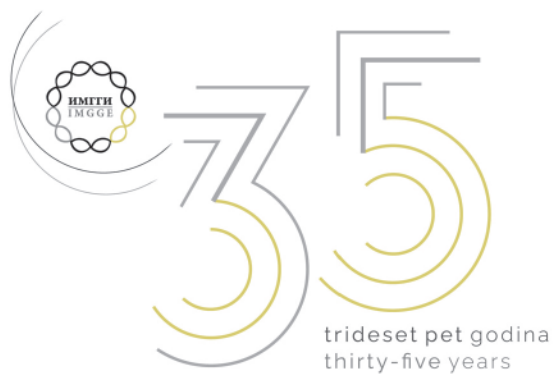


Broj 1 • septembar 2021. N° 1 • September 2021.



Trendovi u **molekularnoj biologiji**
Trends in **Molecular Biology**



Beograd • Belgrade • 2021.
IMGGI • IMGGE

Sadržaj • Content

Personalizovana medicina i COVID-19: značaj genomskog profilisanja pacijenata i bioinformatike Branka Zukić, Biljana Stanković, Nikola Kotur	6	Personalized medicine and COVID-19: the importance of genomic host profiling and bioinformatics
Izotermalna amplifikacija posredovana petljom (LAMP) kao metoda za terensku detekciju SARS-CoV-2 virusa Mila Djisalov, Teodora Knežić, Ljiljana Janjušević, Željko D. Popović, Petar Kosijer, Ivana Gadjanski	21	Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) as a point-of-care SARS-CoV-2 detection method
CRISPR-Cas9 tehnologija: od osnovnih istraživanja do kliničke prakse Marko Panić	33	CRISPR-Cas9 technology: from basic research to clinical application
Primena CRISPR/Cas9 tehnologije u otkrivanju novih molekularnih terapeutika Anita Skakić, Maja Stojilković	42	Application of CRISPR/Cas9 technology in the discovery of new molecular therapeutics
Nova paradigma u dijagnostici retkih bolesti Milica Keckarević Marković, Miljana Kecmanović, Dušan Keckarević	54	Diagnostics of rare diseases: New paradigm
Genetička i epigenetička karakterizacija varijantnih <i>DMPK</i> ekspanzija kao modifikatora fenotipa miotonične distrofije tipa 1 Jovan Pešović, Stojan Perić, Lana Radenković, Vidosava Rakočević-Stojanović, Dušanka Savić-Pavićević	60	Genetic and epigenetic characterization of variant <i>DMPK</i> expansions as a modifier of phenotype in myotonic dystrophy type 1
Molekularna osnova primarne cilijarne diskinezije Marina Anđelković	71	Molecular basis of primary ciliary dyskinesia
Molekularna osnova monogenetskog dijabetesa Jovana Komazec, Milena Ugrin	84	The Molecular Basis of Monogenic Diabetes
Diferencijalna dijagnoza eozinofilnog infiltrata u sluznici jednjaka primenom molekularno-bioloških metoda Nina Ristić, Tijana Išić Denčić, Radmila Janković	96	Differential diagnosis of eosinophilic infiltrate in esophageal mucosa by applying molecular biology methods
Molekularni markeri u sistemskoj sklerozii: geni kandidati i terapijski modaliteti Vesna Spasovski, Miša Vreća	107	Molecular markers in systemic sclerosis: candidate genes and therapeutic modalities
Duga nekodirajuća RNK GAS5 kao novi biomarker u onkologiji Vladimir Gašić, Nataša Tošić	113	Long noncoding RNA GAS5 as a new biomarker in oncology
Prediktivna i prognostička uloga gena p16INK4a, p14ARF i KRAS u karcinomu rektuma čoveka Bojana Kožik, Milena Krajnović, Nikola Kokanov	123	Predictive and prognostic role of p16INK4a, p14ARF and KRAS genes in human rectal carcinoma
Savremena molekularno-biološka ispitivanja prognostičkih faktora papilarnog tiroidnog karcinoma i mogućnost njihove primene u kliničkoj praksi Ilona Đorić, Jelena Janković Miljuš, Sonja Šelemetjev	133	Contemporary molecular-biological investigations of papillary thyroid carcinoma prognostic factors and their potential for application in clinical practice
Nekodirajuće RNK kao perspektiva u dijagnostici i lečenju kardiovaskularnih bolesti Ljiljana Rakićević	146	Non-coding RNAs as a prospect in diagnostics and treatment of cardiovascular diseases
Biološko delovanje polifenola nara na komponente metaboličkog sindroma: implikacije na oksidativni stres Milica Kojadinović i Aleksandra Arsić	152	Biological effect of pomegranate polyphenols on the components of metabolic syndrome: implications on oxidative stress
Biogeni utišavači virulencije vrste <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Milka Malešević, Branko Jovčić	166	Biogenic silencers of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> virulence
Silicijum kao antistres element za biljke izložene toksičnim koncentracijama bakra Dragana Bosnić, Dragana Nikolić, Jelena Samardžić	180	Silicon as an anti-stress element for plants exposed to toxic copper

PREDGOVOR

Molekularna biologija doživljava svoj procvat u XXI veku. Od naučne discipline koja je početkom 1930-ih bila u povojima, i koja je nastojala da objedini genetiku, biohemiju i biofiziku kako bi rasvetlila tajne života, izrasla je u nauku čija su postignuća doprinela velikom napretku u medicini, veterini, poljoprivredi i farmaciji. Uz informaciono komunikacione tehnologije, molekularna biologija je najperspektivnija oblast istraživanja, od koje se očekuje da značajno doprinese boljitku života ljudi u budućnosti.

U Srbiji je molekularna biologija prepoznata relativno rano, pre nego na mnogim drugim meridijanima. Već u školskoj 1972/73. se na Biološkom fakultetu u Beogradu (tada Prirodno-matematički fakultet) osniva smer- molekularna biologija i fiziologija. U našoj zemlji se tako edukuju generacije molekularnih biologa već pola veka. I veliki naučni instituti u Srbiji osnivaju laboratorije u kojima istraživanja prate, a ponekad i predvode, svetske trendove u molekularnoj biologiji. Jedna od tih naučnih institucija je Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI), osnovan 1986. godine u Beogradu. Već 35 godina naučnici iz IMGGI stavljaju najmodernije teme iz molekularne biologije u fokus svojih istraživanja.

Ovaj Tematski zbornik ima za cilj da prikaže aktuelne teme i postignuća iz oblasti molekularne biologije u prethodnoj, 2020. godini i da svedoči o tome kako su naučnici u Srbiji učestvovali u tim svetskim trendovima. Poglavlja su rezultat doktorskih teza mladih molekularnih biologa ali i prikaz aktuelnih istraživanja u kojima je istaknut doprinos naših naučnika. Od godine 2020. se očekivao veliki napredak u mnogim disciplinama zahvaljujući novim saznanjima iz molekularne biologije. Početak godine je doneo pandemiju KOVID-19 bolesti, koja je imala sve karakteristike epidemija iz ranijih vekova. Bili smo na pragu velikog razočaranja. A onda je molekularna biologija upotrebila sve svoje kapacitete, tako što je omogućila karakterizaciju virusa, uzročnika bolesti, za izuzetno kratko vreme. Iz tog razloga metode za detekciju virusa su bile razvijene u rekordnom roku, te je brza i efikasna dijagnostika postala dostupna lekarima. A potom su se pojavile vakcine, rezultat modernih metoda genetičkog inženjerstva. I tako je 2020. godina ipak bila jedinstvena u istoriji, jer je odgovor na epidemiju bio brz i efikasan, zahvaljujući, u velikoj meri, molekularnoj biologiji. Iste godine, Nobelova nagrada za hemiju je dodeljena metodi koja efikasno i tačno edituje humani genom. Vrata medicine budućnosti su se širom otvorila.

Ova sveska bi trebalo da bude prva u nizu godišnjih tematskih zbornika posvećenih aktuelnim temama iz molekularne biologije. Svesni smo kako će ovi rezultati izgledati za deceniju ili dve. Ali, ovo su „znakovi pored puta“ koje je naše vreme ostavilo, osvetljavajući put kojim se ide napred. Mi smo zadivljeni napretkom naše nauke, kad pogledamo u prošlost, ali smo i svesni koji su njeni dometi u odnosu na ono čemu nauka stremi. Radujemo se budućim sveskama i verujemo da će one otvarati nove perspektive i trasirati put napretka.

Nadamo se da će ovaj Tematski zbornik naći put do mladih ljudi, da će ih inspirisati da se opredele za naučni rad, posebno za molekularnu biologiju. Verujemo da će buduće generacije uvideti da naučni rad i u ovoj zemlji može dati doprinos svetskoj nauci a pri tome i dovesti do poboljšanja života ljudi u našoj zemlji. Od svih koji su učestvovali u stvaranju ovog svedočenja o našem vremenu, poruka za vas koji dolazite je:

„Hoćemo li na molekularnu?!“

Sonja Pavlović

IZ RECENZIJA TEMATSKOG ZBORNIKA

Trendovi u molekularnoj biologiji

Tematski zbornik *Trendovi u molekularnoj biologiji* oslikava trenutno stanje i fokus istraživanja u molekularnoj biologiji u Srbiji. Izabrane tematske oblasti i reprezentativni radovi jasno govore o mogućnostima i dometima ove naučne oblasti i spremnosti istraživača u Srbiji da prate trendove i savremene naučne pristupe.

Osim trenutno aktuelnog COVID-19, molekularna biologija je unapredila i obogatila istraživanja u medicini kroz oblast biomedicine. Težište ovog Tematskog zbornika je na rezultatima istraživanja molekularne osnove kompleksnih i retkih bolesti. Proučavanje prokariota dovelo je do mnogih fundamentalnih i revolucionarnih otkrića u molekularnoj biologiji, koja su otvorila put ka biotehnološkoj primeni. Jedno od takvih otkrića je i CRISPR/Cas9 tehnologija za editovanje genoma. Veoma važna oblast istraživanja je i potraga za inovativnim načinima kontrole infekcija izazvanih bakterijama koje su rezistentne na konvencionalne antibiotike. O ovim temama se takođe govori u Tematskom zborniku. Istraživanja u molekularnoj biologiji biljaka ne samo da su proširila znanja o ovim organizmima, već su otvorila put ka primeni savremenih metoda za poboljšanje osobina biljaka i povećanje prinosa. U tom smislu je veoma zanimljiv i ilustrativan rad koji je prikazan u ovom Zborniku.

Tematski zbornik *Trendovi u molekularnoj biologiji* jasno je ukazao na naučni i širi društveni značaj istraživanja u molekularnoj biologiji. Ovim prvim brojem nagoveštava se da će Zbornik ne samo pratiti i dokumentovati najznačajnija dostignuća u molekularnoj biologiji, već da će biti podstrek i inspiracija istraživačima u Srbiji.

Prof. Svetlana Radović, redovni profesor Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Tematski zbornik „Trendovi u molekularnoj biologiji“ je sačinjen od 17 poglavlja u kojima su predstavljeni naučni rezultati iz oblasti molekularne biologije koje su ostvarili naučnici iz Srbije. Veliki broj poglavlja iz Zbornika je posvećen istraživanjima iz oblasti biomedicine. Doprinos koji je molekularna biologija dala modernoj medicini je izuzetno veliki. Danas su u kliničkoj praksi mnogobrojni dijagnostički, prognostički i terapijskih molekularni markeri. Posebno je značajno što je medicina u Srbiji pratila svetske trendove, i to zahvaljujući i velikim naporima molekularnih biologa u našoj zemlji.

Najbolji primer postignuća molekularne biomedicine je odgovor ove nauke na pandemiju KOVID-19. Dijagnostika je omogućena uzuzetno brzo jer je molekularna biologija bila spremna za ovaj zadatak. Ipak je razvoj vakcina u fascinantnom roku najveće postignuće ove nauke. Molekularna biologija je pokazala svoju snagu u pravom trenutku i postala najznačajnija nauka u kriznim momentima za čovečanstvo, kako u svetu, tako i u našoj zemlji.

Sigurno je da će ovako koncipiran Tematski zbornik imati budućnost, jer je napredak medicine nemoguće zamisliti bez novih dostignuća molekularne biologije.

Prof. dr Vesna Škodrić-Trifunović, redovni profesor Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Ovaj Tematski zbornik kroz četiri celine daje pregled najznačajnijih ostvarenja u molekularnoj biologiji u svetu, a kojima se bave i istraživači u Srbiji. U okviru 17 preglednih radova prikazani su različiti rezultati - od onih koji su obeležili prethodnu godinu (posvećeni COVID-19 i CRISPR/Cas9 tehnologiji), preko novih dostignuća u biomedicini (retkih i kompleksnih bolesti), do molekularno bioloških istraživanja prokariota i biljaka.

Značaj ovog Zbornika je višestruk, ogleda se ne samo u činjenici da su najrelevantnija saznanja iz navedenih oblasti objedinjena i postala dostupna široj javnosti na maternjem jeziku, već i zbog toga što su radove napisali istraživači iz različitih naučnih instituta (6), fakulteta (3) i klinika (2) iz Srbije, u kojima se ta istraživanja aktivno sprovode. Naime, saznanja o SARS-CoV-2 koronavirusu, uzročniku nove bolesti COVID-19, se kontinuirano uvećavaju i veoma je važno što i naučnici iz naše zemlje daju doprinos u razumevanju ove pandemije. Isto se odnosi i na najnovije tehnologije za manipulaciju molekula DNK, koje su dovele do revolucionarnih pomaka u biomedicinskim naukama. Stoga, prikazana istraživanja molekularne osnove različitih bolesti najsavremenijim metodološkim pristupima, primena dobijenih rezultata u dijagnozi, preciznom predviđanju progresije bolesti i lečenju, kao i razvoju novih molekularnih terapeutika, daju realnu osnovu očekivanjima da će personalizovana medicina uskoro postati široko dostupna.

Dr Gordana Nikčević, naučni savetnik Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

Silicijum kao antistres element za biljke izložene toksičnim koncentracijama bakra

Dragana Bosnić, Dragana Nikolić, Jelena Samardžić
Laboratorija za molekularnu biologiju biljaka, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu
Kontakt: dragana.bosnic@imgge.bg.ac.rs

Apstrakt: Bakar (Cu) je esencijalan mikroelement za biljke ali ukoliko je prisutan u višku ima fitotoksično dejstvo izazivajući oksidativni stres. Silicijum (Si) ne spada u esencijalne ali je jedini element koji ispoljava protektivni efekat na biljke u uslovima stresa. Primena silicijumove kiseline kod biljaka tretiranih toksičnim koncentracijama bakra ublažava štetna dejstva i povećava toleranciju na prisustvo bakra u višku. Mehanizmi delovanja silicijuma kod biljaka krastavca su detaljno proučeni i obuhvataju: smanjenje akumulacije Cu u biljkama preko snižene ekspresije gena odgovornih za njegovo usvajanje, imobilizaciju Cu u ćelijskim zidovima, povećanje sinteze Cu-liganada: organskih kiselina (citrat, malat i akonitat) i aminokiselina (nikotijanamin i histidin) koji smanjuju koncentraciju slobodnih, reaktivnih jona Cu unutar ćelije. Primena Si je uslovlila smanjenje ekspresije mikro RNK (miR398 i miR408) koje predstavljaju glavne regulatore ekspresije gena i proteina koji sadrže Cu kao kofaktor. Posledično, akumulacija Cu-proteina Cu/Zn superoksid-dismutaze i plastocijanina koji vezujući Cu doprinose skladištenju viška jona Cu u biljnim ćelijama, je izraženija kod biljaka gajenih sa silicijumom. Razumevanje uloge i mehanizama delovanja Si u biljkama će doprineti njegovoj širokoj praktičnoj primeni u cilju povećanja rezistencije i tolerancije biljaka na stres.

Glavne reči: silicijum, toksičnost bakra, oksidativni stres, Cu-ligandi, Cu-proteini, mikro RNK

Silicon as an anti-stress element for plants exposed to toxic copper

Dragana Bosnić, Dragana Nikolić, Jelena Samardžić
Laboratory for Plant Molecular Biology, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering,
University of Belgrade
Correspondence: dragana.bosnic@imgge.bg.ac.rs

Abstract: Although copper (Cu) is an essential microelement for plants, if present in excess it has a phytotoxic effect causing oxidative stress. Silicon (Si) is not essential, but it is the only element with protective effect to plants under stress. Application of silicic acid to plants treated with toxic concentrations of copper alleviates the harmful effects of excess copper, which results in increase tolerance in these plants. The protective mechanisms of Si in cucumber plants have been studied in more details and include a decrease in accumulation of Cu by downregulation of genes responsible for Cu uptake in plants, immobilization of Cu in the root cell walls as well as higher biosynthesis of Cu-ligands: organic acids (citrate, malate and aconitate) and amino acids (nicotianamine and histidine) that decrease the concentration of free, reactive Cu ions within the cell. The application of Si caused lower expression of microRNAs (miR398 and miR408) which are the main regulators of the expression of genes and proteins containing Cu as a cofactor. Consequently, the accumulation of Cu-proteins: Cu/Zn superoxide dismutase and plastocyanin, which are buffering sinks for excess Cu ions in plant cells, is more pronounced in plants grown with silicon. Better understanding the Si-mediated mechanisms in plants exposed to stress will contribute to its wider agronomic application in order to increase plant resistance and tolerance to stress.

Key words: silicon, Cu toxicity, oxidative stress, Cu-ligands, Cu-proteins, micro RNAs

Za rast, razviće i reprodukciju biljaka, pored vode, ugljen-dioksida i sunčeve svetlosti, neophodno je 14 esencijalnih elemenata. Esencijalnost podrazumeva njihovu direktnu ulogu u metabolizmu koja ne može biti u potpunosti zamenjena nekim drugim elementom [1]. Iako su fiziološki gledano podjednako važni, prema sadržaju u biljkama elementi su podeljeni na makro- i mikroelemente. Makroelementi su u biljkama zastupljeni u relativno visokim koncentracijama (>0,1% suve mase), dok su mikroelementi prisutni u znatno manjim količinama (<0,01% suve mase). Mikroelementima, između ostalih, pripadaju metali bakar (Cu), gvožđe (Fe), cink (Zn) i mangan (Mn), koji imaju ulogu kofaktora u metaloproteinima, koji čine trećinu ukupnih proteina [2]. Metaloproteini obavljaju raznovrsne funkcije u ćeliji i u ovu grupu spadaju transkripcioni faktori, metaloenzimi, kao i proteini koji učestvuju u elektron-transfer reakcijama. S obzirom na ulogu metala u biljkama, održavanje njihove homeostaze je ključalno za pravilno funkcionisanje osnovnih ćelijskih procesa.

SILICIJUM U BILJKAMA

Pored esencijalnih, u biljkama postoje i drugi elementi koji iako ne zadovoljavaju sve kriterijume esencijalnosti, povoljno utiču na fiziološke procese i označeni su kao korisni elementi [3]. Za posebne grupe biljaka ili pod određenim uslovima, ovi elementi čak mogu imati esencijalnu ulogu. Takve karakteristike poseduje silicijum (Si). Si je esencijalan za alge dijatomeje kao i biljke familije rastavića, ali kod većine biljaka koje žive u optimalnim uslovima nije bila poznata njegova direktna uloga u metabolizmu stoga je izostavljen iz grupe esencijalnih elemenata. Kod nekih vrsta i rodova sadržaj Si je naročito visok, čak do 10% suve mase, prevazilazeći najzastupljenije makroelemente. Smanjen sadržaj Si kod određenih vrsta dovodi do abnormalnosti u rasteњу i razmnožavanju, što ukazuje da se Si ne može potpuno isključiti kao esencijalan za biljke [4]. Si je jedini element koji ima protektivan efekat na biljke izložene različitim stresnim faktorima pa se može posmatrati kao „antistres“ element.

Silicijum je drugi element po zastupljenosti u zemljinoj kori, gde se najčešće nalazi u vidu silicijum-dioksida ili minerala silikata. U zemljišnom rastvoru i u vodi, Si je u prisutan kao nenaelektrisana ortosilicijumova kiselina, H_4SiO_4 , što je jedini hemijski oblik Si koji biljke mogu da usvajaju [4]. Sadržaj Si u biljkama varira u zavisnosti od biodostupnosti Si ali i od filogenetske pozicije u okviru biljnog carstva. Vrste koje hiperakumuliraju Si (sadrže >4% suve mase), pripadaju monokotilama iz familije trava (oštrice, žitarice, a naročito pirinač). Dikotile uglavnom sadrže manje Si, ali se pojedine familije, kao što je fam. *Cucurbitaceae* (npr. krastavac), ističu višim sadržajem (2-4%) i pripadaju umerenim akumulatorima Si. Ostale vrste koje imaju <0,5% Si označene su kao neakumulatori (npr. paradajz i arabidopsis) [5].

Visoka zastupljenost Si posledica je aktivnog usvajanja Si putem specifičnih transportera. Za inluks Si u ćelije korena odgovoran je Lsi1 (eng. *Low silicon 1*), membranski protein sličan akvaporinima. Dalje sprovođenje Si iz korena ka nadzemnom delu, obavlja efluksni tip transportera Lsi2, po principu protonskog gradijenta. Lokalizacija i polaran raspored ovih transportera u određenim tipovima ćelija korena su presudni faktori odgovorni za usmeren transport i visoku akumulaciju Si, kao što je slučaj kod pirinača [6]. Kod krastavca (*Cucumis sativus* L.) su za razliku od onih u pirinaču, Lsi1 i Lsi2 raspoređeni uniformno u ćelijama korena, bez polarosti, što čini ovu vrstu umerenim akumulatorom Si [7].

Proces transpiracije obezbeđuje protok Si ksilemom, a distribuciju u ćelije listova omogućavaju drugi tipovi transportera. Terminalni događaj jeste polimerizacija silicijumove kiseline i formiranje silicijumskih tela odnosno fitolita ($SiO_2 \cdot nH_2O$), koji svojom rigidnošću pružaju mehaničku podršku biljkama [4].

ULOGA SILICIJUMA U ZAŠTITI BILJAKA OD BIOTIČKOG I ABIOTIČKOG STRESA

Uprkos visokoj zastupljenosti, metabolička uloga silicijuma u biljkama predstavljala je svojevrsnu enigmę za naučnike još od početka XX veka [8]. Zapažanja da dodavanje Si u vidu silikatne šljake povoljno utiče na rast i produktivnost biljnih vrsta od značaja za poljoprivredu i hortikulturu, otvorilo je novu eru istraživanja [9]. Pojedine biljne vrste pokazuju izuzetne razlike u prinosu u zavisnosti od količine dostupne forme Si u zemljišnom rastvoru [10]. Zemljišta u tropskim regionima se karakterišu ograničenom količinom rastvorljivog Si, dok su intenzivna poljoprivreda i uklanjanje žetvenih ostataka doprineli konstantnom smanjenju biodostupnog Si u zemljištu [11]. Fitoliti iz reciliranih ostataka biljaka mogu biti dragoceni izvor Si ali i dodavanje silicijuma u vidu đubriva je potpuno opravdano, imajući u vidu i da Si nije toksičan za biljke čak ni ukoliko je prisutan u višku [4].

Korisno dejstvo silicijuma na biljke naročito se uočava u uslovima stresa. S obzirom da se prisustvo stresnih faktora u prirodi teško može izbeći, usvajanje Si se može posmatrati kao adaptivna osobina biljaka koja je uslovljena sredinskim izazovima i stoga, ako Si i nije *per se* esencijalan, za biljke je od ogromnog značaja [12].

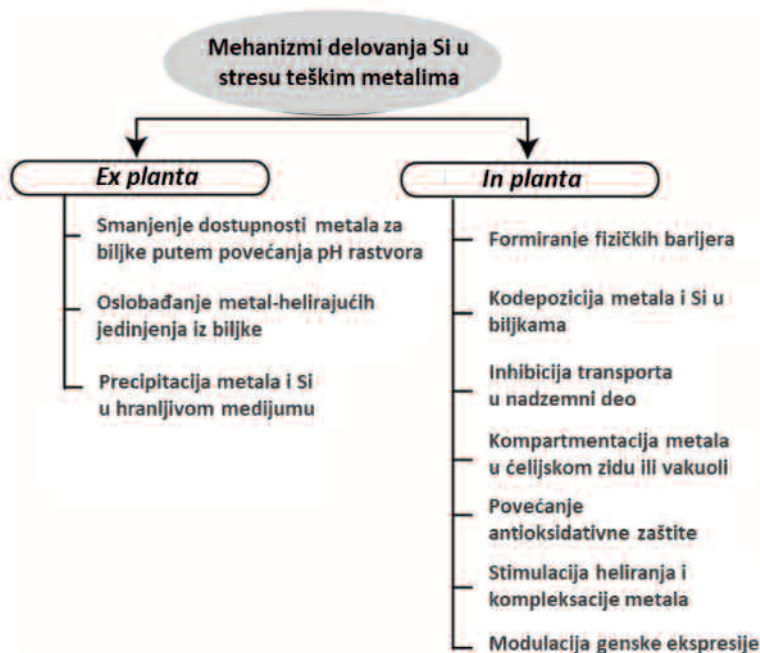
Mnogobrojne publikacije u poslednje dve decenije posvećene su razjašnjenju mehanizama delovanja Si kod biljaka izloženih različitim biotičkim i abiotičkim stresnim faktorima. Depoziti silicijuma u biljkama predstavljaju fizičku

barijeru za napad herbivora, nematoda, kao i za širenje patogenih gljiva i bakterija. Pored toga, istraživanja su pokazala da Si ima i aktivnu ulogu u zaštiti biljaka jer stimuliše endogene odbrambene mehanizme biljaka [13].

Primena silicijuma redukuje efekte abiotičkih stresnih faktora, kao što su fizički faktori (UV zračenje, suša, poleganje, niske i visoke temperature) i hemijski faktori stresa (zaslanjenost, nedostatak hraniva, toksičnost metala). Kao mehanička podrška listovima i stabljikama, Si ih održava u uspravnom položaju i time smanjuje mogućnost poleganja biljaka. Depozicija Si u kutikuli lista sprečava gubitak vode transpiracijom i povećava otpornost na sušu ali i utiče na smanjenje transmisije UV zračenja na epidermis [13].

Nasuprot tome, korisni efekti Si kod biljaka suočenih sa nedostatkom ili viškom esencijalnih elemenata ne mogu se objasniti isključivo njegovom mehaničkom ulogom. Kod biljaka koje rastu u uslovima nedostatka Fe, pokazano je da Si utiče na efikasnije iskorišćavanje apoplastnih rezervi gvožđa, povećavajući njegov sadržaj u listovima i smanjujući hlorozu listova što je uslovljeno promenom ekspresije gena odgovornih za ove procese [14,15]. Nedostatak fosfora može biti ublažen primenom Si, a sam mehanizam delovanja obuhvata stimulaciju jedinjenja koja vrše mobilizaciju i usvajanje fosfora povećavajući njegov sadržaj u biljkama [16].

Uloga Si u ublažavanju toksičnosti metala u biljkama obuhvata različite spoljašnje i unutrašnje mehanizme delovanja, što zavisi od vrste metala i intenziteta stresa (**Slika 1**). Stimulacija rasta biljaka uprkos prisustvu metala u višku, poboljšanje fiziološkog stanja i smanjenje toksičnih efekata metala dokumentovano je kod različitih biljnih vrsta gajenih sa Si. Mehanizmi delovanja Si su proučavani kod toksičnosti kadmijuma, aluminijuma, cinka, mangana, natrijuma [17]. Bakar je esencijalni element, ali kada je prisutan u višku znatno je toksičniji za biljke od pomenutih metala i stoga zahteva posebnu pažnju [18].



Slika 1. Mehanizmi delovanja silicijuma na ublažavanje toksičnosti metala kod biljaka. Slika je modifikovana prema Bhat et al. (2019).

ULOGA BAKRA U BILJKAMA

Bakar je prelazni metal i lako osciluje između oksidovanog Cu^{2+} i redukovano Cu^+ stanja što ga čini idealnim kofaktorom proteina u redoks-reakcijama. Ipak, zbog ovog svojstva, Cu je visoko-reaktivan i moćan generator reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) i otuda potiče potencijalna toksičnost ovog metala. Bakar je kofaktor u tzv. Cu-proteinima, koji imaju značajnu ulogu u metabolizmu ćelije, a preko stotinu takvih proteina postoji u biljkama [19]. Fotosinteza i respiracija su dva najvažnija procesa u biljkama bazirana na reakcijama prenosa elektrona u kojima učestvuju Cu-proteini [3]. Najznačajniji Cu-proteini su plastocijanin, citohrom-c-oksidaza, Cu/Zn superoksid-dismutaza, lakaza [20].

Plastocijanin (PC) je esencijalan za proces fotosinteze kod biljaka i spada u najzastupljenije Cu-proteine. Ima ulogu u elektron-transportnom lancu fotosistema I (PSI) kao mobilni nosač elektrona u lumenu tilakoida u hloroplastima [21,22]. Citohrom-c-oksidaza (CCOX) je transmembranski proteinski kompleks koji učestvuje u elektron-transportnom lancu tokom respiracije kod svih eukariota, arhea i bakterija [23]. Superoksid-dismutaza (SOD) je enzim koji učestvuje

u antioksidativnoj zaštiti kod aerobnih organizama. U zavisnosti od metala koji služi kao kofaktor, razlikuju se Fe SOD, Mn SOD i Cu/Zn SOD izoenzimi. Iako su funkcionalno komplementarni, Cu/Zn SOD se sa svoje tri izoforme (citosolna CSD1, plastidna CSD2 i peroksizomalna CSD3) smatraju najvažnijim za proces detoksifikacije od ROS-a [24,25]. Lakaze (LAC) pripadaju superfamiliji enzima oksido-reduktaza koji katalizuju oksidaciju mnoštva različitih supstrata (fenoli, amini i aromatični amini itd.) omogućavajući njihovu polimerizaciju, a takav tip reakcija je zastupljen u mnogim biološkim procesima [26]. Lakaze kod biljaka učestuju u biosintezi lignina, strukturnog konstituenta ćelijskih zidova, kojima pruža mehaničku i strukturnu potporu. Lignin omogućava funkciju ksilema u sprovođenju vode i hraniva od korena naviše ali je njegova uloga značajna i u formiranju mehaničke barijere prema prodiranju patogena i teških metala u biljna tkiva [27].

USVAJANJE I DISTRIBUCIJA BAKRA

Koncentracija bakra u biljkama je u opsegu 2-50 µg/g suve mase, zavisno od biljne vrste i stadijuma razvića [20]. Na varijacije u sadržaju bakra u biljkama utiče bioraspoloživost bakra u zemljištu ali i zastupljenost drugih esencijalnih elemenata. Biodostupnost bakra zavisi od fizičko-hemijskih osobina, pre svega pH zemljišta kao i bioloških procesa u regionu rizosfere. Bakar je uglavnom imobilisan u mineralima a manji procenat ukupnog bakra je u zemljišnom rastvoru u formi dvovalentnog jona [28]. Mehanizam usvajanja Cu kod dikotila sličan je usvajanju Fe, što podrazumeva redukciju jona na plazma-membrani i usvajanje redukovane forme [29]. Članovi familije metaloreduktaza FRO (eng. Ferric Reductase Oxidase, FRO) obavljaju redukciju Fe³⁺ i Cu²⁺; FRO2 u korenu je najznačajnija za gvožđe, dok su FRO4 i FRO5 uključene u homeostazu bakra [30,31].

Transport Cu⁺ forme obavljaju visoko-afinitetni transporteri konzervisane familije COPT (eng. Copper Protein Transporter), koja postoji kod svih eukariota [32]. Najznačajniji za usvajanje Cu⁺ putem korena je plazma-membranski COPT1 [33]. Za distribuciju Cu unutar ćelije do ciljnih proteina čiji je kofaktor, odgovorni su pomoćni proteini, Cu-šaperoni [34]. U transport bakra u ćelijske kompartmane, eksport bakra iz ćelije, kao i ubacivanje u ksilem uključene su ATPaze P-tipa odnosno HMA (eng. Heavy Metal ATPases) [35].

Glavni helator Cu u ksilemu koji omogućava translokaciju i distribuciju Cu unutar listova floemskim putem, je nikocijanamin (NA) [36,37]. NA je neproteinska aminokiselina koja vezuje i druge metale osim bakra, a kompleks NA-metal ulazi u ćelije putem YSL transportera (eng. Yellow Stripe-Like). Dakle, uloga NA i YSL je u lateralnom transportu, distribuciji metala u listovima, ali i remobilizaciji metala tokom senescencije i njihovo skladištenje u semenu [37,38].

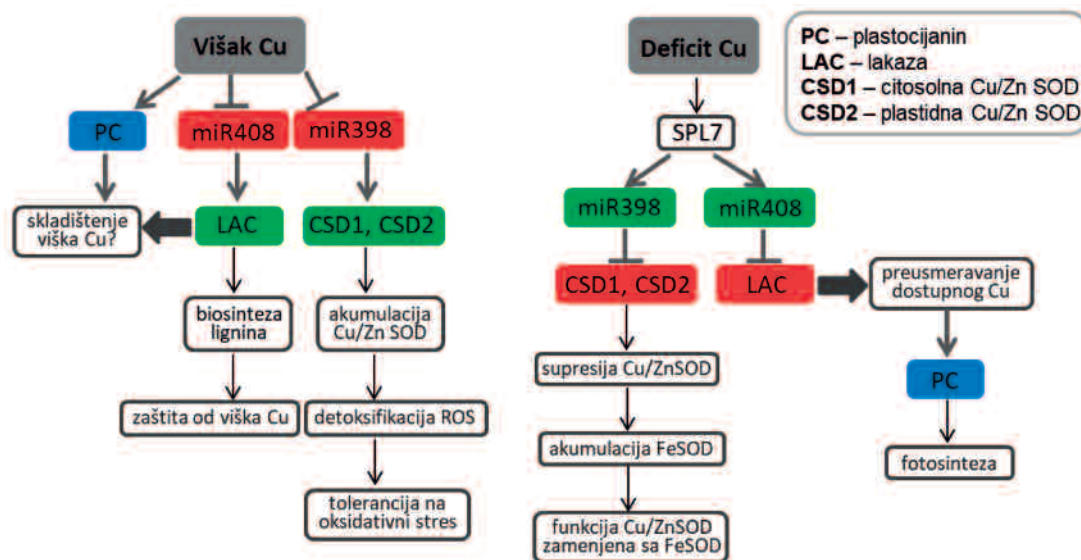
REGULACIJA HOMEOSTAZE BAKRA U BILJKAMA

Homeostaza bakra se postiže održavanjem balansa između procesa usvajanja, skladištenja i izlaska Cu iz ćelije za šta su zaduženi različiti akteri. Stroga kontrola distribucije Cu je neophodna kako bi se obezbedile trenutne potrebe biljaka za Cu, ali i da bi se biljke zaštitile od štetnog prisustva Cu u višku. Promene ekspresije gena i proteina uključenih u homeostazu Cu reguliše transkripcioni faktor SPL7 (eng. SQUAMOSA Promoter-binding protein-Like), uključujući i post-transkripcionu regulaciju putem mikro RNK [39]. Biljne miRNK, za razliku od animalnih, nakon komplementarnog sparivanja, iRNK vode u degradaciju i na taj način ostvaruju ulogu u brojnim biološkim procesima bitnim za rast i razviće, određivanje ćelijskog identiteta, signalnu transdukciju ali i odgovor na stres [40,41]. Čak i kratkotrajna promena ekspresije miRNK tokom stresa može da rezultira značajnim fiziološkim efektima [42].

miR398 i miR408 su visoko konzervisane u biljkama, a njihova ekspresija zavisi od sadržaja Cu u biljkama pa su označene kao Cu-miRNK [39]. Targeti miR398 su izoforme Cu/Zn SOD citosolna CSD1 i plastidna CSD2, šaperon (CCS) koji dostavlja Cu ovim enzimima kao i COX5b-1 subjedinica citohrom-c-oksidge [40,43]. S obzirom da reguliše Cu/Zn SOD, koja je deo antioksidativne odbrane, miR398 je angažovana u odgovoru na različite biotičke i abiotičke faktore koji izazivaju oksidativni stres [42]. Targeti miR408 su lakaze i grupa Cu-proteina označena kao fitocijanini [44]. miR408 omogućava pravilan vegetativni razvoj biljaka, ali takođe učestvuje u odgovoru na različite stresne faktore [42,45,46].

Sinhronizovana regulacija ekspresije gena, koji kodiraju Cu-proteine, putem miRNK ima fiziološki smisao u prioritetnoj raspodeli bakra u biljci, ukoliko su količine ovog elementa ograničene (**Slika 2**). Snižena ekspresija neesencijalnih Cu-proteina omogućava usmeravanje Cu ka plastocijaninu koji je esencijalan za proces fotosinteze [47]. Neesencijalni Cu-proteini se zamenjuju funkcionalnim parnjacima, koji obavljaju istu ulogu, kao što su Cu/Zn SOD i Fe SOD izoenzimi. Njihova ekspresija je koordinisano regulisana na transkripcionom nivou u zavisnosti od dostupnosti Cu odnosno Fe u biljkama. Nivo transkriptata i proteina Cu/Zn SOD i Fe SOD, kao i količina plastocijanina su pouzdani indikatori statusa Cu u biljkama. Kada je Cu u nedostatku, povišena ekspresija miR398 utiče na sniženje ekspresije CSD1 i CSD2, dok je istovremeno Fe SOD visoko ekspimirana [44,47]. Takođe, miR408 snižava ekspresiju svojih targeta i na taj način učestvuje u preusmeravanju Cu ka plastocijaninu [45].

Nasuprot tome, miRNK bi u uslovima bakra u višku mogle da učestvuju ne samo u odbrani od oksidativnog stresa, nego i u povećanju ekspresije Cu-proteina, koji uz svoju primarnu funkciju, mogu poslužiti i kao skladišta reaktivnih Cu jona, i time uticati na smanjenje fitotoksičnosti [48].



Slika 2. Regulatorna mreža Cu-miRNK i njihovih targeta zavisno od nivoa Cu u ćelijama (zeleni pravougaonici označavaju povišenu ekspresiju a crveni sniženu). Slika modifikovana prema Leng et al. (2017).

TOKSIČNOST BAKRA KOD BILJAKA

Toksični efekti bakra na biljke su bili prepoznati pre nego što je dokazana njegova esencijalna uloga. Fitotoksičnost je primetna na morfološkom, fiziološkom i molekularnom nivou već pri koncentraciji Cu od 20 $\mu\text{g/g}$ suve mase [3]. Bakar se prvenstveno akumulira u korenu pa su štetni efekti Cu izraženiji u ovom biljnom organu u vidu progresivnog smanjenja rasta, razvoja, grananja i tamne obojenosti korena. U nadzemnom delu simptomi toksičnosti obuhvataju inhibiciju rasta, hlorozu i nekrozu listova, promene u reproduktivnim organima koje vode ka redukciji veličine ploda i smanjenoj klijavosti semena [20]. Bakar u višku deluje antagonistički na usvajanje i translokaciju drugih esencijalnih elemenata kao što su Fe, Zn i Mn [49–51]. Na ćelijskom nivou, Cu višestruko negativno utiče na najbitnije procese, fotosintezu i respiraciju [3,20], i izaziva promene u propustljivosti ćelijske membrane što dovodi do curenja ćelijskog sadržaja [52,53]. Bakar ima visok afinitet ka proteinima sa kojima može direktno da interaguje ili da izmesti druge esencijalne kofaktore sa svojih mesta, inhibirajući tako katalitičku, strukturnu ili transportnu ulogu proteina [54].

Višak redoks-aktivnih Cu jona katalizuje produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) što za posledicu ima oksidativni stres u ćelijama. ROS višestruko utiču na makromolekule, izazivajući oštećenje nukleinskih kiselina, inhibiciju enzima, oksidaciju proteina, peroksidaciju lipida, što vodi ka aktivaciji programirane ćelijske smrti [55].

MEHANIZMI ZAŠTITE BILJAKA OD TOKSIČNOG BAKRA

Biljke poseduju različite mehanizme tolerancije prema toksičnim metalima koji su orjentisani ka smanjenju akumulacije reaktivnih jona kako bi se suzbila direktna oštećenja ćelijskih struktura. Spoljašnji mehanizmi su usmereni ka smanjenju usvajanja metala putem formiranja ektomikorize ili kompleksiranjem metala sa ekstraćelijskim eksudatima koji se aktivno izbacuju iz ćelija korena u rizosferu. Zadržavanje metala u korenu je mehanizam kojim se ograničava translokacija u nadzemni deo, a samim tim i negativan uticaj na fotosintetske organe [19,56]. Unutrašnji, ćelijski mehanizmi odbrane od toksičnosti uključuju imobilizaciju metala u ćelijskom zidu, ograničen influks kroz ćelijsku membranu i pojačan efluks iz ćelije, što se postiže regulacijom ekspresije transportera odgovornih za ove procese. Mehanizmi za detoksifikaciju od metala podrazumevaju vezivanje metala za različite ligande i skladištenje takvih kompleksa unutar ćelije, u vakuoli, ili u posebnim strukturama kakve su trihome. Jedinjenja koja sadrže tiolnu grupu, kao što su metalotioneini i fitohelatini, imaju jak afinitet ka Cu i stoga imaju važnu ulogu u detoksifikaciji. Sekvestracija metala u vakuolama vezivanjem za organske kiseline je značajan mehanizam tolerancije, koji je naročito izražen kod biljaka hiperakumulatora metala. Pored toga, akumulacija slobodnih aminokiselina smatra se aktivnim odgovorom biljaka na stres teškim metalima. Aminokiseline kao što su histidin i nikocijanamin su snažni helatori bakra koji mogu imati presudnu ulogu u zaštiti od toksičnosti ovog metala [56–58].

TOKSIČNOST BAKRA U ZEMLJIŠTU KAO AGROEKOLOŠKI PROBLEM I PRIMENA SILICIJUMA KAO REŠENJE

Različite antropogene aktivnosti, a naročito prekomerna upotreba fungicida na bazi Cu, uzrokovale su kontaminaciju agroekološkog zemljišta i pijaćih voda bakrom [59]. Bakar kao perzistentan polutant, ima svojstvo akumulacije u životnoj sredini i ulazi u lance ishrane. Brojna istraživanja su pokazala da silicijum u biljkama može redukovati simptome stresa izazvanog toksičnim metalima. Korisni efekti delovanja Si često su specifični za biljnu vrstu/rod i obično su izraženiji kod vrsta koje akumuliraju veće količine Si u svojim tkivima. Razumevanje uloge i mehanizama delovanja Si u biljkama će doprineti njegovoj širokoj praktičnoj primeni u cilju povećanja rezistencije i tolerancije biljaka na stres. Mehanizmi delovanja Si u biljkama izloženim stresu toksičnim koncentracijama bakra, obuhvataju kompleksne efekte vidljive na fiziološkom, biohemijskom i molekularnom nivou (**Tabela 1**).

Biljne vrste	Biomasa korena	Biomasa lista	Ekspresija COPT1	Ekspresija FRO4	Konc. Cu u korenu	Konc. Cu u listu	Konc. Fe u listu	Konc. Mn u listu	Konc. Zn u listu	Sadržaj hlorofila	Ekspresija/aktivnost PAL u korenu	Lipidna peroksidacija	Aktivnost APX	Aktivnost CAT	Aktivnost SOD	Ekspresija SOD	Ekspresija miR398	Ekspresija miR408	Ekspresija MT	Ekspresija PCS	Konc. malata	Konc. citrata	Konc. akonitata	Konc. nikotijanamina	Konc. histidina	reference
<i>Arabidopsis thaliana</i>	↑	↑	↓			-	-	-	-		↓				↑	↑			↑	-						[63,86]
<i>Antirrhinum majus</i>	-	-			↓	-	-	-	-																	[68]
<i>Zinnia elegans</i>	↑	↑			↓	↓	-	↑	-		↓															[68]
<i>Erica andevalensis</i>	↑	↑			↑	↓	-		↑																	[70]
<i>Phyllostachys fastuosa</i>	-	-			-	-																				[62]
<i>Oryza sativa</i>	↑	↑			↓					↑		↓														[61]
<i>Spartina densiflora</i>	↑	-			-	↓		↑		↑																[65]
<i>Triticum turgidum</i>					↓	↓		↓	↓	-											↑	↑	↑			[72]
<i>Gossypium hirsutum</i>	↑	↑			↓	↓				↑		↓	↑	↑	↑											[67]
<i>Nicotiana tabacum</i>	↑	↑	↓		↓	-													↓	↓						[69]
<i>Cucumis sativus</i>	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↑	↑	↑	↑	↑	↑	[60,64,77]

↑ stimulacija, ↓ supresija, – bez uticaja

Tabela 1. Uticaj silicijuma na ispitivane parametre kod različitih biljnih vrsta izloženih toksičnom bakru

UTICAJ SILICIJUMA NA FIZIOLOŠKE PARAMETRE STRESA KOD BILJAKA IZLOŽENIH TOKSIČNOM BAKRU

Inhibitorni efekat na rastenje biljaka krastavca primetan je pri tretmanu različitim koncentracijama Cu, od umereno, do srednje i visoko toksične [60]. Primena Si u vidu 1,5 mM silicijumove kiseline doprinosi povećanju ukupne biomase biljaka, bez obzira na dozu bakra u tretmanu. Analizirajući pojedinačne organe, Si ima veći uticaj na biomasu lista krastavca dok na nivou korena nije primećeno značajnije poboljšanje [60]. Sličan efekat je zabeležen i kod pirinča [61] i bambusa [62], biljnih vrsta koje se odlikuju hiperakumulacijom Si, ali i kod arabidopsisa, koji nije izrazit Si-akumulator [63]. Inhibitorni uticaj na proces fotosinteze jedan je od glavnih simptoma toksičnosti Cu kod biljaka, stoga se uticaj Si na povećanje biomase lista može povezati sa većim intenzitetom fotosinteze kod biljaka gajenih sa Si. U skladu sa tim, izmeren je povećan sadržaj hlorofila kod krastavca i to u svim listovima različite starosti [64]. Kod vrste *Spartina densiflora*, koja toleriše visoke koncentracije Cu, pokazano je da primena Si smanjuje inhibitorni uticaj Cu na aktivna mesta RUBISCO enzima i da povećava koncentraciju biljnih pigmenata, što je rezultovalo povećanjem intenziteta fotosinteze i biomase tretiranih biljaka [65].

Iako Si ne pokazuje značajniji uticaj na biomasu korena biljaka, doprinosi očuvanju strukture i funkcije korena. Teški metali kakav je bakar narušavaju permeabilnost ćelijske membrane i izazivaju akutno curenje elektrolita iz ćelija korena [53]. Ovaj fenomen je povezan sa otvaranjem različitih tipova jonskih kanala i efluksom K⁺, kao i formiranjem ROS-a, što vodi ka programiranoj ćelijskoj smrti [66]. Curenje elektrolita iz korena krastavca se detektuje već u prvim satima od početka tretmana bakrom i vremenom se povećava, dok kod biljaka gajenih sa Si takav efekat izostaje [64]. Na mikroskopskim preseccima korena pirinča primetna su manja oštećenja ćelijskih struktura usled prisustva Si, što može da ima uticaj i na samo usvajanje Cu [61].

ROS izazivaju peroksidaciju lipida ćelijske membrane, ali u prisustvu Si nije zabeleženo povećanje nivoa lipidne peroksidacije u krastavcu [60] i pamuku [67] uprkos povišenim koncentracijama Cu, što ukazuje na smanjen nivo ok-

sidativnog stresa. Zajednička karakteristika vrsta/genotipova tolerantnijih na oksidativni stres uzrokovan teškim metalima jeste efikasna antioksidativna zaštita, što predstavlja adaptivni mehanizam odbrane od stresa [55]. Protektivno delovanje Si ostvaruje se i povećanjem aktivnosti antioksidativnih enzima, kao što su superoksid-dismutaza, askorbat peroksidaza i katalaza koji smanjuju nivo ROS-a [61,64,67]. Povišeni nivo antioksidativne zaštite usled primene Si zabeležen je i u prisustvu drugih stresora: UV zračenje, niske i visoke temperature, zaslanjenost zemljišta, suša itd. [17]. Ovakvi podaci ukazuju da je mehanizam delovanja Si i univerzalnog karaktera, bez obzira na uzrok stresa kojem je biljka izložena.

UTICAJ SILICIJUMA NA USVAJANJE I DISTRIBUCIJU BAKRA U BILJKAMA

Bitan aspekt korisnog delovanja Si jeste smanjenje koncentracije reaktivnih jona unutar biljke kao posledica smanjenog usvajanja, pojačanog izbacivanja ali i efikasnog skladištenja odnosno imobilizacije metala unutar biljke. Akumulacija bakra u korenu tretiranih biljaka krastavca je više destina puta povećana, dok primena Si značajno smanjuje koncentraciju Cu [60], što je potvrđeno i u eksperimentima sa pamukom, pirinčem i cinijom [61,67,68]. Ipak, ovaj efekat se ne može posmatrati kao opšti mehanizam delovanja Si, jer Si nije uticao na usvajanje Cu kod drugih analiziranih biljaka, kao što su arabidopsis i bambus [62,63,65]. Najznačajniji za proces usvajanja Cu je COPT1, koji je visoko-afinitetni transporter Cu⁺ forme, i čija se ekspresija reguliše putem SPL7 TF a direktno zavisi od nivoa Cu u biljkama [33]. U korenu krastavca ustanovljena je snižena ekspresija COPT1, dok je kod biljaka gajenih sa Si ekspresija ovog gena dodatno smanjena [64]. Sličan profil ekspresije COPT1 zabeležen je u biljkama duvana [69]. Imajući u vidu strogu regulaciju i funkciju COPT1 transportera, uticaj Si na ekspresiju COPT1 kod navedenih vrsta dikotila se može smatrati odgovornim za smanjenje koncentracije Cu u korenu.

Usvajanju Cu⁺ prethodi hemijska redukcija na plazma-membrani koju vrše FRO reduktaze. Analizom transkriptomu u uslovima nedostatka Cu, ustanovljena je izrazito povišena ekspresija FRO4 u korenu arabidopsisa [31]. U literaturi za sada nema podataka o ekspresiji ovog gena kod biljaka izloženih povišenim koncentracijama Cu. Rezultati na krastavcu su pokazali da tretman 10 μM Cu snažno utišava ekspresiju FRO4 u korenu, a primena Si utiče na još izraženije smanjenje ekspresije ovog gena, slično ekspresiji COPT1 [64]. Ovakav profil ekspresije nedvosmisleno ukazuje da je smanjenje akumulacije Cu u korenu krastavca posledica uticaja Si na glavni sistem za usvajanje Cu za koji su odgovorni zajedno COPT1 i FRO4.

Primena Si takođe smanjuje koncentraciju Cu u listu krastavca, ali ta razlika nije toliko značajna kao u korenu [60]. Kod arabidopsisa nije bilo razlike u koncentraciji Cu u listu između tretmana bez i sa Si [63]. Manji sadržaj Cu u listovima vrste *Erica andevalensis*, koja toleriše visoke koncentracije Cu, zabeležen je u prisustvu Si što je objašnjeno smanjenom translokacijom Cu iz korena u listove [70]. Sprečavanje translokacije metala može biti posledica Si-stimulisanog formiranja dodatne kasparijeve trake kao i pojačane depozicije lignina u endodermisu korena, koji služe kao fizička barijera za transport metala [71]. Smatra se da je uticaj Si na smanjenu translokaciju Cu kod pšenice, ostvaren putem Si-stimulisanog debljanja endodermisa zajedno sa povećanjem adsorpcije Cu na površini korena i imobilizacijom Cu u epidermisu [72].

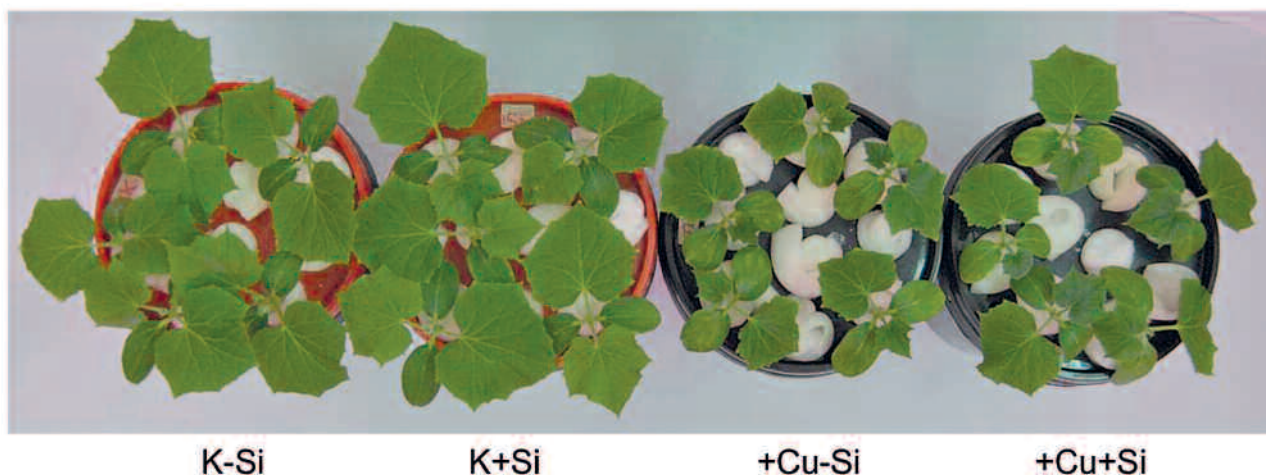
Akumulacija lignina je rezultat povećane aktivnosti enzima peroksidaza i lakaza koji učestvuju u polimerizaciji fenolnih jedinjenja - prekursora lignina, koji se sintetišu u fenilpropanoidnom putu a prvi i najvažniji enzim u tom putu je fenilalanin-amonijum-liaza (PAL) [27,73]. Istraživanja su pokazala da su aktivnost PAL, količina fenola i lignina u pozitivnoj korelaciji sa dozom primenjenog bakra i nivoom stresa [74,75]. Intenzivna lignifikacija u korenu krastavca je detektovana nakon pet dana tretmana Cu. Međutim, biljke gajene sa Si odlikuje niži nivo lignifikacije, kao i manji sadržaj fenola i niža ekspresija PAL, što ukazuje na smanjeni nivo stresa, i u saglasnosti je sa nižom lipidnom peroksidacijom u korenu takvih biljaka [60].

Bakar u višku inhibira akumulaciju drugih esencijalnih elemenata, pre svega Fe, Zn i Mn zbog nespecifičnih mehanizama regulacije selektivnog usvajanja jona u uslovima disbalansa i kompeticije za iste transportere [76]. Naročito je izražena antagonistička interakcija između Cu i Fe koji su označeni kao metabolički parnjaci, što je posledica sličnosti hemijskih osobina i bliske evolutivne povezanosti metaboličkih puteva ovih metala [49,50].

Pored Cu, i Si utiče na celokupan mineralni sastav tretiranih biljaka. Kod trave *Spartina densiflora*, Si povećava koncentraciju Mn, koja je zbog tretmana viškom Cu bila smanjena [65]. Takođe, antagonistički efekat viška Cu na sadržaj Zn u listovima, je umanjen u određenoj meri dodatkom Si kod vrste *Erica andevalensis* [70]. Primena Si je značajno uticala na povećanje sadržaja Fe, Zn i Mn u listovima Cu-tretiranog krastavca [77]. U navedenoj studiji je po prvi put pokazano da Si smanjuje Cu-indukovani nedostatak gvožđa u biljkama. Sa druge strane, uloga Si kod biljaka koje se primarno suočavaju sa nedostatkom Fe detaljnije je proučena. Pokazano je da Si utiče na povećanje apoplastnog depoa Fe u korenu i stimuliše translokaciju Fe do listova zahvaljujući indukovanoj biosintezi Fe-helirajućih jedinjenja, kao što je citrat [14,78]. Citrat je glavni helator gvožđa u ksilemu, a povećanje njegove koncentracije je zabeleženo i kod

biljaka krastavca tretiranih bakrom u prisustvu Si [64]. Ovi podaci potkrepljuju hipotezu o postojanju univerzalnih mehanizama delovanja Si bez obzira na vrstu stresa sa kojim se biljka primarno suočava. Glavni simptom smanjenja koncentracije Fe zbog prisustva Cu jona u višku, je pojava hloroze listova. Kod biljaka gajenih sa Si, povećani sadržaj Fe kao i sadržaj hlorofila smanjili su hlorozu i doprineli povećanju biomase listova uprkos prisustvu bakra u višku (**Slika 3**).

Uticaj Si na preraspodelu metala unutar biljke, kao i njegovo direktno vezivanje metala važni su mehanizmi kojima Si utiče na povećanje tolerancije biljaka prema prisustvu metala u višku [17]. Značajan procenat Cu se nalazi vezan u ćelijskom zidu, čak do 60% ukupnog Cu u ćeliji, čime se obezbeđuje imobilizacija Cu jer su joni metabolički inaktivirani pošto ne ulaze u protoplast ćelije već ostaju izvan [79]. U korenu krastavca primena Si doprinosi povećanju zastupljenosti Cu u ćelijskom zidu, što utiče na procentualno smanjenje sadržaja Cu unutar ćelije [64]. Slični rezultati su zabeleženi i kod stresa Cd [71]. Takođe, uticaj na distribuciju Mn se smatra glavnim mehanizmom delovanja Si kod prevazilaženja toksičnosti Mn. Povećanje zastupljenosti Mn u frakciji ćeljkog zida u listovima biljaka sa Si, direktno utiče na smanjenje sadržaja ROS i nivoa oksidativnog stresa [80]. 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 zajedno sa povećanom aktivnosti antioksidativnih enzima [64]. Iako je pokazano da Si ima uticaja na metabolizam Cu do sada nije dokumentovana njihova kolokalizacija [72].



Slika 3. Biljke krastavca gajene pri optimalnoj koncentraciji Cu (kontrola, K) bez Si (K-Si) i sa 1,5 mM Si (K+Si), kao i biljaka tretiranih pet dana 10µM Cu bez Si (+Cu-Si) i sa 1,5 mM Si (+Cu+Si).

UTICAJ SILICIJUMA NA EKSPRESIJU MIR398, MIR408 I Cu-PROTEINA

Lakaze učestvuju u biosintezi lignina pa je kod biljaka tretiranih bakrom, povećana aktivnost ovog enzima praćena povećanim sadržajem lignina u korenu [81]. Lakaza je, kao Cu-protein, uključena i u homeostazu bakra [44]. Neki predstavnici familije lakaza su konstitutivno ekspimirani i u tkivima koja su minimalno lignifikovana što sugerise da imaju i dodatne uloge [82]. Ekspresija lakaza je post-transkripciono regulisana putem miRNK. Istraživanja na krastavcu su pokazala da je miR408 smanjena u korenu biljaka tretiranih bakrom, što je u saglasnosti sa povišenim nivoom transkripata *LAC3*, implicirajući da je ekspresija *LAC3* regulisana ovom miRNK kada je Cu prisutan u višku [64]. U odnosu na njih, kod biljaka gajenih sa Si, zabeležen je još niži nivo miR408 koje su posledično imale i višu ekspresiju *LAC3*. Zanimljivo je da ovi rezultati nisu u korelaciji sa nižim stepenom lignifikacije koja je zabeležena kod biljaka sa Si [60]. To sugerise da *LAC3* obavlja i druge funkcije u stresu toksičnim Cu, koje nisu povezane sa lignifikacijom, a mogu biti u vezi sa potencijalnom ulogom Cu-proteina u skladištenju viška jona Cu [48], a koje je dodatno stimulisano prisustvom Si.

Silicijum ima uticaj i na ekspresiju drugih Cu-proteina, Cu/Zn SOD izoformi i plastocijanina. Cu/Zn SOD se smatraju najvažnijim izoenzimima SOD, sa centralnom ulogom u odgovoru biljaka na stres [25]. Citosolna CSD1 i plastidna CSD2 su ključne izoforme u biljnim tkivima [44]. Ipak, CSD1 i CSD2 u uslovima stresa ne odgovaraju na isti način. Visok intenzitet oksidativnog stresa često ne stimuliše nego dovodi do inhibicije aktivnosti CSD1 [25,83]. Zapravo, ekspresija CSD1 izoforme odražava opšti odgovor biljaka na stres [24]. Upravo je u korenu krastavca pokazano da je količina CSD1 izrazito snižena zbog tretmana bakrom, što je u skladu sa nižom aktivnosti SOD enzima i ukazuje na visok intenzitet stresa kod ovih biljaka [60]. Očekivano, primena Si je dovela do povećanja CSD1 u korenu, a što je u saglasnosti sa ukupnom aktivnosti SOD. Stoga se može izvesti zaključak da je stimulacija ekspresije CSD1 važna komponenta Si-posredovanog mehanizma tolerancije biljaka i ublažavanja stresa uprkos prisustvu visoke koncentracije Cu u korenu.

S druge strane, CSD2 izoforma je bila povećana u korenu kod obe grupe biljaka tretiranih Cu, ali je ipak zastupljenija kod biljaka gajenih sa Si [60]. Smatra se da CSD2 može da skladišti Cu i na taj način obavlja detoksifikaciju od viška Cu jona. To potvrđuju istraživanja gde je pokazano da CSD2 nije ključna komponenta antioksidativne zaštite u hloroplastima [84], kao i da overekspresija CSD2 ne može značajno da poboljša odgovor na stres na nivou cele biljke [85]. Različiti faktori stresa ne utiču na količinu proteina kao i aktivnost CSD2, mada povećavaju nivo transkriptata [24]. Izuzetak je stres viškom Cu koji dovodi do povećanja CSD2 i na transkripcionom i na proteinskom nivou [84]. Kod biljaka krastavca je pokazano da profil ekspresije CSD2 proteina u potpunosti odražava gensku ekspresiju [64]. Pored toga, analiza miR398, koja targetuje Cu/Zn SOD izoforme i predstavlja glavni modulator homeostaze Cu, potvrdila je ovaj rezultat. Smanjen nivo miR398 je u saglasnosti sa višom ekspresijom CSD2 target gena kod Cu-tretiranih biljaka sa Si [64]. U navedenom radu, po prvi put je predstavljena paralelna analiza ekspresije gena i proteina i njihove aktivnosti, kao i regulatornih miRNK, u uslovima toksičnog bakra i primene silicijuma. Jedino je kod arabidopsisa pokazano da Si dodatno povećava ekspresiju i CSD1 i CSD2, što je u saglasnosti sa ukupnom aktivnosti SOD enzima u listovima, mada u ovom radu nije predstavljen nijedan indikator oksidativnog stresa a razlike u koncentraciji Cu u listovima bez i sa Si nije bilo [63,86].

Polovina ukupnog bakra unutar ćelija zelenih tkiva vezana je za tri proteina: CSD1, CSD2 i plastocijanin [22]. Regulacija homeostaze bakra putem miRNK prvenstveno ima za cilj da omogući distribuciju Cu plastocijaninu, naročito ukoliko je ograničen sadržaj Cu u ćelijama. Ekspresija plastocijanina nije regulisana na transkripcionom nivou putem miRNK i dakle, ne zavisi od statusa Cu u ćeliji. Međutim, pokazano je da količina proteina PC prati povećanje sadržaja Cu od suboptimalnog do optimalnog [44]. S obzirom da je relativno mala količina funkcionalnog plastocijanina dovoljna za maksimalan intenzitet fotosinteze, dodatna akumulacija plastocijanina se zapravo dešava kao odgovor na prisustvo Cu [22,44]. Pored toga, plastocijanin može da vezuje slobodne Cu jone u *in vitro* uslovima i da tako smanji produkciju opasnog hidroksilnog radikala [87]. Rezultati istraživanja na krastavcu su pokazali da se količina plastocijanina kod biljaka tretiranih bakrom povećava, i to u znatno većoj meri ako su biljke gajene sa Si [60]. Ovi rezultati potvrđuju da se plastocijanin akumulira u prisustvu bakra u višku, kao što je pretpostavljeno u literaturi. Time je po prvi put pokazano da primena Si doprinosi akumulaciji PC koji vezuje i skladišti višak Cu u listovima i na taj način smanjuje opasnost od reaktivnih Cu jona što zajedno sa ostalim mehanizmima delovanja doprinosi boljem fitnessu biljaka gajenih sa silicijumom.

UTICAJ SILICIJUMA NA LIGANDE I HELATORE BAKRA

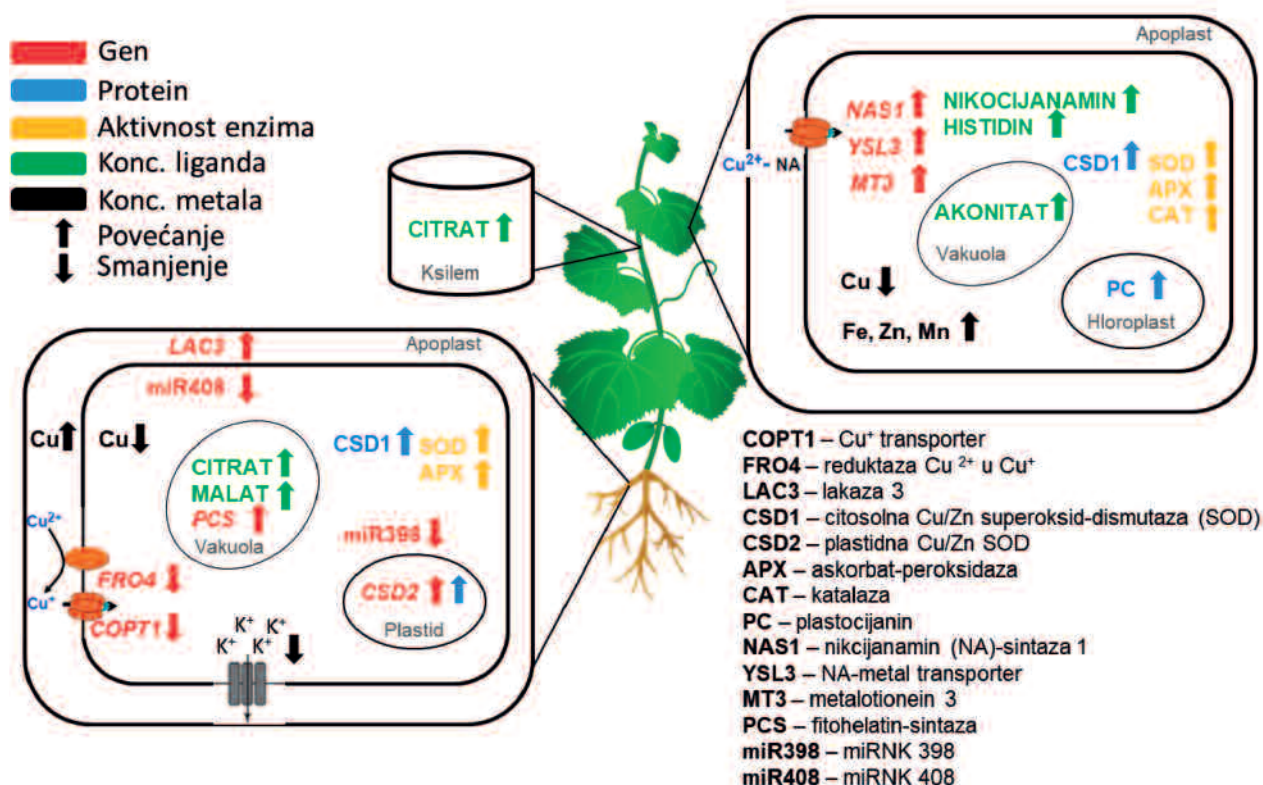
S obzirom na visoku reaktivnost u ćeliji ne sme postojati nijedan slobodan jon bakra [88]. Stoga su različiti organski molekuli uključeni u održavanje homeostaze ali i detoksifikaciju od bakra prisutnog u višku. Među najznačajnijim su tiolna jedinjenja (S-ligandi), organske kiseline (O-ligandi), kao i aminokiseline (N-ligandi) [56,57].

Bakar ima visok afinitet prema tiolnoj grupi stoga su metalotioneini među najvažnijim ligandima bakra u biljkama [58]. Kod krastavca, tretman bakrom dramatično povećava ekspresiju *MT3* u korenu, više od 1000 puta, ukazujući na značajnu ulogu metalotioneina u detoksifikaciji Cu [64]. Međutim, Si nije uticao dodatno na ekspresiju *MT3*, moguće zbog manjeg usvajanja a samim tim i manje koncentracije Cu u korenu. Nasuprot tome, ekspresija *MT2a* i *MT2b* u listu arabidopsisa je stimulirana primenom Si [86]. Iako kod arabidopsisa nije bilo razlike u koncentraciji Cu između tretiranih grupa biljaka, zaključeno je da Si indukuje MT koji mogu da uklone višak Cu [63,86]. Spektroskopske metode su pokazale da Si pospešuje vezivanje Cu za S-ligande (metalotioneine ili fitohelatine) u listu bambusa [62]. Fitohelatini vrše detoksifikaciju i skladištenje u vakuolama vezivanjem metala kakvi su Cd ili As, dok u slučaju Cu, tek u odsustvu drugih odbrambenih mehanizama mogu biti od značaja [89]. Si nema značajnijeg uticaja na aktivaciju *fitohelatin-sintaze*, što je pokazano kod krastavca [64] i arabidopsisa [86].

S druge strane, Si utiče na akumulaciju organskih kiselina kao što su citrat, malat i akonitat [64]. Njihova uloga je važna ne samo u transportu metala, već i u toleranciji prema metalima prisutnim u višku. Povećanje koncentracije citrata u korenu smatra se glavnim odbrambenim mehanizmom kod Cu-tolerantnih vrsta/genotipova [53]. U korenu bambusa pokazano je da je značajan udeo ukupnog Cu vezan za malat, kod biljaka i bez i sa Si [62]. Pored akumulacije citrata i malata u korenu, Si je uticao na akumulaciju akonitata u listu biljaka krastavca [60]. Formiranje kompleksa Cu sa organskim kiselinama, naročito sa akonitatom, je među najvažnijim mehanizmima korisnog efekta Si kod pšenice [72]. Akumulacija akonitata u listovima krastavca i pšenice ukazuje da je to važna organska kiselina za zaštitu biljaka od toksičnog Cu u prisustvu Si.

Aminokiseline kao što su histidin (His) i nikocijanamin (NA) formiraju veoma stabilne komplekse sa Cu i njihova sinteza je indukovana u prisustvu visokih koncentracija Cu kod biljaka [90,91]. NA ima jedinstvenu ulogu u homeostazi Cu [36,37], dok heliranje metala jakim ligandima, kakav je NA, predstavlja glavnu strategiju za detoksifikaciju kod biljaka koje nisu tolerantne na prisustvo metala u višku [57,58]. Za razliku od NA, histidin je aminokiselina koja je odgovorna za hipertoleranciju i hiperakumulaciju metala kod mnogih biljnih vrsta [19].

U listu krastavca detektovana je povećana koncentracija NA i His usled tretmana bakrom u višku, a primena Si je dodatno pospešila akumulaciju NA i His, što potvrđuju i molarni odnosi NA:Cu i His:Cu koji premašuju vrednosti kontrolnih biljaka [77]. Takođe, pokazana je i povećana ekspresija gena koji kodira NA-sintazu (NAS), glavnog enzima u biosintetskom putu NA, kao i YSL3 koji je odgovoran za transport NA-metal kompleksa unutar listova [64]. Kod bambusa tretiranog bakrom detektovani su kompleksi Cu sa N-ligandima, kao i povećanje akumulacije His u korenu biljaka sa Si [62]. Heliranje jona pomoću NA i His važi za vodeći mehanizam kojim se efikasno kontroliše koncentracija slobodnih jona i postiže tolerancija prema metalima prisutnim u višku [57]. U skladu sa tim, može se izvesti zaključak da je stimulacija helatora u cilju povećanja tolerancije prema toksičnom bakru jedan od najvažnijih mehanizama korisnog delovanja Si u listu biljaka krastavca (Slika 4).



Slika 4. Mehanizmi delovanja Si na ublažavanje stresa izazvanog toksičnom koncentracijom Cu kod krastavca.

ZAKLJUČAK

Uobičajeni agroekološki uslovi, čak i oni koji se definišu kao povoljni za rastenje biljaka, podrazumevaju prisustvo bar nekog stresnog faktora koji može značajno uticati na kvalitet i prinos poljoprivrednih kultura. Ublažavanja efekata stresa kao i povećanja tolerancije biljaka prema stresu je imperativ u savremenoj poljoprivredi. Upečatljiva i jedinstvena uloga silicijuma potpuno opravdava njegovu primenu i u skladu je sa strategijom održivog razvoja, koja zahteva razvijanje ekološki prihvatljivih i ekonomičnih alternativa za zaštitu biljaka od višestrukih faktora stresa. Na tržištu su prisutne različite formulacije đubriva bazirane na Si ali je njihova primena i dalje ograničena [17]. Razlog tome je visoka cena ovih đubriva kao i niska efikasnost (biodostupnost Si) posebno u nekim tipovima zemljišta. Bolje razumevanje mehanizama delovanja Si u biljkama izloženim stresu, omogućiće napredak u razvijanju đubriva na bazi Si i promovisati njihovu širu upotrebu kao efikasnog sredstva za zaštitu biljaka od stresa.

LITERATURA

1. Arnon DI, Stout PR. The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper. *Plant Physiol.* 1939;14(2):371.
2. Waldron KJ, Rutherford JC, Ford D, Robinson NJ. Metalloproteins and metal sensing. *Nature.* 2009;460(7257):823–30.

3. Marschner H. Mineral Nutrition of Higher Plants. London: Academic Press; 1995. (Special Publications of the Society for General Microbiology).
4. Epstein E. Silicon. *Annu Rev Plant Biol.* 1999;50(1):641–64.
5. Hodson MJ, White PJ, Mead A, Broadley MR. Phylogenetic variation in the silicon composition of plants. *Ann Bot.* 2005;96(6):1027–46.
6. Ma JF, Yamaji N. A cooperative system of silicon transport in plants. *Trends Plant Sci.* 2015;20(7):435–42.
7. Sun H, Duan Y, Qi X, Zhang L, Huo H, Gong H. Isolation and functional characterization of CsLsi2, a cucumber silicon efflux transporter gene. *Ann Bot.* 2018;122(4):641–8.
8. Hall AD, Morison CGT. On the function of silica in the nutrition of cereals. Part I. *Proc R Soc London Ser B, Contain Pap a Biol Character.* 1906;77(520):455–77.
9. Lewin J, Reimann BEF. Silicon and plant growth. *Annu Rev Plant Physiol.* 1969;20(1):289–304.
10. Winslow MD, Okada K, Correa-Victoria F. Silicon deficiency and the adaptation of tropical rice ecotypes. *Plant Soil.* 1997;188(2):239–48.
11. Meunier JD, Guntzer F, Kirman S, Keller C. Terrestrial plant-Si and environmental changes. *Mineral Mag.* 2008;72(1):263–7.
12. Frew A, Weston LA, Reynolds OL, Gurr GM. The role of silicon in plant biology: a paradigm shift in research approach. *Ann Bot.* 2018;121(7):1265–73.
13. Ma JF. Role of silicon in enhancing the resistance of plants to biotic and abiotic stresses. *Soil Sci Plant Nutr.* 2004 Feb 1;50(1):11–8.
14. Pavlovic J, Samardzic J, Maksimović V, Timotijevic G, Stevic N, Laursen KH, et al. Silicon alleviates iron deficiency in cucumber by promoting mobilization of iron in the root apoplast. *New Phytol.* 2013;198(4):1096–107.
15. Nikolic DB, Nescic S, Bosnic D, Kostic L, Nikolic M, Samardzic JT. Silicon Alleviates Iron Deficiency in Barley by Enhancing Expression of Strategy II Genes and Metal Redistribution. *Front Plant Sci.* 2019;10:416.
16. Kostic L, Nikolic N, Bosnic D, Samardzic J, Nikolic M. Silicon increases phosphorus (P) uptake by wheat under low P acid soil conditions. *Plant Soil.* 2017;419(1–2).
17. Liang Y, Nikolic M, Bélanger R, Gong H, Song A. Silicon-mediated tolerance to metal toxicity. In: *Silicon in Agriculture.* Dordrecht: Springer; 2015. p. 83–122.
18. Kopittke PM, Blamey FPC, Asher CJ, Menzies NW. Trace metal phytotoxicity in solution culture: a review. *J Exp Bot.* 2010;61(4):945–54.
19. Krämer U, Clemens S. Functions and homeostasis of zinc, copper, and nickel in plants. In: *Molecular biology of metal homeostasis and detoxification.* Berlin: Springer; 2005. p. 215–71.
20. Yrueala I. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Funct Plant Biol.* 2009;36(5):409–30.
21. Weigel M, Varotto C, Pesaresi P, Finazzi G, Rappaport F, Salamini F, et al. Plastocyanin is indispensable for photosynthetic electron flow in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem.* 2003;278(33):31286–9.
22. Abdel-Ghany SE. Contribution of plastocyanin isoforms to photosynthesis and copper homeostasis in *Arabidopsis thaliana* grown at different copper regimes. *Planta.* 2009 Mar;229(4):767–79.
23. Castresana J, Lübben M, Saraste M, Higgins DG. Evolution of cytochrome oxidase, an enzyme older than atmospheric oxygen. *EMBO J.* 1994;13(11):2516–25.
24. Kliebenstein DJ, Monde R-A, Last RL. Superoxide Dismutase in *Arabidopsis*: An Eclectic Enzyme Family with Disparate Regulation and Protein Localization. *Plant Physiol.* 1998 Oct 21;118(2):637–50.
25. Alscher RG, Erturk N, Heath LS. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot.* 2002;53(372):1331–41.
26. Solomon EI, Sundaram UM, Machonkin TE. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem Rev.* 1996;96(7):2563–606.
27. Frei M. Lignin: characterization of a multifaceted crop component. *Sci World J.* 2013;2013.
28. Kabata-Pendias A, Pendias H. Trace elements in soils and plants. Boca Raton: CRC Press; 2001. 403 p.
29. Ryan BM, Kirby JK, Degryse F, Harris H, McLaughlin MJ, Scheiderich K. Copper speciation and isotopic fractionation in plants: uptake and translocation mechanisms. *New Phytol.* 2013;199(2):367–78.
30. Robinson NJ, Procter CM, Connolly EL, Guerinot M Lou. A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature.* 1999;397(6721):694–7.
31. Bernal M, Casero D, Singh V, Wilson GT, Grande A, Yang H, et al. Transcriptome sequencing identifies SPL7-regulated copper acquisition genes FRO4/FRO5 and the copper dependence of iron homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2012;24(2):738–61.
32. Puig S, Lee J, Lau M, Thiele DJ. Biochemical and genetic analyses of yeast and human high affinity copper transporters suggest a conserved mechanism for copper uptake. *J Biol Chem.* 2002;277(29):26021–30.
33. Sancenón V, Puig S, Mateu-Andrés I, Dorcay E, Thiele DJ, Peñarrubia L. The *Arabidopsis* copper transporter COPT1 functions in root elongation and pollen development. *J Biol Chem.* 2004;279(15):15348–55.
34. Harrison MD, Jones CE, Dameron CT. Copper chaperones: function, structure and copper-binding properties. *JBIC J Biol Inorg Chem.* 1999;4(2):145–53.
35. Abdel-Ghany SE, Müller-Moulé P, Niyogi KK, Pilon M, Shikanai T. Two P-type ATPases are required for copper delivery in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Plant Cell.* 2005;17(4):1233–51.
36. Pich A, Scholz G. Translocation of copper and other micronutrients in tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.): nicotianamine-stimulated copper transport in the xylem. *J Exp Bot.* 1996;47(1):41–7.
37. Takahashi M, Terada Y, Nakai I, Nakanishi H, Yoshimura E, Mori S, et al. Role of nicotianamine in the intracellular delivery of metals and plant reproductive development. *Plant Cell.* 2003;15(6):1263–80.
38. Curie C, Cassin G, Couch D, Divol F, Higuichi K, Le Jean M, et al. Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Ann Bot.* 2009;103(1):1–11.
39. Yamasaki H, Hayashi M, Fukazawa M, Kobayashi Y, Shikanai T. SQUAMOSA promoter binding protein-like 7 is a central regulator for copper homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2009;21(1):347–61.
40. Sunkar R, Zhu J-K. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2004;16(8):2001–19.
41. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004;116(2):281–97.
42. Sunkar R, Li Y-F, Jagadeeswaran G. Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends Plant Sci.* 2012;17(4):196–203.
43. Jones-Rhoades MW, Bartel DP. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell.* 2004;14(6):787–99.
44. Abdel-Ghany SE, Pilon M. MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in *Arabidopsis*. *J Biol Chem.* 2008 Jun 6;283(23):15932–45.
45. Zhang H, Zhao X, Li J, Cai H, Deng XW, Li L. MicroRNA408 is critical for the HY5-SPL7 gene network that mediates the coordinated response to light and copper. *Plant Cell.* 2014;26(12):4933–53.

46. Zhang H, Li L. SQUAMOSA promoter binding protein-like7 regulated microRNA408 is required for vegetative development in *A. thaliana*. *Plant J*. 2013;74(1):98–109.
47. Cohu CM, Pilon M. Regulation of superoxide dismutase expression by copper availability. *Physiol Plant*. 2007;129(4):747–55.
48. Yamasaki H, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Kobayashi Y, Shikanai T, Pilon M. Regulation of copper homeostasis by micro-RNA in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*. 2007;282(22):16369–78.
49. Schmidt W, Bartels M, Tittel J, Fühner C. Physiological effects of copper on iron acquisition processes in *Plantago*. *New Phytol*. 1997;135(4):659–66.
50. Michaud AM, Chappellaz C, Hinsinger P. Copper phytotoxicity affects root elongation and iron nutrition in durum wheat (*Triticum turgidum* durum L.). *Plant Soil*. 2008;310(1–2):151–65.
51. Ouzounidou G. Copper-induced changes on growth, metal content and photosynthetic function of *Alyssum montanum* L. plants. *Environ Exp Bot*. 1994;34(2):165–72.
52. De Vos CHR, Schat H, Vooijs R, Ernst WHO. Copper-induced damage to the permeability barrier in roots of *Silene cucubalus*. *J Plant Physiol*. 1989;135(2):164–9.
53. Murphy AS, Eisinger WR, Shaff JE, Kochian L V, Taiz L. Early copper-induced leakage of K⁺ from *Arabidopsis* seedlings is mediated by ion channels and coupled to citrate efflux. *Plant Physiol*. 1999;121(4):1375–82.
54. Van Assche F, Clijsters H. Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ*. 1990;13(3):195–206.
55. Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J Bot*. 2012;2012.
56. Hall JL. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot*. 2002;53(366):1–11.
57. Anjum NA, Hasanuzzaman M, Hossain MA, Thangavel P, Roychoudhury A, Gill SS, et al. Jaks of metal/metalloid chelation trade in plants—an overview. *Front Plant Sci*. 2015;6:192.
58. Mijovilovich A, Leitenmaier B, Meyer-Klücke W, Kroneck PMH, Götz B, Küpper H. 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*. 2009;151(2):715–31.
59. Komárek M, Čadková E, Chrástný V, Bordas F, Bollinger J-C. Contamination of vineyard soils with fungicides: a review of environmental and toxicological aspects. *Environ Int*. 2010;36(1):138–51.
60. Bosnić D, Nikolić D, Timotijević G, Pavlović J, Vaculík M, Samardžić J, et al. Silicon alleviates copper (Cu) toxicity in cucumber by increased Cu-binding capacity. *Plant Soil*. 2019;441:629–41.
61. Kim Y-H, Khan AL, Kim D-H, Lee S-Y, Kim K-M, Waqas M, et al. Silicon mitigates heavy metal stress by regulating P-type heavy metal ATPases, *Oryza sativa* low silicon genes, and endogenous phytohormones. *BMC Plant Biol*. 2014;14(1):13.
62. Collin B, Doelsch E, Keller C, Cazevielle P, Tella M, Chaurand P, et al. Evidence of sulfur-bound reduced copper in bamboo exposed to high silicon and copper concentrations. *Environ Pollut*. 2014;187:22–30.
63. Li J, Leisner SM, Frantz J. Alleviation of copper toxicity in *Arabidopsis thaliana* by silicon addition to hydroponic solutions. *J Am Soc Hortic Sci*. 2008;133(5):670–7.
64. Bosnić D. Uloga silicijumove kiseline u modulaciji odgovora krastavca (*Cucumis sativus* L.) na oksidativni stres izazvan toksičnim koncentracijama bakra. Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet; 2020.
65. Mateos-Naranjo E, Gallé A, Florez-Sarasa I, Perdomo JA, Galmés J, Ribas-Carbó M, et al. Assessment of the role of silicon in the Cu-tolerance of the C4 grass *Spartina densiflora*. *J Plant Physiol*. 2015;178:74–83.
66. Demidchik V, Straltsova D, Medvedev SS, Pozhvanov GA, Sokolik A, Yurin V. Stress-induced electrolyte leakage: the role of K⁺-permeable channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment. *J Exp Bot*. 2014;65(5):1259–70.
67. Ali S, Rizwan M, Ullah N, Bharwana SA, Waseem M, Farooq MA, et al. Physiological and biochemical mechanisms of silicon-induced copper stress tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Acta Physiol Plant*. 2016;38(11):262.
68. Frantz JM, Khandekar S, Leisner S. Silicon differentially influences copper toxicity response in silicon-accumulator and non-accumulator species. *J Am Soc Hortic Sci*. 2011;136(5):329–38.
69. Flora C, Khandekar S, Boldt J, Leisner S. Silicon alleviates long-term copper toxicity and influences gene expression in *Nicotiana tabacum*. *J Plant Nutr*. 2019;42(8):864–78.
70. Oliva SR, Mingorance MD, Leidi EO. Effects of silicon on copper toxicity in *Erica andevalensis* Cabezudo and Rivera: a potential species to remediate contaminated soils. *J Environ Monit*. 2011;13(3):591–6.
71. Vaculík M, Landberg T, Greger M, Luxová M, Stoláriková M, Lux A. Silicon modifies root anatomy, and uptake and subcellular distribution of cadmium in young maize plants. *Ann Bot*. 2012;110(2):433–43.
72. Keller C, Rizwan M, Davidian J-C, Pokrovsky OS, Bovet N, Chaurand P, et al. Effect of silicon on wheat seedlings (*Triticum turgidum* L.) grown in hydroponics and exposed to 0 to 30 μ M Cu. *Planta*. 2015;241(4):847–60.
73. Dixon RA, Paiva NL. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*. 1995;7(7):1085.
74. Ali MB, Singh N, Shohaie AM, Hahn EJ, Paek K-Y. Phenolics metabolism and lignin synthesis in root suspension cultures of *Panax ginseng* in response to copper stress. *Plant Sci*. 2006;171(1):147–54.
75. Kováčik J, Klejdus B. Dynamics of phenolic acids and lignin accumulation in metal-treated *Matricaria chamomilla* roots. *Plant Cell Rep*. 2008;27(3):605–15.
76. Wintz H, Fox T, Wu Y-Y, Feng V, Chen W, Chang H-S, et al. Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis. *J Biol Chem*. 2003;278(48):47644–53.
77. Bosnić D, Bosnić P, Nikolić D, Nikolić M, Samardžić J. Silicon and Iron Differently Alleviate Copper Toxicity in Cucumber Leaves. *Plants*. 2019;8(12).
78. Bityutskii N, Pavlovic J, Yakkonen K, Maksimović V, Nikolic M. Contrasting effect of silicon on iron, zinc and manganese status and accumulation of metal-mobilizing compounds in micronutrient-deficient cucumber. *Plant Physiol Biochem*. 2014;74:205–11.
79. Krzesłowska M. The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy. *Acta Physiol Plant*. 2011;33(1):35–51.
80. Dragišić Maksimović J, Mojović M, Maksimović V, Römheld V, Nikolic M. Silicon ameliorates manganese toxicity in cucumber by decreasing hydroxyl radical accumulation in the leaf apoplast. *J Exp Bot*. 2012 Apr 1;63(7):2411–20.
81. Lin C-C, Chen L-M, Liu Z-H. Rapid effect of copper on lignin biosynthesis in soybean roots. *Plant Sci*. 2005;168(3):855–61.
82. Gavnholt B, Larsen K. Molecular biology of plant laccases in relation to lignin formation. *Physiol Plant*. 2002;116(3):273–80.
83. Baum JA, Chandless JM, Scandalios JG. Purification and partial characterization of a genetically-defined superoxide dismutase (SOD-1) associated with maize chloroplasts. *Plant Physiol*. 1983;73(1):31–5.

84. Sagasti S, Bernal M, Sancho D, B. del Castillo M, Picorel R. Regulation of the chloroplastic copper chaperone (CCS) and cuprozinic superoxide dismutase (CSD2) by alternative splicing and copper excess in *Glycine max*. *Funct Plant Biol*. 2014 Jan 1;41(2):144–55.
85. Pilon M, Ravet K, Tapken W. The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*. 2011 Aug 1;1807(8):989–98.
86. Khandekar S, Leisner S. Soluble silicon modulates expression of *Arabidopsis thaliana* genes involved in copper stress. *J Plant Physiol*. 2011;168(7):699–705.
87. Zhou X-T, Wang F, Ma Y-P, Jia L-J, Liu N, Wang H-Y, et al. Ectopic expression of *SsPETE2*, a plastocyanin from *Suaeda salsa*, improves plant tolerance to oxidative stress. *Plant Sci*. 2018;268:1–10.
88. Rae TD, Schmidt PJ, Pufahl RA, Culotta VC, O'Halloran TV. Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* (80-). 1999;284(5415):805–8.
89. Guo W-J, Meetam M, Goldsbrough PB. Examining the specific contributions of individual *Arabidopsis* metallothioneins to copper distribution and metal tolerance. *Plant Physiol*. 2008;146(4):1697–706.
90. Liao MT, Hedley MJ, Woolley DJ, Brooks RR, Nichols MA. Copper uptake and translocation in chicory (*Cichorium intybus* L. cv Grasslands Puna) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv Ronyd) plants grown in NFT system. II. The role of nicotianamine and histidine in xylem sap copper transport. *Plant Soil*. 2000;223(1):243–52.
91. Irtelli B, Petrucci WA, Navari-Izzo F. 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*. 2008;60(1):269–77.
92. Bhat JA, Shivaraj SM, Singh P, Navadagi DB, Tripathi DK, Dash PK, et al. Role of Silicon in Mitigation of Heavy Metal Stresses in Crop Plants. *Plants* (Basel, Switzerland). 2019 Mar 21;8(3):71.
93. Leng X, Wang P, Zhao P, Wang M, Cui L, Shangguan L, et al. Conservation of microRNA-mediated regulatory networks in response to copper stress in grapevine. *Plant Growth Regul*. 2017;82(2):293–304.

IMPRESUM

Trendovi u molekularnoj biologiji, 2021.

Izdavač

**Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu**

Uređivački odbor

Dr **Sonja Pavlović**, naučni savetnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo
Univerzitet u Beogradu

Dr **Jelena Begović**, naučni savetnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo
Univerzitet u Beogradu

Prof. dr **Ivana Novaković**, redovni profesor,
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr **Dužanka Savić Pavićević**, redovni profesor,
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr **Ana Đorđević**, naučni savetnik,
Univerzitet u Beogradu Institut za biološka istraživanja
„Siniša Stanković“

Recenzenti

Dr **Svetlana Radović**, redovni profesor,
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr **Vesna Škodrić Trifunović**, redovni profesor,
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr **Gordana Nikčević**, naučni savetnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo
Univerzitet u Beogradu

Dizajn i izrada korica

Ivan Strahinić

Štampa

Curent Print, Beograd

Periodičnost izlaza publikacije

Godišnje

Tiraž

200 primeraka

Autori

Anđelković Marina	71
Arsić Aleksandra.....	152
Bosnić Dragana	180
Djusalov Mila	21
Đorić Ilona	133
Gadjanski Ivana	21
Gašić Vladimir	113
Išić Denčić Tijana	96
Janjušević Ljiljana	21
Janković Miljuš Jelena	133
Janković Radmila	96
Jovčić Branko	166
Keckarević Dušan	54
Keckarević Marković Milica	54
Kecmanović Miljana	54
Knežić Teodora	21
Kojadinović Milica	152
Kokanov Nikola	123
Komazec Jovana	84
Kosijer Petar	21
Kotur Nikola	6
Kožik Bojana	123
Krajnović Milena	123
Malešević Milka	166
Nikolić Dragana	180
Panić Marko	33
Perić Stojan	60
Pešović Jovan	60
Popović D. Željko	21
Radenković Lana	60
Rakićević Ljiljana	146
Rakočević-Stojanović Vidosava	60
Ristić Nina	96
Samardžić Jelena	180
Savić-Pavićević Dužanka	60
Šelemetjev Sonja	133
Skakić Anita	42
Spasovski Vesna	107
Stanković Biljana	6
Stojiljković Maja	42
Tošić Nataša	113
Ugrin Milena	84
Vreća Miša	107
Zukić Branka	6

CIP - Каталогизacija y publikaciji
Народна библиотека Србије, Београд

577.2

TRENDOVI u molekularnoj biologiji = Trends in
Molecular Biology. - 2021, br. 1 (sep.)- . - Beograd :
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
2021- (Beograd : Curent Print). - 28 cm

Godišnje. - Tekst na srp. i engl. jeziku.
ISSN 2787-2947 = Trendovi u molekularnoj biologiji
COBISS.SR-ID 45105929