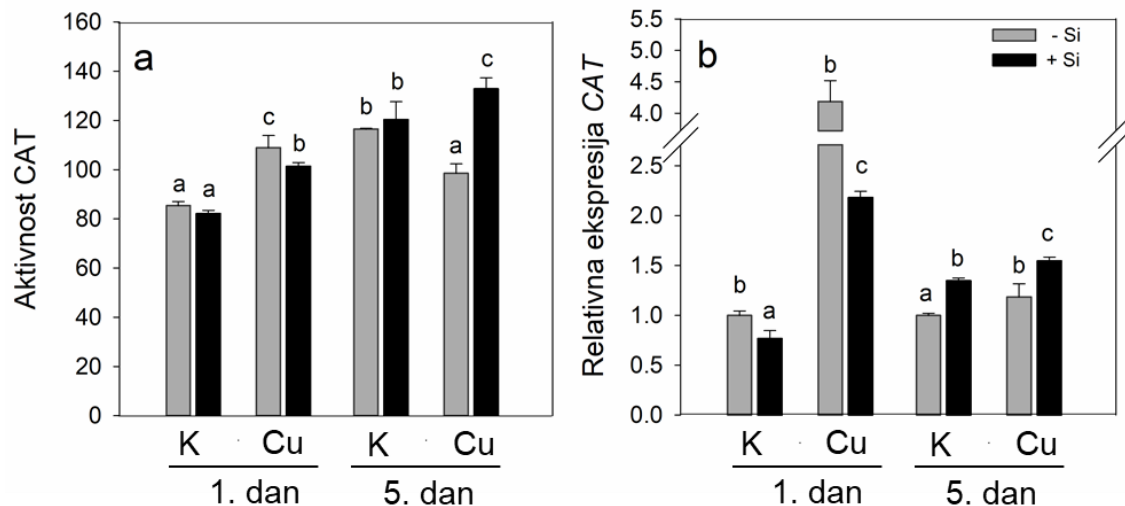
vrednostima od 1,5 do 2 puta višim od kontrolnih. Kontrolne biljke sa Si (K+Si), imale su sniženu relativnu ekspresiju *APX* u petom danu, za oko 30% u odnosu na kontrolu bez Si (K-Si) (Slika 4.21 b).

#### 4.4.2.4 Aktivnost i genska ekspresija katalaze

Aktivnost katalaze po metodi Havir and McHale (1987) nije detektovana u korenu biljaka krastavca, već samo u listu, stoga je i ekspresija gena koji kodira *CAT* analizirana samo u listu.

Aktivnost *CAT* u listu bila je povećana kod +Cu-Si tretmana oko 25% dok je kod +Cu+Si aktivnost bila viša za oko 20% u odnosu na vrednosti kontrolnih biljaka prvog analiziranog dana. Nasuprot, petog dana je aktivnost *CAT* kod +Cu-Si bila smanjena ispod nivoa kontrolnih vrednosti (za 15%), dok je kod +Cu+Si bila povećana za 14% u odnosu na kontrolu. K+Si biljke imale su isti nivo aktivnosti *CAT* kao i kontrolne biljke, i u prvom i u petom danu (Slika 4.22 a).

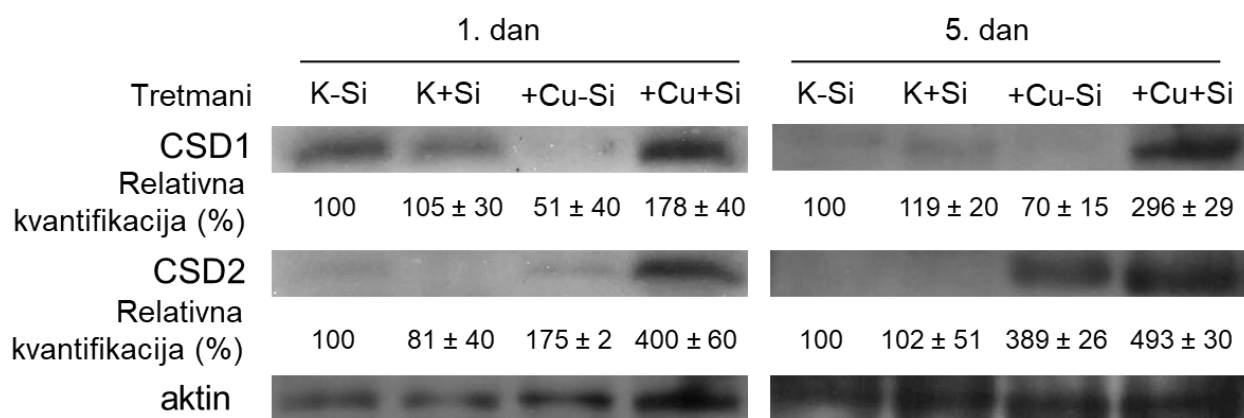
Relativna ekspresija *CAT* u listu bila je povišena 4,2 puta kod +Cu-Si tretmana a 2,2 puta kod +Cu+Si tretmana, prvog analiziranog danu. U petom danu nivo ekspresije *CAT* je generalno bio niži nego u prvom danu, kod tretiranih biljaka, ali ipak povišen u odnosu na kontrolu, za 20% kod +Cu-Si a za 55% kod +Cu+Si biljaka. Relativna ekspresija *CAT* kod K+Si biljaka bila je snižena prvog dana a povišena petog dana u odnosu na kontrolu, u oba slučaja za vrednosti od oko 30% (Slika 4.22 b).



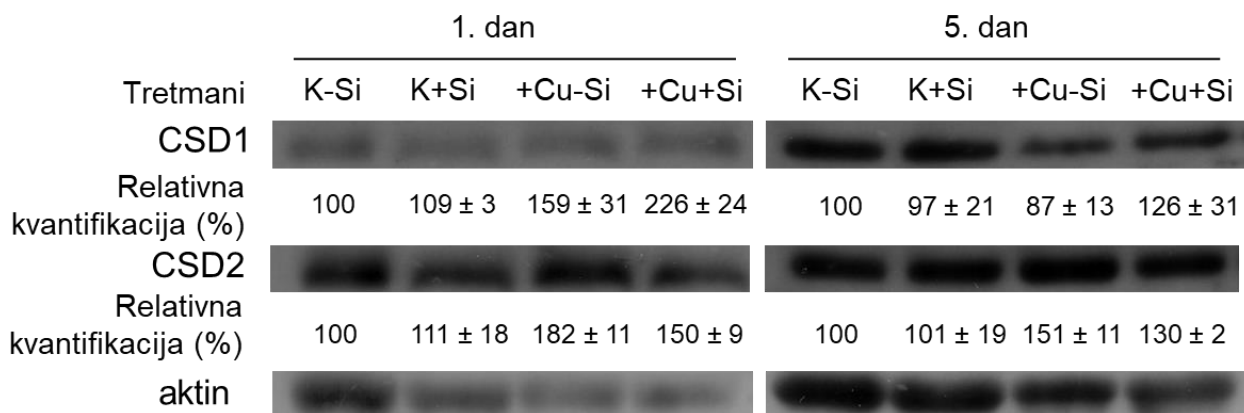
**Slika 4.22.** Uticaj primene Si na aktivnost katalaze (*CAT*) (a) i relativnu ekspresiju *CAT* (b) u listu kod biljaka gajenih u optimalnoj koncentraciji Cu (K) kao i biljaka tretiranih 10  $\mu$ M Cu (Cu) nakon jednog dana i nakon pet dana tretmana. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  SD a statistički značajne razlike između tretmana su označene različitim slovima na osnovu Takijevog testa ( $p < 0.05$ ).

## 4.5 Imunoblot analiza Cu/Zn SOD izoformi

Imunoblot analizom detektovane su dve izoforme, solubilna CSD1, molekulske mase oko 15 kDa i plastidna CSD2, oko 20 kDa. Rezultati u korenu krastavca pokazali su da je količina CSD1 izoforme smanjena kod +Cu-Si biljaka u odnosu na kontrolne biljke (K-Si) u obe analizirane vremenske tačke, i to za 50% prvog dana, a 30 % petog dana. Nasuprot tome, kod biljaka tretiranih +Cu+Si, CSD1 izoforma je bila povećana za 70% prvog dana tretmana, odnosno za 200% petog dana u odnosu na kontrolu. Kod biljaka tretiranih bakrom bez dodatka Si (+Cu-Si) nivo CSD2 forme u korenu je bio povećan za 75% prvog dana a četiri puta petog dana. Biljke +Cu+Si imale su četiri puta veću količinu CSD2 izoforme u korenu 1. dana a pet puta 5. dana u odnosu na kontrolu. Nije detektovana razlika u nivou proteina (obe analizirane izoforme) između K+Si i K-Si biljaka (**Slika 4.23**).



**Slika 4.23.** Imunoblot analiza izoformi proteina Cu/Zn SOD, citosolne CSD1 i plastidne CSD2 kao i endogene kontrole (aktin) u korenu biljaka gajenih u optimalnoj koncentraciji Cu (K) i biljaka tretiranih 10 µM Cu, bez Si i sa Si. Semikvantifikacija rezultata je predstavljena kao srednja vrednost ± SD ispod reprezentativne slike.

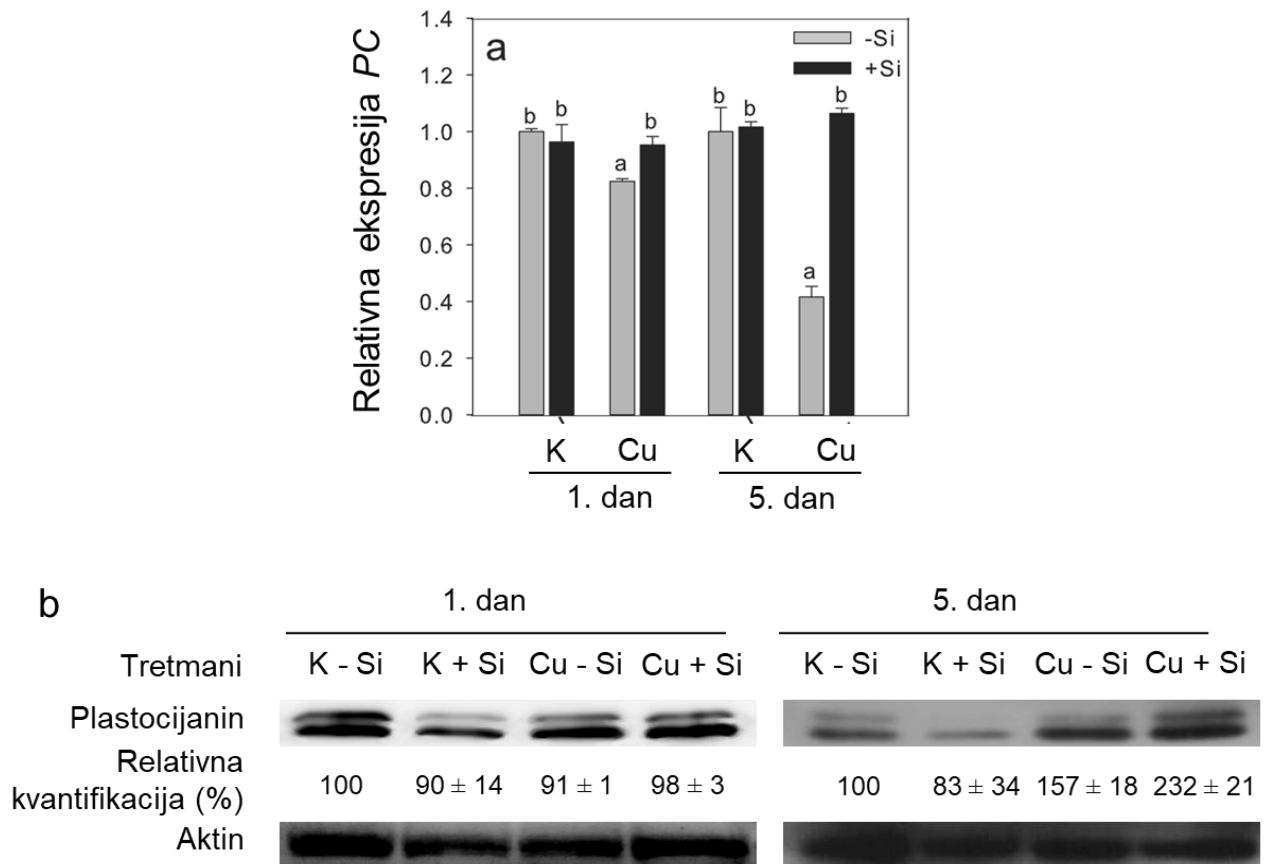


**Slika 4.24.** Imunoblot analiza izoformi proteina Cu/Zn SOD, citosolne CSD1 i plastidne CSD2 kao i endogene kontrole (aktin) u listu biljaka gajenih u optimalnoj koncentraciji Cu (K) i biljaka tretiranih 10 µM Cu, bez Si i sa Si. Semikvantifikacija rezultata je predstavljena kao srednja vrednost ± SD ispod reprezentativne slike.

U listu je, takođe, CSD1 izoforma bila više zastupljena kod +Cu+Si nego kod +Cu-Si, biljaka dok su suprotni rezultati dobijeni za CSD2 izoformu. Količina CSD1 proteinske izoforme kod +Cu-Si biljaka bila je povećana za 60% prvog dana dok u petom danu nije uočena promena u odnosu na kontrolne biljke. Tretman +Cu+Si doveo je do povećanja CSD1 od 125% prvog dana odnosno 25% petog dana. Izoforma CSD2 bila je povećana za 80% prvog dana odnosno za 50% petog dana kod +Cu-Si biljaka u odnosu na kontrolne. U tretmanu +Cu+Si dobijeno je povećanje od 50% prvog dana a 30% petog dana u odnosu na kontrolne biljke (K-Si). Dodavanje Si kontrolnim biljkama nije uticalo na promenu u proteinskom nivou Cu/Zn SOD izoformi (Slika 4.24).

## 4.6 Analiza plastocijanina

Analiza ekspresije gena koji kodira plastocijanin pokazala je da je relativna ekspresija *PC* bila promenjena jedino kod +Cu-Si biljaka. Snižen nivo ekspresije *PC* kod +Cu-Si biljaka za 20% dobijen je prvog dana, a za 60% petog analiziranog dana u odnosu na vrednosti kontrolnih biljaka (Slika 4.25 a).



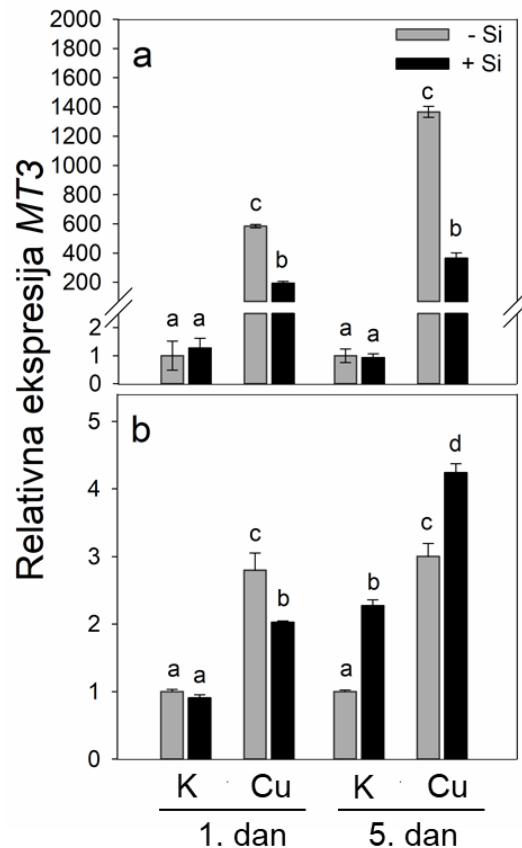
**Slika 4.25.** Uticaj primene Si na relativnu ekspresiju plastocijanina (*PC*) (a) i imunoblot analiza izoformi plastocijanina (b) u listu kod biljaka gajenih u optimalnoj koncentraciji Cu (K) kao i biljaka tretiranih 10  $\mu$ M Cu (Cu) nakon jednog dana i nakon pet dana tretmana. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  SD a statistički značajne razlike između tretmana su označene različitim slovima na osnovu Takijevog testa ( $p < 0.05$ ).

Imunoblot metodom uočeno je prisustvo dve izoforme plastocijanina u listovima krastavca veličine oko 10 kDa. Zastupljenija izoforma, manje molekulske mase je semikvantifikovana. Prvog analiziranog dana nije uočena razlika u količini plastocijanina među tretmanima. Petog dana je detektovana povećana akumulacija plastocijanina u tretmanima bakrom, i to za oko 60% kod +Cu-Si biljaka, dok je kod +Cu+Si biljaka količina plastocijanina bila povećana za 130% u odnosu na kontrolne biljke (Slika 4.25 b).

## 4.7 Analiza liganada bakra

### 4.7.1 Analiza ekspresije metalotioneina

Relativna ekspresija *MT3* bila je izrazito povišena u korenu biljaka tretiranih bakrom, oko 600 puta kod +Cu-Si, odnosno oko 200 puta kod +Cu+Si biljaka u odnosu na vrednosti kontrolnih biljaka prvog dana tretmana (Slika 4.26 a).



**Slika 4.26.** Uticaj primene Si na ekspresiju metalotioneina tip 3 (*MT3*) u korenu (a) i listu (b) biljaka gajenih u optimalnoj koncentraciji Cu (K) i biljaka tretiranih 10  $\mu$ M Cu (Cu) nakon jednog dana i nakon pet dana tretmana. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  SD a statistički značajne razlike između tretmana su označene različitim slovima na osnovu Takijevog testa ( $p < 0.05$ ).

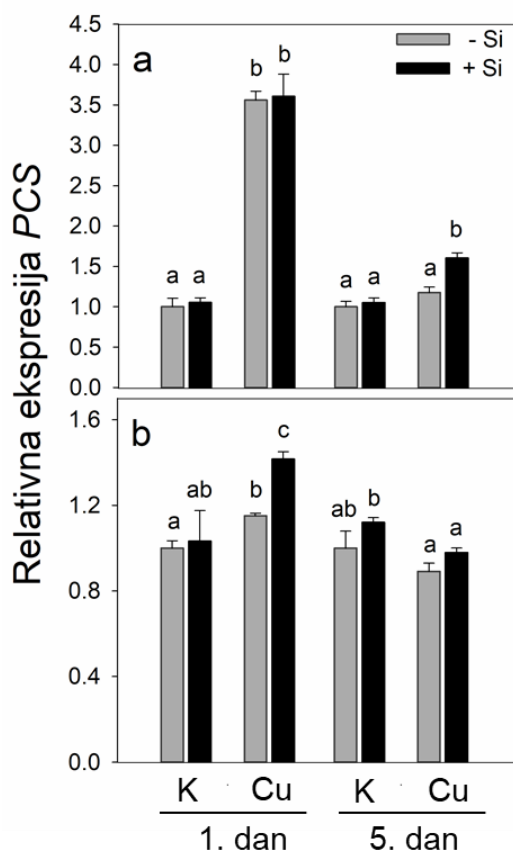


U produženom tretmanu, relativna ekspresija *MT3* bila je još viša, 1400 puta povišena kod +Cu-Si, odnosno 400 puta kod +Cu+Si biljaka u odnosu na kontrolne biljke. K+Si biljke su imale iste vrednosti kao i kontrolne (K-Si) (**Slika 4.26 a**).

Relativna ekspresija *MT3* u listu je, takođe, bila povišena kod biljaka tretiranih bakrom, ali u znatno manjoj meri u odnosu na koren. Oko tri puta viša ekspresija *MT3* dobijena je u prvom danu kod +Cu-Si biljaka, a oko dva puta kod +Cu+Si biljaka. Isti nivo ekspresije je zabeležen u petom danu kod +Cu-Si biljaka, dok je kod +Cu+Si ekspresija *MT3* bila dodatno povećana, oko 4 puta u odnosu na vrednosti kontrolnih biljaka. Nivo ekspresije *MT3* kod biljaka gajenih pri optimalnoj koncentraciji Cu, i sa Si, bio je dva puta viši u petom danu u odnosu na kontrolne biljke gajene bez Si (**Slika 4.26 b**).

#### 4.7.2 Analiza ekspresije fitohelatin-sintaze

Nivo ekspresije fitohelatin-sintaze (*PCS*) bio je povišen u korenu prvog dana tretmana viškom bakra, oko 3.5 puta u odnosu na kontrolne biljke, bez obzira na prisustvo Si. Petog dana, ekspresija *PCS* je bila povišena samo kod +Cu+Si biljaka, za 60% u odnosu na kontrolne biljke (**Slika 4.27 a**).

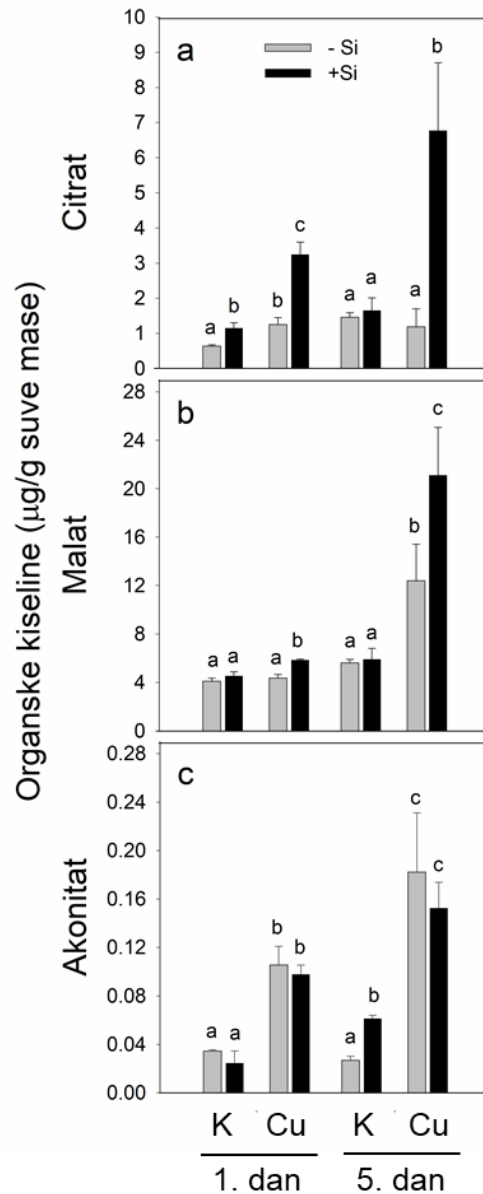


**Slika 4.27.** Uticaj primene Si na relativnu ekspresiju fitohelatin-sintaze (*PCS*) u korenu (a) i listu (b) kod biljaka gajenih u optimalnoj koncentraciji Cu (K) kao i biljaka tretiranih 10 μM Cu (Cu) nakon jednog dana i nakon pet dana tretmana. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti ± SD a statistički značajne razlike između tretmana su označene različitim slovima na osnovu Takijevog testa ( $p < 0.05$ ).

U listu, nivo ekspresije *PCS* je bio povišen prvog dana, za 15% kod +Cu-Si, odnosno za 40% kod +Cu+Si biljaka. Nasuprot, petog dana nije uočena promena ekspresije *PCS* u odnosu na kontrolne biljke. Kod K+Si biljaka, ekspresija *PCS* je bila povišena za 12% u odnosu na kontrolne (Slika 4.27 b).

### 4.7.3 Analiza prisustva organskih kiselina

Najzastupljenije organske kiseline izmerene u ovom radu u biljkama krastavca su citrat, malat i akonitat.



**Slika 4.28.** Uticaj primene Si na koncentraciju citrata (a), malata (b) i akonitata (c) u korenu biljaka gajenih u optimalnoj koncentraciji Cu (K) kao i biljaka tretiranih 10 µM Cu (Cu) nakon jednog dana i nakon pet dana tretmana. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti ± SD a statistički značajne razlike između tretmana su označene različitim slovima na osnovu Takijevog testa (p<0.05).

U korenu biljaka krastavca, izmerene koncentracije citrata i malata su bile znatno više od akonitata. Koncentracija citrata bila je povećana dva puta kod +Cu-Si biljaka prvog dana dok u petom danu nije bilo razlike u odnosu na kontrolne biljke. Kod +Cu+Si biljaka, dobijeno je povećanje koncentracije citrata od oko pet puta u odnosu na kontrolu, i prvog i petog dana tretmana. Povećanje od dva puta kod K+Si biljaka dobijeno je prvog dana, dok u petom danu nije bilo razlike u odnosu na kontrolu (**Slika 4.28 a**). Povećanje koncentracije malata u korenu (oko 40%) u prvom danu izmereno je jedino kod Cu+Si biljaka. Petog dana dobijeno je povećanje od oko 2,5 puta kod +Cu-Si biljaka, a oko četiri puta kod +Cu+Si biljaka u odnosu na kontrolne biljke (**Slika 4.28 b**). Koncentracija akonitata je bila povećana tri puta prvog analiziranog dana, i kod +Cu-Si i kod +Cu+Si biljaka. U petom danu, dobijeno je povećanje koncentracije akonitata od oko sedam puta kod +Cu-Si odnosno šest puta kod +Cu+Si biljaka u odnosu na vrednosti kontrolnih biljaka. Uočeno je i dvostruko povećanje koncentracije ove organske kiseline kod K+Si tretmana u odnosu na kontrolne biljke petog dana (**Slika 4.28 c**).

Molarni odnos koncentracije Cu prema organskim kiselinama izračunat je za vrednosti dobijene u petom danu i predstavljen u **Tabeli 4.2**. Kod biljaka tretiranih bakrom, bez i sa Si, molarni odnosi Cu:citrat, Cu:malat i Cu:akonitat bili su smanjeni u odnosu na vrednosti kontrolnih biljaka u korenu. Molarni odnos Cu i organskih kiselina bio je povećan jedino kod biljaka K+Si u poređenju sa netretiranim kontrolama (**Tablea 2**).

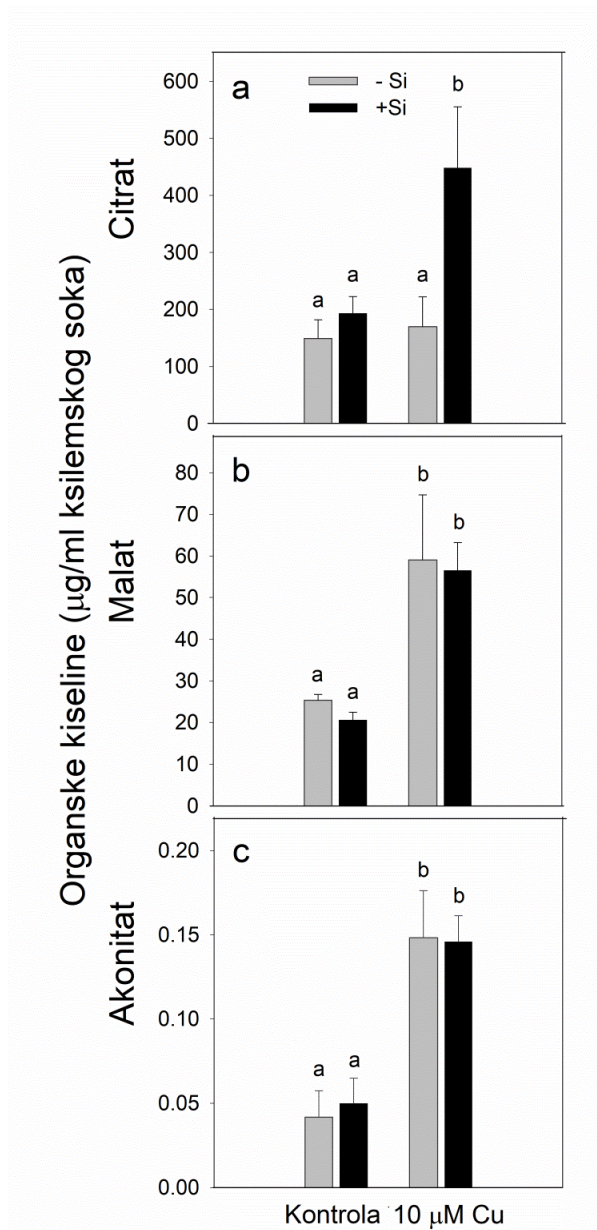
**Tabela 4.2.** Relativan molarni odnos koncentracija Cu u vodenoj frakciji i organskih kiselina (citrata, malata i akonitata) u korenu biljaka krastavca.

Tretmani	Relativan molarni odnos		
	Cu : Citrat	Cu : Malat	Cu : Akonitat
K-Si	1 : 0.38	1 : 0.008	1 : 2.1
K+Si	1 : 0.43	1 : 0.018	1 : 2.2
+Cu-Si	1 : 0.02	1 : 0.003	1 : 0.3
+Cu+Si	1 : 0.07	1 : 0.002	1 : 0.3

Rezultati predstavljaju srednje vrednosti odnosa koncentracija u korenu kod biljaka gajenih u optimalnoj koncentraciji Cu (K) i biljaka nakon pet dana tretmana 10  $\mu$ M Cu, bez i sa primene Si.

Analiza prisustva organskih kiselina u ksilemskom soku izvršena je petog dana od početka tretmana sa bakrom i silicijumom i pokazala je da je citrat zastupljeniji u odnosu na malat, a naročito akonitat, slično kao i u korenu (**Slika 4.29**). Koncentracija citrata u ksilemu bila je tri puta povećana kod +Cu+Si biljaka, dok u ostalim tretmanima nije bilo razlike u odnosu na kontrolu. Koncentracija malata je kod +Cu-Si i kod +Cu+Si biljaka bila povećana nešto više od dva puta (2,3). Povećanje koncentracije akonitata od 3,5 puta u odnosu na kontrolu izmereno je kako kod +Cu-Si tako i kod

+Cu+Si biljaka. Nije bilo razlika u koncentraciji organskih kiselina u ksilemu između kontrolnih biljaka sa i bez Si (**Slika 4.29**).

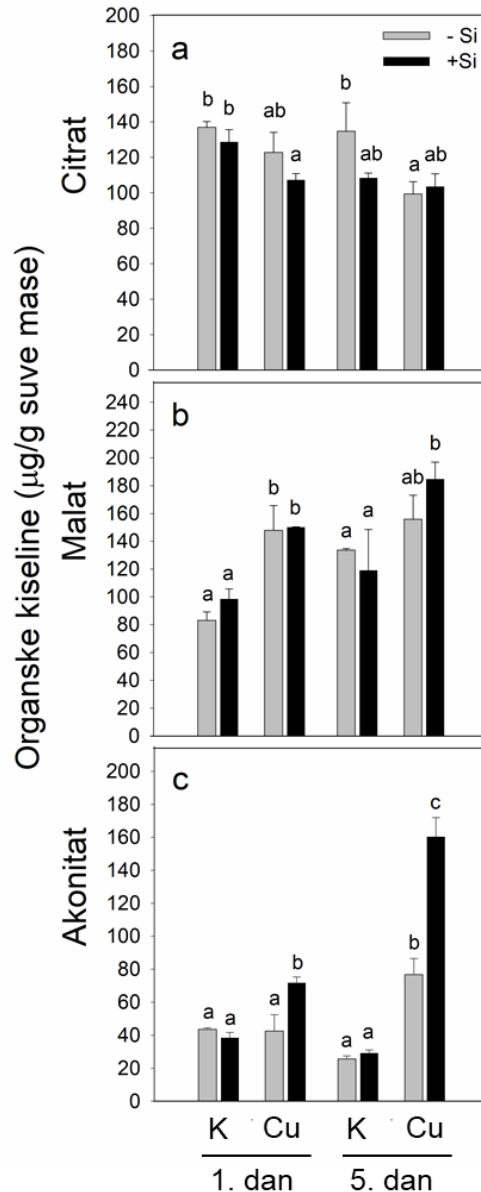


**Slika 4.29.** Uticaj primene Si na koncentraciju citrata (a), malata (b) i akonitata (c) u ksilemskom soku biljaka gajenih u optimalnoj koncentraciji Cu (Kontrola) kao i biljaka tretiranih 10 µM Cu nakon pet dana tretmana.

Rezultati predstavljaju srednje vrednosti ± SD a statistički značajne razlike između tretmana su označene različitim slovima na osnovu Takijevog testa (p<0.05).

Vrednosti koncentracija organskih kiselina u listu bile su jedan do tri reda veličine veće nego u korenu, pri čemu su sve tri analizirane organske kiseline bile podjednako zastupljene (**Slika 4.30**). Koncentracija citrata je pokazala tendenciju smanjenja kod biljaka tretiranih bakrom, međutim, značajne razlike su jedino uočene kod +Cu+Si biljaka u prvom danu a kod +Cu-Si biljaka u petom danu u odnosu na date vrednosti kontrolnih biljaka. Koncentracija malata u listu je bila povećana oko

dva puta kod +Cu-Si i kod +Cu+Si biljaka prvog analiziranog dana. U produženom tretmanu, koncentracija malata je bila značajno povećana jedino kod +Cu+Si tretmana, oko 40% u odnosu na vrednosti izmerene u kontrolnim biljkama. Koncentracija akonitata u prvom danu tretmana je bila povećana jedino kod +Cu+Si biljaka za oko 65% u odnosu na vrednosti kontrolnih biljaka. U petom danu, koncentracija akonitata je bila povećana tri puta kod +Cu-Si biljaka a čak šest puta kod +Cu+Si biljaka u odnosu na vrednosti kontrolnih biljaka. Kontrolne biljke gajene sa Si nisu se razlikovale od K-Si biljaka u pogledu koncentracije ispitivanih organskih kiselina u listu (**Slika 4.30**).



**Slika 4.30.** Uticaj primene Si na koncentraciju citrata (a), malata (b) i akonitata (c) u listu biljaka gajenih u optimalnoj koncentraciji Cu (K) kao i biljaka tretiranih 10 µM Cu (Cu) nakon jednog dana i nakon pet dana tretmana. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti ± SD a statistički značajne razlike između tretmana su označene različitim slovima na osnovu Takijevog testa (p<0.05).

Molarni odnos Cu:citrat i Cu:malat u listu bio je smanjen kod +Cu-Si i kod +Cu+Si biljaka u odnosu na vrednosti kod kontrolnih biljaka. Odnos Cu:akonitat bio je smanjen kod +Cu-Si tretmana dok je kod +Cu+Si dobijeno značajno povećanje u odnosu na vrednosti dobijene za kontrolne biljke. Biljke iz tretmana K+Si imale su smanjen odnos Cu:citrat i Cu:malat a povećan Cu:akonitat u odnosu na kontrolne (**Tabela 4.3**).

**Tabela 4.3.** Relativan molarni odnos koncentracija Cu u vodenoj frakciji i organskih kiselina (citrate, malata i akonitata) u listu biljaka krastavaca.

Tretmani	Relativan molarni odnos		
	Cu : Citrat	Cu : Malat	Cu : Akonitat
K-Si	1 : 70	1 : 100	1 : 15
K+Si	1 : 56	1 : 89	1 : 17
+Cu-Si	1 : 10	1 : 23	1 : 9
+Cu+Si	1 : 13	1 : 34	1 : 23

Rezultati predstavljaju srednje vrednosti odnosa koncentracija u korenu kod biljaka gajenih u optimalnoj koncentraciji Cu (K) i biljaka nakon pet dana tretmana 10  $\mu$ M Cu, bez i sa primene Si.

#### 4.7.4 Analiza aminokiselina nikocijanamina i histidina

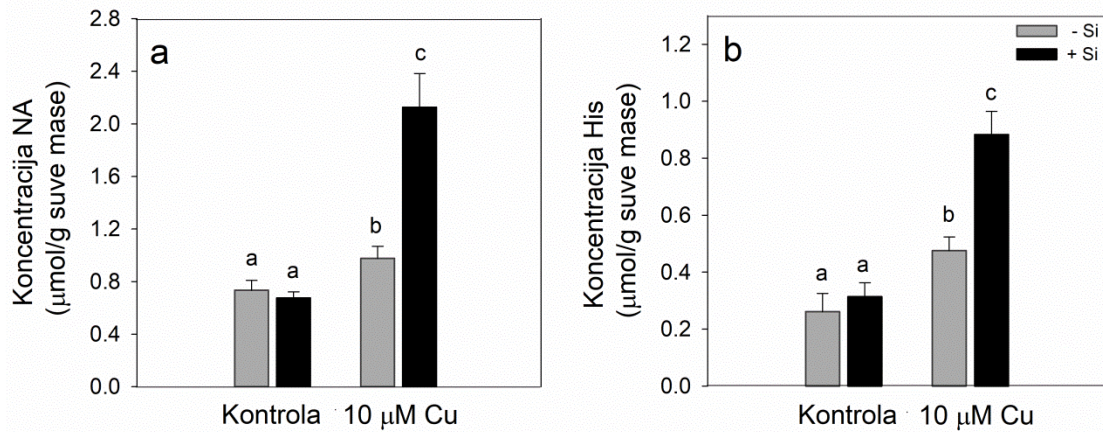
Koncentracija nikocijanamina u listovima bila je povećana kod +Cu-Si biljaka za oko 30%, dok je tretman +Cu+Si doveo je do izrazitog povećanja koncentracije NA, oko 300% u odnosu na kontrolne biljke. Nije bilo razlike u koncentraciji NA u listovima između K+Si i K-Si biljaka (**Slika 4.31 a**).

Koncentracija histidina u listovima krastavca bila je povećana kod biljaka tretiranih bakrom. Kod +Cu-Si biljaka, dobijeno je povećanje od oko dva puta dok je kod +Cu+Si biljaka koncentracija histidina bila 3,4 puta veća od vrednosti kontrolnih biljaka. K+Si biljke se nisu razlikovale od kontrolnih u pogledu koncentracije analiziranih aminokiselina (**Slika 4.31 b**).

Molarni odnos Cu:NA i Cu:His izračunat je na osnovu njihovih koncentracija izmerenih 5. dana tretmana i predstavljen u **Tabeli 4.4**. Molarni odnos Cu:NA bio je smanjen kod +Cu-Si biljaka u odnosu na kontrolne biljke. Za razliku, kod tretmana +Cu+Si molarni odnos Cu:NA je povećan u odnosu na kontrolne biljke. Kod K+Si biljaka, odnos Cu:NA je neznatno promenjen (**Tabela 4.4**).

Molarni odnos Cu:His je promenjen kod tretiranih u odnosu na kontrolne biljke. Slično kao i za NA, odnos Cu:His je smanjen kod +Cu-Si biljaka dok je kod +Cu+Si biljaka povećan u odnosu na

kontrolne biljke. Takođe, kod K+Si biljaka uočeno je povećanje odnosa Cu:His u odnosu na kontrolne K-Si (Tabela 4.4).



**Slika 4.31.** Uticaj primene Si na koncentraciju nikocijanamina (NA) (a) i histidina (His) (b) u listu kod biljaka gajenih u optimalnoj koncentraciji Cu (kontrola) kao i biljkama nakon 5 dana tretmana 10 µM Cu. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti ± SD a statistički značajne razlike između tretmana su označene različitim slovima na osnovu Takijevog testa ( $p < 0.05$ ).

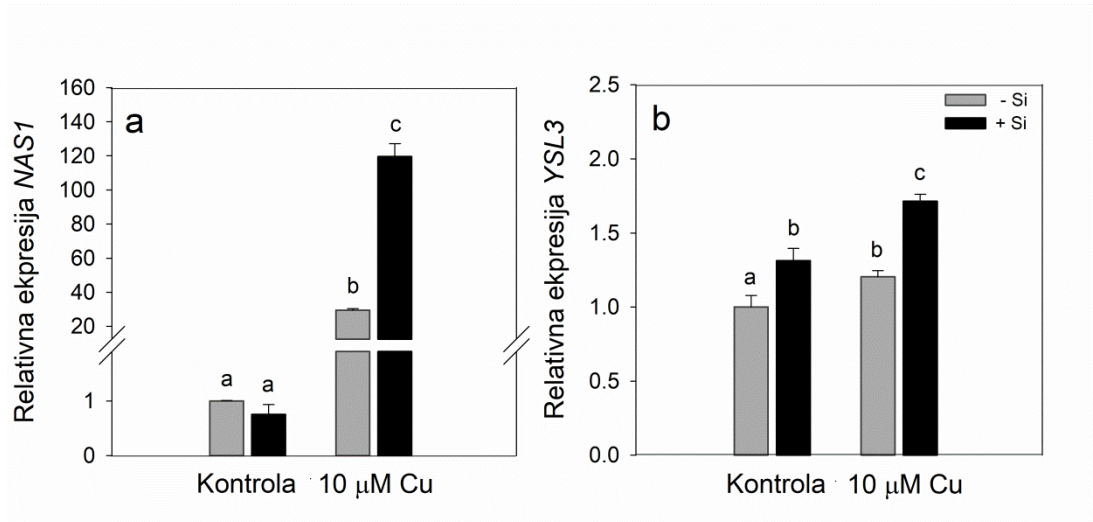
**Tabela 4.4.** Relativan molarni odnos koncentracije Cu u vodenoj frakciji i ukupne koncentracije aminokiselina nikocijanamina (NA) i histidina (His) u listu biljaka krastavca.

Tretman	Relativan molarni odnos	
	Cu : NA	Cu : His
K-Si	1 : 3.8	1 : 1.3
K+Si	1 : 3.6	1 : 1.7
+Cu-Si	1 : 2.2	1 : 1.1
+Cu+Si	1 : 5.4	1 : 2.2

Rezultati predstavljaju srednje vrednosti odnosa koncentracija u korenu kod biljaka gajenih u optimalnoj koncentraciji Cu (K) i biljaka nakon pet dana tretmana 10 µM Cu, sa i bez primene Si.

Biosinteza nikocijanamina direktno zavisi od enzima nikocijanamin-sintaze (NAS1). Rezultati analize relativne ekspresija gena *NAS1* su pokazali izrazito povećanje kod +Cu-Si biljaka, oko 30 puta, dok je kod +Cu+Si biljaka ekspresija bila povećana čak 120 puta u odnosu na kontrolu. Snižen nivo ekspresije *NAS1* za 25% uočen je kod K+Si biljaka u odnosu na kontrolne (K-Si) (Slika 4.32 a).

Transport kompleksa nikocijanamin-metal se obavlja putem YSL transporterera. Nivo ekspresije *YSL3* gena je bio povišen kod svih tretiranih grupa biljaka u odnosu na kontrolne. Kod +Cu-Si biljaka dobijen je za 20% viši nivo ekspresije *YSL3* u odnosu na kontrolne biljke, dok je kod +Cu+Si biljaka nivo ekspresije bio za 70% viši od kontrolnih biljaka. K+Si biljke imale su za oko 30% višu ekspresiju *YSL3* od kontrolnih biljaka K-Si (Slika 4.32 b).



**Slika 4.32.** Uticaj primene Si na relativnu ekspresiju nikocijanamin-sintaze 1 (*NAS1*) (a) i transporterera *YSL3* (b) u listu kod biljaka gajenih u optimalnoj koncentraciji Cu (kontrola) kao i biljkama nakon pet dana tretmana 10 μM Cu. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti ± SD a statistički značajne razlike između tretmana su označene različitim slovima na osnovu Takijevog testa ( $p < 0.05$ ).



## 5 Diskusija

S obzirom na način života, biljke su konstantno izložene delovanju promenljivih faktora spoljašnje sredine, od kojih mnogi deluju nepovoljno na rastenje i razviće i označavaju se kao stresni faktori. Prisustvo stresnih faktora značajno utiče na kvalitet i prinos poljoprivrednih kultura, stoga, ublažavanje efekata stresa kao i povećanje tolerancije biljaka na stres predstavlja imperativ u savremenoj poljoprivredi (Rao and Rogers 2006; Tuteja et al. 2011; Mantri et al. 2012). Među abiotičkim faktorima stresa, kontaminacija zemljišta teškim metalima je jedan od velikih problema današnjice koji je gotovo isključivo nastao antropogenim aktivnostima. Povećana akumulacija bakra u zemljištu, površinskim i podzemnim vodotokovima potiče od izlivanja rudnog jalovinskog materijala, ispuštanja industrijskih otpadnih voda kao i usled dugogodišnje i prekomerne upotrebe fungicida na bazi Cu. Poseban problem predstavljaju zemljišta na kojima se u dužem vremenskom periodu (čak i preko sto godina) gaji ista biljna kultura, kao što su vinogradi, ali i staklene bašte gde se uzgajaju različite povrtarske kulture (Kaplan 1999; Zheng et al. 2005; Komárek et al. 2010). Bakar kao perzistentan polutant, akumulira se u životnoj sredini i posledično ulazi u lance ishrane. Zbog svoje izrazite redoks aktivnosti, bakar je toksičan za sve žive sisteme, ali je za biljke znatno toksičniji nego za životinje i ljude (Wheeler and Power 1995; Gajewska and Sklodowska 2010; Metwali et al. 2013). Ispitivanje fitotoksičnosti teških metala u različitim eksperimentalnim uslovima kod brojnih biljnih vrsta, pokazalo je da su od Cu toksičniji jedino olovo i živa, dok je Cu znatno toksičniji od Cd, As, Co, Ni, Zn i Mn. Srednja toksična koncentracija za bakar je oko 2  $\mu\text{M}$  što zavisi od uslova pretretmana, trajanja tretmana i od biljne vrste (Kopittke et al. 2010).

Silicijum je prepoznat kao koristan element za biljke pre više od jednog veka. Brojna istraživanja u poslednjih 25 godina su pokazala da gajenje biljaka u prisustvu Si može doprineti prevazilaženju stanja stresa izazvanog različitim abiotičkim ili biotičkim faktorima. Međutim, mehanizmi koji su u osnovi njegovog dejstva na biljke, ni do danas nisu potpuno razjašnjeni. Primena Si je ekološki prihvatljiva s obzirom na to da Si ne ispoljava štetne efekte na biljke i životnu sredinu ukoliko je prisutan u većim koncentracijama. Pozitivan efekat delovanja Si često je specifičan za biljnu vrstu/rod i obično je izraženiji kod vrsta koje akumuliraju veće količine Si u svojim tkivima. Krastavac (*Cucumis sativus* L.) pripada malobrojnoj grupi dikotiledonih biljaka koje mogu da akumuliraju značajne količine Si i, stoga, predstavlja dobar model za ispitivanje mehanizma delovanja Si u uslovima stresa.

### 5.1 Uticaj Si na fiziološke parametre stresa kod biljaka izloženih povišenim koncentracijama bakra

U cilju utvrđivanja efekata Si, kao i mehanizama odgovornih za potencijalan zaštitni efekat Si kod biljaka krastavaca koje se suočavaju sa stresom usled prisustva Cu u višku, u prvom setu eksperimenata testirano je nekoliko koncentracija Cu. Najizraženiji efekat na povećanje biomase i smanjenje oksidativnog stresa je pokazan kod umereno toksične koncentracije Cu (10  $\mu\text{M}$ ), stoga je ta koncentracija odabrana za detaljnije ispitivanje mehanizama delovanja Si kod biljaka krastavca tretiranih bakrom (**Slika 4.3, 4.4**). Da bi se procenio intenzitet stresa, kao i blagotvorni efekat silicijuma na povećanje tolerancije biljaka na dati stres praćene su promene u biomasi korena i lista, sadržaju

hlorofila, intenzitetu lignifikacije, nivoa lipidne peroksidacije kao i očuvanosti integriteta ćelijskih membrane korena.

Povećanje biomase biljaka gajenih u prisustvu Si je posledica više različitih mehanizama kojima Si omogućava da se efekti toksičnog delovanja Cu redukuju. Analizirajući pojedinačne organe, Si je imao veći uticaj na povećanje biomase lista dok na nivou korena nije zabeležena značajnija razlika (**Slika 4.6**). Sličan efekat je je primećen i kod pirinča (Kim et al. 2014) i bambusa (Collin et al. 2014), predstavnika grupe biljaka koje hiperakumuliraju Si u svojim tkivima, ali i kod arabidopsisa, vrste koja se ne smatra Si-akumulatorom (Li et al. 2008). Inhibitorni uticaj na proces fotosinteze je jedan od glavnih simptoma prisustva toksičnih doza Cu, tako da se uticaj Si na povećanje biomase lista biljaka može povezati sa višim intenzitetom fotosinteze kod biljaka gajenih sa Si (Mateos-Naranjo et al. 2015). Smanjenje fotosintetske aktivnosti kod biljaka tretiranih bakrom potiče od strukturnih promena fotosintetskog aparata kao i smanjenja sadržaja hlorofila (Sandman and Böger 1980). Kod krastavca je pokazano da u uslovima stresa izazvanog viškom Cu dolazi do značajnog smanjenja intenziteta fotosinteze, a s tim u vezi i lisne površine (Vinit-Dunand et al. 2002). Uticaj Cu na biosintezu hlorofila ispitivan je kod mnogih biljnih vrsta (Kabata-Pendias and Pendias 2001). Smatra se da Cu u višku sprečava integraciju hlorofila u tilakoidne membrane hloroplasta (Caspi et al. 1999). Kod pšenice je pokazano da sadržaj hlorofila linearno opada sa povećanjem nivoa Cu u zemljištu (Cook et al. 1997). U ovoj studiji izmerena je manja koncentracija hlorofila kod biljaka tretiranih bakrom u odnosu na kontrolne (**Slika 4.7**). Međutim, kod biljaka u +Cu+Si tretmanu, zabeležen je viši sadržaj hlorofila kod sva tri ispitivana lista, u poređenju sa biljkama iz +Cu-Si tretmana, dok u najmlađem listu nije bilo razlike u sadržaju hlorofila između +Cu+Si i kontrolnih biljaka (**Slika 4.7**). Kod vrste trave *Spartina densiflora*, koja može da toleriše visoke koncentracije Cu, pokazano je da je blagotvoran efekat Si na fotosintetski aparat povezan sa inhibicijom uticaja Cu na aktivna mesta RUBISCO enzima kao i sa povećanom koncentracijom biljnih pigmentata, što je rezultovalo povećanjem intenziteta fotosinteze i biomase kod +Cu+Si tretiranih biljaka (Mateos-Naranjo et al. 2015).

Hloroza listova je karakterističan vizuelni simptom toksičnosti Cu kod biljaka (Ciscato et al. 1997; Wodala et al. 2012), što je zapaženo i u ovom radu (**Slika 4.5**). Međutim, pojava hloroze je indirektna posledica smanjenog sadržaja Fe kod biljaka izloženih visokim koncentracijama Cu. Smatra se da smanjenje hlorofila i fotoinhibicija PSII sistema zapravo potiču od nedostatka Fe koji je indukovano prisustvom Cu u višku (Pätsikkä et al. 2002). Biljke krastavca gajene sa silicijumom (+Cu+Si) pokazuju manji stepen hloroze i kod takvih biljaka je izmeren veći sadržaj Fe u listovima (**Tabela 4.1**). Povećani sadržaj Fe i hlorofila kod +Cu+Si tretmana usloveli su povećanje biomase listova u ovoj grupi biljaka. Ranije studije su pokazale da se koristan efekat Si kod biljaka krastavca gajenih u uslovima nedostatka Fe između ostalog ogleda u povećanju količine biljnih pigmentata i prevazilaženju hloroze listova (Pavlovic et al. 2013).

Prisustvo Si nije značajno uticalo na masu korena biljaka, ali je uticalo na očuvanje strukture i funkcije korena. Curenje elektrolita je fenomen koji se javlja usled prisustva viška Cu, ali i drugih teških metala, a dešava se ubrzo nakon izlaganja stresoru i posledica je narušene permeabilnosti membrana ćelija korena (Demidchik et al. 2014). Curenje elektrolita iz korena krastavca je detektovano već u prvim satima tretmana bakrom i tokom vremena se povećavalo (**Slika 4.8**). Nasuprot, primena Si kod biljaka tretiranih Cu je sprečila takav efekat. Količina oslobođenih elektrolita predstavlja merilo tolerancije na stres Cu, pa se Cu-tolerentni genotipovi odlikuju očuvanom permeabilnosti ćelijskih membrana nasuprot Cu-senzitivnim (De Vos et al. 1991; Murphy and Taiz 1997). Fenomen gubitka elektrolita, pre svega  $K^+$ , je povezan sa otvaranjem različitih tipova jonskih kanala i uvek je praćen formiranjem ROS-a i često vodi ka programiranoj ćelijskoj smrti (Demidchik et al. 2014). Dokaz da su ova dva indikatora stresa (produkcija ROS i efluks  $K^+$ ) međusobno povezana, leži u preklapanju

njihovih kinetika (Demidchik et al. 2003, 2010; Rodrigo-Moreno et al. 2013). Direktna efekta povećanja ROS jeste peroksidacija lipida ćelijske membrane što se manifestuje kroz akumulaciju krajnjeg produkta MDA. Usled prisustva Si, nije zabeleženo povećanje nivoa lipidne peroksidacije tokom prvog dana tretmana (**Slika 4.16**), pa se može zaključiti da je manja količina ROS, ali i smanjenje slobodnog Cu u citosolu kod +Cu+Si biljaka, rezultovalo izostankom efekta curenja elektrolita ili bar njegovim sprečavanjem u prvim satima izlaganja Cu-stresu (**Slika 4.8**). Kod pirinča tretiranog +Cu+Si, mikroskopske analize su pokazale smanjenje oštećenja ćelijskih struktura u korenu usled prisustva Si (Kim et al. 2014). Pokazano je i da je Si smanjio gubitak elektrolita iz korena biljaka pamuka tretiranog kadmijumom (Farooq et al. 2013).

Inhibicija rasta kao i braon obojenost korena su tipični simptomi stresa kod biljaka izloženih visokim koncentracijama bakra, koji se mogu uočiti već nakon jednog dana tretmana (Zheng et al. 2005), što je zapaženo i kod biljaka krastavca u ovom eksperimentu (**Slika 4.2**). Ovaj fenomen se dovodi u vezu sa metabolizmom fenola, ali i sintezom lignina (Lin et al. 2005; Kováčik et al. 2008). Smanjenje braon-obojenosti korena kod biljaka krastavaca gajenih sa Si je u direktnoj korelaciji sa smanjenom količinom ukupnih fenola i stepenom lignifikacije korena (**Slika 4.9, 4.10**).

Lignin je kompleksan polimer, jedinstven u biljnom carstvu kao integralni deo ćelijskih zidova biljnih ćelija (Lewis 1999). Lignin kao glavni konstituent ksilemskih sprovodnih sudova, zahvaljujući svojim fizikohemijskim osobinama, omogućava transport vode i mineralnih elemenata od korena ka listu bez značajnijih gubitaka, pruža mehaničku potporu i zaštitu od napada patogena i herbivora (Gavnholt and Larsen 2002). Lignifikacija je karakteristična za određene ćelijske tipove, ali se može indukovati stresom, čak kod tipova ćelija koje nisu uobičajeno lignifikovane, kao odgovor na promene u spoljašnjoj sredini. Povećanje nivoa lignifikacije u uslovima biotičkog stresa ima za cilj formiranje mehaničke barijere za prodor patogena, a tokom abiotičkog stresa, kao što je stres teškim metalima, smanjenje njihovog ulaska u biljna tkiva i u ćelije (Frei 2013). Paralelno sa inhibicijom rasta korena, povećanje lignifikacije je efekat koji se javlja usled prisustva toksične koncentracije bakra (Moura et al. 2010). Akumulacija lignina, kao rezultat povećanja aktivnosti enzima pekosidaza, lakaza, kao i PAL koji učestvuju u njegovom biosintetskom putu, zabeleženo je kod različitih biljnih vrsta tretiranih bakrom (Chen et al. 2002a; Lin et al. 2005; Ali et al. 2006; Kováčik and Klejdus 2008). Takođe, povećanje aktivnosti navedenih enzima posledica je povećane ekspresije gena koji ih kodiraju i ukazuje na *de novo* sintezu lignina i njegovih prekursora (Díaz et al. 2001; Michalak 2006; Liu et al. 2015). U ovom radu, detektovana je intenzivna lignifikacija u korenu krastavca nakon pet dana tretmana bakrom (**Slika 4.9**). U skladu sa ovim rezultatom je i povišena ekspresija *PAL* gena kao i sadržaj totalnih fenola (**Slika 4.10**). *PAL* je prvi enzim u biosintetskom putu fenilpropanoida kojim se sintetišu monolignoli, gradivne jedinice lignina (Dixon and Paiva 1995). Sadržaj fenola koji je u korelaciji sa enzimima koji učestvuju u njihovoj biosintezi ukazuje da se ukupni fenoli mogu smatrati intermedijerima u biosintezi lignina i pouzdanim markerima stresa (Díaz et al. 2001; Michalak 2006). Povišena ekspresija *PAL*, kao i aktivnost ovog enzima koji su u saglasnosti sa akumulacijom lignina i ukupnih fenola pokazani su i kod drugih biljnih vrsta tretiranih bakrom (Díaz et al. 2001; Kováčik and Klejdus 2008; Liu et al. 2015). Štaviše, pokazano je da je količina lignina i fenola kao i aktivnost *PAL* u direktnoj korelaciji sa dozom primenjenog bakra (Ali et al. 2006; Kováčik and Klejdus 2008; Feigl et al. 2013). S obzirom da je u ovoj studiji pokazano da biljke u tretmanu +Cu+Si, imaju niži stepen lignifikacije, manji sadržaj fenola kao i niži nivo ekspresije *PAL*, nego +Cu-Si biljke, može se zaključiti da je to posledica smanjenog nivoa stresa, što je u saglasnosti sa smanjenjem lipidne peroksidacije u korenu kao i drugih parametara stresa. Uticaj Si na smanjenje lignifikacije je pokazan i kod tretman viškom cinka, kadmijuma i natrijuma (Hashemi et al. 2010; Vaculík et al. 2012; Bokor et al. 2014). Zajednička osobina silicijuma i lignina jeste mehanička potpora i zaštita od stresnih uslova. Kod pirinča koji je hiperakumulator Si i za koga je Si esencijalan, pokazana je negativna korelacija između akumulacije

silicijuma i sadržaja lignina u optimalnim fiziološkim uslovima (Suzuki et al. 2012). Depozicija silicijuma u ćelijskom zidu korena kod trava koje aktivno usvajaju veće količine Si, kolokalizuje sa polimerizacijom lignina i to je koordinisan i regulisan proces (Soukup et al. 2017, 2019).

Iako se antioksidativna uloga fenolnih jednjenja u uklanjanju ROS ne može zanemariti, njihov redoks ciklus je u disbalansu u prisustvu teških metala. Naime, u prisustvu teških metala dominira prooksidantska, radikalska forma fenola koja dovodi do direktnog oštećenja DNK molekula i izaziva lipidnu peroksidaciju (Sakihama et al. 2002; Michalak 2006; Iwasaki et al. 2011). Za razliku od drugih teških metala kakav je Cd, koji nije redoks-aktivan, Cu ima izraženiji uticaj na metabolizam fenola i, stoga, veću fitotoksičnost Cu nego Cd prati i povećanje sadržaja ukupnih fenola (Arduini et al. 1995; Kováčik and Klejduš 2008). U ovoj studiji je pokazano da gajenje biljaka sa silicijumom u uslovima viška bakra, u poređenju sa biljkama bez Si, dovodi do smanjenja količine fenola, što je u skladu sa smanjenim nivoom oksidativnog stresa. Slični rezultati su zabeleženi i kod krastavca tretiranog manganom. Primena Si dovela je do smanjenog efekta oksidacije fenola pod uticajem viška Mn a samim tim i izostanka oksidativnog braon obojenja na listovima, koji je tipičan simptom toksičnosti Mn (Iwasaki et al. 2002; Dragišić Maksimović et al. 2007).

## 5.2 Uticaj Si na ekspresiju lakaze i post-transkripcionog regulatora miR408

Lakaza je enzim koji sadrži Cu kao kofaktor, koji omogućava ulogu ovog enzima u oksidoredukcionim reakcijama u procesu biosinteze lignina, a samim tim i ulogu u održavanju strukture i integriteta ćelijskog zida, kao i odgovoru na stres. Lakaza je, kao Cu-protein, uključena i u homeostazu bakra (Sterjiades et al. 1992; Bao et al. 1993; Dean and Eriksson 1994; Ranocha et al. 2002; Abdel-Ghany and Pilon 2008). Aktivnost ovog enzima se povećava kod biljaka tretiranih bakrom što je u skladu sa povećanim sadržajem lignina u korenu (Lin et al. 2005; Liu et al. 2015). Međutim, istraživanja su pokazala da su lakaze konstitutivno, tkivno-specifično eksprimirane u tkivima koja su minimalno lignifikovana i ta činjenica sugerise da neki predstavnici ove familije proteina, pored biosinteze lignina, imaju i dodatne uloge (Gavnholt and Larsen 2002; McCaig et al. 2005). Smatra se da LAC3 pripada lakazama specifičnim za koren (Berthet et al. 2012). Biljke kod kojih je utišan gen *lac3* pokazuju promene u celokupnom metabolizmu fenola, međutim smanjenje sadržaja lignina kod takvih biljaka nije uočeno (Ranocha et al. 2002). Ekspresija lakaza je post-transkripciono regulisana pomoću miRNK, miR397 i miR408. Dok je miR397 isključivo negativni regulator sadržaja lignina, miR408 ima ključnu ulogu u homeostazi bakra ali je povezana i sa tolerancijom na oksidativni stres uzrokovan različitim stresnim faktorima (Abdel-Ghany and Pilon 2008; Trindade et al. 2010; Jovanović et al. 2014; Ma et al. 2015a).

Ekspresija miR408 se povećava u uslovima nedostatka Cu, dok se, očekivano, ekspresija *LAC3* smanjuje (Abdel-Ghany and Pilon 2008; Ma et al. 2015a) Međutim, ne postoji mnogo podataka u literaturi koji se tiču uticaja viška Cu na ekspresiju ovih gena. Kod vinove loze je pokazano da se ekspresija miR408, kao i miR397, smanjuje sa povećanjem doze primenjenog Cu, a takav profil prati i ekspresija njihovih target gena *LAC4*, *LAC12* i *LAC17* (Leng et al. 2017). Kod topole se ekspresioni profil miR408, takođe, razlikuje u zavisnosti od doze primenjenog Cu, kao i analiziranog biljnog organa, dok ekspresija nekoliko ispitivanih lakaza nije u saglasnosti sa svojim regulatorom (Lu et al. 2011). Za sada nema literaturnih podataka koji se tiču praćenja paralelne ekspresije *LAC3* i miR408 kod biljaka tretiranih bakrom u višku. U ovoj disertaciji je pokazano da je profil ekspresije miR408 kod različitih tretmana u korenu krastavca u potpunoj saglasnosti sa ekspresijom *LAC3* oba analizirana dana

(**Slika 4.11**), ukazujući da je *LAC3* regulisana ovom miRNK i u uslovima povišenih koncentracija bakra. Niži nivo ekspresije miR408 je dobijen kod +Cu+Si biljaka, koje su imale višu ekspresiju *LAC3*, u odnosu na +Cu-Si biljke. Međutim, ekspresija *LAC3* u korenu krastavca nije u skladu sa stepenom lignifikacije i nivoom oksidativnog stresa u korenu kod različitih tretmana, što sugerise da *LAC3* obavlja i druge funkcije u stresu Cu koje nisu povezane sa lignifikacijom. Naime, kod +Cu+Si biljaka, nivo ekspresije *LAC3* je viši a stepen lignifikacije niži dok je suprotno dobijeno kod +Cu-Si biljaka. Dakle, primena Si je povećala ekspresiju *LAC3* gena koji kodira Cu-protein, i to je u saglasnosti sa nivoom ekspresije njegovog post-transkripcionog regulatora miR408.

U ovoj disertaciji je pokazano da silicijum ima uticaj na ekspresiju drugih Cu-proteina, plastocijanina i Cu/Zn SOD izoformi. Pored svoje osnovne uloge, pomenuti Cu-proteini bi mogli imati ulogu depoa Cu jona ukoliko su prisutni u višku (Yamasaki et al. 2007). Moguće je da je povećanje ekspresije *LAC3*, takođe, u vezi sa potencijalnom ulogom Cu-proteina u stresu usled prisustva bakra u višku, a to je vezivanje i skladištenje viška Cu jona, koje je dodatno stimulisano prisustvom Si. Za potvrdu ove hipoteze potrebni su dodatni eksperimenti kao i proteomske analize.

### 5.3 Uticaj Si na usvajanje i distribuciju Cu u biljkama

Homeostaza metala u biljci se održava kroz balans između procesa usvajanja, skladištenja i izbacivanja Cu za čiji su transport odgovorni membranski transporteri koji fino modulišu koncentraciju Cu u ćelijama.

Rezultati istraživanja predstavljeni u ovoj disertaciji pokazali su da se u prisustvu Si, koncentracija Cu u korenu +Cu+Si biljaka krastavca smanjuje u odnosu na koren +Cu-Si biljaka (**Slika 4.12**). Slični rezultati su zabeleženi i u eksperimentima sa pirinčem, pamukom i cinijom (Frantz et al. 2011; Kim et al. 2014; Ali et al. 2016). Međutim, to se ne može smatrati generalnim mehanizmom delovanja, jer Si nije doprineo smanjenju usvajanja Cu kod drugih ispitivanih vrsta (Li et al. 2008; Collin et al. 2014; Mateos-Naranjo et al. 2015). Iako bi za proces usvajanja Cu mogli biti odgovorni različiti transportni putevi, transporteri COPT familije su ključni za usvajanje Cu iz hranljivog medijuma, a pre svega COPT1 koji predstavlja visokoafinitetni transporter  $\text{Cu}^+$  forme (Sancenón et al. 2004). Regulacija ekspresije gena koji kodira ovaj transporter direktno zavisi od statusa Cu u ćelijama. Dosadašnje studije su se uglavnom bavile ispitivanjem regulacije ekspresije ovog gena u uslovima ograničene snabdevenosti Cu ( $<0.5\mu\text{M}$ ) dok su istraživanja ekspresije COPT transportera u uslovima viška Cu malobrojna (Andrés-Colás et al. 2013; Garcia-Molina et al. 2013; Perea-García et al. 2016).

U ovoj disertaciji, dobijeno je značajno smanjenje ekspresije *COPT1* u korenu krastavca već nakon jednog dana tretmana +Cu-/ +Si (**Slika 4.13**), što je u saglasnosti sa prethodno navedenim objašnjenjem o regulaciji ovog gena u zavisnosti od dostupnosti Cu. Rezultati dobijeni u petom danu jasno pokazuju da je primena Si dovela do dvostruko niže ekspresije *COPT1* kod +Cu+Si biljaka, u odnosu na +Cu-Si biljke. Nasuprot, kod biljaka arabidopsisa koje su tretirane viškom Cu, dobijena je povišena ekspresija *COPT1* u odnosu na kontrolu, a slični rezultati su zabeleženi i kod biljaka duvana (Li et al. 2008; Flora et al. 2019). Međutim, kod obe ove vrste, dodavanje Si u hranljivi medijum snizilo je ekspresiju *COPT1*, u poređenju sa tretiranim biljkama bez Si. Slično prikazanim rezultatima na krastavcu, usled primene Si, ekspresija *COPT1* gena kod duvana je bila snižena ispod nivoa kontrolnih biljaka, što sugerise ulogu Si u transportu i akumulaciji Cu u korenu ovih vrsta dikotila na nivou regulacije ekspresije visoko-afinitetnog transportera (Flora et al. 2019). Uzimajući u obzir strogu

regulaciju i funkciju COPT1 transportera, snižena ekspresija *COPT1* kod +Cu+Si biljaka se može smatrati odgovornom za smanjenje koncentracije Cu, izmerene u korenu krastavca (**Slika 4.12**).

Usvajanje Cu putem COPT1 transportera, prethodi hemijska redukcija  $\text{Cu}^{2+}$  do  $\text{Cu}^+$  na plazma-membrani koju obavljaju FRO reduktaze. Dok je FRO2 odgovorna za redukciju gvožđa (Yi and Guerinet 1996; Robinson et al. 1999), FRO4 i FRO5 su uključene u homeostazu bakra (Bernal et al. 2012). Ekspresija *FRO4* je izrazito indukovana u korenu u uslovima nedostatka Cu (Bernal et al. 2012). U literaturi nema podataka o ekspresiji ovog gena u uslovima viška Cu. Rezultati ove disertacije su pokazali da tretman 10  $\mu\text{M}$  Cu dovodi do snažnog utišavanja ekspresije *FRO4* gena u korenu biljaka krastavca, dok primena Si dodatno snižava ekspresiju ovog gena (**Slika 4.13**). Već prvog dana tretmana uočene su razlike između +Cu-Si i +Cu+Si biljaka, koje su se održale i u petom danu. Ovakvo delovanje Si nedvosmisleno ukazuje na njegovu značajnu ulogu u smanjenju akumulacije Cu u korenu krastavca, ne samo uticajem na ekspresiju *COPT1*, već i smanjenjem ekspresije *FRO4* gena. Uticaj Si na ekspresiju *FRO* je pokazan u eksperimentima na biljkama krastavca suočenim sa nedostatkom Fe, gde je primena Si omogućila povišenu ekspresiju *FRO2* kao i visoko-afinitetnog transportera za Fe (*IRT1*) što je doprinelo poboljšanju statusa Fe u biljkama (Pavlovic et al. 2013).

Analizom koncentracije bakra u listu krastavca pokazano je da primena Si, takođe, smanjuje akumulaciju Cu u listu, u odnosu na +Cu-Si biljke, ali ta razlika nije toliko izražena kao u korenu (**Slika 4.12**). Kod arabidopsisa nije dobijena razlika u koncentraciji Cu u listu između tretmana +Cu-Si i +Cu+Si (Li et al. 2008). Smanjenje akumulacije Cu u listovima pod uticajem Si je zabeleženo kod vrste *Erica andevalensis*, koja toleriše velike koncentracije Cu, što je objašnjeno smanjenom translokacijom Cu iz korena u listove (Oliva et al. 2011). Inhibicija translokacije metala usled prisustva Si može biti posledica dodatnog razvoja kasparijeve trake u endodermisu kao i depozicije lignina i Si u ćelijskim zidovima endodermisa (Shi et al. 2005b; da Cunha and do Nascimento 2009). Smatra se da je smanjena translokacija Cu usled prisustva Si kod pšenice ostvarena putem povećanja adsorpcije Cu na površini korena, zadržavanjem Cu u epidermisu kao i Si-stimulisanim debljanjem endodermisa (Keller et al. 2015). Rezultati ove disertacije nisu pokazali da je primena Si kod biljaka krastavca izazvala smanjenje translokacije Cu jer se ukupan sadržaj Cu u listovima +Cu+Si biljaka nije razlikovao od +Cu-Si biljaka (**Tabela 4.1**). Generalno, smanjenje usvajanja Cu putem korena jeste doprinelo i smanjenoj koncentraciji Cu u listovima kod +Cu+Si biljaka, ali uticaj Si u listu se, pre svega, odnosi na drugačiju preraspodelu ukupnog sadržaja Cu kao i aktiviranje mehanizama helacije, koji uklanjaju višak reaktivnih Cu jona što će kasnije biti razmatrano.

Pored visoke akumulacije Cu, tretman biljaka Cu u višku dovodi i do smanjenja usvajanja i akumulacije drugih esencijalnih elemenata: Fe, Zn i Mn (**Tabela 4.1**). Bakar prisutan u višku utiče na celokupan mineralni sastav biljaka, na način koji zavisi od doze Cu u hranljivom medijumu, dužine trajanja stresa, uslova gajenja kao i od biljne vrste. Uticaj Cu na usvajanje i akumulaciju Fe, Zn i Mn potiče od nepostojanja specifičnog mehanizama regulacije i selektivnog usvajanja pojedinačnih vrsta jona u uslovima kompeticije za iste transportere metala. ZIP familija transportera kojoj pripada *IRT1* kao i predstavnici *NRAMP* familije mogu da vrše neselektivan transport metala Fe, Zn, Cu, Mn i Cd u zavisnosti od njihove dostupnosti (Vert et al. 2002; Wintz et al. 2003; Cailliatte et al. 2010). Naročito je izražena uzajamna antagonistička interakcija između Cu i Fe koji se često označavaju kao metabolički parnjaci, što je posledica bliske evolutivne povezanosti njihovih metaboličkih puteva (Stewart and Leonard 1952; Foy et al. 1978). Pokazano je da Cu prisutan u višku utiče na dostupnost Fe u hranljivom medijumu i smanjenje usvajanja Fe putem korena, a takođe, višak Cu inhbira odgovor biljaka na nedostatak Fe, što sve ima za posledicu smanjeni sadržaj Fe u biljkama (Wallace et al. 1992; Schmidt et al. 1997; Michaud et al. 2008; Waters and Armbrust 2013). Inhibicija aktivnosti FRO reduktaze u uslovima viška Cu, utiče i na redukciju Fe, što je pokazano i kod krastavca (Welch et al.

1993; Alcántara et al. 1994; Waters and Armbrust 2013). Interakcija između Cu i Zn je, takođe, označena kao antagonizam (Davis and Beckett 1978; Kabata-Pendias and Pendias 2001). Smanjenje usvajanja Zn usled viška Cu u medijumu je opisano kod mnogih biljnih vrsta (Lin and Wu 1994; Shi et al. 2011; Feigl et al. 2013). ZIP transporteri bi mogli biti odgovorni za interakciju Cu i Zn, s obzirom da mogu biti regulisani od strane oba metala (Wintz et al. 2003). Takođe, pokazano je da Cu u višku može da inhibira usvajanje i distribuciju Mn kod nekih biljnih vrsta (Lidon and Henriques 1993; Shi et al. 2011; Feigl et al. 2013).

Gajenje biljaka u prisustvu Si doprinelo je povećanju sadržaja Fe, Zn i Mn u listovima kod +Cu+Si tretmana (**Tabela 4.1**). Uticaj Si na metabolizam esencijalnih mikroelemenata u prisustvu bakra u višku Cu nije mnogo izučavan. Kod vrste *Spartina densiflora*, pokazano je da je Si doprineo povećanju koncentracije Mn, koja je bila smanjena usled tretmana viškom Cu (Mateos-Naranjo et al. 2015). Takođe, antagonistički efekat Cu na koncentraciju Zn u listovima, donekle je prevaziđen dodatkom Si kod vrste *Erica andevalensis* (Oliva et al. 2011). Uticaj Si na Cu-indukovani deficit Fe nije proučavan sve do istraživanja čiji su rezultati prikazani u ovoj disertaciji. Sa druge strane, ispitivana je uloga Si kod biljaka koje se primarno suočavaju sa stresom usled deficita mikroelemenata. U tom smislu najviše je proučavan mehanizam delovanja Si na prevazilaženje nedostatka Fe. Pokazano je da kod krastavca Si utiče na povećanje apoplastnog pula Fe i poboljšanje translokacije Fe od korena do listova zahvaljujući Si-posredovanoj stimulaciji biosinteze jedinjenja (organske kiseline i fenoli) koja heliraju Fe (Pavlovic et al. 2013). To je praćeno povećanom ekspresijom gena uključenih u usvajanje Fe. Slično, pokazano je da Si stimuliše formiranje apoplastnog pula Zn kao i efikasnu mobilizaciju i distribuciju Zn u uslovima nedostatka (Pascual et al. 2016). Primena Si ublažava simptome nedostatka Mn, iako nije uticala na ukupnu koncentraciju Mn u biljkama, već na preraspodelu u okviru biljnih tkiva (Kluthcouski and Nelson 1980; Jarvis and Jones 1987).

Predhodna istraživanja su pokazala da je Si doprineo mobilizaciji i translokaciji Fe iz korena do listova u uslovima njegovog nedostatka putem Si-indukovane biosinteze helirajućih jedinjenja kao što je citrat (Pavlovic et al. 2013; Bityutskii et al. 2014). Analizom organskih kiselina u ovoj studiji dobijena je značajno povećana koncentracija citrata kako u korenu tako i u ksilemskom soku kod +Cu+Si biljaka (**Slika 4.28, 4.29**). S obzirom da je citrat glavni helator gvožđa u ksilemu (von Wirén et al. 1999), može se zaključiti da je i u uslovima stresa viškom Cu, primena Si na isti način uticala na povećanje translokacije Fe do listova krastavca i povećala sadržaja Fe kod +Cu+Si tretiranih biljaka. Ovi podaci ukazuju i na postojanje univerzalnih mehanizama delovanja Si bez obzira na stresni faktor sa kojim se biljka primarno suočava.

Uticaj Si na distribuciju metala u biljci kao i direktno vezivanje metala za Si su važni mehanizmi delovanja Si koji se smatraju odgovornim za povećanje tolerancije biljaka na prisustvo metala u višku (Liang et al. 2015). Ipak, postoji malo literaturnih podataka o lokalizaciji Si i metala u kombinovanim tretmanima biljaka koji bi bliže odredili ulogu Si u distribuciji metala na nivou ćelije. Pokazano je da Si zajedno sa Al formira hidroksialuminijum-silikate u korenu i tako smanjuje mobilnost apoplastnog Al u apikalnom regionu korena kukuruza (Wang et al. 2004b). Ranija istraživanja su ukazala da bi Si mogao povećati kapacitet ćelijskog zida za vezivanje metala i ovaj mehanizam je dugo smatran jedinim efektom koji ovaj element ima na biljke u stresu prisustva metala u višku (Horst et al. 1999). Ispitivanja u kulturi ćelija su pokazala da Si povećava vezivanje Cd za hemicelulozu u ćelijskom zidu čime se direktno smanjuje unos Cd unutar ćelije (Ma et al. 2015b). Tehnikom spektroskopije fotoelektrona dobijenih x-zracima (XPS) na poprečnim presecima korena pšenice nije pokazano da Si i Cu kolokalizuju (Keller et al. 2015). Generalno, značajan procenat Cu je

vezan u ćelijskom zidu za pektinske komponente (poligalakaturonska kiselina), čak i do 60% ukupnog Cu u ćeliji (Nishizono et al. 1987; Iwasaki et al. 1990). To je u skladu sa rezultatima dobijenim u krastavcu, gde je analiza sadržaja metala u različitim frakcijama biljnog tkiva pokazala da je i kod netretiranih i kod biljaka tretiranih bakrom, najveći procenat Cu vezan za frakciju ćelijskog zida, kako u korenu tako i u listu (**Slika 4.14**). Akumulacija, depozicija i sekvestracija Cu u ćelijskom zidu predstavlja fizičku barijeru za migraciju Cu jona u unutrašnjost ćelije (Krzesłowska 2011). Primena Si je doprinela povećanju zastupljenosti Cu u frakciji ćelijskog zida u korenu, što je uticalo na procentualno smanjenje Cu u ostalim frakcijama unutar ćelije (**Slika 4.14**). Slični rezultati su zabeleženi i kod biljaka izloženih stresu Cd (Liang et al. 2005b; Vaculík et al. 2012). U stresu viškom Mn, uticaj Si na distribuciju Mn se smatra glavnim mehanizmom delovanja Si (Horst et al. 1999; Rogalla and Römheld 2002). U eksperimentima sa Mn i Si kod krastavca, pokazano je da povećanje sadržaja Mn u frakciji ćelijskog zida u listovima usled prisustva Si, utiče na smanjenje sadržaja ROS i nivoa stresa kod +Mn+Si tretiranih biljaka (Dragišić Maksimović et al. 2012). U skladu sa tim, povećano vezivanje Cu u ćelijskom zidu a smanjeno prisustvo unutar ćelije kod biljaka krastavca gajenih za Si, doprinelo je smanjenju nivoa oksidativnog stresa što je pokazano smanjenim nivoom lipidne peroksidacije kod +Cu+Si biljaka krastavca.

U prethodnim istraživanjama koja se tiču uloge Si u stresu viškom Cu, pretpostavljeno je da Si ima uticaj na distribuciju ili biodostupnost Cu u listovima arabidopsisa tretiranog Cu (Li et al. 2008). Kompartimentaciona analiza je pokazala da je najveći procenat Cu u listu krastavca, vezan u ćelijskom zidu, međutim, kod Cu-tretiranih biljaka taj procenat je manji nego kod kontrolnih biljaka i nema značajne razlike između +Cu-Si i +Cu+Si tretmana. Značajnija razlika je dobijena u smanjenju prisustva Cu u solubilnoj (vodenoj) frakciji a povećanju u proteinskoj frakciji u listu kod +Cu+Si tretmana. Rezultati analize sadržaja Cu u različitim frakcijama ćelije usmerili su dalja istraživanja ka detaljnijoj analizi helirajućih jedinjenja koja su prisutna u vodenoj frakciji ali i proteina koji vezuju Cu i predstavljaju skladišta Cu jona.

## 5.4 Uticaj Si na ekspresiju plastocijanina

Polovina ukupnog bakra unutar biljne ćelije u fotosintetičkim tkivima je vezana za tri proteina, CSD1, CSD2 i plastocijanin (Shikanai et al. 2003; Abdel-Ghany 2009). Za razliku od prva dva, plastocijanin je esencijalan Cu-protein za biljke koji ima nezamenljivu ulogu u transferu elektrona u procesu fotosinteze. Regulacija Cu homeostaze putem miRNK prvenstveno ima za cilj da omogući prioritetno dostavljanje Cu plastocijaninu, naročito ukoliko je količina Cu u ćelijama ograničena. Za razliku od drugih Cu-proteina, ekspresija gena koji kodira PC nije regulisana pomoću miRNK, a takođe i ne zavisi od statusa Cu u ćeliji. Međutim, pokazano je da se količina proteina povećava sa povećanjem koncentracija Cu od suboptimalnih do optimalnih (Abdel-Ghany and Pilon 2008). Zanimljiv podatak je da čak i relativno mala količina funkcionalnog plastocijanina (holoplastocijanin) je dovoljna za maksimalan intenzitet fotosinteze (Abdel-Ghany and Pilon 2008). Stoga je zaključeno da se dodatna akumulacija plastocijanina zapravo dešava kao odgovor na prisustvo Cu. Dakle, jedan deo ukupnog PC ne učestvuje u fotosintezi već u održavanju homeostaze Cu kao skladište viška Cu jona (Yamasaki et al. 2007; Abdel-Ghany and Pilon 2008; Ravet and Pilon 2013).

Nedavna istraživanja su pokazala da plastocijanin iz vrste *Suaeda salsa* (SsPETE2) može da veže slobodne Cu jone i na taj način smanjuje produkciju hidroksilnog radikala u *in vitro* uslovima (Zhou et al. 2018). Ova funkcija PC je potvrđena u eksperimentima heterologne ekspresije SsPETE2 u arabidopsisu, koji je postao tolerantniji na oksidativni stres izazvan metil violagenom (Zhou et al.



2018). Rezultati predstavljeni u ovoj disertaciji su pokazali da tretman povišenim koncentracijama bakra nije uslovio povećanje genske ekspresije *PC* gena što je u saglasnosti sa literaturnim podacima. Nasuprot, tretman bakrom je uticao na povećanje proteinskog nivoa plastocijanina i to u većoj meri kod +Cu+Si nego kod +Cu-Si biljaka (**Slika 4.25**). Ovi rezultati potvrđuju da se plastocijanin akumulira u uslovima viška bakra, kao što je pretpostavljeno u literaturi (Ravet and Pilon 2013). U ovom radu je po prvi put pokazano da primena Si doprinosi povećanoj akumulaciji PC koji skladišti višak Cu jona i na taj način smanjuje prisustvo slobodnih Cu jona u listovima krastavca, što za krajnji rezultat ima smanjenje oksidativnog stresa kod +Cu+Si biljaka.

## 5.5 Uticaj Si na antioksidativnu zaštitu

Oksidativni stres se uvek javlja kao posledica prisustva bakra u višku. Kao Fentonov katalizator, Cu indukuje povećanje ROS-a koji dovode do mnogostrukih oštećenja ćelijskih konstituenata, inhibicije proteina, peroksidacije lipida i oštećenja DNK molekula. Intenzitet oksidativnog stresa u biljkama najčešće se prati detekcijom nivoa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i stepenom lipidne peroksidacije ćelijskih membrana izraženom kroz koncentraciju MDA. Povećanje nivoa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kao i lipidne peroksidacije je detektovano kod mnogih biljnih vrsta tretiranih viškom Cu (Zhang et al. 2008; Posmyk et al. 2009; Gajewska and Sklodowska 2010). U ovom istraživanju, povećanje lipidne peroksidacije je pokazano i u korenu i u listu krastavca već nakon jednog dana tretmana Cu, dok je u produženom tretmanom (5. dan) oksidativni stres još izraženiji (**Slika 4.16**). Biljke gajene sa Si su ispoljavale niži nivo stresa u obe vremenske tačke u poređenju sa tretiranim biljkama bez Si. To je u skladu sa rezultatima dobijenim kod drugih ispitivanih biljnih vrsta tretiranih Cu i Si (Kim et al. 2014; Ali et al. 2016). Takođe, smanjenje nivoa oksidativnog stresa usled primene Si zabeleženo je i kod drugih izvora stresa kao što su stres solima, UV radijacija, stres prouzrokovan niskim i visokim temperaturama, vodnim deficitom itd. (Liang et al. 2015). Ovakvi podaci ukazuju da kompleksno delovanje Si obuhvata i opšti mehanizam delovanja na smanjenje oksidativnog stresa kod biljaka, bez obzira na vrstu stresora.

Sposobnost biljaka da kontrolišu oksidativni stres izazvan prisutvom metala u višku je u direktnoj korelaciji sa njihovom tolerancijom na stres. Različite komponente antioksidativne zaštite omogućavaju biljkama da se bore protiv povišenih koncentracija ROS. Produkcija ROS i antioksidativni odgovor zavise od biljne vrste, jačine i trajanja Cu stresa. Sa povećanjem koncentracije Cu u medijumu povećava se generisanje ROS u biljkama i ovaj odnos je dozno zavisian. Sa druge strane, aktivnost antioksidativnih enzima može da prati povećanje stresa samo do određenog nivoa jer dugotrajno izlaganje toksičnom Cu dovodi do inhibicije nekih od antioksidativnih enzima kao posledica izrazitog oksidativnog stresa u biljkama (Chamseddine et al. 2009; Yruela 2009; Wang et al. 2011).

Antioksidativni enzimi kao što su SOD, APX i CAT katalizuju detoksifikaciju od ROS. SOD predstavlja prvu liniju odbrane od povećanog nivoa ROS (Gill and Tuteja 2010). Aktivnost SOD enzima direktno zavisi od intenziteta stresa (Kono and Fridovich 1982; Baum et al. 1983), i pokazano je da visok intenzitet stresa usled prisustva toksičnih metala (Cu, Zn, Cr) ne stimuliše nego često smanjuje aktivnost ovog enzima (Song et al. 2011; Wang et al. 2011; Zeng et al. 2011). Takav trend je primećen i kod krastavca pod uticajem različitih stresora (Choi et al. 2001; Zhu et al. 2004; Zhang et al. 2015). Rezultati u ovoj studiji su pokazali da je aktivnost SOD snažno inhibirana prisutvom Cu u korenu krastavca što ukazuje na visok nivo stresa već prvog dana tretmana viškom Cu (**Slika 4.17**). Naprotiv, biljke gajene sa Si, imale su povišenu aktivnost SOD, značajno višu i od kontrolnih biljaka u

prvom danu tretmana. Nakon pet dana tretmana, ukupna aktivnosti SOD je dodatno povećana kod +Cu+Si biljaka, dok kod +Cu-Si biljaka ni tada nije zabeleženo povećanje aktivnosti SOD. Ovi rezultati su u korelaciji sa nižim vrednostima lipidne peroksidacije kod +Cu+Si tretiranih biljaka koji odražavaju manji nivo oksidativnog stresa. Slično je zabeleženo i u listu, gde je viša aktivnost SOD kod +Cu+Si u odnosu na +Cu-Si biljke u saglasnosti sa sniženom koncentracijom MDA izmerenom u listu krastavca (**Slika 4.16**). Ispitivanje ukupne aktivnosti SOD u tretmanima Cu i Si do sada je publikovano jedino kod dve biljne vrste, arabidopsisa i pamuka, gde je, takođe, zabeleženo njeno povećanje usled prisustva Si (Khandekar and Leisner 2011; Ali et al. 2016). I u slučaju prisustva drugih stresora pokazano je da Si utiče na povećanje aktivnosti SOD u odnosu na tretirane biljke bez Si, međutim, te vrednosti često nisu bile više od vrednosti kontrolnih biljaka (Shi et al. 2005a; Gong et al. 2006; Song et al. 2009).

Za regulaciju intraćelijskog nivoa  $H_2O_2$  kod biljaka odgovorno je više enzima pri čemu su CAT i APX u tom pogledu najvažnije (Noctor and Foyer 1998). CAT i APX se ne smatraju redundantnim enzimima pošto pripadaju različitim klasama enzima sakupljača  $H_2O_2$  (Mittler 2002). APX za svoju aktivnost zahteva redukcionu ekvivalent (askorbat) i to je jedan od najzastupljenijih antioksidativnih enzima u biljnoj ćeliji sa mnogo većim afinitetom prema  $H_2O_2$  nego CAT. S obzirom da CAT ima bržu kinetiku reakcije od APX (Wang et al. 1997), smatra se da je ovaj enzim prvenstveno odgovoran za uklanjanje ROS tokom stresa, a da APX ima ulogu u finoj modulaciji nivoa ROS (Mittler 2002).

APX je široko rasprostranjen enzim u biljnoj ćeliji, prisutan u citosolu, stromi, tilakoidima, mitohondrijama i peroksizomima (Jimenez et al. 1997; Sharma and Dubey 2004). Stres teškim metalima izaziva povećanje aktivnosti ovog enzima (Sharma et al. 2012). Pokazano je da višak Cu utiče na povećanje aktivnosti APX kod više biljnih vrsta uključujući krastavac (Azooz et al. 2012; Janicka-Russak et al. 2012; Ali et al. 2016). Aktivnosti APX u tretmanima Cu i Si je do sada ispitivana jedino kod biljaka pamuka tretiranih sa dve koncentracije Cu (25 i 50  $\mu M$ ). Viša aktivnost APX je dobijena kod +Cu+Si tretiranih biljaka pamuka u odnosu na one bez Si bez obzira na dozu Cu, mada se sa povećanjem doze generalno smanjuje aktivnost APX (Ali et al. 2016). Slično tome, aktivnost APX u korenu krastavca nakon jednog dana tretmana je povećana jedino kod +Cu+Si biljaka, dok je petog dana aktivnost povećana kod obe grupe tretirane viškom Cu, pri čemu je kod +Cu+Si bila viša nego kod +Cu-Si tretmana (**Slika 4.20**). Dakle, primena Si uticala je na bržu aktivaciju APX u korenu i povećanje aktivnosti u produženom tretmanu. Nasuprot, u listu je visoka aktivnost APX detektovana već prvog dana kod tretmana +Cu-Si, dok je u produženom tretmanu aktivnost APX bila viša kod +Cu+Si tretiranih biljaka. Slično je pokazano u listu krastavca tretiranog NaCl gde je primena Si održala visoku aktivnost APX nakon 10d tretmana solima (Zhu et al. 2004). Ispitivanjem APX u stresu Mn kod krastavca je zaključeno da APX ima važnu ulogu kod krastavca, i da primena Si može da poveća efikasnost askorbat-glutation ciklusa i na taj način poveća toleranciju na oksidativni stres kod krastavca (Shi et al. 2005a). Ekspresija APX je u saglasnosti sa izmerenom aktivnošću ovog enzima (**Slika 4.21**). Analizom ekspresije APX kod različitih ekotipova metalofite *Silene vulgaris* pokazano je da se Cu-tolerantni ekotipovi nasuprot senzitivnim karakterišu konstitutivno visokom ekspresijom gena koji kodira APX (Baloun et al. 2014). Do sada nije ispitivana ekspresija gena koji kodira APX u istraživanjima koja se tiču silicijuma. Zaključno, biljke krastavca tretirane Si reaguju na Cu-stres slično Cu-tolerantnim genotipovima povećavajući aktivnost APX, ali i podižući nivo transkripcije gena, što je u ovom radu pokazano po prvi put.

CAT je specifičan enzim koji uklanja  $H_2O_2$  jer ne zahteva redukujući ekvivalent i ima najveću brzinu reakcije u poređenju sa drugim enzimima koji obavljaju istu funkciju. Različiti stresni faktori uzrokuju povećanje ili smanjenje aktivnosti CAT što zavisi od intenziteta, trajanja i tipa stresa (Sharma and Dubey 2005; Han et al. 2009; Posmyk et al. 2009). Razlog smanjenja aktivnosti CAT je što ROS

mogu da inhibiraju aktivnost ovog enzima (Kono and Fridovich 1982). Smanjenje aktivnosti CAT ograničava toleranciju biljaka na stres, dok se povećanje aktivnosti CAT smatra adaptivnom osobinom koja omogućava biljkama da smanje oštećenja ćelijskih struktura (Karuppanapandian et al. 2011). Ispitivanje uticaja viška Cu na aktivnost CAT u mnogim studijama je pokazalo smanjenje aktivnosti ovog enzima, naročito usled produženog tretmana visokim koncentracijama Cu (Wang et al. 2004a; Srivastava et al. 2006; Chamseddine et al. 2009; Posmyk et al. 2009). Pokazno je da sa rastućim supraoptimalnim koncentracijama Cu u medijumu, aktivnost CAT proporcionalno opada (Drażkiewicz et al. 2004).

U eksperimentima prikazanim u ovom radu povišena aktivnost CAT je detektovana već u prvom danu u listu krastavca pri čemu je bila viša kod +Cu-Si nego kod +Cu+Si biljka, što je u skladu i sa nivoom ekspresije *CAT* gena (**Slika 4.22**). Međutim, u petom danu aktivnost CAT pada u odnosu na vrednosti izmerene prvog dana, a takođe, i u poređenju sa kontrolom, ukazujući na inhibiciju ovog enzima usled prisustva intenzivnog stresa. Nasuprot tome, biljke gajene sa Si karakteriše povišena aktivnost CAT, naročito u produženom tretmanu Cu (5. dan), što je u saglasnosti sa povišenim nivoom transkripcije *CAT* gena. Dakle, Si je sprečio inhibiciju aktivnosti katalaze. Slično povećanje aktivnosti CAT pod uticajem Si zapaženo je kod biljaka izloženih toksičnim koncentracijama Mn i Cd, pri čemu su biljke bez Si imale značajno nižu aktivnost ovog enzima (Shi et al. 2005a; Song et al. 2009). Održavanje aktivnosti CAT na visokom nivou se smatra odgovornim za povećanu toleranciju na stres usled prisustva Cu kod nekih vrsta (Wang et al. 2011), nasuprot vrstama kod kojih je nađeno da smanjena aktivnost CAT korelira sa smanjenom tolerantnosti na Cu u višku (Drażkiewicz et al. 2004; Gallego et al. 1996; Posmyk et al. 2009). Dakle, biljke krastavca gajene sa Si se odlikuju visokom aktivnosti CAT u listu, što je omogućilo povećanje tolerancije na prisustvu Cu u višku.

Zajednička karakteristika vrsta/genotipova tolerantnijih na oksidativni stres uzrokovan teškim metalima u višku jeste povišeni nivo antioksidativne zaštite, što predstavlja adaptivni mehanizam odbrane od stresa (Sreenivasulu et al. 2001). Rezultati dobijeni u ovoj studiji na krastavcu ukazuju da je primena Si omogućila efikasnu antioksidativnu odbranu od toksičnosti Cu na način koji je karakterističan za tolerantne genotipove. Povećana ekspresija gena praćena povećanjem aktivnosti antioksidativnih enzima SOD, APX i CAT, jedan je od ključnih mehanizama korisnog efekta Si na biljke krastavca tretirane Cu, što je rezultovalo direktnim smanjenjem nivoa oksidativnog stresa. Podaci iz literature potkrepljuju ove tvrdnje i ukazuju da je stimulatívni uticaj Si na antioksidativnu odbranu biljaka univerzalni mehanizam za prevazilaženje stresa izazvanog prisustvom metala u višku (Liang et al. 2015).

## **5.6 Uticaj Si na ekspresiju Cu/Zn SOD izoformi i post-transkripcionog regulatora miR398**

Cu/Zn SOD se smatraju najvažnijim izoenzimima SOD, koji imaju centralnu ulogu u odgovoru biljaka na stres (Alscher et al. 2002). Citosolna izoforma CSD1 i plastidna CSD2 predstavljaju ključne izoforme Cu/Zn SOD u biljnim tkivima (Abdel-Ghany and Pilon 2008). Istraživanja su pokazala da CSD1 i CSD2 u uslovima stresa ne odgovaraju na isti način. CSD1 je osetljivija na inhibiciju peroksidom nego CSD2 (Baum et al. 1983; Kwiatowski and Kaniuga 1986; Alscher et al. 2002). Utvrđeno je da ekspresija CSD1 izoforme odražava generalni odgovor biljaka na stres (Kliebenstein et al. 1998), što je u skladu i sa rezultatima ove studije. Proteinski nivo CSD1 izoforme je izrazito snižen

u korenu kod +Cu-Si biljaka krastavca, reflektujući ukupnu izmerenu aktivnost SOD enzima (**Slika 4.23**). Nasuprot, primena Si je dovela je do povećanja količine CSD1 u korenu, naročito 5. dana tretmana, a što je u saglasnosti sa ukupnom izmerenom aktivnošću SOD enzima. Povećanje količine CSD1 koje je u korelaciji sa povećanom aktivnosti ove izoforme je pokazano kod genotipova tolerantnih na oksidativni stres nasuprot senzitivnim (Sreenivasulu et al. 2001). Stoga se može izvesti zaključak da je stimulacija produkcije CSD1 važna komponenta Si-posredovanog mehanizma tolerancije biljaka i ublažavanja stresa usled prisustva visoke koncentracije Cu u korenu. U listu tretiranih biljaka gajenih bez Si, nakon inicijalnog povećanja u prvom danu, količina CSD1 je smanjena 5. dana tretmana što je rezultovalo povećanim nivoom oksidativnog stresa (**Slika 4.24**). CSD1 je snažno indukovana prvog dana kod +Cu+Si biljaka dok petog dana nije zabeleženo dodatno povećanje što je u saglasnosti sa nepromenjenim nivoom stresa u listu.

Iako je količina izoforme CSD2 bila povećana kod +Cu-Si biljaka (**Slika 4.23, 4.24**), ovo povećanje nije bilo dovoljno za odbranu od oksidativnog stresa niti je doprinelo ukupnoj aktivnosti SOD. Smatra se da overekspresija CSD2 nema odlučujuću ulogu u zaštiti od delovanja stresnih faktora, niti može značajno da poboljša odgovor na stres na nivou cele biljke (Pilon et al. 2011). Pokazano je da različiti stresni faktori (promena intenziteta svetlosti, UV radijacija, stres ozonom) ne utiču na nivo proteina kao i aktivnost CSD2, ali povećavaju nivo transkriptata (Kliebenstein et al. 1998). Međutim, stres viškom Cu dovodi do povećanja CSD2 i na transkripcionom i na proteinskom nivou (Sagasti et al. 2014). U istraživanjima na kvascu, pokazano je da Cu/Zn SOD pored uloge u uklanjanju ROS imaju i dodatnu ulogu, a to je detoksifikacija od viška Cu (Culotta et al. 1995). Smatra se da i u biljkama, CSD2 može da skladišti višak Cu i na taj način sprečava direktna oštećenja usled visoke reaktivnosti Cu jona (Cohu et al. 2009). To potvrđuju istraživanja gde je pokazano da CSD2 nije ključna komponenta antioksidativne zaštite u hloroplastima (Cohu et al. 2009), kao i da je CSD2 nađena i u stromi i u tilakoidima kod nekih vrsta (Sagasti et al. 2014). Pored toga, CCS, šaperon koji dostavlja Cu do CSD2, nije na isti način regulisan u uslovima viška Cu, kao i da CSD2 može biti aktivirana nezavisno od prisustva CCS (Cohu et al. 2009; Huang et al. 2012; Sagasti et al. 2014). Akumulacija CSD2 izoforme u korenu već nakon jednog dana tretman +Cu+Si ukazuje da su biljke gajene sa Si brzo odgovorile na povećano prisustvo Cu što je doprinelo uklanjanju slobodnih Cu jona a krajnji rezultat je smanjen nivo oksidativnog stresa (**Slika 4.23**). U petom danu u korenu obe grupe biljaka, CSD2 je visoko zastupljena. U listu je CSD2 bila povišena kod obe grupe biljaka ali nije bila od značaja kod biljaka sa silicijumom verovatno usled aktiviranja drugih mehanizama zaštite, pre svega plastocijanina koji se nalazi u istom kompartmanu.

S obzirom na potencijalno važnu ulogu CSD2 u detoksifikaciji Cu, ova izoforma je analizirana i na transkripcionom nivou. Nivo ekspresije CSD2 je regulisan različitim stresnim faktorima iako, kako je već navedeno, količina proteina ne mora da korelira sa genskom ekspresijom (Kliebenstein et al. 1998). U ovoj studiji je pokazano da tretman Cu indukuje ekspresiju gena CSD2 u korenu prvog dana ali da nema razlike između tretmana, dok je petog dana ekspresija ovog gena znatno viša kod +Cu+Si u odnosu na +Cu-Si biljke (**Slika 4.18**). To nije u potpunosti u saglasnosti sa rezultatima dobijenim na proteinskom nivou (**Slika 4.23**). Kliebenstein et al. (1998), su sugerisali da različiti nivoi regulacije genske ekspresije su odgovorni za ovaj fenomen. Post-transkripciona regulacija putem miRNK je karakteristična za Cu-proteine. miR398 je regulisna nivoom Cu a targetuje Cu/Zn SOD izoforme kao i Cu-šaperon CCS i predstavlja glavni modulator homeostaze Cu (Ding and Zhu 2009). Nivo ekspresije miR398 u korenu je snižen kod biljaka tretiranih Cu, pri čemu je niži kod +Cu+Si nego kod +Cu-Si oba analizirana dana (**Slika 4.19**). Smanjen nivo transkriptata miR398 je u saglasnosti sa povišenom ekspresijom CSD2 target gena kod +Cu+Si biljaka, dok je u poređenju sa njima, ekspresija miR398 viša a CSD2 niža kod +Cu-Si biljaka. Suprotni rezultati su dobijeni u listu biljaka. Viši nivo miR398 korelira sa smanjenjem ekspresije CSD2 kod +Cu+Si u odnosu na +Cu-Si biljke oba analizirana dana.

Takođe, taj rezultat odgovara proteinskom nivou CSD2 u listu. Dakle, kod tretmana kod kojih je bio izraženiji oksidativni stres u listu krastavca a to je tretman +Cu-Si, ekspresija CSD2 je viša a miR398 niža u odnosu na tretman koji je izazvao manji oksidativni stres (+Cu+Si) što je u skladu sa literaturnim podacima. Naime, istraživanja kod vinove loze i topole tretirane rastućim koncentracijama Cu, su pokazala da je kod većih primenjenih doza, CSD2 više eksprimirana u listu, dok ekspresija miR398 opada, prateći takav trend (Lu et al. 2011; Leng et al. 2017). U ovom radu, po prvi put su sprovedena istraživanja koja obuhvataju i paralelno prate ekspresiju gena i proteina i njihove aktivnosti, kao i regulaciju ekspresije ovih gena putem miRNK u uslovima stresa viškom Cu, i u kontekstu delovanja silicijuma. Jedini literaturni podaci odnose se na arabidopsis gde je dobijena povišena ekspresija obe izoforme CSD1 i CSD2, i to viša kod +Cu+Si u odnosu na +Cu-Si, što je bilo u saglasnosti sa izmerenom ukupnom aktivnošću SOD enzima u listovima nakon tri dana tretmana (Khandekar and Leisner 2011). Treba naglasiti da u listovima arabidopsisa nije bilo razlike u koncentraciji Cu između +Cu-Si i +Cu+Si biljaka kao i da u radu nije prikazan nikakav indikator oksidativnog stresa (Li et al. 2008; Khandekar and Leisner 2011).

## 5.7 Uticaj Si na sadržaj i distribuciju jedinjenja koja heliraju Cu u biljnim tkivima

Teoretski, unutar ćelije ne sme postojati niti jedan slobodan Cu jon, jer može lako dovesti do oksidativnog stresa i oštećenja biološki važnih makromolekula (Rae et al. 1999). Stoga, različiti organski molekuli - ligandi i helatori bakra su uključeni u održavanje homeostaze i detoksifikaciju od bakra prisutnog u višku. Među najznačajnijim su tiolni ligandi (S-ligandi), kao što su metalotioneini, fitohelatini i glutation ili tzv. netiolni ligandi kao što su organske kiseline (O-ligandi), N-ligandi kakav je histidin ili neproteinogena aminokiselina nikocijanamin (Callahan et al. 2006; Leitenmaier and Küpper 2013; Anjum et al. 2015; Andresen et al. 2018). Cu-ligand specijacija je veoma dinamična u biljkama. Koji tip ligand će biti dominantan, zavisi od činjenice da li je u pitanju hiperakumulirajuća, tolerantna, ili vrsta osetljiva na prisustvo viška Cu. Treba naglasiti da varijacije u prisustvu specifičnih Cu-liganada postoje i između biljnih organa, na nivou tkiva i zavise od doze primenjenog Cu kao i dužine trajanja tretmana (Shi et al. 2008; Mijovilovich et al. 2009; Kopittke et al. 2011; Collin et al. 2014; Zhao et al. 2018; Ogunkunle et al. 2019). Tehnikama spektroskopije pomoću x-zraka jedino je moguće dobiti informaciju o specijaciji i prostornoj distribuciji Cu, odnosno vrsti liganada za koje je on vezan u različitim biljnim tkivima i organima (Lombi et al. 2011; Donner et al. 2012). Međutim, ni ovim metodama nije moguće identifikovati ligande Cu u određenim tipovima ćelija i subćelijskim kompartmanima (Haydon and Cobbett 2007).

Bakar ima visok afinitet prema tiolnoj grupi stoga su metalotioneini među najvažnijim ligandima bakra u biljkama (Mijovilovich et al. 2009; Kopittke et al. 2011). Ekspresija gena koji kodiraju MT se povećava u uslovima Cu stresa (Zhou and Goldsbrough 1994; Murphy and Taiz 1995; Guo et al. 2003; Nikolić et al. 2010). Kod arabidopsisa, MT3 je najviše eksprimiran u mezofilnim ćelijama listova i apikalnim delovima korena, mestima akumulacije viška Cu, i indukovano je tretmanom Cu (Guo et al. 2003). U korenu krastavca ekspresija MT3 je izrazito povećana izlaganjem stresu Cu pri čemu je nivo ekspresije viši kod +Cu-Si nego kod +Cu+Si biljaka oba analizirana dana (**Slika 4.26**). Istraživanja su pokazala da ekspresija MT3 raste sa povećanjem doze Cu u hranljivom medijumu (Roosens et al. 2004; Nikolić et al. 2010), međutim, vremenski profil ekspresije može da se razlikuje u zavisnosti od dužine trajanja tretmana (Navarrete et al. 2019). U korenu krastavca prikazana je jasna razlika u koncentraciji Cu između tretmana stoga se može zaključiti da profil ekspresije MT3 u

korenu reflektuje količinu Cu koja je manja kod +Cu+Si nego kod +Cu-Si biljaka. Izrazito povećana ekspresija *MT3* u korenu, više od 1000 puta, znatno prevazilazi nivo ekspresije bilo kog drugog analiziranog gena u ovoj studiji, stoga ukazuje da su najverovatnije metalotioneini odigrali presudnu ulogu u detoksifikaciji viška Cu u korenu krastavca. Ukoliko se pretpostavi da bi proteinski nivo odražavao ovako visok nivo genske ekspresije, onda su prikazani rezultati u saglasnosti sa povećanim prisustvom Cu u proteinskoj frakciji u korenu kod +Cu-Si nasuprot +Cu+Si biljkama (**Slika 4.14**). Međutim, pokazano je da Si doprinosi vezivanju Cu za S-ligande u listu bambusa (Collin et al. 2014). U listu krastavca je dobijen znatno niži nivo ekspresije *MT3* nego u korenu, što je u skladu sa nižom koncentracijom Cu izmerenom u ovom biljnom organu. Međutim, petog dana tretmana u listovima krastavca, +Cu+Si biljke su imale viši nivo ekspresije *MT3* od +Cu-Si biljaka. Slični rezultati su zabeleženi i u listovima arabidopsisa tretiranog Cu i Si; ekspresija *MT2a* i *MT2b* je viša kod +Cu+Si nego kod +Cu-Si biljaka (Khandekar and Leisner 2011). Iako kod arabidopsisa nije bilo razlike u koncentraciji Cu između tretiranih grupa biljaka, zaključeno je da se koristan efekat Si ogleda u indukciji MT koji mogu da uklanjaju solubilni Cu (Li et al. 2008; Khandekar and Leisner 2011). Profil ekspresije *MT3* kod krastavca ne prati koncentraciju Cu u listovima, međutim u saglasnosti je sa procentualnom zastupljenošću Cu u proteinskoj frakciji koja je veća kod +Cu+Si nego kod +Cu-Si biljaka (**Slika 4.14**). Detoksifikacija Cu vezivanjem za MT u listu može biti deo mehanizma korisnog efekta Si, zajedno sa povećanjem koncentracije ostalih helirajućih jedinjenja prikazanih u ovoj studiji.

Za razliku od MT koji vrše detoksifikaciju metala u citoplazmi, fitohelatini transportuju metale u vakuole u formi kompleksa. Povišena ekspresija *PCS* značajno doprinosi toleranciji na prisustvo Cd i As (Gasic and Korban 2007; Brunetti et al. 2011; Zanella et al. 2016), dok uloga PC u detoksifikaciji Cu nije pokazana kod svih biljnih vrsta (De Vos et al. 1992; Leopold et al. 1999; Lee and Kang 2005; Flores-Cáceres et al. 2015). Tranzijentno povećanje PC tokom trajanja stresa ukazuje na postojanje komplementarnih mehanizama koji koordinisano regulišu odgovor na višak Cu (Navarrete et al. 2019). Rezultati kod krastavca ukazuju da je indukcija ekspresije *PCS* od značaja na samom početku tretmana (**Slika 4.27**), dok sa povećanjem akumulacije Cu, drugi helatori (MT, OK, NA, His) preuzimaju dominantu ulogu u detoksifikaciji Cu. Kod drugih vrsta je, takođe, pokazano da se ekspresija *PCS* i akumulacija PC menjaju tokom trajanja tretmana Cu i da to nije proporcionalno primenjenoj dozi, kao i da nije u skladu sa intracelularnom koncentracijom Cu (Gonzalez-Mendoza et al. 2007; Zlobin et al. 2015; Navarrete et al. 2019). Odsustvo drugih odbrambenih mehanizama može biti od značaja za aktivaciju *PCS* (Guo et al. 2008). Pored toga, akumulacija PC zavisi od dostignutog praga toksičnosti pa se PC ne uključuju u sekvestraciju Cu u uslovima subtoksičnih koncentracija (De Vos et al. 1992; Rijstenbil et al. 1998; Rijstenbil and Gerringa 2002). Istraživanja koja se tiču uticaja Si na ekspresiju *PCS* su malobrojna. U listu arabidopsisa, nakon tri dana tretmana je dobijena povišena ekspresija *PCS*, međutim, bez razlike između +Cu-Si i +Cu+Si biljaka. Takođe, kod lucerke tretirane Cd i Si nije bilo razlike u nivou *PCS* između kontrolnih i tretiranih biljaka u korenu nakon 7 dana tretmana (Kabir et al. 2016). Iz predhodno navedenih rezultata može se zaključiti da Si nema značajnijeg uticaja na *PCS* s obzirom da to i nije jedan od presudnih mehanizama kojima se biljke bore protiv toksičnosti Cu.

Kompleksacija teških metala organskim kiselinama ima važnu, po mišljenju mnogih autora i ključnu ulogu u transportu, skladištenju i detoksifikaciji metala (Ryan and Walker-Simmons 1983; Rauser 1999; Callahan et al. 2006; Haydon and Cobbett 2007). Organske kiseline su od presudnog značaja za sekvestraciju metala (Cd, Zn i Ni) u vakuolama kod biljaka hiperakumulatora (Krämer et al. 2000; Küpper et al. 2004). Takođe, X-zračna apsorpciona spektroskopija (XAS) je pokazala da je Cu, kod hiperakumulatora *Crassula helmsii*, gotovo isključivo vezan za O-ligande, implicirajući na organske kiseline kao glavne medijatore hiperakumulacije Cu kod ove vrste (Küpper et al. 2009).

Rezultati predstavljeni u ovoj disertaciji su pokazali da, pored povećanog vezivanja Cu za ćelijski zid (**Slika 4.14, 4.15**), jedna od najizraženijih razlika u korenu između +Cu-Si i +Cu+Si biljaka krastavca je u akumulaciji citrata i to naročito nakon pet dana tretmana (**Slika 4.28**). Kompleksi Cu sa citratom su detektovani u korenu krastavca XAS metodom i to je dominantan mehanizam detoksifikacije u vršnim regionima korena dok idući ka drugim zonama, Cu je uglavnom vezan za ćelijski zid (Song et al. 2013). Povećanje koncentracije citrata u korenu smatra se odgovornim za toleranciju viška Cu kod Cu-tolerantnih vrsta/genotipova (Kishinami and Widholm 1987; Murphy et al. 1999). Stimulisanje akumulacije citrata usled prisustva Si, ukazuje da je to mehanizam kojim je Si doprineo povećanju tolerancije na višak Cu jona. Takođe, i u ksilemu je izmerena značajno veća akumulacija citrata kod +Cu+Si biljaka (**Slika 4.29**). Pored toga što vezuje Cu, citrat je, takođe, i najznačajniji ligand za transport Fe u ksilemu (von Wirén et al. 1999). Manje izražen deficit Fe uočen kod +Cu+Si biljaka može biti i usled povećane translokacije Fe, što je dokazan mehanizam delovanja Si kod biljaka koje se primarno suočavaju sa nedostatkom Fe (Bityutskii et al. 2014). Ovi podaci ukazuju da helirajuća jedinjenja poput citrata imaju ključnu ulogu u Si-stimulisanoj remobilizaciji metala u uslovima deficita ali i u sekvestraciji metala u uslovima toksičnosti. Petog dana tretmana izmerena je i povećana koncentracija malata kod +Cu+Si biljaka (**Slika 4.28**). U korenu bambusa pokazano je da je veliki procenat Cu vezan za malat ali nije nađena značajna razlika između +Cu-Si i +Cu+Si tretiranih biljaka (Collin et al. 2014). Pored akumulacije citrata i malata u korenu, Si je značajno doprineo i akumulaciji akonitata u listu kod +Cu+Si biljaka krastavca (**Slika 4.30**). Zapravo, molarni odnos Cu:akonitat kod +Cu+Si prevazilazi vrednosti kontrolnih biljaka, što ukazuje da je ova kiselina bila u značajnom višku u odnosu na koncentraciju Cu u listu (**Tabela 4.3**). Povećana kompleksacija Cu organskim kiselinama stimulisana prisustvom Si, smatra se jednim od glavnih mehanizama korisnog efekta Si kod pšenice tretirane Cu (Keller et al. 2015). Isti autori su naročito istakli potencijalno vezivanje Cu za akonitat u listu usled prisustva Si, na šta ukazuju i ovde predstavljeni rezultati. Povećanje akumulacije akonitata u listovima krastavca (**Slika 4.30**) i pšenice (Keller et al. 2015) ukazuje da to može biti univerzalan mehanizam delovanja Si na nivou lista kod biljaka tretiranim bakrom.

Akumulacija slobodnih aminokiselina smatra se aktivnim odgovorom biljaka na stres izazvan teškim metalima (Sharma and Dietz 2006). Istraživanja na ksilemskom soku su pokazala da među ispitivanim aminokiselinama, NA i His se najviše akumuliraju usled stresa viškom Cu (Liao et al. 2000; Irtelli et al. 2008). NA i His imaju visoke konstante vezivanja za Cu, više nego za druge metale (May et al. 1977; Beneš et al. 1983). NA ima jedinstvenu ulogu u homeostazi Cu i za razliku od drugih metala, neophodan je za transport Cu i ksilemom i floemom (Pich et al. 1994; Takahashi et al. 2003). Međutim, NA ima i značajnu ulogu u stresu teškim metalima. Pich and Scholz (1996) su zaključili da je povećanje koncentracije NA u listovima paradajza tretiranog Cu, neophodno za zaštitu od fitotoksičnosti Cu. Takođe, isti autori su označili His kao potencijalni kompetitivni ligand za Cu i u ksilemu i u floemu. Vezivanje metala za jake ligande, kakav je NA, smatra se glavnom strategijom za detoksifikaciju metala kod netolerantnih biljaka (Mijovilovich et al. 2009; Leitenmaier and Küpper 2013). Povećanje koncentracije NA je u korelaciji sa povećanom tolerancijom na Ni (Pianelli et al. 2005), Zn (Weber et al. 2004), Fe (Pich et al. 2001). S druge strane, poznato je da se hipertolerancija i hiparkumulacija kod nekih vrsta hiperakumulatora metala zasniva isključivo na His (Krämer et al. 1996; Ingle et al. 2005). Kod vrste *Brassica carinata* tretman viškom Cu je najviše indukovao povećanje His, dok je NA aminokiselina sa najvećom apsolutnom koncentracijom zabeležena u ksilemskom soku (Irtelli et al. 2008). U istom radu je, takođe, pokazano da se NA indukuje deficitom Cu a ne tretmanom povećanim koncentracijama Cu, dok se His povećava sa povećanjem koncentracije Cu u hranljivom medijumu. Autori su ove rezultate pripisali *species*-specifičnom ali i stres-specifičnom odgovoru (Irtelli et al. 2008).

Heliranjem Cu jona pomoću NA i His kontroliše se koncentracija slobodnih Cu jona što je efikasan mehanizam tolerancije na prisustvo viška metala (Anjum et al. 2015). U listu krastavca izmerena je povećana koncentracija NA i His usled tretmana Cu (**Slika 4.31**). Međutim, primena Si je doprinela još većoj akumulaciji NA i His, dok su molarni odnosi NA:Cu i His:Cu kod +Cu+Si tretmana premašili vrednosti kontrolnih biljaka, što ukazuje da su ove dve aminokiseline bile u značajnom višku u odnosu na, takođe, povećanu koncentraciju Cu (**Tabela 4.4**). Ovakvo povećanje koncentracije NA i His, indukovano dodavanjem Si je moglo biti najvažniji mehanizam za uklanjanje viška Cu jona u listovima kod +Cu+Si biljaka a krajnji efekat je smanjenje oksidativnog stresa i povećanje biomase biljaka. Cu-NA i Cu-His kompleksi u uslovima stresa su detektovani kod više biljnih vrsta (Mijovilovich et al. 2009; Collin et al. 2014; Hazama et al. 2015). Iz svega navedenog, može se zaključiti da je stimulacija sinteze helatora u cilju povećanja tolerancije na prisustvo Cu u višku. osnovni mehanizam korisnog delovanja Si u listu krastavca.

Istraživanja uticaja Si na produkciju helirajućih aminokiselina su malobrojna. Kod bambusa tretiranog Cu i Si pokazano je da su amino grupe uključene u kompleksaciju Cu, i takođe je detektovano povećanje akumulacije His u korenu kod +Cu+Si tretiranih biljaka bambusa (Collin et al. 2014). U listu pšenice tretirane NaCl, Si je povećao ukupnu koncentraciju slobodnih aminokiselina a među njima detaljnijom analizom je pokazano povećanje koncentracije prolina (Hajiboland et al. 2016). Takođe, Si utiče na sintezu NA u uslovima deficita hraniva (Pavlovic et al. 2016). NA je neophodan za metabolizam i drugih metala, naročito za njihov transport floemom (Takahashi et al. 2003). U ovoj studiji je pokazano da se listovi krastavca pored visoke akumulacije Cu, karakterišu smanjenim sadržajem drugih esencijalnih elmenata: Fe, Zn i Mn (**Tabela 4.1**). Mnogobrojne studije su se bavile ulogom NA u homeostazi Fe, u kojima je pokazano da nedostatak Fe ne indukuje povećanje ekspresije *NAS* niti akumulaciju NA kod ispitivanih vrsta dikotila (Higuchi et al. 1995, 1996; Pich et al. 2001). Međutim, dodavanje Si je uticalo na stimulaciju sinteze NA u uslovima deficita Fe kod krastavca, što je omogućilo remobilizaciju Fe iz starijih u mlađe listove (Pavlovic et al. 2016). Dakle, povećanje NA predstavljeno u ovoj disertaciji, ne samo da je moglo uticati na smanjenje toksičnosti Cu, nego i na povećanje remobilizacije drugih esencijalnih metala i njihovu bolju distribuciju u tkivima, što je u skladu sa povećanim sadržajem Fe, Zn i Mn u listovima kod +Cu+Si biljaka u odnosu na +Cu-Si (**Tabela 4.1**).

Najvažniji enzim u biosintezi NA je *NAS*. Transformacija *NAS* genima ima značajan biofortifikacioni potencijal ali i potencijal za bioremedijaciju. Pokazano je da overekspresija *OsNAS3* kod pirinča rezultuje povećanjem tolerancije na deficit Fe i Zn, kao i povećanjem sadržaja Fe, Zn i Cu u semenima ali i većom tolerancijom na metale kao što su Cu, Zn i Ni prisutne u višku (Lee et al. 2009). Pored toga, mutanti *nas3* su osetljiviji na stres viškom Cu, Zn ili Ni (Lee et al. 2009). U ovoj disertaciji, ekspresija *NAS1* je u skladu sa izmerenom količinom NA u listovima krastavca kod različitih tretmana (**Slika 4.32**). To je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u pomenutoj studiji sa deficitom Fe, gde je pokazano da ekspresija *NAS1* u potpunosti prati količinu NA izmerenu u starijim i u mlađim, potpuno razvijenim listovima krastavca (Pavlovic et al. 2016). Ovi rezultati potvrđuju da Si ima ulogu u indukciji ekspresije *NAS1* i povećanju biosinteze NA kod krastavca što ukazuje ili da je to odgovor specifičan za vrstu, kao što je prethodno predloženo u radu Irtelli et al. (2008) ili da predstavlja specifičan mehanizam delovanja silicijuma kojim se omogućava povećana tolerancija na metale prisutne u višku kao i redistribucija metala u deficitu. Dalja istraživanja u drugim biljnim vrstama će doprineti razjašnjenju ovog fenomena.

Opšta uloga *YSL* transportera je u transportu kompleksa NA-metal iz vaskulature u tkiva koja se tek razvijaju, remobilizaciji metala iz senescentnih tkiva kao i snabdevanje semena esencijalnim elementima (Colangelo and Guerinet 2006; Yruela 2009). Profil ekspresije *YSL3* kod tretiranih grupa u



listovima krastavca je u saglasnosti sa ekspresijom *NAST* i količinom NA u listovima (**Slika 4.32**). YSL transporteri nisu mnogo ispitivani u kontekstu homeostaze Cu za razliku od studija koje su se bavile gvožđem. Dvostruki mutant arbidopsisa *ysl1ysl3* pokazuje promene u homeostazi metala uključujući Cu, u vidu poremećaja u distribuciji Cu u listovima, remobilizaciji Cu i Zn tokom senescencije, kao i smanjenoj količini Cu, Fe i Zn u semenima (Waters et al. 2006). Iako AtYSL1 i AtYSL3 u listovima učestvuju u pravilnoj distribuciji metala pokazano je da oni ipak nisu funkcionalno redundantni (Chu et al. 2010). Kod krastavca izloženog deficitu Fe, pokazano je da veći značaj za redistribuciju Fe iz starijih u mlađe listove pod uticajem Si ima YSL1 dok je YSL3 bio povećan samo u pojedinim listovima usled tretmana Si (Pavlovic et al. 2016). Moguće je da YSL3 ima veći značaj u transportu NA-Cu nego NA-Fe kompleksa. U prilog tome idu i rezultati istraživanja gde je pokazano da YSL3 obavlja ključnu ulogu u akumulaciji Cu u nadzemnom delu, odnosno translokaciji Cu od korena do listova i da stoga učestvuje u uspostavljanju tolerancije na višak Cu (Chen et al. 2011). Koja je tačna uloga ovog transportera u homeostazi Cu u listovima za sada nije poznato ali bi mogao biti odgovoran za transport NA-Cu kompleksa u određene tipove ćelija u cilju skladištenja viška Cu jona. U uslovima viška Fe, pokazano je da NA učestvuje u sekvestraciji Fe, tako što se NA-Fe kompleksi skladište u vakuoli ćelija mezofila (Pich et al. 2001). S obzirom da je NA-Cu kompleks stabilan u vrlo visokom rasponu pH (3.0-7.5) (Rellán-Álvarez et al. 2008), pored toga što je detektovan i u ksilemu i floemu, može biti stabilan i prisutan i u različitim subćelijskim sredinama (t.j. vakuoli i u citosolu).

## 5.8 Uloga Si kod kontrolnih biljaka i primena Si u poljoprivredi

Većina studija koje su se bavile ispitivanjem uloge silicijuma u stresu, nisu zabeležile značajne razlike kod biljaka koje nisu bile izložene stresnim faktorima. Primena Si u optimalnim, fiziološkim uslovima, pokazuje minimalan efekat na rastenje, funkciju i metaboličku aktivnost biljaka (Coskun et al. 2019). Drastične razlike nije ni moguće uočiti ukoliko su biljke gajene u kontrolisanim uslovima u zemljištu ili hidroponičnoj kulturi, gde je Si prisutan čak i u visoko prečišćenoj vodi (Epstein 1994). Analizom transkriptoma je pokazano da Si utiče na ograničen broj gena kod nekoliko ispitivanih vrsta gajenih u optimalnim uslovima (Watanabe et al. 2004; Fauteux et al. 2006; Brunings et al. 2009; Rasoolizadeh et al. 2018). Sporadično, literaturni podaci ukazuju na efekat Si kod biljaka gajenih u kontrolnim uslovima. U ovoj disertaciji primena Si kod kontrolnih biljaka je pokazala promene na malom broju ukupno ispitivanih parametara. Smanjenje koncentracije MDA u korenu, kao i smanjenje aktivnosti APX u korenu i listu su zabeleženi kod K+Si biljaka u odnosu na K-Si biljke (**Slika 4.20**). U drugoj studiji, takođe na krastavcu, pokazano je da je Si uticao na smanjenje parametra oksidativnog stresa, sadržaja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, iako nisu zabeležene promene u aktivnosti ispitivanih antoksidativnih enzima (Zhu et al. 2004). Povećanje ekspresije *COPT1* transportera u korenu je takođe dobijeno, premda nije uočena razlika u koncentraciji Cu između K+Si i K-Si biljaka. Zanimljivo je da je isti rezultat dobijen i kod arbidopsisa, jedine vrste kod koje je ovaj parametar ispitivan do rezultata prikazanih u ovoj disertaciji (Li et al. 2008). U eksperimentima sa krastavcem je, takođe, pokazano i da primena Si utiče na povećanje ekspresije miR398 i miR408, kao i na ekspresiju njihovih targeta. Ove miRNK se najčešće povezuju sa odgovorom biljaka na oksidativni stres. Nedavna studija na krastavcu je pokazala da dodavanje Si kontrolnim biljkama utiče na ekspresiju velikog broja gena (preko 1000) koji su uključeni u odbrambeni odgovor biljaka (Zhu et al. 2019). Autori su sugerisali da Si može delovati kao elicitor koji priprema biljke krastavca na stres i tako im omogućava toleranciju ukoliko stres nastupi (Zhu et al. 2019). Iako za sada ne postoje dokazi da je Si direktno uključen u regulaciju genske ekspresije, niti da je Si sekundarni prenosilac signala (signalni molekul) kako je ranije pretpostavljeno (Fawe et al. 2001), profilaktička uloga Si jeste prihvaćena kao i efekat prajminga odnosno pripreme

biljke za stanje stresa. Neobičnost Si u biologiji biljaka na koju je ukazao Epstein (1994), rodonačelnik istraživanja koja se tiču direktne uloge Si u biljkama, nastavlja da intrigira naučnu javnost. Dalje rasvetljavanje direktne uloge Si u biljkama, kao kriterijuma esencijalnosti elementa, će sačekati razvoj novih analitičkih metoda, pre svega dobijanje medijuma za gajenje biljaka, koji ne sadrži Si ni u tragovima.

Imajući u vidu da uobičajeni agroekološki uslovi za gajenje useva uvek podrazumevaju prisustvo bar nekog stresnog faktora, primena Si u poljoprivrednoj praksi je potpuno opravdana (Liang et al. 2015), naročito ako se uzmu u obzir globalne klimatske promene i povećana incidenca ekstremnih vremenskih uslova (Lobell et al. 2011; Cai et al. 2014; Myers et al. 2014). Primena Si u poljoprivredi je u skladu sa održivim razvojem, ekološki prihvatljiva i ekonomična alternativa za zaštitu biljaka od višestrukih faktora stresa (Etesami and Jeong 2018). Intenzivno obrađivanje zemljišta kao i uklanjanje biljnih ostataka nakon žetve je doprinelo značajnom smanjenju količine biodostupnog Si u poljoprivrednom zemljištu (Meunier et al. 2008). Fitoliti predstavljaju dragoceni izvor silicijuma i mogu doprineti ponovnom snabdevanju zemljišta sa Si, stoga se preporučuje da se biljni ostaci posle žetve recikliraju kako bi se ograničilo smanjenje biodostupnog Si (Guntzer et al. 2012). Pored toga, različite forme đubriva na bazi Si su u upotrebi širom sveta (Liang et al. 2015), ali je za široku primenu ovakvih đubriva neophodna optimizacija za različite tipove zemljišta i vrste useva kao i razvijanje ekonomičnijih i efikasnijih oblika Si-đubriva (Yan et al. 2018). Bolje razumevanje mehanizama delovanja Si u biljkama izloženih stresu (npr. višku metala, uključujući i Cu) će dati na značaju i omogućiti napredak u razvijanju đubriva na bazi Si kao efikasnog sredstva za zaštitu biljaka od stresa (Bhatt and Sharma 2018).

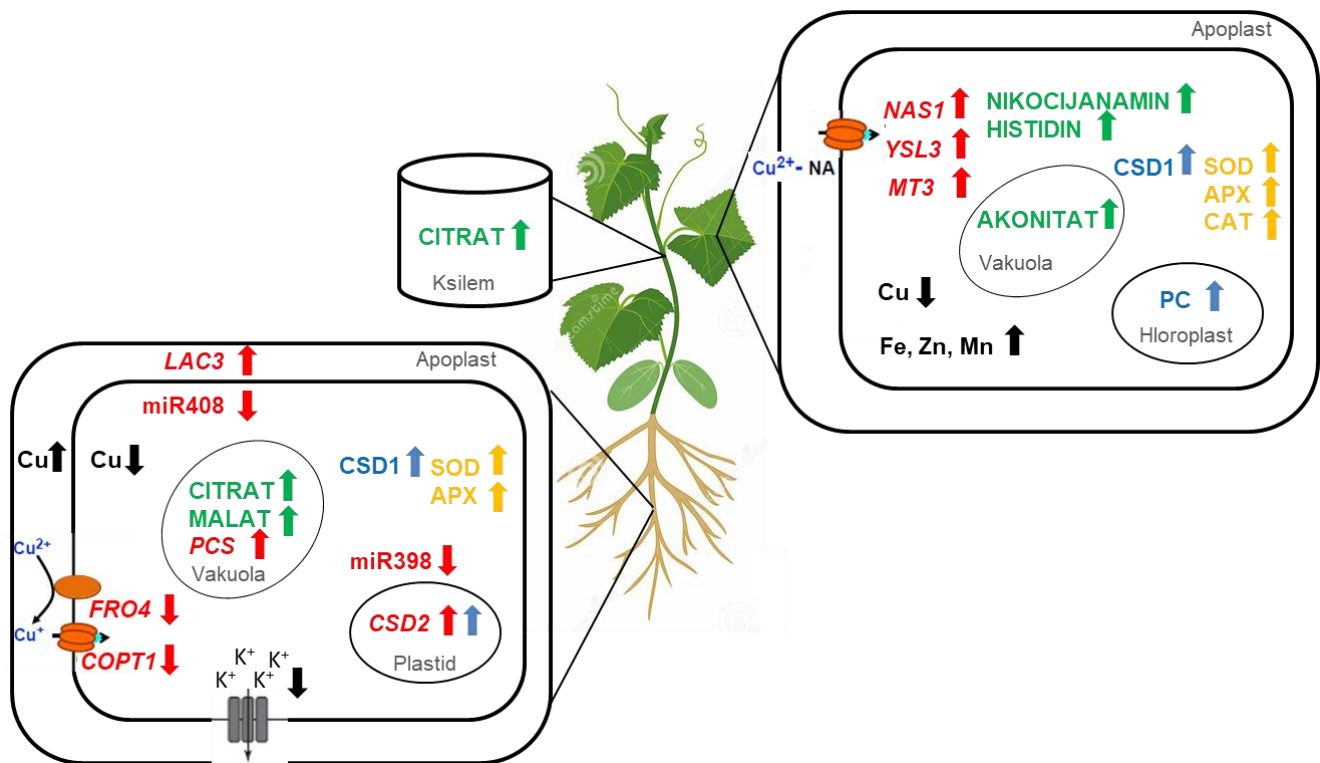
## **5.9 Mehanizam delovanja Si na prevazilaženje stresa povišenim koncentracijama bakra kod krastavca**

Na osnovu rezultata predstavljenih u ovoj doktorskoj disertaciji predloženi su mehanizmi delovanja Si putem kojih se povećava tolerancija biljaka krastavca na stres usled prisustva umereno toksičnih koncentracija bakra (**Slika 5.1**). Delovanje silicijuma je usmereno ka stumulaciji urođenih odbrambenih mehanizama biljaka, koji se tiču povećanog heliranja i skladištenje visoko reaktivnih jona Cu, čime se postiže smanjenje toksičnih efekata Cu na ćelijske strukture kao i snižavanje oksidativnog stresa u ćelijama. Smanjenje nivoa stresa, izraženog preko smanjene lignifikacije, kao i smanjene lipidne peroksidacije, posledica je nekoliko efikasnih mehanizama delovanja Si. Na nivou korena, Si sprečava poremećaj u permeabilnosti membrane ćelija doprinoseći očuvanju strukture i funkcije korena. Među najvažnijim mehanizmima predstavljenim u ovom istraživanju jeste smanjenje usvajanja Cu što se postiže sniženom ekspresijom *COPT1* i *FRO4* gena. Si je doprineo preraspodeli Cu na nivou ćelija korena, povećavajući vezivanje i imobilizaciju Cu u ćelijskim zidovima, što je smanjilo količinu Cu unutar ćelija. Bakar prisutan unutar ćelija korena je heliran od strane metalotioneina u citosolu, dok je Si najviše uticao na akumulaciju organskih kiselina, citrata i malata koji vrše kompartmentaciju Cu u vakuolama. Povećanje antioksidativne zaštite pod uticajem Si, pre svega SOD i APX je omogućilo direktno smanjenje nivoa ROS u ćelijama korena.

Si nije značajno uticao na smanjenje koncentracije Cu u listovima niti je doprineo vezivanju za ćelijski zid. Međutim, Cu je unutar ćelija lista bio uskladišten vezivanjem za proteine i Cu-helirajuće ligande. Si je stimulisao sintezu akonitata, ekspresiju *MT3*, dok je najviše uticao na akumulaciju helatorskih aminokiselina nikocijanamina i histidina koji su odigrali dominantnu ulogu u heliranju Cu u listu. Primena Si je povećala aktivnost antioksidativnih enzima SOD, APX i CAT čime je nivo lipidne

peroksidacije u ćelijama lista umanjen. Si je smanjio negativan uticaj Cu na koncentraciju drugih mikroelemenata u listu, pre svega Fe, putem povećane translokacije sa citratom ksilemom, što je smanjilo hlorozu i povećalo biomasu listova kod +Cu+Si tretiranih biljaka.

Primena Si je uticala na glavne regulatore homeostaze Cu, miR398 i miR408, čija je snižena ekspresija u korenu omogućila povišenu ekspresiju njihovih targeta *CSD2* i *LAC3*. U skladu sa tim, akumulacija Cu-proteina, *CSD2* u korenu i plastocijanina u listu, kao primarnih depoa Cu jona, je izraženija kod biljaka gajenih sa Si. Uticaj Si na akumulaciju proteina koji sadrže Cu kao kofaktor je po prvi put pokazan u ovom istraživanju. Povećanje ekspresije *LAC3* ukazuje da je i ovaj protein mogao odigrati istu ulogu u korenu.



**Slika 5.1.** Mehanizmi delovanja Si na ublažavanje stresa izazvanog umereno toksičnom koncentracijom Cu kod krastavca. Uticaj Si na ekspresiju gena je označen crvenom bojom, na koncentraciju elemenata crnom, koncentraciju helatora bakra zelenom, količinu Cu-proteina plavom bojom i aktivnost enzima narandžastom bojom. Strelica usmerena na gore označava povećanje dok strelica usmerena na dole označava smanjenje.

## 6 Zaključci

Na osnovu dobijenih rezultata moguće je izvesti sledeće zaključke:

1. Primena silicijuma u obliku silicijumove kiseline, doprinosi ublažavanju stresa kod biljaka krastavca (*Cucumis sativus* L.) izloženih umereno toksičnoj koncentraciji Cu, što je pokazano smanjenjem nivoa lignifikacije i izostankom fenomena curenja elektrolita iz korena, kao i smanjenjem lipidne peroksidacije u tkivima korena i lista.
2. Na nivou korena, Si smanjuje unos Cu putem smanjenja ekspresije gena koji kodiraju FRO4 reduktazu i COPT1 transporter. Pored toga, Si utiče na preraspodelu Cu na nivou ćelija korena, povećavajući vezivanje i imobilizaciju Cu u ćelijskim zidovima, što za posledicu ima smanjenu količinu Cu unutar ćelija.
3. Primena Si povećava biomasu i sadržaj biljnih pigmenata u listu.
4. Si ne utiče na translokaciju Cu do listova, niti na značajno smanjenje ukupne koncentracije Cu u listovima. Sa druge strane, Si utiče na zastupljenost Cu u ćelijskim frakcijama lista, tako što povećava njegovo prisustvo u proteinskoj a smanjuje u vodenoj frakciji, sa izuzetkom ćelijskih zidova u kojima je depozicija Cu nepromenjena.
5. Kod biljaka gajenih sa Si zabeleženo je povećanje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite: SOD, APX i CAT.
6. Primena Si je uticala na povećanje sadržaja helirajućih jedinjenja - organskih kiselina (citrata i malata u korenu a akonitata u listu), dok nije bila presudna za indukciju metalotioneina 3 i fitohelatin-sintaze.
7. Povećanje citrata u ksilemu je omogućilo efikasniji transport Fe do listova i ublažavanje deficita Fe i drugih mikroelementa (Zn i Mn).
8. Najznačajniji mehanizam zaštite od toksičnog delovanja Cu u listu je akumulacija aminokiselina nikocijanamina i histidina, koje su doprinele efikasnom uklanjanju reaktivnih jona Cu unutar ćelije.
9. Primena Si je smanjila ekspresiju glavnih regulatora homeostaze Cu, miR398 i miR408 u korenu, čime je ostvareno povećanje ekspresije njihovih targeta *CSD2* i *LAC3*.
10. Profil ekspresije *CSD1* izoforme je u korelaciji sa ukupnom aktivnosti SOD enzima.
11. Važan mehanizam Si-stimulisane zaštite od toksičnog delovanja Cu je akumulacija Cu-proteina, *CSD2* u korenu i plastocijanina u listu, kao primarnih skladišta jona Cu.
12. Primena Si povećava toleranciju biljaka krastavca na prisustvo povišenih koncentracija Cu, kroz kompleksno delovanje na različite mehanizme zaštite biljaka od oksidativnog stresa.

## 7 Literatura

- Abdel-Ghany SE (2009) Contribution of plastocyanin isoforms to photosynthesis and copper homeostasis in *Arabidopsis thaliana* grown at different copper regimes. *Planta* 229:767–779
- Abdel-Ghany SE, Burkhead JL, Gogolin KA, Andrés-Colás N, Bodecker JR, Puig S, Peñarrubia L, Pilon M (2005a) AtCCS is a functional homolog of the yeast copper chaperone Ccs1/Lys7. *FEBS Lett* 579:2307–2312
- Abdel-Ghany SE, Müller-Moulé P, Niyogi KK, Pilon M, Shikanai T (2005b) Two P-type ATPases are required for copper delivery in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Plant Cell* 17:1233–1251
- Abdel-Ghany SE, Pilon M (2008) MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 283:15932–15945
- Adatia MH, Besford RT (1986) The effects of silicon on cucumber plants grown in recirculating nutrient solution. *Ann Bot* 58:343–351
- Adrees M, Ali S, Rizwan M, Ibrahim M, Abbas F, Farid M, Zia-ur-Rehman M, Irshad MK, Bharwana SA (2015) The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: a review. *Environ Sci Pollut Res* 22:8148–8162
- Adriano DC (2001) Bioavailability of trace metals. *Trace Elements in Terrestrial Environments*. Springer, New York, pp 61–89
- Aguirre G, Pilon M (2016) Copper delivery to chloroplast proteins and its regulation. *Front Plant Sci* 6:1250
- Ahmad MA, Gupta M (2013) Exposure of *Brassica juncea* (L) to arsenic species in hydroponic medium: comparative analysis in accumulation and biochemical and transcriptional alterations. *Environ Sci Pollut Res* 20:8141–8150
- Ahmed M, Hassen FU, Qadeer U, Aslam MA (2011) Silicon application and drought tolerance mechanism of sorghum. *African J Agric Res* 6:594–607
- Ainsworth EA, Gillespie KM (2007) Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nat Protoc* 2:875
- Alaoui-Sossé B, Genet P, Vinit-Dunand F, Toussaint M-L, Epron D, Badot P-M (2004) Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. *Plant Sci* 166:1213–1218
- Alcántara E, Romera FJ, Cañete M, De la Guardia MD (1994) Effects of heavy metals on both induction and function of root Fe (III) reductase in Fe-deficient cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants. *J Exp Bot* 45:1893–1898
- Ali MB, Singh N, Shohael AM, Hahn EJ, Paek K-Y (2006) Phenolics metabolism and lignin synthesis in root suspension cultures of *Panax ginseng* in response to copper stress. *Plant Sci* 171:147–154
- Ali S, Rizwan M, Ullah N, Bharwana SA, Waseem M, Farooq MA, Abbasi GH, Farid M (2016) Physiological and biochemical mechanisms of silicon-induced copper stress tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Acta Physiol Plant* 38:262
- Alloway BJ (2013) Sources of heavy metals and metalloids in soils. *Heavy metals in soils*. Springer, Dordrecht, pp 11–50
- Alloway BJ, Tills AR (1984) Copper deficiency in world crops. *Outlook Agric* 13:32–42
- Alscher RG, Erturk N, Heath LS (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot* 53:1331–1341
- Ando Y, Nagata S, Yanagisawa S, Yoneyama T (2013) Copper in xylem and phloem saps from rice (*Oryza sativa*): the effect of moderate copper concentrations in the growth medium on the accumulation of five essential metals and a speciation analysis of copper-containing compounds.

Funct Plant Biol 40:89–100

- Andrés-Colás N, Perea-García A, de Andrés SM, Garcia-Molina A, Dorcey E, Rodríguez-Navarro S, Pérez-Amador MA, Puig S, Peñarrubia L (2013) Comparison of global responses to mild deficiency and excess copper levels in *Arabidopsis* seedlings. *Metallomics* 5:1234–1246
- Andrés-Colás N, Sancenón V, Rodríguez-Navarro S, Mayo S, Thiele DJ, Ecker JR, Puig S, Peñarrubia L (2006) The *Arabidopsis* heavy metal P-type ATPase HMA5 interacts with metallochaperones and functions in copper detoxification of roots. *Plant J* 45:225–236
- Andresen E, Peiter E, Küpper H (2018) Trace metal metabolism in plants. *J Exp Bot* 69:909–954
- Angelini R, Tisi A, Rea G, Chen MM, Botta M, Federico R, Cona A (2008) Involvement of polyamine oxidase in wound healing. *Plant Physiol* 146:162–177
- Anjum NA, Gill SS, Gill R (2014) Plant adaptation to environmental change: significance of amino acids and their derivatives. CABI, Wallingford
- Anjum NA, Hasanuzzaman M, Hossain MA, Thangavel P, Roychoudhury A, Gill SS, Rodrigo MAM, Adam V, Fujita M, Kizek R, Duarte AC, Pereira E, Ahmad I (2015) Jacks of metal/metalloid chelation trade in plants—an overview. *Front Plant Sci* 6:192
- Aono M, Saji H, Sakamoto A, Tanaka K, Kondo N, Tanaka K (1995) Paraquat tolerance of transgenic *Nicotiana tabacum* with enhanced activities of glutathione reductase and superoxide dismutase. *Plant Cell Physiol* 36:1687–1691
- Araki R, Mermoud M, Yamasaki H, Kamiya T, Fujiwara T, Shikanai T (2018) SPL7 locally regulates copper-homeostasis-related genes in *Arabidopsis*. *J Plant Physiol* 224:137–143
- Arduini I, Godbold DL, Onnis A (1995) Influence of copper on root growth and morphology of *Pinus pinea* L. and *Pinus pinaster* Ait. seedlings. *Tree Physiol* 15:411–415
- Arnon DI, Stout PR (1939) The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper. *Plant Physiol* 14:371
- Asada K (1992) Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol Plant* 85:235–241
- Ashraf M, Harris PJC (2004) Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Sci* 166:3–16
- Aspinall D (1981) Proline accumulation: physiological aspects. *Physiol Biochem drought Resist plants*
- Van Assche F, Clijsters H (1990) Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ* 13:195–206
- Aung MS, Masuda H, Nozoye T, Kobayashi T, Jeon J-S, An G, Nishizawa NK (2019) Nicotianamine synthesis by OsNAS3 is important for mitigating iron excess stress in rice. *Front Plant Sci* 10:
- Axelsen KB, Palmgren MG (1998) Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J Mol Evol* 46:84–101
- Axtell MJ, Bowman JL (2008) Evolution of plant microRNAs and their targets. *Trends Plant Sci* 13:343–349
- Ayala MB, Sandmann G (1988) Activities of Cu-containing proteins in Cu-depleted pea leaves. *Physiol Plant* 72:801–806
- Ayres AS (1966) Calcium silicate slag as a growth stimulant for sugarcane on low-silicon soils. *Soil Sci* 101:216–227
- Azooz MM, Abou-Elhamd MF, Al-Fredan MA (2012) Biphasic effect of copper on growth, proline, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of wheat (*Triticum aestivum* 'cv. Hasaawi) at early growing stage. *Aust J Crop Sci* 6:688
- Balandin T, Castresana C (2002) AtCOX17, an *Arabidopsis* homolog of the yeast copper chaperone COX17. *Plant Physiol* 129:1852–1857
- Baloun J, Nevrtalova E, Kovacova V, Hudzieczek V, Cegan R, Vyskot B, Hobza R (2014) Characterization of the HMA7 gene and transcriptomic analysis of candidate genes for copper

- tolerance in two *Silene vulgaris* ecotypes. *J Plant Physiol* 171:1188–1196
- Bannister WH, Bannister J V, Barra D, Bond J, Bossa F (1991) Evolutionary aspects of superoxide dismutase: the copper/zinc enzyme. *Free Radic Res Commun* 12:349–361
- Bao W, O'Malley DM, Whetten R, Sederoff RR (1993) A laccase associated with lignification in loblolly pine xylem. *Science* (80- ) 260:672–674
- Barber SA (1995) *Soil nutrient bioavailability: a mechanistic approach*. John Wiley & Sons, New York
- Barbusiński K (2009) Fenton reaction-controversy concerning the chemistry. *Ecol Chem Eng S* 16:347–358
- Barker A V, Pilbeam DJ (2007) *Handbook of plant nutrition*. CRC press, Boca Raton
- Barnes J, Zheng Y, Lyons T (2002) Plant resistance to ozone: the role of ascorbate. *Air pollution and plant biotechnology*. Springer, Tokyo, pp 235–252
- Barros J, Serk H, Granlund I, Pesquet E (2015) The cell biology of lignification in higher plants. *Ann Bot* 115:1053–1074
- Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281–297
- Baszynski T, Tukendorf A, Ruszkowska M, Skorzynska E, Maksymieci W (1988) Characteristics of the photosynthetic apparatus of copper non-tolerant spinach exposed to excess copper. *J Plant Physiol* 132:708–713
- Baum JA, Chandless JM, Scandalios JG (1983) Purification and partial characterization of a genetically-defined superoxide dismutase (SOD-1) associated with maize chloroplasts. *Plant Physiol* 73:31–35
- Beauclair L, Yu A, Bouché N (2010) microRNA-directed cleavage and translational repression of the copper chaperone for superoxide dismutase mRNA in *Arabidopsis*. *Plant J* 62:454–462
- Benatti M, Yookongkaew N, Meetam M, Guo W, Punyasuk N, AbuQamar S, Goldsbrough P (2014) Metallothionein deficiency impacts copper accumulation and redistribution in leaves and seeds of *Arabidopsis*. *New Phytol* 202:940–951
- Beneš I, Schreiber K, Ripberger H, Kircheiss A (1983) Metal complex formation by nicotianamine, a possible phytosiderophore. *Experientia* 39:261–262
- Bernal M, Casero D, Singh V, Wilson GT, Grande A, Yang H, Dodani SC, Pellegrini M, Huijser P, Connolly EL (2012) Transcriptome sequencing identifies SPL7-regulated copper acquisition genes FRO4/FRO5 and the copper dependence of iron homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24:738–761
- Bernal M, Ramiro MV, Cases R, Picorel R, Yruela I (2006) Excess copper effect on growth, chloroplast ultrastructure, oxygen-evolution activity and chlorophyll fluorescence in *Glycine max* cell suspensions. *Physiol Plant* 127:312–325
- Bernal M, Testillano PS, Alfonso M, del Carmen Risueño M, Picorel R, Yruela I (2007) Identification and subcellular localization of the soybean copper P1B-ATPase GmHMA8 transporter. *J Struct Biol* 158:46–58
- Berthet S, Demont-Caulet N, Pollet B, Bidzinski P, Cézard L, Le Bris P, Borrega N, Hervé J, Blondet E, Balzergue S (2011) Disruption of LACCASE4 and 17 results in tissue-specific alterations to lignification of *Arabidopsis thaliana* stems. *Plant Cell* 23:1124–1137
- Berthet S, Thevenin J, Baratiny D, Demont-Caulet N, Debeaujon I, Bidzinski P, Leple J-C, Huis R, Hawkins S, Gomez L-D (2012) Role of plant laccases in lignin polymerization. *Advances in Botanical Research*. Elsevier, New York, pp 145–172
- Bhat JA, Shivaraj SM, Singh P, Navadagi DB, Tripathi DK, Dash PK, Solanke AU, Sonah H, Deshmukh R (2019) Role of Silicon in Mitigation of Heavy Metal Stresses in Crop Plants. *Plants* (Basel, Switzerland) 8:71
- Bhatt D, Sharma G (2018) Role of silicon in counteracting abiotic and biotic plant stresses. *IJCS* 6:1434–1442

- Bityutskii N, Pavlovic J, Yakkonen K, Maksimović V, Nikolic M (2014) Contrasting effect of silicon on iron, zinc and manganese status and accumulation of metal-mobilizing compounds in micronutrient-deficient cucumber. *Plant Physiol Biochem* 74:205–211
- Blaby-Haas CE, Padilla-Benavides T, Stübe R, Argüello JM, Merchant SS (2014) Evolution of a plant-specific copper chaperone family for chloroplast copper homeostasis. *Proc Natl Acad Sci* 111:E5480–E5487
- Van Bockhaven J, De Vleeschauwer D, Höfte M (2013) Towards establishing broad-spectrum disease resistance in plants: silicon leads the way. *J Exp Bot* 64:1281–1293
- Boerjan W, Ralph J, Baucher M (2003) Lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* 54:519–546
- Bokor B, Bokorová S, Ondoš S, Švubová R, Lukačová Z, Hýblová M, Szemes T, Lux A (2015) Ionome and expression level of Si transporter genes (*Lsi1*, *Lsi2*, and *Lsi6*) affected by Zn and Si interaction in maize. *Environ Sci Pollut Res* 22:6800–6811
- Bokor B, Vaculík M, Slováková L, Masarovič D, Lux A (2014) Silicon does not always mitigate zinc toxicity in maize. *Acta Physiol Plant* 36:733–743
- Bonnet E, Wuyts J, Rouzé P, Van de Peer Y (2004) Evidence that microRNA precursors, unlike other non-coding RNAs, have lower folding free energies than random sequences. *Bioinformatics* 20:2911–2917
- Bordo D, Djinovic K, Bolognesi M (1994) Conserved patterns in the Cu, Zn superoxide dismutase family. *J Mol Biol* 238:366–386
- Bosnic P, Bosnic D, Jasnic J, Nikolic M (2018) Silicon mediates sodium transport and partitioning in maize under moderate salt stress. *Environ Exp Bot* 155:
- Boutigny S, Sautron E, Finazzi G, Rivasseau C, Frelet-Barrand A, Pilon M, Rolland N, Seigneurin-Berny D (2014) HMA1 and PAA1, two chloroplast-envelope PIB-ATPases, play distinct roles in chloroplast copper homeostasis. *J Exp Bot* 65:1529–1540
- Boyd RS (2007) The defense hypothesis of elemental hyperaccumulation: status, challenges and new directions. *Plant Soil* 293:153–176
- Boyd RS, Martens SN (1998) The significance of metal hyperaccumulation for biotic interactions. *Chemoecology* 8:1–7
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Bravin MN, Marti AL, Clairotte M, Hinsinger P (2009) Rhizosphere alkalisation—a major driver of copper bioavailability over a broad pH range in an acidic, copper-contaminated soil. *Plant Soil* 318:257–268
- Brennan RF, Bolland MDA (2003) Comparing copper requirements of faba bean, chickpea, and lentil with spring wheat. *J Plant Nutr* 26:883–899
- Brooks RR (1998) Plants that hyperaccumulate heavy metals, their role in phytoremediation, microbiology, archaeology, mineral exploration and phytomining. CABI, Wallingford
- Brun LA, Maillot J, Richarte J, Herrmann P, Remy JC (1998) Relationships between extractable copper, soil properties and copper uptake by wild plants in vineyard soils. *Environ Pollut* 102:151–161
- Brunetti P, Zanella L, Proia A, De Paolis A, Falasca G, Altamura MM, Sanità di Toppi L, Costantino P, Cardarelli M (2011) Cadmium tolerance and phytochelatin content of *Arabidopsis* seedlings over-expressing the phytochelatin synthase gene *AtPCS1*. *J Exp Bot* 62:5509–5519
- Brunings AM, Datnoff LE, Ma JF, Mitani N, Nagamura Y, Rathinasabapathi B, Kirst M (2009) Differential gene expression of rice in response to silicon and rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Ann Appl Biol* 155:161–170
- Bueno P, Varela J, Gimenez-Gallego G, del Rio LA (1995) Peroxisomal copper, zinc superoxide dismutase (characterization of the isoenzyme from watermelon cotyledons). *Plant Physiol*



108:1151–1160

- Burkhead JL, Reynolds KAG, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Pilon M (2009) Copper homeostasis. *New Phytol* 182:799–816
- Burzyński M, Migocka M, Kłobus G (2005) Cu and Cd transport in cucumber (*Cucumis sativus* L.) root plasma membranes. *Plant Sci* 168:1609–1614
- Cai W, Borlace S, Lengaigne M, Van Rensch P, Collins M, Vecchi G, Timmermann A, Santoso A, McPhaden MJ, Wu L (2014) Increasing frequency of extreme El Niño events due to greenhouse warming. *Nat Clim Chang* 4:111–116
- Cailliatte R, Schikora A, Briat J-F, Mari S, Curie C (2010) High-affinity manganese uptake by the metal transporter NRAMP1 is essential for Arabidopsis growth in low manganese conditions. *Plant Cell* 22:904–917
- Caldwell CR (2001) Effect of elevated copper on the ultraviolet light-absorbing compounds of cucumber cotyledon and leaf tissues. *J Plant Nutr* 24:283–295
- Callahan DL, Baker AJM, Kolev SD, Wedd AG (2006) Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *JBIC J Biol Inorg Chem* 11:2–12
- Callahan DL, Kolev SD, O’Hair RAJ, Salt DE, Baker AJM (2007) Relationships of nicotianamine and other amino acids with nickel, zinc and iron in *Thlaspi* hyperaccumulators. *New Phytol* 176:836–848
- Campbell MM, Sederoff RR (1996) Variation in lignin content and composition (mechanisms of control and implications for the genetic improvement of plants). *Plant Physiol* 110:3
- Cardon G, Höhmann S, Klein J, Nettesheim K, Saedler H, Huijser P (1999) Molecular characterisation of the Arabidopsis SBP-box genes. *Gene* 237:91–104
- Carr HS, Winge DR (2003) Assembly of cytochrome c oxidase within the mitochondrion. *Acc Chem Res* 36:309–316
- Casey WH, Kinrade SD, Knight CTG, Rains DW, Epstein E (2004) Aqueous silicate complexes in wheat, *Triticum aestivum* L. *Plant Cell Environ* 27:51–54
- Caspi V, Droppa M, Horváth G, Malkin S, Marder JB, Raskin VI (1999) The effect of copper on chlorophyll organization during greening of barley leaves. *Photosynth Res* 62:165–174
- Castresana J, Lübben M, Saraste M, Higgins DG (1994) Evolution of cytochrome oxidase, an enzyme older than atmospheric oxygen. *EMBO J* 13:2516–2525
- Chai M, Shi F, Li R, Qiu G, Liu F, Liu L (2014) Growth and physiological responses to copper stress in a halophyte *Spartina alterniflora* (Poaceae). *Acta Physiol Plant* 36:745–754
- Chaignon V, Bedin F, Hinsinger P (2002) Copper bioavailability and rhizosphere pH changes as affected by nitrogen supply for tomato and oilseed rape cropped on an acidic and a calcareous soil. *Plant Soil* 243:219–228
- Chaignon V, Sanchez-Neira I, Herrmann P, Jaillard B, Hinsinger P (2003) Copper bioavailability and extractability as related to chemical properties of contaminated soils from a vine-growing area. *Environ Pollut* 123:229–238
- Chain F, Côté-Beaulieu C, Belzile F, Menzies JG, Bélanger RR (2009) A comprehensive transcriptomic analysis of the effect of silicon on wheat plants under control and pathogen stress conditions. *Mol plant-microbe Interact* 22:1323–1330
- Chamseddine M, Wided BA, Guy H, Marie-Edith C, Fatma J (2009) Cadmium and copper induction of oxidative stress and antioxidative response in tomato (*Solanum lycopersicon*) leaves. *Plant Growth Regul* 57:89
- Chapman DJ, Schopf JW (1983) *Earth’s Earliest Biosphere: Its Origin and Evolution*. Princeton University Press, Princeton,
- Chen C-C, Chen Y-Y, Tang I-C, Liang H-M, Lai C-C, Chiou J-M, Yeh K-C (2011) Arabidopsis SUMO E3 ligase SIZ1 is involved in excess copper tolerance. *Plant Physiol* 156:2225–2234

- Chen C, Lewin J (1969) Silicon as a nutrient element for *Equisetum arvense*. *Can J Bot* 47:125–131
- Chen CT, Chen L-M, Lin CC, Kao CH (2001) Regulation of proline accumulation in detached rice leaves exposed to excess copper. *Plant Sci* 160:283–290
- Chen E-L, Chen Y-A, Chen L-M, Liu Z-H (2002a) Effect of copper on peroxidase activity and lignin content in *Raphanus sativus*. *Plant Physiol Biochem* 40:439–444
- Chen Y-F, Randlett MD, Findell JL, Schaller GE (2002b) Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 277:19861–19866
- Chérif M, Asselin A, Bélanger RR (1994) Defense responses induced by soluble silicon in cucumber roots infected by *Pythium* spp. *Phytopathology* 84:236–242
- Chérif M, Benhamou N, Menzies JG, Bélanger RR (1992) Silicon induced resistance in cucumber plants against *Pythium ultimum*. *Physiol Mol Plant Pathol* 41:411–425
- Chiba Y, Mitani N, Yamaji N, Ma JF (2009) HvLsi1 is a silicon influx transporter in barley. *Plant J* 57:810–818
- Chipeng FK, Hermans C, Colinet G, Faucon M-P, Ngongo M, Meerts P, Verbruggen N (2010) Copper tolerance in the cuprophyte *Haumaniastrum katangense* (S. Moore) PA Duvign. & Plancke. *Plant Soil* 328:235–244
- Choi SM, Suh KH, Kim J-S, Park Y-I (2001) Inactivation of photosystem I in cucumber leaves exposed to paraquat-induced oxidative stress. *J Photosci* 8:13–17
- Chu C-C, Lee W-C, Guo W-Y, Pan S-M, Chen L-J, Li H, Jinn T-L (2005) A copper chaperone for superoxide dismutase that confers three types of copper/zinc superoxide dismutase activity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 139:425–436
- Chu H-H, Chiecko J, Punshon T, Lanzirotti A, Lahner B, Salt DE, Walker EL (2010) Successful reproduction requires the function of *Arabidopsis* Yellow Stripe-Like1 and Yellow Stripe-Like3 metal-nicotianamine transporters in both vegetative and reproductive structures. *Plant Physiol* 154:197–210
- Ciscato M, Valcke R, Van Loven K, Clijsters H, Navari-Izzo F (1997) Effects of in vivo copper treatment on the photosynthetic apparatus of two *Triticum durum* cultivars with different stress sensitivity. *Physiol Plant* 100:901–908
- Claus H (2004) Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron* 35:93–96
- Clemens S, Deinlein U, Ahmadi H, Höreth S, Uruguchi S (2013) Nicotianamine is a major player in plant Zn homeostasis. *Biometals* 26:623–632
- Clements HF (1965) Effects of silicate on the growth and leaf freckle of sugarcane in Hawaii. *Proc Int Soc Sugarcane Tech* 12:197–21
- Cobbett C, Goldsbrough P (2002) Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol* 53:159–182
- Cobbett CS (2000) Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol* 123:825–832
- Cohu CM, Abdel-Ghany SE, Gogolin Reynolds KA, Onofrio AM, Bodecker JR, Kimbrel JA, Niyogi KK, Pilon M (2009) Copper Delivery by the Copper Chaperone for Chloroplast and Cytosolic Copper/Zinc-Superoxide Dismutases: Regulation and Unexpected Phenotypes in an *Arabidopsis* Mutant. *Mol Plant* 2:1336–1350
- Cohu CM, Pilon M (2007) Regulation of superoxide dismutase expression by copper availability. *Physiol Plant* 129:747–755
- Cohu CM, Pilon M (2010) Cell biology of copper. *Cell biology of metals and nutrients*. Springer, Berlin, pp 55–74
- Colangelo EP, Guerinot M Lou (2006) Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. *Curr Opin Plant Biol* 9:322–330
- Collin B, Doelsch E, Keller C, Cazevieille P, Tella M, Chaurand P, Panfili F, Hazemann J-L, Meunier

- J-D (2014) Evidence of sulfur-bound reduced copper in bamboo exposed to high silicon and copper concentrations. *Environ Pollut* 187:22–30
- Collins AR (2001) Carotenoids and genomic stability. *Mutat Res Mol Mech Mutagen* 475:21–28
- Cook CM, Vardaka E, Lanaras T (1997) Concentrations of Cu, growth, and chlorophyll content of field-cultivated wheat growing in naturally enriched Cu soil. *Bull Environ Contam Toxicol* 58:248–253
- Cornu J, Deinlein U, Höreth S, Braun M, Schmidt H, Weber M, Persson DP, Husted S, Schjoerring JK, Clemens S (2015) Contrasting effects of nicotianamine synthase knockdown on zinc and nickel tolerance and accumulation in the zinc/cadmium hyperaccumulator *A. rabilopsis halleri*. *New Phytol* 206:738–750
- Coskun D, Deshmukh R, Sonah H, Menzies JG, Reynolds O, Ma JF, Kronzucker HJ, Bélanger RR (2019) The controversies of silicon's role in plant biology. *New Phytol* 221:67–85
- Culotta VC, Joh H-D, Lin S-J, Slekar KH, Strain J (1995) A physiological role for *Saccharomyces cerevisiae* copper/zinc superoxide dismutase in copper buffering. *J Biol Chem* 270:29991–29997
- Culotta VC, Klomp LWJ, Strain J, Casareno RLB, Krems B, Gitlin JD (1997) The copper chaperone for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 272:23469–23472
- da Cunha KPV, do Nascimento CWA (2009) Silicon effects on metal tolerance and structural changes in maize (*Zea mays* L.) grown on a cadmium and zinc enriched soil. *Water Air Soil Pollut* 197:323
- Cuperus JT, Fahlgren N, Carrington JC (2011) Evolution and functional diversification of MIRNA genes. *Plant Cell* 23:431–442
- Curie C, Briat J-F (2003) Iron transport and signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* 54:183–206
- Curie C, Cassin G, Couch D, Divol F, Higuchi K, Le Jean M, Misson J, Schikora A, Czernic P, Mari S (2009) Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Ann Bot* 103:1–11
- Dancis A, Haile D, Yuan DS, Klausner RD (1994) The *Saccharomyces cerevisiae* copper transport protein (Ctr1p). Biochemical characterization, regulation by copper, and physiologic role in copper uptake. *J Biol Chem* 269:25660–25667
- Darley WM, Volcani BE (1969) Role of silicon in diatom metabolism: a silicon requirement for deoxyribonucleic acid synthesis in the diatom *Cylindrotheca fusiformis* Reimann and Lewin. *Exp Cell Res* 58:334–342
- Dat J, Vandenabeele S, Vranova E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci C* 57:779–795
- Davis RD, Beckett PHT (1978) Upper critical levels of toxic elements in plants: II. Critical levels of copper in young barley, wheat, rape, lettuce and ryegrass, and of nickel and zinc in young barley and ryegrass. *New Phytol* 80:23–32
- Davis TA, Volesky B, Mucci A (2003) A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water Res* 37:4311–4330
- Dean JFD, Eriksson K-EL (1994) Laccase and the deposition of lignin in vascular plants. *Holzforschung-International J Biol Chem Phys Technol Wood* 48:21–33
- Deinlein U, Weber M, Schmidt H, Rensch S, Trampczynska A, Hansen TH, Husted S, Schjoerring JK, Talke IN, Krämer U (2012) Elevated nicotianamine levels in *Arabidopsis halleri* roots play a key role in zinc hyperaccumulation. *Plant Cell* 24:708–723
- Demidchik V, Cuin TA, Svistunenko D, Smith SJ, Miller AJ, Shabala S, Sokolik A, Yurin V (2010) *Arabidopsis* root K<sup>+</sup>-efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death. *J Cell Sci* 123:1468–1479
- Demidchik V, Shabala SN, Coutts KB, Tester MA, Davies JM (2003) Free oxygen radicals regulate plasma membrane Ca<sup>2+</sup>- and K<sup>+</sup>-permeable channels in plant root cells. *J Cell Sci* 116:81–88

- Demidchik V, Straltsova D, Medvedev SS, Pozhvanov GA, Sokolik A, Yurin V (2014) Stress-induced electrolyte leakage: the role of K<sup>+</sup>-permeable channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment. *J Exp Bot* 65:1259–1270
- Deng F, Yamaji N, Xia J, Ma JF (2013) A member of the heavy metal P-type ATPase OsHMA5 is involved in xylem loading of copper in rice. *Plant Physiol* 163:1353–1362
- DiDonato RJ, Roberts LA, Sanderson T, Eisley RB, Walker EL (2004) Arabidopsis Yellow Stripe-Like2 (YSL2): a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine-metal complexes. *Plant J* 39:403–414
- Ding Y-F, Zhu C (2009) The role of microRNAs in copper and cadmium homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun* 386:6–10
- Dismukes GC, Klimov V V, Baranov S V, Kozlov YN, DasGupta J, Tyrishkin A (2001) The origin of atmospheric oxygen on Earth: the innovation of oxygenic photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci* 98:2170–2175
- Dixon RA, Paiva NL (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7:1085
- Dizdaroglu M, Laval J, Boiteux S (1993) Substrate specificity of the Escherichia coli endonuclease III: excision of thymine- and cytosine-derived lesions in DNA produced by radiation-generated free radicals. *Biochemistry* 32:12105–12111
- Díaz J, Bernal A, Pomar F, Merino F (2001) Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. *Plant Sci* 161:179–188
- Dong J, Kim ST, Lord EM (2005) Plantacyanin plays a role in reproduction in Arabidopsis. *Plant Physiol* 138:778–789
- Donner E, Punshon T, Guerinot M Lou, Lombi E (2012) Functional characterisation of metal (loid) processes in planta through the integration of synchrotron techniques and plant molecular biology. *Anal Bioanal Chem* 402:3287–3298
- Dragišić Maksimović J, Bogdanović J, Maksimović V, Nikolic M (2007) Silicon modulates the metabolism and utilization of phenolic compounds in cucumber (*Cucumis sativus* L.) grown at excess manganese. *J Plant Nutr Soil Sci* 170:739–744
- Dragišić Maksimović J, Mojović M, Maksimović V, Römheld V, Nikolic M (2012) Silicon ameliorates manganese toxicity in cucumber by decreasing hydroxyl radical accumulation in the leaf apoplast. *J Exp Bot* 63:2411–2420
- Drażkiewicz M, Skórzyńska-Polit E, Krupa Z (2004) Copper-induced oxidative stress and antioxidant defence in Arabidopsis thaliana. *Biometals* 17:379–387
- Dronnet VM, Renard C, Axelos MA V, Thibault J-F (1996) Heavy metals binding by pectins: selectivity, quantification and characterisation. *Progress in Biotechnology*. Elsevier, pp 535–540
- Droppa M, Terry N, Horvath G (1984) Effects of Cu deficiency on photosynthetic electron transport. *Proc Natl Acad Sci* 81:2369–2373
- Dugas D V, Bartel B (2008) Sucrose induction of Arabidopsis miR398 represses two Cu/Zn superoxide dismutases. *Plant Mol Biol* 67:403–417
- Echevarría-Zomeño S, Yánguez E, Fernández-Bautista N, Castro-Sanz AB, Ferrando A, Castellano M (2013) Regulation of translation initiation under biotic and abiotic stresses. *Int J Mol Sci* 14:4670–4683
- Ecker DJ, Butt TR, Sternberg EJ, Neeper MP, Debouck C, Gorman JA, Crooke ST (1986) Yeast metallothionein function in metal ion detoxification. *J Biol Chem* 261:16895–16900
- Enomoto Y, Goto F (2013) Long-distance signaling of iron deficiency in plants. *Long-Distance Systemic Signaling and Communication in Plants*. Springer, Berlin, pp 167–188
- Van der Ent A, Baker AJM, Reeves RD, Pollard AJ, Schat H (2013) Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: facts and fiction. *Plant Soil* 362:319–334

- Epstein E (1994) The anomaly of silicon in plant biology. *Proc Natl Acad Sci* 91:11–17
- Epstein E (1999) Silicon. *Annu Rev Plant Biol* 50:641–664
- Epstein E, Bloom AJ (2005) Mineral nutrition of plants: principles and perspectives, 2nd edn. Sinauer Assoc. Inc, Sunderland, UK
- Esaka M, Fujisawa K, Goto M, Kisu Y (1992) Regulation of ascorbate oxidase expression in pumpkin by auxin and copper. *Plant Physiol* 100:231–237
- Etesami H, Jeong BR (2018) Silicon (Si): Review and future prospects on the action mechanisms in alleviating biotic and abiotic stresses in plants. *Ecotoxicol Environ Saf* 147:881–896
- Exley C (1998) Silicon in life: a bioinorganic solution to bioinorganic essentiality. *J Inorg Biochem* 69:139–144
- Exley C (2015) A possible mechanism of biological silicification in plants. *Front Plant Sci* 6:853
- Fahlgren N, Howell MD, Kasschau KD, Chapman EJ, Sullivan CM, Cumbie JS, Givan SA, Law TF, Grant SR, Dangl JL (2007) High-throughput sequencing of *Arabidopsis* microRNAs: evidence for frequent birth and death of MIRNA genes. *PLoS One* 2:
- Farooq MA, Ali S, Hameed A, Ishaque W, Mahmood K, Iqbal Z (2013) Alleviation of cadmium toxicity by silicon is related to elevated photosynthesis, antioxidant enzymes; suppressed cadmium uptake and oxidative stress in cotton. *Ecotoxicol Environ Saf* 96:242–249
- Farver O, Pecht I (1992) Low activation barriers characterize intramolecular electron transfer in ascorbate oxidase. *Proc Natl Acad Sci* 89:8283–8287
- Fauteux F, Chain F, Belzile F, Menzies JG, Bélanger RR (2006) The protective role of silicon in the *Arabidopsis*–powdery mildew pathosystem. *Proc Natl Acad Sci* 103:17554–17559
- Fauteux F, Rémus-Borel W, Menzies JG, Bélanger RR (2005) Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. *FEMS Microbiol Lett* 249:1–6
- Fawe A, Abou-Zaid M, Menzies JG, Bélanger RR (1998) Silicon-mediated accumulation of flavonoid phytoalexins in cucumber. *Phytopathology* 88:396–401
- Fawe A, Menzies JG, Chérif M, Bélanger RR (2001) Silicon and disease resistance in dicotyledons. *Studies in plant science*. Elsevier, Amsterdam, pp 159–169
- Feigl G, Kumar D, Lehotai N, Tugyi N, Molnár Á, Ördög A, Szepesi Á, Gémes K, Laskay G, Erdei L (2013) Physiological and morphological responses of the root system of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.) and rapeseed (*Brassica napus* L.) to copper stress. *Ecotoxicol Environ Saf* 94:179–189
- Fernández-Calviño D, Rodríguez-Suárez JA, López-Periago E, Arias-Estévez M, Simal-Gándara J (2008) Copper content of soils and river sediments in a winegrowing area, and its distribution among soil or sediment components. *Geoderma* 145:91–97
- Festa RA, Thiele DJ (2011) Copper: an essential metal in biology. *Curr Biol* 21:R877–R883
- Fink RC, Scandalios JG (2002) Molecular evolution and structure–function relationships of the superoxide dismutase gene families in angiosperms and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic superoxide dismutases. *Arch Biochem Biophys* 399:19–36
- Fleck AT, Mattusch J, Schenk MK (2013) Silicon decreases the arsenic level in rice grain by limiting arsenite transport. *J Plant Nutr Soil Sci* 176:785–794
- Flora C, Khandekar S, Boldt J, Leisner S (2019) Silicon alleviates long-term copper toxicity and influences gene expression in *Nicotiana tabacum*. *J Plant Nutr* 42:864–878
- Flores-Cáceres ML, Hattab S, Hattab S, Boussetta H, Banni M, Hernández LE (2015) Specific mechanisms of tolerance to copper and cadmium are compromised by a limited concentration of glutathione in alfalfa plants. *Plant Sci* 233:165–173
- Flores-Velez LM, Ducaroir J, Jaunet AM, Robert M (1996) Study of the distribution of copper in an acid sandy vineyard soil by three different methods. *Eur J Soil Sci* 47:523–532
- Fotopoulos V, Sanmartin M, Kanellis AK (2006) Effect of ascorbate oxidase over-expression on

- ascorbate recycling gene expression in response to agents imposing oxidative stress. *J Exp Bot* 57:3933–3943
- Foy CD, Chaney RL, White MC (1978) The Physiology of Metal Toxicity in Plants. *Annu Rev Plant Physiol* 29:511–566
- Frantz JM, Khandekar S, Leisner S (2011) Silicon differentially influences copper toxicity response in silicon-accumulator and non-accumulator species. *J Am Soc Hortic Sci* 136:329–338
- Frébort I, Šebela M, Svendsen I, Hirota S, Endo M, Yamauchi O, Bellelli A, Lemr K, Peč P (2000) Molecular mode of interaction of plant amine oxidase with the mechanism-based inhibitor 2-butyn-1, 4-diamine. *Eur J Biochem* 267:1423–1433
- Frei M (2013) Lignin: characterization of a multifaceted crop component. *Sci World J* 2013:
- Frew A, Weston LA, Reynolds OL, Gurr GM (2018) The role of silicon in plant biology: a paradigm shift in research approach. *Ann Bot* 121:1265–1273
- Fridovich I (1983) Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 23:239–257
- Fryer MJ (1992) The antioxidant effects of thylakoid vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol). *Plant Cell Environ* 15:381–392
- Gajewska E, Sklodowska M (2010) Differential effect of equal copper, cadmium and nickel concentration on biochemical reactions in wheat seedlings. *Ecotoxicol Environ Saf* 73:996–1003
- Gallego SM, Benavides MP, Tomaro ML (1996) Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Sci* 121:151–159
- Gallie DR (2015) Appearance and elaboration of the ethylene receptor family during land plant evolution. *Plant Mol Biol* 87:521–539
- Gao X, Zou C, Wang L, Zhang F (2006) Silicon decreases transpiration rate and conductance from stomata of maize plants. *J Plant Nutr* 29:1637–1647
- Garcia-Molina A, Andrés-Colás N, Perea-García A, Neumann U, Dodani SC, Huijser P, Peñarrubia L, Puig S (2013) The Arabidopsis COPT6 transport protein functions in copper distribution under copper-deficient conditions. *Plant Cell Physiol* 54:1378–1390
- Garcia-Molina A, Andrés-Colás N, Perea-García A, del Valle-Tascón S, Peñarrubia L, Puig S (2011) The intracellular Arabidopsis COPT5 transport protein is required for photosynthetic electron transport under severe copper deficiency. *Plant J* 65:848–860
- Garcia-Molina A, Xing S, Huijser P (2014) Functional characterisation of Arabidopsis SPL7 conserved protein domains suggests novel regulatory mechanisms in the Cu deficiency response. *BMC Plant Biol* 14:231
- Gasic K, Korban SS (2007) Transgenic Indian mustard (*Brassica juncea*) plants expressing an Arabidopsis phytochelatin synthase (*AtPCS1*) exhibit enhanced As and Cd tolerance. *Plant Mol Biol* 64:361–369
- Gavnholt B, Larsen K (2002) Molecular biology of plant laccases in relation to lignin formation. *Physiol Plant* 116:273–280
- Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol* 59:309–314
- Gill SS, Anjum NA, Gill R, Yadav S, Hasanuzzaman M, Fujita M, Mishra P, Sabat SC, Tuteja N (2015) Superoxide dismutase—mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. *Environ Sci Pollut Res* 22:10375–10394
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* 48:909–930
- Gong HJ, Randall DP, Flowers TJ (2006) Silicon deposition in the root reduces sodium uptake in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings by reducing bypass flow. *Plant Cell Environ* 29:1970–1979
- Gonzalez-Mendoza D, Moreno AQ, Zapata-Perez O (2007) Coordinated responses of phytochelatin

- synthase and metallothionein genes in black mangrove, *Avicennia germinans*, exposed to cadmium and copper. *Aquat Toxicol* 83:306–314
- Grace SC, Logan BA (2000) Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Philos Trans R Soc London Ser B Biol Sci* 355:1499–1510
- Grotz N, Fox T, Connolly E, Park W, Guerinot M Lou, Eide D (1998) Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. *Proc Natl Acad Sci* 95:7220–7224
- Gu H-H, Zhan S-S, Wang S-Z, Tang Y-T, Chaney RL, Fang X-H, Cai X-D, Qiu R-L (2012) Silicon-mediated amelioration of zinc toxicity in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Plant Soil* 350:193–204
- Guan Z, Chai T, Zhang Y, Xu J, Wei W (2009) Enhancement of Cd tolerance in transgenic tobacco plants overexpressing a Cd-induced catalase cDNA. *Chemosphere* 76:623–630
- Guntzer F, Keller C, Meunier J-D (2012) Benefits of plant silicon for crops: a review. *Agron Sustain Dev* 32:201–213
- Guo W-J, Meenam M, Goldsbrough PB (2008) Examining the specific contributions of individual *Arabidopsis* metallothioneins to copper distribution and metal tolerance. *Plant Physiol* 146:1697–1706
- Guo W, Bundithya W, Goldsbrough PB (2003) Characterization of the *Arabidopsis* metallothionein gene family: tissue-specific expression and induction during senescence and in response to copper. *New Phytol* 159:369–381
- Gutteridge JMC, Halliwell B (1989) 1 Iron toxicity and oxygen radicals. *Baillieres Clin Haematol* 2:195–256
- Guyot S, Vercauteren J, Cheynier V (1996) Structural determination of colourless and yellow dimers resulting from (+)-catechin coupling catalysed by grape polyphenoloxidase. *Phytochemistry* 42:1279–1288
- Hajiboland R, Cherghvareh L, Dashtebani F (2016) Effect of silicon supplementation on wheat plants under salt stress. *J Plant Process Funct* 5:1–12
- Hall AD, Morison CGT (1906) On the function of silica in the nutrition of cereals.—Part I. *Proc R Soc London Ser B, Contain Pap a Biol Character* 77:455–477
- Hall JL (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot* 53:1–11
- Halliwell B (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 141:312–322
- Halliwell B, Gutteridge JM (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219:1–14
- Hamer DH (1986) Metallothionein. *Annu Rev Biochem* 55:913–951
- Hammond KE, Evans DE, Hodson MJ (1995) Aluminium/silicon interactions in barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *Plant Soil* 173:89–95
- Han C, Liu Q, Yang Y (2009) Short-term effects of experimental warming and enhanced ultraviolet-B radiation on photosynthesis and antioxidant defense of *Picea asperata* seedlings. *Plant Growth Regul* 58:153–162
- Hanson KR (1981) Phenylalanine ammonialyase. *Secondary Plant products*. Academic Press, New York, pp 577–625
- Harrison MD, Jones CE, Dameron CT (1999) Copper chaperones: function, structure and copper-binding properties. *JBIC J Biol Inorg Chem* 4:145–153
- Harrison PM, Hoare RJ (1980) *Metals in biochemistry*. Springer, Dordrecht
- Hartley-Whitaker J, Ainsworth G, Meharg AA (2001) Copper- and arsenate-induced oxidative stress in *Holcus lanatus* L. clones with differential sensitivity. *Plant Cell Environ* 24:713–722
- Hartley RD, Jones LHP (1972) Silicon compounds in xylem exudates of plants. *J Exp Bot* 23:637–640
- Hartley SE (2015) Round and round in cycles? Silicon-based plant defences and vole population

- dynamics. *Funct Ecol* 29:151–153
- Hashemi A, Abdolzadeh A, Sadeghipour HR (2010) Beneficial effects of silicon nutrition in alleviating salinity stress in hydroponically grown canola, *Brassica napus* L., plants. *Soil Sci Plant Nutr* 56:244–253
- Hassett R, Kosman DJ (1995) Evidence for Cu (II) reduction as a component of copper uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 270:128–134
- Hattori T, Inanaga S, Araki H, An P, Morita S, Luxová M, Lux A (2005) Application of silicon enhanced drought tolerance in *Sorghum bicolor*. *Physiol Plant* 123:459–466
- Havir EA, McHale NA (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol* 84:450–455
- Haydon M, Cobbett CS (2007) Haydon, M.J. & Cobbett, C.S. Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *New Phytol.* 174, 499-506.
- Hazama K, Nagata S, Fujimori T, Yanagisawa S, Yoneyama T (2015) Concentrations of metals and potential metal-binding compounds and speciation of Cd, Zn and Cu in phloem and xylem saps from castor bean plants (*Ricinus communis*) treated with four levels of cadmium. *Physiol Plant* 154:243–255
- Henriet C, Draye X, Oppitz I, Swennen R, Delvaux B (2006) Effects, distribution and uptake of silicon in banana (*Musa* spp.) under controlled conditions. *Plant Soil* 287:359–374
- Herbik A, Giritch A, Horstmann C, Becker R, Balzer H-J, Baumlein H, Stephan UW (1996) Iron and copper nutrition-dependent changes in protein expression in a tomato wild type and the nicotianamine-free mutant chloronerva. *Plant Physiol* 111:533–540
- Higuchi K, Nishizawa N-K, Yamaguchi H, Römheld V, Marschner H, Mori S (1995) Response of nicotianamine synthase activity to Fe-deficiency in tobacco plants as compared with barley. *J Exp Bot* 46:1061–1063
- Higuchi K, Nishizawa N, Römheld V, Marschner H, Mori S (1996) Absence of nicotianamine synthase activity in the tomato mutant 'chloronerva.' *J Plant Nutr* 19:1235–1239
- Himelblau E, Mira H, Lin S-J, Culotta VC, Penarrubia L, Amasino RM (1998) Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene ATX1 from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 117:1227–1234
- Hirayama T, Alonso JM (2000) Ethylene captures a metal! Metal ions are involved in ethylene perception and signal transduction. *Plant cell Physiol* 41:548–555
- Von Hodenberg A, Finck A (1975) Determination of toxicity limiting values of Zn, Cu and Pb for oat and red clover. *Z Pflanzenern Bodenk* 4:489
- Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207:604–611
- Hodson MJ, White PJ, Mead A, Broadley MR (2005) Phylogenetic variation in the silicon composition of plants. *Ann Bot* 96:1027–1046
- Hornig Y-C, Cobine PA, Maxfield AB, Carr HS, Winge DR (2004) Specific copper transfer from the Cox17 metallochaperone to both Sco1 and Cox11 in the assembly of yeast cytochrome C oxidase. *J Biol Chem* 279:35334–35340
- Horst WJ, Fecht M, Naumann A, Wissemeier AH, Maier P (1999) Physiology of manganese toxicity and tolerance in *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *J Plant Nutr Soil Sci* 162:263–274
- Horst WJ, Marschner H (1978) Effect of silicon on manganese tolerance of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Soil* 50:287–303
- Hossain MA, Piyatida P, da Silva JAT, Fujita M (2012) Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. *J Bot* 2012:



- Huang C-H, Kuo W-Y, Weiss C, Jinn T-L (2012) Copper chaperone-dependent and-independent activation of three copper-zinc superoxide dismutase homologs localized in different cellular compartments in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 158:737–746
- Huffman DL, O'Halloran T V (2001) Function, structure, and mechanism of intracellular copper trafficking proteins. *Annu Rev Biochem* 70:677–701
- Ingle RA, Mugford ST, Rees JD, Campbell MM, Smith JAC (2005) Constitutively high expression of the histidine biosynthetic pathway contributes to nickel tolerance in hyperaccumulator plants. *Plant Cell* 17:2089–2106
- Inzé D, Van Montagu M (1995) Oxidative stress in plants. *Curr Opin Biotechnol* 6:153–158
- Irtelli B, Petrucci WA, Navari-Izzo F (2008) Nicotianamine and histidine/proline are, respectively, the most important copper chelators in xylem sap of *Brassica carinata* under conditions of copper deficiency and excess. *J Exp Bot* 60:269–277
- Iwasaki K, Maier P, Fecht M, Horst WJ (2002) Effects of silicon supply on apoplastic manganese concentrations in leaves and their relation to manganese tolerance in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Plant Soil* 238:281–288
- Iwasaki K zō, Sakurai K, Takahashi E (1990) Copper binding by the root cell walls of Italian ryegrass and red clover. *Soil Sci Plant Nutr* 36:431–439
- Iwasaki Y, Hirasawa T, Maruyama Y, Ishii Y, Ito R, Saito K, Umemura T, Nishikawa A, Nakazawa H (2011) Effect of interaction between phenolic compounds and copper ion on antioxidant and pro-oxidant activities. *Toxicol Vitr* 25:1320–1327
- Jackson C, Dench J, Moore AL, Halliwell B, Foyer CH, Hall DO (1978) Subcellular localisation and identification of superoxide dismutase in the leaves of higher plants. *Eur J Biochem* 91:339–344
- Janicka-Russak M, Kabała K, Burzyński M (2012) Different effect of cadmium and copper on H<sup>+</sup>-ATPase activity in plasma membrane vesicles from *Cucumis sativus* roots. *J Exp Bot* 63:4133–4142
- Jarvis SC, Jones LHP (1987) The absorption and transport of manganese by perennial ryegrass and white clover as affected by silicon. *Plant Soil* 99:231–240
- Jarvis SC, Whitehead DC (1981) The influence of some soil and plant factors on the concentration of copper in perennial ryegrass. *Plant Soil* 60:275–286
- Jie Yang M, E Yang X, Römheld V (2002) Growth and nutrient composition of *Elsholtzia splendens* Nakai under copper toxicity. *J Plant Nutr* 25:1359–1375
- Jimenez A, Hernandez JA, del Río LA, Sevilla F (1997) Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiol* 114:275–284
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP (2004) Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell* 14:787–799
- Jouvin D, Weiss DJ, Mason TFM, Bravin MN, Louvat P, Zhao F, Ferec F, Hinsinger P, Benedetti MF (2012) Stable isotopes of Cu and Zn in higher plants: evidence for Cu reduction at the root surface and two conceptual models for isotopic fractionation processes. *Environ Sci Technol* 46:2652–2660
- Jovanović Ž, Stanisavljević N, Mikić A, Radović S, Maksimović V (2014) Water deficit down-regulates miR398 and miR408 in pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiol Biochem* 83:26–31
- Jung H, Gayomba SR, Rutzke MA, Craft E, Kochian L V, Vatamaniuk OK (2012) COPT6 is a plasma membrane transporter that functions in copper homeostasis in *Arabidopsis* and is a novel target of SQUAMOSA promoter-binding protein-like 7. *J Biol Chem* 287:33252–33267
- Kabata-Pendias A, Pendias H (2001) Trace elements in soils and plants. CRC Press, Boca Raton
- Kabir AH, Hossain MM, Khatun MA, Mandal A, Haider SA (2016) Role of silicon counteracting cadmium toxicity in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Front Plant Sci* 7:1117
- Kadenbach B, Hüttemann M, Arnold S, Lee I, Bender E (2000) Mitochondrial energy metabolism is

- regulated via nuclear-coded subunits of cytochrome c oxidase. *Free Radic Biol Med* 29:211–221
- Kagan VE, Fabisiak JP, Quinn PJ (2000) Coenzyme Q and vitamin E need each other as antioxidants. *Protoplasma* 214:11–18
- Kaim W, Rall J (1996) Copper—a “modern” bioelement. *Angew Chemie Int Ed English* 35:43–60
- Kaiser BN, Moreau S, Castelli J, Thomson R, Lambert A, Bogliolo S, Puppo A, Day DA (2003) The soybean NRAMP homologue, GmDMT1, is a symbiotic divalent metal transporter capable of ferrous iron transport. *Plant J* 35:295–304
- Kaplan M (1999) Accumulation of copper in soils and leaves of tomato plants in greenhouses in Turkey. *J Plant Nutr* 22:237–244
- Kartel MT, Kupchik LA, Veisov BK (1999) Evaluation of pectin binding of heavy metal ions in aqueous solutions. *Chemosphere* 38:2591–2596
- Karuppanapandian T, Moon J-C, Kim C, Manoharan K, Kim W (2011) Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Aust J Crop Sci* 5:709
- Keller C, Rizwan M, Davidian J-C, Pokrovsky OS, Bovet N, Chaurand P, Meunier J-D (2015) Effect of silicon on wheat seedlings (*Triticum turgidum* L.) grown in hydroponics and exposed to 0 to 30  $\mu$ M Cu. *Planta* 241:847–860
- Kerkeb L, Krämer U (2003) The Role of Free Histidine in Xylem Loading of Nickel in *Alyssum lesbiacum* and *Brassica juncea*. *Plant Physiol* 131:716–724
- Khandekar S, Leisner S (2011) Soluble silicon modulates expression of *Arabidopsis thaliana* genes involved in copper stress. *J Plant Physiol* 168:699–705
- Kidd PS, Llugany M, Poschenrieder CH, Gunse B, Barcelo J (2001) The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.). *J Exp Bot* 52:1339–1352
- Kim HJ, Kato N, Kim S, Triplett B (2008) Cu/Zn superoxide dismutases in developing cotton fibers: evidence for an extracellular form. *Planta* 228:281
- Kim S, Takahashi M, Higuchi K, Tsunoda K, Nakanishi H, Yoshimura E, Mori S, Nishizawa NK (2005) Increased nicotianamine biosynthesis confers enhanced tolerance of high levels of metals, in particular nickel, to plants. *Plant Cell Physiol* 46:1809–1818
- Kim Y-H, Khan AL, Kim D-H, Lee S-Y, Kim K-M, Waqas M, Jung H-Y, Shin J-H, Kim J-G, Lee I-J (2014) Silicon mitigates heavy metal stress by regulating P-type heavy metal ATPases, *Oryza sativa* low silicon genes, and endogenous phytohormones. *BMC Plant Biol* 14:13
- Kishinami I, Widholm JM (1987) Characterization of Cu and Zn resistant *Nicotiana plumbaginifolia* suspension cultures. *Plant Cell Physiol* 28:203–210
- Klatte M, Schuler M, Wirtz M, Fink-Straube C, Hell R, Bauer P (2009) The analysis of *Arabidopsis* nicotianamine synthase mutants reveals functions for nicotianamine in seed iron loading and iron deficiency responses. *Plant Physiol* 150:257–271
- Klaumann S, Nickolaus SD, Fürst SH, Starck S, Schneider S, Ekkehard Neuhaus H, Trentmann O (2011) The tonoplast copper transporter COPT5 acts as an exporter and is required for interorgan allocation of copper in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 192:393–404
- Kliebenstein DJ, Monde R-A, Last RL (1998) Superoxide Dismutase in *Arabidopsis*: An Eclectic Enzyme Family with Disparate Regulation and Protein Localization. *Plant Physiol* 118:637–650
- Kluthcouski J, Nelson LE (1980) The effect of silicon on the manganese nutrition of soybeans (*Glycine max* (L.) Merrill). *Plant Soil* 56:157–160
- Kobayashi Y, Kuroda K, Kimura K, Southron-Francis JL, Furuzawa A, Kimura K, Iuchi S, Kobayashi M, Taylor GJ, Koyama H (2008) Amino acid polymorphisms in strictly conserved domains of a P-type ATPase HMA5 are involved in the mechanism of copper tolerance variation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 148:969–980
- Koch KA, Peña MMO, Thiele DJ (1997) Copper-binding motifs in catalysis, transport, detoxification

- and signaling. *Chem Biol* 4:549–560
- Kochian L V, Hoekenga OA, Pineros MA (2004) How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annu Rev Plant Biol* 55:459–493
- Komárek M, Čadková E, Chrástný V, Bordas F, Bollinger J-C (2010) Contamination of vineyard soils with fungicides: a review of environmental and toxicological aspects. *Environ Int* 36:138–151
- Kono Y, Fridovich I (1982) Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem* 257:5751–5754
- Kopittke PM, Blamey FPC, Asher CJ, Menzies NW (2010) Trace metal phytotoxicity in solution culture: a review. *J Exp Bot* 61:945–954
- Kopittke PM, Menzies NW (2006) Effect of Cu toxicity on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Plant Soil* 279:287–296
- Kopittke PM, Menzies NW, de Jonge MD, McKenna BA, Donner E, Webb RI, Paterson DJ, Howard DL, Ryan CG, Glover CJ (2011) In situ distribution and speciation of toxic copper, nickel, and zinc in hydrated roots of cowpea. *Plant Physiol* 156:663–673
- Kostic L, Nikolic N, Bosnic D, Samardzic J, Nikolic M (2017) Silicon increases phosphorus (P) uptake by wheat under low P acid soil conditions. *Plant Soil* 419:
- Kováčik J, Grúz J, Bačkor M, Tomko J, Strnad M, Repčák M (2008) Phenolic compounds composition and physiological attributes of *Matricaria chamomilla* grown in copper excess. *Environ Exp Bot* 62:145–152
- Kováčik J, Klejdus B (2008) Dynamics of phenolic acids and lignin accumulation in metal-treated *Matricaria chamomilla* roots. *Plant Cell Rep* 27:605–615
- Kováčik J, Tomko J, Bačkor M, Repčák M (2006) *Matricaria chamomilla* is not a hyperaccumulator, but tolerant to cadmium stress. *Plant Growth Regul* 50:239–247
- Krämer U, Clemens S (2005) Functions and homeostasis of zinc, copper, and nickel in plants. *Molecular biology of metal homeostasis and detoxification*. Springer, Berlin, pp 215–271
- Krämer U, Cotter-Howells JD, Charnock JM, Baker AJM, Smith JAC (1996) Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* 379:635–638
- Krämer U, Pickering IJ, Prince RC, Raskin I, Salt DE (2000) Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species. *Plant Physiol* 122:1343–1354
- Kreps JA, Wu Y, Chang H-S, Zhu T, Wang X, Harper JF (2002) Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol* 130:2129–2141
- Kropat J, Tottey S, Birkenbihl RP, Depege N, Huijser P, Merchant S (2005) A regulator of nutritional copper signaling in *Chlamydomonas* is an SBP domain protein that recognizes the GTAC core of copper response element. *Proc Natl Acad Sci* 102:18730–18735
- Krzesłowska M (2011) The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy. *Acta Physiol Plant* 33:35–51
- Kumar S, Soukup M, Elbaum R (2017) Silicification in grasses: variation between different cell types. *Front Plant Sci* 8:438
- Kumar V, Dooley DM, Freeman HC, Guss JM, Harvey I, McGuirl MA, Wilce MCJ, Zubak VM (1996) Crystal structure of a eukaryotic (pea seedling) copper-containing amine oxidase at 2.2 Å resolution. *Structure* 4:943–955
- Kuper J, Llamas A, Hecht H-J, Mendel RR, Schwarz G (2004) Structure of the molybdopterin-bound Cnx1G domain links molybdenum and copper metabolism. *Nature* 430:803–806
- Küpper H, Götz B, Mijovilovich A, Küpper FC, Meyer-Klaucke W (2009) Complexation and Toxicity of Copper in Higher Plants. I. Characterization of Copper Accumulation, Speciation, and Toxicity in *Crassula helmsii* as a New Copper Accumulator. *Plant Physiol* 151:702–714
- Kupper H, Kroneck PMH (2005) Heavy metal uptake by plants and cyanobacteria. *Met Ions Biol Syst* 44:97
- Küpper H, Mijovilovich A, Meyer-Klaucke W, Kroneck PMH (2004) Tissue- and age-dependent

- differences in the complexation of cadmium and zinc in the cadmium/zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (Ganges ecotype) revealed by X-ray absorption spectroscopy. *Plant Physiol* 134:748–757
- Küpper H, Šetlík I, Šetliková E, Ferimazova N, Spiller M, Küpper FC (2003) Copper-induced inhibition of photosynthesis: limiting steps of in vivo copper chlorophyll formation in *Scenedesmus quadricauda*. *Funct Plant Biol* 30:1187–1196
- Kwiatowski J, Kaniuga Z (1986) Isolation and characterization of cytosolic and chloroplast isoenzymes of Cu, Zn-superoxide dismutase from tomato leaves and their relationships to other Cu, Zn-superoxide dismutases. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Protein Struct Mol Enzymol* 874:99–115
- Kwon SY, Jeong YJ, Lee HS, Kim JS, Cho KY, Allen RD, Kwak SS (2002) Enhanced tolerances of transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against methyl viologen-mediated oxidative stress. *Plant Cell Environ* 25:873–882
- LaFayette PR, Eriksson K-EL, Dean JFD (1999) Characterization and heterologous expression of laccase cDNAs from xylem tissues of yellow-poplar (*Liriodendron tulipifera*). *Plant Mol Biol* 40:23–35
- Lange B, van der Ent A, Baker AJM, Echevarria G, Mahy G, Malaisse F, Meerts P, Pourret O, Verbruggen N, Faucon M (2017) Copper and cobalt accumulation in plants: a critical assessment of the current state of knowledge. *New Phytol* 213:537–551
- Lee S-H, Ahsan N, Lee K-W, Kim D-H, Lee D-G, Kwak S-S, Kwon S-Y, Kim T-H, Lee B-H (2007) Simultaneous overexpression of both CuZn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in transgenic tall fescue plants confers increased tolerance to a wide range of abiotic stresses. *J Plant Physiol* 164:1626–1638
- Lee S, Jeon US, Lee SJ, Kim Y-K, Persson DP, Husted S, Schjørring JK, Kakei Y, Masuda H, Nishizawa NK (2009) Iron fortification of rice seeds through activation of the nicotianamine synthase gene. *Proc Natl Acad Sci* 106:22014–22019
- Lee S, Kang BS (2005) Phytochelatin is not a primary factor in determining copper tolerance. *J Plant Biol* 48:32–38
- Leitenmaier B, Küpper H (2013) Compartmentation and complexation of metals in hyperaccumulator plants. *Front Plant Sci* 4:374
- Leng X, Wang P, Zhao P, Wang M, Cui L, Shangguan L, Wang C (2017) Conservation of microRNA-mediated regulatory networks in response to copper stress in grapevine. *Plant Growth Regul* 82:293–304
- Leopold I, Günther D, Schmidt J, Neumann D (1999) Phytochelatins and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* 50:1323–1328
- Lewin J, Reimann BEF (1969) Silicon and plant growth. *Annu Rev Plant Physiol* 20:289–304
- Lewis NG (1999) Lignans: biosynthesis and function. *Compr Nat Prod Chem* 1:639–712
- Lexmond TM, Van der Vorm PDJ (1981) The effect of pH on copper toxicity to hydroponically grown maize. *Netherlands J Agric Sci* 29:217–238
- Li H-M, Theg SM, Bauerle CM, Keegstra K (1990) Metal-ion-center assembly of ferredoxin and plastocyanin in isolated chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci* 87:6748–6752
- Li J, Leisner SM, Frantz J (2008) Alleviation of copper toxicity in *Arabidopsis thaliana* by silicon addition to hydroponic solutions. *J Am Soc Hortic Sci* 133:670–677
- Li L, Zheng C, Fu Y, Wu D, Yang X, Shen H (2012) Silicate-mediated alleviation of Pb toxicity in banana grown in Pb-contaminated soil. *Biol Trace Elem Res* 145:101–108
- Li W-B, Shi X-H, Wang H, Zhang F-S (2004) Effects of silicon on rice leaves resistance to ultraviolet-B. *ACTA Bot Sin Ed* 46:691–697
- Lian S (1976) Silica fertilization of rice. *Fertility of Paddy Soils and Fertilizer Applications For Rice*. Food Fertilizer Technology Center, Taipei, pp 197–220

- Liang Y, Hua H, Zhu Y, Zhang J, Cheng C, Römheld V (2006) Importance of plant species and external silicon concentration to active silicon uptake and transport. *New Phytol* 172:63–72
- Liang Y, Nikolic M, Bélanger R, Gong H, Song A (2015) Silicon-mediated tolerance to metal toxicity. *Silicon in Agriculture*. Springer, Dordrecht, pp 83–122
- Liang Y, Si J, Römheld V (2005a) Silicon uptake and transport is an active process in *Cucumis sativus*. *New Phytol* 167:797–804
- Liang Y, Wong JWC, Wei L (2005b) Silicon-mediated enhancement of cadmium tolerance in maize (*Zea mays* L.) grown in cadmium contaminated soil. *Chemosphere* 58:475–483
- Liao MT, Hedley MJ, Woolley DJ, Brooks RR, Nichols MA (2000) Copper uptake and translocation in chicory (*Cichorium intybus* L. cv Grasslands Puna) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv Rondy) plants grown in NFT system. II. The role of nicotianamine and histidine in xylem sap copper transport. *Plant Soil* 223:243–252
- Lidon FC, Henriques FS (1991) Limiting step on photosynthesis of rice plants treated with varying copper levels. *J Plant Physiol* 138:115–118
- Lidon FC, Henriques FS (1993) Effects of copper toxicity on growth and the uptake and translocation of metals in rice plants. *J Plant Nutr* 16:1449–1464
- Lin C-C, Chen L-M, Liu Z-H (2005) Rapid effect of copper on lignin biosynthesis in soybean roots. *Plant Sci* 168:855–861
- Lin J-T, Liu S-C, Shen Y-C, Yang D-J (2011) Comparison of Various Preparation Methods for Determination of Organic Acids in Fruit Vinegars with a Simple Ion-Exclusion Liquid Chromatography. *Food Anal Methods* 4:531–539
- Lin S-L, Wu L (1994) Effects of copper concentration on mineral nutrient uptake and copper accumulation in protein of copper-tolerant and nontolerant *Lotus purshianus* L. *Ecotoxicol Environ Saf* 29:214–228
- Linder MC, Goode CA (1991) *Biochemistry of copper*. Plenum Press, New York
- Lippard SJ, Berg JM (1994) *Principles of bioinorganic chemistry*. University Science Books, Mill Valley
- Liu D, Jang W, Hou W (2001) Uptake and accumulation of copper by roots and shoots of maize (*Zea mays* L.). *J Environ Sci* 13:228–232
- Liu Q, Zheng L, He F, Zhao F-J, Shen Z, Zheng L (2015) Transcriptional and physiological analyses identify a regulatory role for hydrogen peroxide in the lignin biosynthesis of copper-stressed rice roots. *Plant Soil* 387:323–336
- Lobell DB, Schlenker W, Costa-Roberts J (2011) Climate trends and global crop production since 1980. *Science* (80- ) 333:616–620
- Lombi E, Scheckel KG, Kempson IM (2011) In situ analysis of metal (loid) s in plants: state of the art and artefacts. *Environ Exp Bot* 72:3–17
- Loneragan JF, Delhaize E, Webb J (1982) Enzymic diagnosis of copper deficiency in subterranean clover. I. Relationship of ascorbate oxidase activity in leaves to plant copper status. *Aust J Agric Res* 33:967–979
- Loneragan JF, Graham RD, Robson AD (1981) *Copper in soils and plants*. Academic Press, Sydney
- Lopez-Huertas E, Charlton WL, Johnson B, Graham IA, Baker A (2000) Stress induces peroxisome biogenesis genes. *EMBO J* 19:6770–6777
- Lu S, Li Q, Wei H, Chang M-J, Tunlaya-Anukit S, Kim H, Liu J, Song J, Sun Y-H, Yuan L (2013) Ptr-miR397a is a negative regulator of laccase genes affecting lignin content in *Populus trichocarpa*. *Proc Natl Acad Sci* 110:10848–10853
- Lu S, Sun Y-H, Shi R, Clark C, Li L, Chiang VL (2005) Novel and mechanical stress-responsive microRNAs in *Populus trichocarpa* that are absent from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17:2186–2203
- Lu S, Yang C, Chiang VL (2011) Conservation and Diversity of MicroRNA-associated Copper-

- regulatory Networks in *Populus trichocarpa* F. *J Integr Plant Biol* 53:879–891
- Lux A, Vaculík M, Kováč J (2015) Improved methods for clearing and staining of plant samples. *Plant microtechniques and protocols*. Springer, Berlin, pp 167–178
- Ma C, Burd S, Lers A (2015a) mi R 408 is involved in abiotic stress responses in *A. rabidopsis*. *Plant J* 84:169–187
- Ma J, Cai H, He C, Zhang W, Wang L (2015b) A hemicellulose-bound form of silicon inhibits cadmium ion uptake in rice (*Oryza sativa*) cells. *New Phytol* 206:1063–1074
- Ma J, Nishimura K, Takahashi E (1989) Effect of silicon on the growth of rice plant at different growth stages. *Soil Sci Plant Nutr* 35:347–356
- Ma J, Takahashi E (1990) Effect of silicon on the growth and phosphorus uptake of rice. *Plant Soil* 126:115–119
- Ma JF, Miyake Y, Takahashi E (2001) Silicon as a beneficial element for crop plants. *Silicon in Agriculture*. Elsevier, Amsterdam, pp 17–39
- Ma JF, Takahashi E (2002) Soil, fertilizer, and plant silicon research in Japan. Elsevier, Amsterdam
- Ma JF, Tamai K, Yamaji N, Mitani N, Konishi S, Katsuhara M, Ishiguro M, Murata Y, Yano M (2006) A silicon transporter in rice. *Nature* 440:688–691
- Ma JF, Yamaji N (2015) A cooperative system of silicon transport in plants. *Trends Plant Sci* 20:435–442
- Ma JF, Yamaji N, Mitani N, Tamai K, Konishi S, Fujiwara T, Katsuhara M, Yano M (2007) An efflux transporter of silicon in rice. *Nature* 448:209–212
- Macnair MR (1981) The uptake of copper by plants of *Mimulus guttatus* differing in genotype primarily at a single major copper tolerance locus. *New Phytol* 88:723–730
- Maksymiec W (1998) Effect of copper on cellular processes in higher plants. *Photosynthetica* 34:321–342
- Mantovi P, Bonazzi G, Maestri E, Marmioli N (2003) Accumulation of copper and zinc from liquid manure in agricultural soils and crop plants. *Plant Soil* 250:249–257
- Mantri N, Patade V, Penna S, Ford R, Pang E (2012) Abiotic stress responses in plants: present and future. *Abiotic stress responses in plants*. Springer, New York, pp 1–19
- Marino M, Galvano M, Cambria A, Polticelli F, Desideri A (1995) Modelling the three-dimensional structure and the electrostatic potential field of two Cu, Zn superoxide dismutase variants from tomato leaves. *Protein Eng Des Sel* 8:551–556
- Marschner H (1995) *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press, London
- Martens DC, Westermann DT (1991) Fertilizer application for correcting micronutrient deficiencies. *Micronutrients in Agriculture*. Soil Science Society of America, Madison,
- Martens SN, Boyd RS (1994) The ecological significance of nickel hyperaccumulation: a plant chemical defense. *Oecologia* 98:379–384
- Martins LJ, Jensen LT, Simon JR, Keller GL, Winge DR (1998) Metalloregulation of FRE1 and FRE2 Homologs in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273:23716–23721
- Mateos-Naranjo E, Gallé A, Florez-Sarasa I, Perdomo JA, Galmés J, Ribas-Carbó M, Flexas J (2015) Assessment of the role of silicon in the Cu-tolerance of the C4 grass *Spartina densiflora*. *J Plant Physiol* 178:74–83
- Matysik J, Alia, Bhalu B, Mohanty P (2002) Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Curr Sci* 525–532
- May PM, Linder PW, Williams DR (1977) Computer simulation of metal-ion equilibria in biofluids: models for the low-molecular-weight complex distribution of calcium (II), magnesium (II), manganese (II), iron (III), copper (II), zinc (II), and lead (II) ions in human blood plasma. *J Chem Soc Dalt Trans* 588–595
- Mayer AM (2006) Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review. *Phytochemistry*

67:2318–2331

- Mayer AM, Staples RC (2002) Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60:551–565
- McCaig BC, Meagher RB, Dean JFD (2005) Gene structure and molecular analysis of the laccase-like multicopper oxidase (LMCO) gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 221:619–636
- McNaughton SJ, Tarrant JL (1983) Grass leaf silicification: natural selection for an inducible defense against herbivores. *Proc Natl Acad Sci* 80:790–791
- Meharg AA (1994) Integrated tolerance mechanisms: constitutive and adaptive plant responses to elevated metal concentrations in the environment. *Plant Cell Environ* 17:989–993
- Mendel RR (2005) Molybdenum: biological activity and metabolism. *Dalt Trans* 3404–3409
- Mengel D, Rehm G (2000) Fundamentals of fertilizer application. *Handb soil Sci*
- Merchant S, Bogorad L (1987) The Cu (II)-repressible plastidic cytochrome c. Cloning and sequence of a complementary DNA for the pre-apoprotein. *J Biol Chem* 262:9062–9067
- Merchant SS, Allen MD, Kropat J, Moseley JL, Long JC, Tottey S, Terauchi AM (2006) Between a rock and a hard place: trace element nutrition in *Chlamydomonas*. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Molecular Cell Res* 1763:578–594
- Meriga B, Reddy BK, Rao KR, Reddy LA, Kishor PBK (2004) Aluminium-induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice (*Oryza sativa*). *J Plant Physiol* 161:63–68
- Metwali MR, Gowayed SMH, Al-Maghrabi OA, Mosleh YY (2013) Evaluation of toxic effect of copper and cadmium on growth, physiological traits and protein profile of wheat (*Triticum aestivum* L.), maize (*Zea mays* L.) and sorghum (*Sorghum bicolor* L.). *World Appl Sci J* 21:301–304
- Meunier JD, Guntzer F, Kirman S, Keller C (2008) Terrestrial plant-Si and environmental changes. *Mineral Mag* 72:263–267
- Meyer JH, Keeping MG (2001) Past, present and future research of the role of silicon for sugarcane in southern Africa. *Silicon Agric* 8:257–275
- Miao Y-C, Liu C-J (2010) ATP-binding cassette-like transporters are involved in the transport of lignin precursors across plasma and vacuolar membranes. *Proc Natl Acad Sci* 107:22728–22733
- Michalak A (2006) Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish J Environ Stud* 15:
- Michaud AM, Chappellaz C, Hinsinger P (2008) Copper phytotoxicity affects root elongation and iron nutrition in durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.). *Plant Soil* 310:151–165
- Mijovilovich A, Leitenmaier B, Meyer-Klaucke W, Kroneck PMH, Götz B, Küpper H (2009) Complexation and toxicity of copper in higher plants. II. Different mechanisms for copper versus cadmium detoxification in the copper-sensitive cadmium/zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (Ganges ecotype). *Plant Physiol* 151:715–731
- Miller G, Shulaev V, Mittler R (2008) Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiol Plant* 133:481–489
- Mira H, Martínez-García F, Peñarrubia L (2001) Evidence for the plant-specific intercellular transport of the *Arabidopsis* copper chaperone CCH. *Plant J* 25:521–528
- Mirlean N, Roisenberg A, Chies JO (2007) Metal contamination of vineyard soils in wet subtropics (southern Brazil). *Environ Pollut* 149:10–17
- Mishra S, Dubey RS (2005) Heavy metal toxicity induced alterations in photosynthetic metabolism in plants. *Handb Photosynth* 2:845–863
- Misra KC (2000) Understanding mineral deposits. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Mitani N, Chiba Y, Yamaji N, Ma JF (2009a) Identification and characterization of maize and barley Lsi2-like silicon efflux transporters reveals a distinct silicon uptake system from that in rice. *Plant Cell* 21:2133–2142

- Mitani N, Ma JF, Iwashita T (2005) Identification of the silicon form in xylem sap of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiol* 46:279–283
- Mitani N, Yamaji N, Ago Y, Iwasaki K, Ma JF (2011) Isolation and functional characterization of an influx silicon transporter in two pumpkin cultivars contrasting in silicon accumulation. *Plant J* 66:231–240
- Mitani N, Yamaji N, Ma JF (2009b) Identification of maize silicon influx transporters. *Plant Cell Physiol* 50:5–12
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7:405–410
- Molina-Heredia FP, Wastl J, Navarro JA, Bendall DS, Hervás M, Howe CJ, Miguel A (2003) A new function for an old cytochrome? *Nature* 424:33–34
- Møller SG, McPherson MJ (1998) Developmental expression and biochemical analysis of the *Arabidopsis* *atao1* gene encoding an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating diamine oxidase. *Plant J* 13:781–791
- Morozova O V, Shumakovich GP, Gorbacheva MA, Shleev S V, Yaropolov AI (2007) “Blue” laccases. *Biochem* 72:1136–1150
- Moura JCMS, Bonine CAV, de Oliveira Fernandes Viana J, Dornelas MC, Mazzafera P (2010) Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *J Integr Plant Biol* 52:360–376
- Mukherjee I, Campbell NH, Ash JS, Connolly EL (2006) Expression profiling of the *Arabidopsis* ferric chelate reductase (FRO) gene family reveals differential regulation by iron and copper. *Planta* 223:1178–1190
- Murphy A, Taiz L (1995) Comparison of metallothionein gene expression and nonprotein thiols in ten *Arabidopsis* ecotypes (correlation with copper tolerance). *Plant Physiol* 109:945–954
- Murphy A, Taiz L (1997) Correlation between potassium efflux and copper sensitivity in 10 *Arabidopsis* ecotypes. *New Phytol* 136:211–222
- Murphy AS, Eisinger WR, Shaff JE, Kochian L V, Taiz L (1999) Early copper-induced leakage of K<sup>+</sup> from *Arabidopsis* seedlings is mediated by ion channels and coupled to citrate efflux. *Plant Physiol* 121:1375–1382
- Myers SS, Zanobetti A, Kloog I, Huybers P, Leakey ADB, Bloom AJ, Carlisle E, Dietterich LH, Fitzgerald G, Hasegawa T (2014) Increasing CO<sub>2</sub> threatens human nutrition. *Nature* 510:139–142
- Mylona P V, Polidoros AN (2010) ROS regulation of antioxidant genes. *Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants*. CRC Press, New York, pp 101–127
- Nagae M, Nakata M, Takahashi Y (2008) Identification of negative cis-acting elements in response to copper in the chloroplastic iron superoxide dismutase gene of the moss *Barbula unguiculata*. *Plant Physiol* 146:1687–1696
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 22:867–880
- Navarrete A, González A, Gómez M, Contreras RA, Díaz P, Lobos G, Brown MT, Sáez CA, Moenne A (2019) Copper excess detoxification is mediated by a coordinated and complementary induction of glutathione, phytochelatin and metallothioneins in the green seaweed *Ulva compressa*. *Plant Physiol Biochem* 135:423–431
- Nersissian AM, Valentine JS, Immoos C, Hill MG, Hart PJ, Williams G, Herrmann RG (1998) Uclacyanins, stellacyanins, and plantacyanins are distinct subfamilies of phytocyanins: Plant-specific mononuclear blue copper proteins. *Protein Sci* 7:1915–1929
- Nešković M, Konjević R, Culafić L (2003) *Fiziologija biljaka*. NNK-International, Beograd
- Neumann G, Römheld V (1999) Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. *Plant Soil* 211:121–130
- Nevo Y, Nelson N (2006) The NRAMP family of metal-ion transporters. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Molecular Cell Res* 1763:609–620



- Nguyen TQ, Hayward AR, Bruce KE, Hutchinson TC, Emery RJN (2018) Chelator production by *Deschampsia cespitosa* (L.) Beauv. in adaptive Ni/Cu hyper-tolerance derived from fields in the Sudbury region and lab assessment. *Botany* 96:711–721
- Nikolić DB, Samardžić JT, Bratić AM, Radin IP, Gavrilović SP, Rausch T, Maksimović VR (2010) Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) FeMT3 gene in heavy metal stress: protective role of the protein and inducibility of the promoter region under Cu<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> treatments. *J Agric Food Chem* 58:3488–3494
- Nikolic M, Nikolic N, Liang Y, Kirkby EA, Römheld V (2007) Germanium-68 as an adequate tracer for silicon transport in plants. Characterization of silicon uptake in different crop species. *Plant Physiol* 143:495–503
- Nishizono H, Ichikawa H, Suzuki S, Ishii F (1987) The role of the root cell wall in the heavy metal tolerance of *Athyrium yokoscense*. *Plant Soil* 101:15–20
- Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Biol* 49:249–279
- Noma M, Noguchi M (1976) Occurrence of nicotianamine in higher plants. *Phytochemistry* 15:1701–1702
- Ogunkunle CO, Bornmann B, Wagner R, Fatoba PO, Frahm R, Lützenkirchen-Hecht D (2019) Copper uptake, tissue partitioning and biotransformation evidence by XANES in cowpea (*Vigna unguiculata* L) grown in soil amended with nano-sized copper particles. *Environ Nanotechnology, Monit Manag* 12:100231
- Okuda A, Takahashi E (1965) The role of silicon. *The Mineral Nutrition of the Rice Plant*. John Hopkins Press, Baltimore, pp 123–146
- Oliva SR, Mingorance MD, Leidi EO (2011) Effects of silicon on copper toxicity in *Erica andevalensis* Cabezudo and Rivera: a potential species to remediate contaminated soils. *J Environ Monit* 13:591–596
- Osaki Y, Shirabe T, Nakanishi H, Wakagi T, Yoshimura E (2009) Characterization of phytochelatin synthase produced by the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Metallomics* 1:353–358
- Ouzounidou G (1994) Copper-induced changes on growth, metal content and photosynthetic function of *Alyssum montanum* L. plants. *Environ Exp Bot* 34:165–172
- Ouzounidou G, Čiamporová M, Moustakas M, Karataglis S (1995) Responses of maize (*Zea mays* L.) plants to copper stress—I. Growth, mineral content and ultrastructure of roots. *Environ Exp Bot* 35:167–176
- Overmyer K, Brosché M, Kangasjärvi J (2003) Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends Plant Sci* 8:335–342
- Panou-Filotheou H, Bosabalidis AM, Karataglis S (2001) Effects of copper toxicity on leaves of oregano (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*). *Ann Bot* 88:207–214
- Parry DW, Hodson MJ, Sangster AG (1984) Some recent advances in studies of silicon in higher plants. *Philos Trans R Soc London B, Biol Sci* 304:537–549
- Pascual MB, Echevarria V, Gonzalo MJ, Hernández-Apaolaza L (2016) Silicon addition to soybean (*Glycine max* L.) plants alleviate zinc deficiency. *Plant Physiol Biochem* 108:132–138
- Patel P, Yadav K, Ganapathi TR, Penna S (2019) Plant miRNAome: cross talk in abiotic stressful times. *Genetic Enhancement of Crops for Tolerance to Abiotic Stress: Mechanisms and Approaches, Vol. I*. Springer, Berlin, pp 25–52
- Pätsikkä E, Aro E-M, Tyystjärvi E (1998) Increase in the quantum yield of photoinhibition contributes to copper toxicity in vivo. *Plant Physiol* 117:619–627
- Pätsikkä E, Kairavuo M, Šeršen F, Aro E-M, Tyystjärvi E (2002) Excess copper predisposes photosystem II to photoinhibition in vivo by outcompeting iron and causing decrease in leaf chlorophyll. *Plant Physiol* 129:1359–1367

- Pavlovic J, Samardzic J, Kostic L, Laursen KH, Natic M, Timotijevic G, Schjoerring JK, Nikolic M (2016) Silicon enhances leaf remobilization of iron in cucumber under limited iron conditions. *Ann Bot* 118:271–280
- Pavlovic J, Samardzic J, Maksimović V, Timotijevic G, Stevic N, Laursen KH, Hansen TH, Husted S, Schjoerring JK, Liang Y (2013) Silicon alleviates iron deficiency in cucumber by promoting mobilization of iron in the root apoplast. *New Phytol* 198:1096–1107
- Perea-García A, Andrés-Bordería A, Mayo de Andrés S, Sanz A, Davis AM, Davis SJ, Huijser P, Peñarrubia L (2016) Modulation of copper deficiency responses by diurnal and circadian rhythms in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 67:391–403
- Perea-García A, Andrés-Colás N, Peñarrubia L (2010) Copper homeostasis influences the circadian clock in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav* 5:1237–1240
- Perea-García A, Garcia-Molina A, Andrés-Colás N, Vera-Sirera F, Pérez-Amador MA, Puig S, Peñarrubia L (2013) *Arabidopsis* copper transport protein COPT2 participates in the cross talk between iron deficiency responses and low-phosphate signaling. *Plant Physiol* 162:180–194
- Pianelli K, Mari S, Marquès L, Lebrun M, Czernic P (2005) Nicotianamine over-accumulation confers resistance to nickel in *Arabidopsis thaliana*. *Transgenic Res* 14:739–748
- Pich A, Manteuffel R, Hillmer S, Scholz G, Schmidt W (2001) Fe homeostasis in plant cells: does nicotianamine play multiple roles in the regulation of cytoplasmic Fe concentration? *Planta* 213:967–976
- Pich A, Scholz G (1996) Translocation of copper and other micronutrients in tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.): nicotianamine-stimulated copper transport in the xylem. *J Exp Bot* 47:41–47
- Pich A, Scholz G, Stephan UW (1994) Iron-dependent changes of heavy metals, nicotianamine, and citrate in different plant organs and in the xylem exudate of two tomato genotypes. Nicotianamine as possible copper translocator. *Plant Soil* 165:189–196
- Pilon-Smits E, Pilon M (2002) Phytoremediation of metals using transgenic plants. *CRC Crit Rev Plant Sci* 21:439–456
- Pilon M (2017) The copper microRNAs. *New Phytol* 213:1030–1035
- Pilon M, Ravet K, Tapken W (2011) The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 1807:989–998
- Pinto E, Sigaud-kutner TCS, Leitao MAS, Okamoto OK, Morse D, Colepicolo P (2003) Heavy metal-induced oxidative stress in algae 1. *J Phycol* 39:1008–1018
- de Pinto MC, De Gara L (2004) Changes in the ascorbate metabolism of apoplastic and symplastic spaces are associated with cell differentiation. *J Exp Bot* 55:2559–2569
- Ponzi R, Pizzolongo P (2003) Morphology and distribution of epidermal phytoliths in *Triticum aestivum* L. *Plant Biosyst Int J Deal with all Asp Plant Biol* 137:3–10
- Posmyk MM, Kontek R, Janas KM (2009) Antioxidant enzymes activity and phenolic compounds content in red cabbage seedlings exposed to copper stress. *Ecotoxicol Environ Saf* 72:596–602
- Pourcel L, Routaboul J-M, Kerhoas L, Caboche M, Lepiniec L, Debeaujon I (2005) TRANSPARENT TESTA10 encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in *Arabidopsis* seed coat. *Plant Cell* 17:2966–2980
- del Pozo T, Cambiazo V, González M (2010) Gene expression profiling analysis of copper homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Biophys Res Commun* 393:248–252
- Prasad MN V, Strzałka K (1999) Impact of heavy metals on photosynthesis. *Heavy metal stress in plants*. Springer, Berlin, pp 117–138
- Printz B, Lutts S, Hausman J-F, Sergeant K (2016) Copper trafficking in plants and its implication on cell wall dynamics. *Front Plant Sci* 7:601
- Puig S (2014) Function and regulation of the plant COPT family of high-affinity copper transport

- proteins. *Adv Bot* 2014:
- Puig S, Andrés-Colás N, García-Molina A, Penarrubia L (2007a) Copper and iron homeostasis in *Arabidopsis*: responses to metal deficiencies, interactions and biotechnological applications. *Plant Cell Environ* 30:271–290
- Puig S, Lee J, Lau M, Thiele DJ (2002) Biochemical and genetic analyses of yeast and human high affinity copper transporters suggest a conserved mechanism for copper uptake. *J Biol Chem* 277:26021–26030
- Puig S, Mira H, Dorcey E, Sancenon V, Andrés-Colás N, Garcia-Molina A, Burkhead JL, Gogolin KA, Abdel-Ghany SE, Thiele DJ (2007b) Higher plants possess two different types of ATX1-like copper chaperones. *Biochem Biophys Res Commun* 354:385–390
- Quartacci MF, Pinzino C, Sgherri CLM, Dalla Vecchia F, Navari-Izzo F (2000) Growth in excess copper induces changes in the lipid composition and fluidity of PSII-enriched membranes in wheat. *Physiol Plant* 108:87–93
- Radin I, Mansilla N, Rödel G, Steinebrunner I (2015) The *Arabidopsis* COX11 homolog is essential for cytochrome c oxidase activity. *Front Plant Sci* 6:1091
- Radisky D, Kaplan J (1999) Regulation of transition metal transport across the yeast plasma membrane. *J Biol Chem* 274:4481–4484
- Radotić K, Dučić T, Mutavdžić D (2000) Changes in peroxidase activity and isoenzymes in spruce needles after exposure to different concentrations of cadmium. *Environ Exp Bot* 44:105–113
- Rae TD, Schmidt PJ, Pufahl RA, Culotta VC, O'Halloran T V (1999) Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* (80- ) 284:805–808
- Rahimi A, Bussler W (1973) The effect of copper deficiency on the tissue structure of higher plants. *Z Pflanzenernaehr Bodenkd* 135:183–195
- Ranocha P, Chabannes M, Chamayou S, Danoun S, Jauneau A, Boudet A-M, Goffner D (2002) Laccase down-regulation causes alterations in phenolic metabolism and cell wall structure in poplar. *Plant Physiol* 129:145–155
- Ranocha P, McDougall G, Hawkins S, Sterjiades R, Borderies G, Stewart D, Cabanes-Macheteau M, Boudet A, Goffner D (1999) Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases—a divergent gene family—in poplar. *Eur J Biochem* 259:485–495
- Rao NH, Rogers PP (2006) Assessment of agricultural sustainability. *Curr Sci* 439–448
- Rasoolizadeh A, Labbé C, Sonah H, Deshmukh RK, Belzile F, Menzies JG, Bélanger RR (2018) Silicon protects soybean plants against *Phytophthora sojae* by interfering with effector-receptor expression. *BMC Plant Biol* 18:97
- Rausser WE (1999) Structure and function of metal chelators produced by plants. *Cell Biochem Biophys* 31:19–48
- Raven JA, Evans MCW, Korb RE (1999) The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O<sub>2</sub>-evolving organisms. *Photosynth Res* 60:111–150
- Ravet K, Danford FL, Dihle A, Pittarello M, Pilon M (2011) Spatiotemporal analysis of copper homeostasis in *Populus trichocarpa* reveals an integrated molecular remodeling for a preferential allocation of copper to plastocyanin in the chloroplasts of developing leaves. *Plant Physiol* 157:1300–1312
- Ravet K, Pilon M (2013) Copper and iron homeostasis in plants: the challenges of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 19:919–932
- Rea G, Metoui O, Infantino A, Federico R, Angelini R (2002) Copper amine oxidase expression in defense responses to wounding and *Ascochyta rabiei* invasion. *Plant Physiol* 128:865–875
- Reeves RD, Baker AJM, Raskin I, Ensley BD (2000) Phytoremediation of toxic metals. *Using Plants to Clean Up the Environment*. John Wiley & Sons, New York, pp 193–229

- Reinhammar B, Malmström BG (1981) Blue copper-containing oxidases. *Copper proteins*. Wiley, New York, pp 109–150
- Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP (2002) MicroRNAs in plants. *Genes Dev* 16:1616–1626
- Rellán-Álvarez R, Abadía J, Álvarez-Fernández A (2008) Formation of metal-nicotianamine complexes as affected by pH, ligand exchange with citrate and metal exchange. A study by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom An Int J Devoted to Rapid Dissem Up-to-the-Minute Res Mass Spectrom* 22:1553–1562
- Reuther W, Labanauskas C (1966) Copper. *Diagnostic Criteria for Plants and Soils*. Agricultural Publishers, University of California, Berkely, pp 157–79
- Richau KH, Schat H (2009) Intraspecific variation of nickel and zinc accumulation and tolerance in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Soil* 314:253–262
- Richmond KE, Sussman M (2003) Got silicon? The non-essential beneficial plant nutrient. *Curr Opin Plant Biol* 6:268–272
- Rijstenbil JW, Gerringa LJA (2002) Interactions of algal ligands, metal complexation and availability, and cell responses of the diatom *Ditylum brightwellii* with a gradual increase in copper. *Aquat Toxicol* 56:115–131
- Rijstenbil JW, Haritonidis S, Malea P, Seferlis M, Wijnholds JA (1998) Thiol pools and glutathione redox ratios as possible indicators of copper toxicity in the green macroalgae *Enteromorpha* spp. from the Scheldt Estuary (SW Netherlands, Belgium) and Thermaikos Gulf (Greece, N Aegean Sea). *Hydrobiologia* 385:171–181
- Ripperger H (1982) Nicotianamine and analogous amino acids, endogenous iron carriers in higher plants. *Heterocycles* 17:447–461
- Ritter H, Schulz GE (2004) Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase. *Plant Cell* 16:3426–3436
- Riva S (2006) Laccases: blue enzymes for green chemistry. *TRENDS Biotechnol* 24:219–226
- Robinson NJ, Procter CM, Connolly EL, Guerinot M Lou (1999) A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* 397:694–697
- Robson AD, Hartley RD, Jarvis SC (1981) Effect of copper deficiency on phenolic and other constituents of wheat cell walls. *New Phytol* 89:361–371
- Rodrigo-Moreno ANA, Andrés-Colás N, Poschenrieder C, Gunse B, Penarrubia L, Shabala S (2013) Calcium-and potassium-permeable plasma membrane transporters are activated by copper in *Arabidopsis* root tips: linking copper transport with cytosolic hydroxyl radical production. *Plant Cell Environ* 36:844–855
- Rodrigues FA, Datnoff LE (2015) *Silicon and plant diseases*. Springer, Berlin
- Rodríguez FI, Esch JJ, Hall AE, Binder BM, Schaller GE, Bleecker AB (1999) A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. *Science* (80- ) 283:996–998
- Rogalla H, Römheld V (2002) Role of leaf apoplast in silicon-mediated manganese tolerance of *Cucumis sativus* L. *Plant Cell Environ* 25:549–555
- Roosens NH, Bernard C, Leplae R, Verbruggen N (2004) Evidence for copper homeostasis function of metallothionein (MT3) in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *FEBS Lett* 577:9–16
- Rosenzweig AC (2002) Metallochaperones: bind and deliver. *Chem Biol* 9:673–677
- Rutherford JC, Bird AJ (2004) Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eukaryot Cell* 3:1–13
- Ryan BM, Kirby JK, Degryse F, Harris H, McLaughlin MJ, Scheiderich K (2013) Copper speciation and isotopic fractionation in plants: uptake and translocation mechanisms. *New Phytol* 199:367–378
- Ryan CA, Walker-Simmons M (1983) Plant vacuoles. *Methods Enzymol* 96:580–589

- Sagasti S, Bernal M, Sancho D, B. del Castillo M, Picorel R (2014) Regulation of the chloroplastic copper chaperone (CCS) and cuprozinic superoxide dismutase (CSD2) by alternative splicing and copper excess in *Glycine max*. *Funct Plant Biol* 41:144–155
- Sakihama Y, Cohen MF, Grace SC, Yamasaki H (2002) Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* 177:67–80
- Sakurai G, Satake A, Yamaji N, Mitani-Ueno N, Yokozawa M, Feugier FG, Ma JF (2015) In silico simulation modeling reveals the importance of the Casparian strip for efficient silicon uptake in rice roots. *Plant Cell Physiol* 56:631–639
- Salt DE, Prince RC, Pickering IJ, Raskin I (1995) Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. *Plant Physiol* 109:1427–1433
- Samuels AL, Glass ADM, Ehret DL, Menzies JG (1991) Distribution of silicon in cucumber leaves during infection by powdery mildew fungus (*Sphaerotheca fuliginea*). *Can J Bot* 69:140–146
- Sancenón V, Puig S, Mateu-Andrés I, Dorcey E, Thiele DJ, Peñarrubia L (2004) The Arabidopsis copper transporter COPT1 functions in root elongation and pollen development. *J Biol Chem* 279:15348–15355
- Sancenón V, Puig S, Mira H, Thiele DJ, Peñarrubia L (2003) Identification of a copper transporter family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 51:577–587
- Sandman G, Böger P (1980) Copper-induced exchange of plastocyanin and cytochrome c-553 in cultures of *Anabaena variabilis* and *Plectonema boryanum*. *Plant Sci Lett* 17:417–424
- Sangster AG (1978) Silicon in the roots of higher plants. *Am J Bot* 65:929–935
- Sangster AG, Hodson MJ, Tubb HJ (2001) Silicon deposition in higher plants. *Studies in Plant Science*. Elsevier, Amsterdam, pp 85–113
- Saradhi PP (1991) Proline accumulation under heavy metal stress. *J Plant Physiol* 138:554–558
- Sarkar B, Wigfield Y (1967) The Structure of Copper (II)-Histidine Chelate The question of the involvement of the imidazole group. *J Biol Chem* 242:5572–5577
- Scandalios JG (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian J Med Biol Res* 38:995–1014
- Scandalios JG, Guan L, Polidoros AN (1997) Catalases in plants: gene structure, properties, regulation, and expression. *Cold Spring Harb Monogr Ser* 34:343–406
- Schaaf G, Schikora A, Häberle J, Vert G, Ludewig U, Briat J-F, Curie C, von Wirén N (2005) A putative function for the Arabidopsis Fe-phytosiderophore transporter homolog AtYSL2 in Fe and Zn homeostasis. *Plant Cell Physiol* 46:762–774
- Schat H, Kuiper E, Ten Bookum WM, Vooijs R (1993) A general model for the genetic control of copper tolerance in *Silene vulgaris*: evidence from crosses between plants from different tolerant populations. *Heredity (Edinb)* 70:142–147
- Schiavon M, Zhang L, Abdel-Ghany SE, Pilon M, Malagoli M, Pilon-Smits EAH (2007) Variation in copper tolerance in *Arabidopsis thaliana* accessions Columbia, Landsberg erecta and Wassilewskija. *Physiol Plant* 129:342–350
- Schmidt W, Bartels M, Tittel J, Fühner C (1997) Physiological effects of copper on iron acquisition processes in *Plantago*. *New Phytol* 135:659–666
- Seigneurin-Berny D, Gravot A, Auroy P, Mazard C, Kraut A, Finazzi G, Grunwald D, Rappaport F, Vavasseur A, Joyard J (2006) HMA1, a new Cu-ATPase of the chloro plast envelope, is essential for growth under adverse light conditions. *J Biol Chem* 281:2882–2892
- Sharma P, Dubey RS (2004) Ascorbate peroxidase from rice seedlings: properties of enzyme isoforms, effects of stresses and protective roles of osmolytes. *Plant Sci* 167:541–550
- Sharma P, Dubey RS (2005) Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Growth Regul* 46:209–221

- Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J Bot* 2012:
- Sharma SS, Dietz K-J (2006) The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *J Exp Bot* 57:711–726
- Sharma SS, Dietz K-J (2009) The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends Plant Sci* 14:43–50
- Shewfelt RL, Purvis AC (1995) Toward a comprehensive model for lipid peroxidation in plant tissue disorders. *Hort Sci* 30:213–218
- Shi G, Cai Q, Liu C, Wu L (2010) Silicon alleviates cadmium toxicity in peanut plants in relation to cadmium distribution and stimulation of antioxidative enzymes. *Plant Growth Regul* 61:45–52
- Shi J, Wu B, Yuan X, Cao YY, Chen X, Chen Y, Hu T (2008) An X-ray absorption spectroscopy investigation of speciation and biotransformation of copper in *Elsholtzia splendens*. *Plant Soil* 302:163–174
- Shi J, Yuan X, Chen X, Wu B, Huang Y, Chen Y (2011) Copper uptake and its effect on metal distribution in root growth zones of *Commelina communis* revealed by SRXRF. *Biol Trace Elem Res* 141:294–304
- Shi Q, Bao Z, Zhu Z, He Y, Qian Q, Yu J (2005a) Silicon-mediated alleviation of Mn toxicity in *Cucumis sativus* in relation to activities of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase. *Phytochemistry* 66:1551–1559
- Shi X, Zhang C, Wang H, Zhang F (2005b) Effect of Si on the distribution of Cd in rice seedlings. *Plant Soil* 272:53–60
- Shikanai T, Müller-Moulé P, Munekage Y, Niyogi KK, Pilon M (2003) PAA1, a P-type ATPase of *Arabidopsis*, functions in copper transport in chloroplasts. *Plant Cell* 15:1333–1346
- Shin L-J, Lo J-C, Yeh K-C (2012) Copper chaperone antioxidant protein1 is essential for copper homeostasis. *Plant Physiol* 159:1099–1110
- Shojima S, Nishizawa N-K, Fushiya S, Nozoe S, Irifune T, Mori S (1990) Biosynthesis of phytosiderophores: in vitro biosynthesis of 2'-deoxymugineic acid from L-methionine and nicotianamine. *Plant Physiol* 93:1497–1503
- Shojima S, Nishizawa NK, Fushiya S, Nozoe S, Kumashiro T, Nagata T, Ohata T, Mori S (1989) Biosynthesis of nicotianamine in the suspension-cultured cells of tobacco (*Nicotiana megalosiphon*). *Biol Met* 2:142–145
- Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolic substances. *US Am Chem Soc Symp Ser* 26:47–70
- Sjöberg S, Hägglund Y, Nordin A, Ingri N (1983) Equilibrium and structural studies of silicon (iv) and aluminium (iii) in aqueous solution. V. Acidity constants of silicic acid and the ionic product of water in the medium range 0.05–2.0 M Na (Cl) at 25° C. *Mar Chem* 13:35–44
- Smirnoff N (2000) Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Curr Opin Plant Biol* 3:229–235
- Solomon EI, Sundaram UM, Machonkin TE (1996) Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem Rev* 96:2563–2606
- Song A, Li P, Li Z, Fan F, Nikolic M, Liang Y (2011) The alleviation of zinc toxicity by silicon is related to zinc transport and antioxidative reactions in rice. *Plant Soil* 344:319–333
- Song A, Li Z, Zhang J, Xue G, Fan F, Liang Y (2009) Silicon-enhanced resistance to cadmium toxicity in *Brassica chinensis* L. is attributed to Si-suppressed cadmium uptake and transport and Si-enhanced antioxidant defense capacity. *J Hazard Mater* 172:74–83
- Song J, Yang YQ, Zhu SH, Chen GC, Yuan XF, Liu TT, Yu XH, Shi JY (2013) Spatial distribution and speciation of copper in root tips of cucumber revealed by  $\mu$ -XRF and  $\mu$ -XANES. *Biol Plant* 57:581–586

- Song J, Zhao F-J, Luo Y-M, McGrath SP, Zhang H (2004) Copper uptake by *Elsholtzia splendens* and *Silene vulgaris* and assessment of copper phytoavailability in contaminated soils. *Environ Pollut* 128:307–315
- Song W, Mendoza-Cozatl DG, Lee Y, Schroeder JI, Ahn S-N, Lee H, Wicker T, Martinoia E (2014) Phytochelatin–metal (loid) transport into vacuoles shows different substrate preferences in barley and *A. rabidopsis*. *Plant Cell Environ* 37:1192–1201
- Soukup M, Martinka M, Bosnić D, Čaplovičová M, Elbaum R, Lux A (2017) Formation of silica aggregates in sorghum root endodermis is predetermined by cell wall architecture and development. *Ann Bot* 120:
- Soukup M, Rodriguez Zancajo VM, Kneipp J, Elbaum R (2019) Formation of root silica aggregates in sorghum is an active process of the endodermis. *J Exp Bot*
- Sreenivasulu N, Grimm B, Wobus U, Weschke W (2001) Differential response of antioxidant compounds to salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive seedlings of foxtail millet (*Setaria italica*). *Physiol Plant* 109:435–442
- Srivastava S, Mishra S, Tripathi RD, Dwivedi S, Gupta DK (2006) Copper-induced oxidative stress and responses of antioxidants and phytochelatins in *Hydrilla verticillata* (Lf) Royle. *Aquat Toxicol* 80:405–415
- Stadtman ER (1986) Oxidation of proteins by mixed-function oxidation systems: implication in protein turnover, ageing and neutrophil function. *Trends Biochem Sci* 11:11–12
- Steffens JC, Harel E, Hunt MD (1994) Polyphenol oxidase. Genetic engineering of plant secondary metabolism. Springer, Boston, pp 275–312
- Stephan UW, Schmidke I, Pich A (1994) Phloem translocation of Fe, Cu, Mn, and Zn in *Ricinus* seedlings in relation to the concentrations of nicotianamine, an endogenous chelator of divalent metal ions, in different seedling parts. *Plant Soil* 165:181–188
- Sterjiades R, Dean JFD, Eriksson K-EL (1992) Laccase from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) polymerizes monolignols. *Plant Physiol* 99:1162–1168
- Stevens R, Truffault V, Baldet P, Gautier H (2017) Ascorbate oxidase in plant growth, development, and stress tolerance. *Ascorbic Acid in Plant Growth, Development and Stress Tolerance*. Springer, pp 273–295
- Stewart I, Leonard CD (1952) Chelates as sources of iron for plants growing in the field. *Science* (80-) 116:564–566
- Sun H, Duan Y, Mitani-Ueno N, Che J, Jia J, Liu J, Guo J, Ma JF, Gong H (2020) Tomato roots have a functional silicon influx transporter but not a functional silicon efflux transporter. *Plant Cell Environ* 43:732–744
- Sun H, Duan Y, Qi X, Zhang L, Huo H, Gong H (2018a) Isolation and functional characterization of *CsLsi2*, a cucumber silicon efflux transporter gene. *Ann Bot* 122:641–648
- Sun H, Guo J, Duan Y, Zhang T, Huo H, Gong H (2017) Isolation and functional characterization of *CsLsi1*, a silicon transporter gene in *Cucumis sativus*. *Physiol Plant* 159:201–214
- Sun Q, Liu X, Yang J, Liu W, Du Q, Wang H, Fu C, Li W-X (2018b) MicroRNA528 affects lodging resistance of maize by regulating lignin biosynthesis under nitrogen-luxury conditions. *Mol Plant* 11:806–814
- Sunkar R (2010) MicroRNAs with macro-effects on plant stress responses. *Semin Cell Dev Biol* 21:805–811
- Sunkar R, Kapoor A, Zhu J-K (2006) Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell* 18:2051–2065
- Sunkar R, Li Y-F, Jagadeeswaran G (2012) Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends Plant Sci* 17:196–203

- Sunkar R, Zhu J-K (2004) Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16:2001–2019
- Suzuki S, Ma JF, Yamamoto N, Hattori T, Sakamoto M, Umezawa T (2012) Silicon deficiency promotes lignin accumulation in rice. *Plant Biotechnol* 29:391–394
- Tabata K, Kashiwagi S, Mori H, Ueguchi C, Mizuno T (1997) Cloning of a cDNA encoding a putative metal-transporting P-type ATPase from *Arabidopsis thaliana*. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Biomembranes* 1326:1–6
- Takahashi E (1978) Silica uptake by plant with special reference to the forms of dissolved silica. *J Sci Soil Manure, Jpn* 49:357–360
- Takahashi M, Terada Y, Nakai I, Nakanishi H, Yoshimura E, Mori S, Nishizawa NK (2003) Role of nicotianamine in the intracellular delivery of metals and plant reproductive development. *Plant Cell* 15:1263–1280
- Tepperman JM, Dunsmuir P (1990) Transformed plants with elevated levels of chloroplastic SOD are not more resistant to superoxide toxicity. *Plant Mol Biol* 14:501–511
- Theriappan P, Gupta AK, Dhasarrathan P (2011) Accumulation of proline under salinity and heavy metal stress in cauliflower seedlings. *J Appl Sci Environ Manag* 15:
- Thiel H, Finck A (1973) Determination of limiting values of optimum copper supply of oat and barley plants. *Z Pflanzenernuhr Bodenkd* 134:107–125
- Thomine S, Schroeder JI (2004) Plant metal transporters with homology to proteins of the NRAMP family. The NRAMP family. *Molecular Biology Intelligence Unit, Andes/Kluwer Series, Georgetown*, pp 113–121
- Van Tichelen KK, Colpaert J V, Vangronsveld J (2001) Ectomycorrhizal protection of *Pinus sylvestris* against copper toxicity. *New Phytol* 150:203–213
- Tobimatsu Y, Schuetz M (2019) Lignin polymerization: how do plants manage the chemistry so well? *Curr Opin Biotechnol* 56:75–81
- Tommey AM, Shi J, Lindsay WP, Urwin PE, Robinson NJ (1991) Expression of the pea gene PsMTA in *E. coli*: metal-binding properties of the expressed protein. *FEBS Lett* 292:48–52
- Trindade I, Capitão C, Dalmay T, Fevereiro MP, Dos Santos DM (2010) miR398 and miR408 are up-regulated in response to water deficit in *Medicago truncatula*. *Planta* 231:705–716
- Trindade LM, Horvath BM, Bergervoet MJE, Visser RGF (2003) Isolation of a gene encoding a copper chaperone for the copper/zinc superoxide dismutase and characterization of its promoter in potato. *Plant Physiol* 133:618–629
- Tripathi BN, Gaur JP (2004) Relationship between copper-and zinc-induced oxidative stress and proline accumulation in *Scenedesmus* sp. *Planta* 219:397–404
- Turlapati P V, Kim K-W, Davin LB, Lewis NG (2011) The laccase multigene family in *Arabidopsis thaliana*: towards addressing the mystery of their gene function (s). *Planta* 233:439–470
- Tuteja N, Gill SS, Tuteja R (2011) Plant responses to abiotic stresses: shedding light on salt, drought, cold and heavy metal stress. *Omi Plant Abiotic Stress Toler* 1:39–64
- Ushimaru T, Maki Y, Sano S, Koshiha K, Asada K, Tsuji H (1997) Induction of enzymes involved in the ascorbate-dependent antioxidative system, namely, ascorbate peroxidase, monodehydroascorbate reductase and dehydroascorbate reductase, after exposure to air of rice (*Oryza sativa*) seedlings germinated under water. *Plant Cell Physiol* 38:541–549
- Vaculík M, Landberg T, Greger M, Luxová M, Stoláriková M, Lux A (2012) Silicon modifies root anatomy, and uptake and subcellular distribution of cadmium in young maize plants. *Ann Bot* 110:433–443
- Vaculík M, Lux A, Luxová M, Tanimoto E, Lichtscheidl I (2009) Silicon mitigates cadmium inhibitory effects in young maize plants. *Environ Exp Bot* 67:52–58
- Vangronsveld J, Clijsters H (1994) Toxic effects of metals. *Plants and the chemical elements*:



- biochemistry, uptake, tolerance and toxicity. VCH, Weinheim, pp 149–177
- Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton EF, Hellens RP (2007) Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods* 3:12
- Vasanits A, Kutlán D, Sass P, Molnár-Perl I (2000) Retention/quantitation properties of the o-phthalaldehyde–3-mercaptopropionic acid and the o-phthalaldehyde–N-acetyl-L-cysteine amino acid derivatives in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 870:271–287
- Vatamaniuk OK, Mari S, Lu Y-P, Rea PA (2000) Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase blocked thiols are sufficient for PC synthase-catalyzed transpeptidation of glutathione and related thiol peptides. *J Biol Chem* 275:31451–31459
- Vega I, Nikolic M, Pontigo S, Godoy K, Mora M de LL, Cartes P (2019) Silicon improves the production of high antioxidant or structural phenolic compounds in barley cultivars under aluminum stress. *Agronomy* 9:388
- Vert G, Grotz N, Dédaldéchamp F, Gaymard F, Guerinot M Lou, Briat J-F, Curie C (2002) IRT1, an Arabidopsis transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell* 14:1223–1233
- Vinit-Dunand F, Epron D, Alaoui-Sossé B, Badot P-M (2002) Effects of copper on growth and on photosynthesis of mature and expanding leaves in cucumber plants. *Plant Sci* 163:53–58
- De Vos CHR, Schat H, Vooijs R, Ernst WHO (1989) Copper-induced damage to the permeability barrier in roots of *Silene cucubalus*. *J Plant Physiol* 135:164–169
- De Vos CHR, Schat H, De Waal MAM, Vooijs R, Ernst WHO (1991) Increased resistance to copper-induced damage of the root cell plasmalemma in copper tolerant *Silene cucubalus*. *Physiol Plant* 82:523–528
- De Vos CHR, Vonk MJ, Vooijs R, Schat H (1992) Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus*. *Plant Physiol* 98:853–858
- Wagner F (1940) The significance of silicon acid for the growth of certain cultivated plants, their nutrient economy, and their susceptibility to genuine mildews. *Phytopathology* 12:419–427
- Waldron KJ, Rutherford JC, Ford D, Robinson NJ (2009) Metalloproteins and metal sensing. *Nature* 460:823–830
- Wallace A, Wallace GA, Cha JW (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. *J Plant Nutr* 15:1589–1598
- Wang C, Zhang S, Yu Y, Luo Y, Liu Q, Ju C, Zhang Y, Qu L, Lucas WJ, Wang X (2014) MiR397b regulates both lignin content and seed number in *Arabidopsis* via modulating a laccase involved in lignin biosynthesis. *Plant Biotechnol J* 12:1132–1142
- Wang J, Zhang H, Allen RD (1999) Overexpression of an *Arabidopsis* peroxisomal ascorbate peroxidase gene in tobacco increases protection against oxidative stress. *Plant Cell Physiol* 40:725–732
- Wang S-H, Yang Z-M, Yang H, Lu B, Li S-Q, Lu Y-P (2004a) Copper-induced stress and antioxidative responses in roots of *Brassica juncea* L. *Bot Bull Acad Sin* 45:203–212
- Wang S-H, Zhang H, Zhang Q, Jin G-M, Jiang S-J, Jiang D, He Q-Y, Li Z-P (2011) Copper-Induced Oxidative Stress and Responses of the Antioxidant System in Roots of *Medicago sativa*. *J Agron Crop Sci* 197:418–429
- Wang TS, Shu YF, Liu YC, Jan KY, Huang H (1997) Glutathione peroxidase and catalase modulate the genotoxicity of arsenite. *Toxicology* 121:229–237
- Wang Y, Stass A, Horst WJ (2004b) Apoplastic binding of aluminum is involved in silicon-induced amelioration of aluminum toxicity in maize. *Plant Physiol* 136:3762–3770
- Wani PA, Khan MS, Zaidi A (2007) Impact of heavy metal toxicity on plant growth, symbiosis, seed

- yield and nitrogen and metal uptake in chickpea. *Aust J Exp Agric* 47:712–720
- Ware GW, Whitacre DM (2004) An introduction to insecticides. *Pestic B* 6:
- Watanabe S, Shimoi E, Ohkama N, Hayashi H, Yoneyama T, Yazaki J, Fujii F, Shinbo K, Yamamoto K, Sakata K (2004) Identification of several rice genes regulated by Si nutrition. *Soil Sci Plant Nutr* 50:1273–1276
- Waters BM, Armbrust LC (2013) Optimal copper supply is required for normal plant iron deficiency responses. *Plant Signal Behav* 8:e26611
- Waters BM, Chu H-H, DiDonato RJ, Roberts LA, Easley RB, Lahner B, Salt DE, Walker EL (2006) Mutations in *Arabidopsis* yellow stripe-like1 and yellow stripe-like3 reveal their roles in metal ion homeostasis and loading of metal ions in seeds. *Plant Physiol* 141:1446–1458
- Wayne Richardson H (2000) Copper compounds. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. Wiley-VCH, Weinheim,
- Weber M, Harada E, Vess C, Roepenack-Lahaye E v, Clemens S (2004) Comparative microarray analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* roots identifies nicotianamine synthase, a ZIP transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors. *Plant J* 37:269–281
- Weigel M, Varotto C, Pesaresi P, Finazzi G, Rappaport F, Salamini F, Leister D (2003) Plastocyanin is indispensable for photosynthetic electron flow in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 278:31286–31289
- Welch RM, Norvell WA, Schaefer SC, Shaff JE, Kochian L V (1993) Induction of iron (III) and copper (II) reduction in pea (*Pisum sativum* L.) roots by Fe and Cu status: Does the root-cell plasmalemma Fe (III)-chelate reductase perform a general role in regulating cation uptake? *Planta* 190:555–561
- Wheeler DM, Power IL (1995) Comparison of plant uptake and plant toxicity of various ions in wheat. *Plant Soil* 172:167–173
- White PJ, Broadley MR (2009) Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets—iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytol* 182:49–84
- Whitehead DC (1987) Some soil-plant and root-shoot relationships of copper, zinc and manganese in white clover and perennial ryegrass. *Plant Soil* 97:47–56
- Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, Van Montagu M, Inze D, Van Camp W (1997) Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C<sub>3</sub> plants. *EMBO J* 16:4806–4816
- Williams DE, Vlamis J (1957) The effect of silicon on yield and manganese-54 uptake and distribution in the leaves of barley plants grown in culture solutions. *Plant Physiol* 32:404
- Williams LE, Mills RF (2005) P1B-ATPases—an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants. *Trends Plant Sci* 10:491–502
- Winslow MD, Okada K, Correa-Victoria F (1997) Silicon deficiency and the adaptation of tropical rice ecotypes. *Plant Soil* 188:239–248
- Wintz H, Fox T, Wu Y-Y, Feng V, Chen W, Chang H-S, Zhu T, Vulpe C (2003) Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis. *J Biol Chem* 278:47644–47653
- von Wirén N, Klair S, Bansal S, Briat J-F, Khodr H, Shioiri T, Leigh RA, Hider RC (1999) Nicotianamine chelates both Fe<sup>III</sup> and Fe<sup>II</sup>. Implications for metal transport in plants. *Plant Physiol* 119:1107–1114
- Wodala B, Eitel G, Gyula TN, Ördög A, Horváth F (2012) Monitoring moderate Cu and Cd toxicity by chlorophyll fluorescence and P 700 absorbance in pea leaves. *Photosynthetica* 50:380–386
- Woeste KE, Kieber JJ (2000) A strong loss-of-function mutation in RAN1 results in constitutive activation of the ethylene response pathway as well as a rosette-lethal phenotype. *Plant Cell* 12:443–455

- Wu J-W, Shi Y, Zhu Y-X, Wang Y-C, Gong H-J (2013) Mechanisms of Enhanced Heavy Metal Tolerance in Plants by Silicon: A Review. *Pedosphere* 23:815–825
- Wu J, Yang R, Yang Z, Yao S, Zhao S, Wang Y, Li P, Song X, Jin L, Zhou T (2017) ROS accumulation and antiviral defence control by microRNA528 in rice. *Nat plants* 3:1–7
- Xu J, Yang L, Wang Z, Dong G, Huang J, Wang Y (2006) Toxicity of copper on rice growth and accumulation of copper in rice grain in copper contaminated soil. *Chemosphere* 62:602–607
- Yabuta Y, Motoki T, Yoshimura K, Takeda T, Ishikawa T, Shigeoka S (2002) Thylakoid membrane-bound ascorbate peroxidase is a limiting factor of antioxidative systems under photo-oxidative stress. *Plant J* 32:915–925
- Yamaji N, Chiba Y, Mitani-Ueno N, Ma JF (2012) Functional characterization of a silicon transporter gene implicated in silicon distribution in barley. *Plant Physiol* 160:1491–1497
- Yamaji N, Mitatni N, Ma JF (2008) A transporter regulating silicon distribution in rice shoots. *Plant Cell* 20:1381–1389
- Yamasaki H, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Kobayashi Y, Shikanai T, Pilon M (2007) Regulation of copper homeostasis by micro-RNA in Arabidopsis. *J Biol Chem* 282:16369–16378
- Yamasaki H, Hayashi M, Fukazawa M, Kobayashi Y, Shikanai T (2009) SQUAMOSA promoter binding protein-like7 is a central regulator for copper homeostasis in Arabidopsis. *Plant Cell* 21:347–361
- Yan G, Nikolic M, Ye M, Xiao Z, Liang Y (2018) Silicon acquisition and accumulation in plant and its significance for agriculture. *J Integr Agric* 17:2138–2150
- Yen M-R, Tseng Y-H, Saier Jr MH (2001) Maize Yellow Stripe1, an iron-phytosiderophore uptake transporter, is a member of the oligopeptide transporter (OPT) family. *Microbiology* 147:2881–2883
- Yi Y, Guerinot M Lou (1996) Genetic evidence that induction of root Fe (III) chelate reductase activity is necessary for iron uptake under iron deficiency. *Plant J* 10:835–844
- Yoshida S, Ohnishi Y, Kitagishi K (1962) Histochemistry of silicon in rice plant: III. The presence of cuticle-silica double layer in the epidermal tissue. *Soil Sci Plant Nutr* 8:1–5
- Yruela I (2005) Copper in plants. *Brazilian J Plant Physiol* 17:145–156
- Yruela I (2009) Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Funct Plant Biol* 36:409–430
- Zanella L, Fattorini L, Brunetti P, Roccotiello E, Cornara L, D'Angeli S, Della Rovere F, Cardarelli M, Barbieri M, Di Toppi LS (2016) Overexpression of AtPCS1 in tobacco increases arsenic and arsenic plus cadmium accumulation and detoxification. *Planta* 243:605–622
- Zeng F, Zhao F, Qiu B, Ouyang Y, Wu F, Zhang G (2011) Alleviation of Chromium Toxicity by Silicon Addition in Rice Plants. *Agric Sci China* 10:1188–1196
- Zhang C, Lu W, Yang Y, Shen Z, Ma JF, Zheng L (2018) OsYSL16 is required for preferential Cu distribution to floral organs in rice. *Plant Cell Physiol* 59:2039–2051
- Zhang H, Li L (2013) SQUAMOSA promoter binding protein-like7 regulated microRNA408 is required for vegetative development in Arabidopsis. *Plant J* 74:98–109
- Zhang H, Xia Y, Wang G, Shen Z (2008) Excess copper induces accumulation of hydrogen peroxide and increases lipid peroxidation and total activity of copper–zinc superoxide dismutase in roots of *Elsholtzia haichowensis*. *Planta* 227:465–475
- Zhang H, Zhao X, Li J, Cai H, Deng XW, Li L (2014) MicroRNA408 is critical for the HY5-SPL7 gene network that mediates the coordinated response to light and copper. *Plant Cell* 26:4933–4953
- Zhang Y, Du N, Wang L, Zhang H, Zhao J, Sun G, Wang P (2015) Physical and chemical indices of cucumber seedling leaves under dibutyl phthalate stress. *Environ Sci Pollut Res* 22:3477–3488
- Zhao Q, Nakashima J, Chen F, Yin Y, Fu C, Yun J, Shao H, Wang X, Wang Z-Y, Dixon RA (2013) Laccase is necessary and nonredundant with peroxidase for lignin polymerization during vascular development in Arabidopsis. *Plant Cell* 25:3976–3987

- Zhao Y, Cui J, Chan T, Dong J, Chen D, Li X (2018) Role of chelant on Cu distribution and speciation in *Lolium multiflorum* by synchrotron techniques. *Sci Total Environ* 621:772–781
- Zhao Y, Lin S, Qiu Z, Cao D, Wen J, Deng X, Wang X, Lin J, Li X (2015) MicroRNA857 is involved in the regulation of secondary growth of vascular tissues in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 169:2539–2552
- Zheng L, Yamaji N, Yokosho K, Ma JF (2012) YSL16 is a phloem-localized transporter of the copper-nicotianamine complex that is responsible for copper distribution in rice. *Plant Cell* 24:3767–3782
- Zheng Y, Wang L, Dixon M (2005) Greenhouse pepper growth and yield response to copper application. *Hort Sci* 40:2132–2134
- Zhou J, Goldsbrough PB (1994) Functional homologs of fungal metallothionein genes from *Arabidopsis*. *Plant Cell* 6:875–884
- Zhou X-T, Wang F, Ma Y-P, Jia L-J, Liu N, Wang H-Y, Zhao P, Xia G-X, Zhong N-Q (2018) Ectopic expression of SsPETE2, a plastocyanin from *Suaeda salsa*, improves plant tolerance to oxidative stress. *Plant Sci* 268:1–10
- Zhu C, Ding Y, Liu H (2011) MiR398 and plant stress responses. *Physiol Plant* 143:1–9
- Zhu H, Chen C, Zeng J, Yun Z, Liu Y, Qu H, Jiang Y, Duan X, Xia R (2020) Micro RNA 528, a hub regulator modulating ROS homeostasis via targeting of a diverse set of genes encoding copper-containing proteins in monocots. *New Phytol* 225:385–399
- Zhu Y, Yin J, Liang Y, Liu J, Jia J, Huo H, Wu Z, Yang R, Gong H (2019) Transcriptomic dynamics provide an insight into the mechanism for silicon-mediated alleviation of salt stress in cucumber plants. *Ecotoxicol Environ Saf* 174:245–254
- Zhu Z, Wei G, Li J, Qian Q, Yu J (2004) Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Sci* 167:527–533
- Zlobin IE, Kholodova VP, Rakhmankulova ZF, Kuznetsov V V (2015) *Brassica napus* responses to short-term excessive copper treatment with decrease of photosynthetic pigments, differential expression of heavy metal homeostasis genes including activation of gene NRAMP4 involved in photosystem II stabilization. *Photosynth Res* 125:141–150

<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>

<http://cucurbitgenomics.org/>

<http://www.mirbase.org/>

<https://www.coherentmarketinsights.com/market-insight/wine-market-940>

## Biografija autora

Dragana Bosnić je rođena 10.06.1987. u Loznici. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Biologija, upisala je 2006. a diplomirala je 2011. godine sa prosečnom ocenom 9.63 i diplomskim radom „Uloga silicijuma u stresu izazvanom viškom bakra kod krastavca (*Cucumis sativus* L.)“. Za ovaj rad dobila je nagradu „Goran Ljubijankić“ za najbolji diplomski rad iz oblasti molekularne biologije u Srbiji. Doktorske studije je upisala iste godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Molekularna biologija. Od novembra 2011. zaposlena je u Laboratoriji za molekularnu biologiju biljaka Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu. Učestvovala je na nacionalnom projektu „Molekularni mehanizmi odgovora biljaka na abiotički stres-uloga transkripcionih faktora i malih RNK i analiza genetičkog diverziteta biljnih kultura od interesa za poljoprivredu i biotehnologiju (173005)“. Bila je učesnik na međunarodnom projektu „Science in motion for Friday Night Commotion "SCIMFONICOM": (EU, H2020-MSCA-NIGHT 2014-633376)“, inovacionom projektu „Detekcija i kvantifikacija DNK animalnog porekla u hrani i hrani za životinje (451-03-2802-1/161, 2014-2015)“ kao i bilateralnom projektu naučne i tehnološke saradnje između Republike Srbije i Republike Slovačke pod nazivom „Silicijum u biologiji biljaka gajenih pod stresnim uslovima: teški metali i drugi fitotoksični elementi (451-03-545/2015-09/02, 2015-2016)“. U okviru ovog projekta u toku 2015. godine, Dragana Bosnić je boravila u Laboratoriji za fiziologiju biljaka, Fakulteta prirodnih nauka, Komenius Univerziteta u Bratislavi, Slovačka. Dragana Bosnić je do sada objavila 8 radova u časopisima međunarodnog značaja i imala 14 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima.

# Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Драгана Боснић

Број индекса М3007/2011

## Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Улога силицијумове киселине у модулацији одговора краставца (*Cucumis sativus* L.)

---

на оксидативни стрес изазван токсичним концентрацијама бакра“

---

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Драгана Боснић

Број индекса М3007/2011

Студијски програм Молекуларна биологија

Наслов рада „Улога силицијумове киселине у модулацији одговора краставца (*Cucumis sativus* L.) на оксидативни стрес изазван токсичним концентрацијама бакра“

Ментор др Јелена Самарцић и др Светлана Радовић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Улога силицијумове киселине у модулацији одговора краставца (*Cucumis sativus* L.)

---

на оксидативни стрес изазван токсичним концентрацијама бакра“

---

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

① Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.