

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Jelena M. Pavlović

Uloga silicijuma u prevazilaženju nedostatka  
gvožđa kod krastavca (*Cucumis sativus* L.)

doktorska disertacija

Beograd, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Jelena M. Pavlović

The Role of Silicon in Alleviation of Iron  
Deficiency in Cucumber (*Cucumis sativus* L.)

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017.

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

**KOMISIJA ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE:**

**MENTORI:**

dr Miroslav Nikolić, naučni savetik  
Univerzitet u Beogradu - Institut za multidisciplinarna istraživanja

dr Aneta Sabovljević, vanredni profesor  
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

**ČLAN KOMISIJE:**

dr Jelena Samardžić, naučni saradnik  
Univerzitet u Beogradu – Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

**Datum odbrane:** \_\_\_\_\_

*Ova doktorska disertacija realizovana je u okviru projekta osnovnih istraživanja Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije „Mineralni stres i adaptacija biljaka na marginalnim poljoprivrednim zemljištima” (OI-173028), pod rukovodstvom dr Miroslava Nikolića, naučnog savetnika.*

*Najveću zahvalnost svakako dugujem mom mentoru dr Miroslavu Nikoliću, pre svega na ukazanom poverenju, izuzetnoj posvećenosti i stručnosti u vođenju ove doktorske disertacije u svim fazama njene realizacije. Hvala Vam što ste na mene preneli deo svog velikog znanja iz oblasti mineralne ishrane biljaka, kao i posvećenost i ljubav prema naučnom radu. Zahvaljujem Vam se na dragocenom vremenu koje ste mi posvetili učeći me brojnim veštinama značajnim u istraživačkom radu. Hvala Vam što ste mi pokazali da je u redu postaviti ispred sebe visoke ciljeve. Hvala Vam na svim izazovima i kreativnim diskusijama. I na kraju, hvala Vam što ste me trpeli.*

*Želela bih da izrazim zahvalnost i dr Jeleni Samardžić i njenim saradnicima, dr Gordani Timotijević i Dragani Bosnić, iz Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, na izvođenju molekularnih analiza i obradi rezultata. Dr Jeleni Samardžić bih se zahvalila i na pomoći pri planiranju analiza, obradi i tumačenju rezultata, kao i na čitanju rukopisa i sugestijama. Jelena, hvala ti na nesebičnom prenošenju znanja i veština iz oblasti molekularne biologije, kao i na svim toplim rečima podrške i ohrabrenjima.*

*Zahvaljujem se mojim dragim kolegama iz Grupe za ishranu biljaka, Instituta za multidisciplinarna istraživanja, dr Nini Nikolić, dr Ljiljani Kostić-Kravljanac, Predragu Bosniću i Nenadu Steviću, na svesrdnoj podršci, pomoći, sjajnim diskusijama i neverovatnim količinama smeha. Ljiljo, hvala ti na svemu što si me naučila u praktičnom radu u laboratoriji, kao i na pomoći, podršci i iskrenom prijateljstvu. Tvoja istrajnost, posvećenost i borbenost bile su mi prava inspiracija, u laboratoriji i van nje.*

*Zahvaljujem dr Vuku Maksimoviću iz Instituta za multidisciplinarna istraživanja na izvođenju HPLC analiza.*

*Zahvaljujem se drugom mentoru dr Aneti Sabovljević na ukazanom poverenju, kao i na kritičkom čitanju rukopisa i korisnim sugestijama pri finalnom oblikovanju ove doktorske disertacije.*

*Hvala i mojoj dragoj komšinici Ceci na svim pitama, kolačima, kafama i razgovorima.*

*Zahvaljujem se mojim prijateljima i mojoj porodici, majci Mirjani, ocu Miloradu i braći Dušanu i Luki, koji su sve vreme bili uz mene, na svojoj ljubavi i podršci koju su mi pružili. Mama i Tata, hvala vam što ste podržali moje školovanje, i što ste dali sve od sebe u svakom pogledu, znam da nije bilo lako. Dućo, hvala ti što si slušao i razumeo, a tebi Luka hvala na svim „hladnim tuševima”, zajedno ste odradili sjajan posao u očuvanju mog zdravog razuma.*

*Mojoj porodici*

## Uloga silicijuma u prevazilaženju nedostatka gvožđa kod krastavca

(*Cucumis sativus* L.)

**Sažetak:** Nedostatak gvožđa (Fe) predstavlja jedan od glavnih ograničavajućih faktora u proizvodnji useva širom sveta, koji značajno umanjuje prinos i kvalitet. Sa druge strane, koristan efekat silicijuma (Si) na rastenje i razviće biljaka, posebno u uslovima stresa, dobro je poznat u literaturi. Cilj ove teze je bio da se prouči mehanizam kako Si ublažava stres izazvan nedostatkom Fe kod dikotiledonih biljaka (strategija I usvajanja Fe), o kome se do sada ništa nije znalo. Kao model biljka odabran je krastavac (*Cucumis sativus* L.) kao vrsta koja akumulira Si.

Izvršena su detaljna izučavanja mobilnosti Fe u apoplastu, biosinteze jedinjenja koja mobilišu Fe i njegovog daljeg usvajanja na bazi redukcije u korenu, zajedno sa ekspresijom gena uključenih u te procese. U nadzemnom delu biljke, proučavana je remobilizacija Fe iz starijih u mlađe listove, tako što su paralelno mereni distribucija <sup>59</sup>Fe u listovima na različitim pozicijama i koncentracija helatora nikocijanamina (NA), zajedno sa ekspresijom gena za nikocijanamin sintazu (NAS) uključenu u njegovu biosintezu i YSL (eng. *yellow stripe-like*) transporter koji posreduju u transportu Fe-NA floemom.

Ishrana Si uticala je na povećanu akumulaciju Fe u apoplastu i Fe-mobilizirajućih jedinjenja u korenu, kao i na stimulaciju mašinerije za usvajanje Fe. U listovima, Si je uticao na relativnu distribuciju Fe povećavajući remobilizaciju Fe iz starijih listova zbog povećane akumulacije NA i ekspresije YSL1, što je pospešilo heliranje Fe i njegovu retranslokaciju u mlađe listove.

Ova teza pruža, po prvi put, objašnjenje mehanizma koji Si ispoljava u prevazilaženju nedostatka Fe, a koji se sastoji u povećanju rezervi Fe u apoplastu korena, njegove mobilizacije i transporta iz korenu u izdanak, kao i poboljšane remobilizacije iz starijih u mlađe listove.

**Ključne reči:** krastavac (*Cucumis sativus* L.), nedostatak gvožđa, usvajanje gvožđa, retranslokacija gvožđa, organske kiseline, fenoli, geni strategije I, nikocijanamin sintaza (NAS), yellow stripe-like (YSL) transporteri, silicijum

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Fiziologija i molekularna biologija biljaka

**UDK broj:** [582.681.71:546.72]:[577.118:581.1](043.3)



# The Role of Silicon in Alleviation of Iron Deficiency in Cucumber

(*Cucumis sativus* L.)

**Abstract:** Iron (Fe) deficiency represents a major limiting factor for crop production worldwide, affecting both crop yield and quality. Beneficial effect of silicon (Si) on plant growth and development, especially under stress conditions, is well documented in the literature. The objective of this thesis was to investigate the mechanisms of how Si ameliorates Fe deficiency in Strategy I plants, which has not been understood until recently. Cucumber (*Cucumis sativus* L.) was selected as a common model plant for Fe research and which is also known as a Si-accumulating dicot.

Detailed analyzes of the dynamics of apoplastic Fe, biosynthesis of Fe-mobilizing compounds and reduction-based Fe acquisition were performed in roots along with the expression of relevant genes involved in these processes. At the shoot level, distribution of <sup>59</sup>Fe was measured in the leaves at different positions and developmental stages in parallel with the concentration of the Fe chelator nicotianamine (NA) and the gene expression of nicotianamine synthase (NAS) involved in its biosynthesis. The expression of yellow stripe-like (YSL) transporters mediating phloem transport of Fe-NA in shoot was also determined.

Silicon nutrition increased the accumulation of apoplastic Fe and Fe mobilizing compounds in roots. In leaves, Si affected relative Fe distribution by enhancing Fe remobilization from old leaves via increased NA accumulation and expression of the *YSL1*, which stimulated Fe chelation and its retranslocation to younger leaves.

This thesis for the first time elucidates the mechanism of Si-mediated alleviation of Fe deficiency stress, by increasing the root apoplastic Fe pool, enhancing its acquisition by roots and translocation to shoots and also remobilization of Fe from older to younger leaves.

**Key words:** cucumber (*Cucumis sativus* L.), iron deficiency, iron acquisition, iron retranslocation, organic acids, phenolics, Strategy I-related genes, nicotianamine synthase (NAS), yellow stripe-like (YSL) transporters, silicon.

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfield:** Plant physiology and molecular biology

**UDC number:** [582.681.71:546.72]:[577.118:581.1](043.3)

**Publikovani rezultati doktorske disertacije “Uloga silicijuma u prevazilaženju nedostatka gvožđa kod krastavca (*Cucumis sativus* L.)”:**

1. Pavlovic J, Samardzic J, Kostic L, Laursen K.H, Natic M, Timotijevic G, Schjoerring JK, Nikolic M. 2016. Silicon enhances leaf remobilization of iron in cucumber under limited iron conditions. *Annals of Botany* 118: 271-280.
2. Bityutskii N\*, Pavlovic J\*, Yakkonen K, Maksimovic 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 Physiology and Biochemistry* 74: 205-211.
3. Pavlovic J, Samardzic J, Masimović V, Timotijevic G, Stevic N, Laursen KH, Hansen TH, Husted S, Schjoerring JK, Liang Y, Nikolic M. 2013. Silicon alleviates iron deficiency in cucumber by promoting mobilization of iron in the root apoplast. *New Phytologist* 198: 1096-1107.

---

\**equal contribution*

# Sadržaj

<b>1</b>	<b>Uvod</b> .....	1
1.1	Fiziološka uloga gvožđa kod biljaka .....	1
1.1.1	Konstituenti redoks sistema koji sadrže gvožđe.....	2
1.2	Gvožđe u zemljištu .....	6
1.3	Usvajanje gvožđa korenovim sistemom .....	6
1.3.1	Adaptivni mehanizam biljaka strategije I.....	7
1.3.2	Adaptivni mehanizam biljaka strategije II.....	10
1.4	Transport i distribucija gvožđa u biljci .....	11
1.4.1	Translokacija gvožđa iz korena u nadzemni deo biljke.....	11
1.4.2	Međucelijski transport gvožđa .....	14
1.4.3	Remobilizacija i redistribucija gvožđa u izdanku.....	15
1.4.4	Subćelijski transport i lokalizacija gvožđa .....	16
1.5	Nedostatak gvožđa kao globalni problem.....	18
1.6	Silicijum kao koristan element za više biljke .....	19
1.7	Silicijum u zemljištu .....	21
1.8	Usvajanje i transport silicijuma kod vaskularnih biljaka.....	22
<b>2</b>	<b>Ciljevi istraživanja</b> .....	28
<b>3</b>	<b>Materijal i metode</b> .....	29
3.1	Biljni materijal i uslovi gajenja.....	29
3.2	Eksperiment 1: Interakcija Si i Fe u ishrani biljaka.....	29
3.2.1	Dizajn eksperimenta .....	30

3.3	Eksperiment 2: Uticaj Si na usvajanje Fe na nivou korena na biljke krastavca u uslovima nedostatka Fe .....	30
3.3.1	Vremenska dinamika fizioloških činilaca mašinerije za usvajanje Fe biljaka strategije I.....	30
3.3.2	Uticaj Si na usvajanje Fe iz slabo rastvorljivog Fe <sup>III</sup> hidroksida.....	32
3.3.3	Uticaj Si na sintezu organskih kiselina u listu krastavca.....	32
3.4	Eksperiment 4: Uticaj Si na remobilizaciju Fe u listovima krastavca u uslovima nedostatka Fe.....	33
3.4.1	Dizajn eksperimenta .....	33
3.5	Određivanje hlorofila.....	35
3.6	Sakupljanje ksilemskog soka.....	35
3.7	Određivanje Fe u apoplastu korena .....	36
3.8	Određivanje Fe u biljnim tkivima.....	36
3.9	Određivanje Fe u ksilemskom soku.....	36
3.10	Određivanje Si u biljnim tkivima.....	37
3.11	Određivanje Si u hranljivom rastvoru.....	37
3.12	Određivanje organskih kiselina, fenolnih jedinjenja i riboflavina u različitim biljnim tkivima i ksilemskom soku .....	37
3.13	Određivanje redukcionog kapaciteta Fe <sup>III</sup> helata.....	39
3.14	Priprema <sup>57</sup> Fe <sup>III</sup> EDTA, usvajanje <sup>57</sup> Fe i određivanje <sup>57</sup> Fe u biljnim tkivima.....	39
3.15	Ekstrakcija i određivanje NA.....	41
3.16	Ekstrakcija RNK, semikvantitativni RT-PCR i kvantitativni PCR u realnom vremenu (Real-time PCR).....	42
3.17	Filogenetska analiza.....	44
3.18	Statistička analiza podataka .....	45

<b>4</b>	<b>Rezultati</b> .....	46
4.1	Interakcija Fe i Si u ishrani krastavca.....	46
4.2	Uticaj Si na komponente mašinerije za usvajanje Fe biljaka strategije I.....	48
4.3	Dinamika korisnog efekta Si na ublažavanje hloroze izazvane deficitom Fe .....	49
4.4	Uticaj Si na dinamiku ekspresije gena i aktivnosti proteina uključenih u usvajanje Fe.....	51
4.5	Uticaj Si na iskorišćavanje Fe iz apoplasta korena i njegovu translokaciju putem ksilema u nadzemne delove biljke .....	52
4.6	Uticaj Si na akumulaciju Fe-mobilizirajućih/redukujućih jedinjenja i ekspresiju gena ključnih za njihovu biosintezu u korenu.....	54
4.7	Uticaj Si na akumulaciju karboksilata u listu krastavca .....	58
4.8	Uticaj Si na retranslokaciju Fe kod krastavca.....	60
4.8.1	Uticaj eksperimentalnih uslova na rastenje biljaka i mobilnost Fe tokom trajanja eksperimenta.....	60
4.8.2	Uticaj Si na remobilizaciju Fe iz starijih u mlađe listove.....	63
4.8.3	Uticaj Si na ekspresiju <i>NRAMP1</i> gena u listovima .....	65
4.8.4	Uticaj Si na koncentraciju NA i ekspresiju <i>NAS</i> gena u listu.....	65
4.9	Uticaj Si na ekspresiju YSL1 i YSL3 transportera za Fe-NA kompleks u listu ....	67
4.10	Filogenetska analiza aminokiselinskih sekvenci <i>NAS</i> i YSL kod krastavca i arabidopsisa.....	68
<b>5</b>	<b>Diskusija</b> .....	71
5.1	Uticaj Si na mobilizaciju, usvajanje Fe korenom i njegovu translokaciju do listova.....	71
5.1.1	Mobilizacija Fe iz apoplasta korena .....	72
5.1.2	Uticaj Si na mašineriju za usvajanje Fe u korenu.....	74

5.1.3	Uticaj Si na translokaciju Fe putem ksilema i iskorišćavanje Fe u listovima	74
5.2	Uticaj Si na retranslokaciju Fe u nadzemnom delu biljke .....	76
5.2.1	Uticaj Si na NA-posredovanu redistribuciju Fe u listovima krastavca .....	77
5.3	Delovanje Si na metabolizam biljaka izloženih stresu: direktno <i>versus</i> indirektno.....	79
5.4	Mehanizam delovanja Si na homeostazu Fe kod krastavca.....	81
<b>6</b>	<b>Zaključci</b> .....	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>Literatura</b> .....	<b>85</b>
	Biografija autora	
	Izjava o autorstvu	
	Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada	
	Izjava o korišćenju	

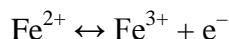
# 1 Uvod

## 1.1 Fiziološka uloga gvožđa kod biljaka

Gvožđe (Fe) je esencijalni hranljivi element za biljke i kao konstituent citohroma i nehem proteina neophodno je za odvijanje vitalnih fizioloških procesa kao što su disanje, fotosinteza i fiksacija azota. Takođe, Fe igra značajnu ulogu u transferu elektrona i reverzibilnim redoks reakcijama u biljnim ćelijama i tkivima (Kim *et* Guerinot, 2007).

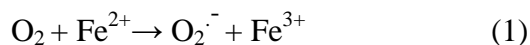
Još je Julius von Sachs, začetnik modernih eksperimenata u hranljivim rastvorima, 1860. godine uključio Fe kao sastavni hranljivi element u svoju recepturu rastvora za gajenje biljaka, dok je Eusèbe Gris 1844. godine pokazao da je Fe esencijalno za lečenje hloroze kod vinove loze (Römheld *et* Nikolić, 2006).

Fiziološka uloga Fe u biljnim sistemima se, pre svega, zasniva na osobini Fe kao prelaznog metala da lako i reverzibilno menja svoje redoks stanje između fero ( $\text{Fe}^{2+}$ ) i feri ( $\text{Fe}^{3+}$ ) jonskog oblika

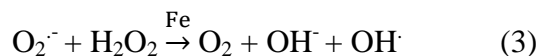
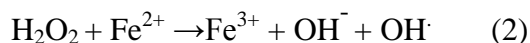


a takođe i da formira oktaedralne komplekse sa brojnim ligandima uz mogućnost da lako menja svoj redoks potencijal u zavisnosti od liganda (Hell *et* Stephan, 2003). Upravo zbog ovakvih karakteristika, Fe je od suštinske važnosti u biološkim redoks sistemima. Zbog visokog afiniteta Fe za različite ligande (npr. organske kiseline ili neorganski fosfat), Fe se kroz biljku ne transportuje u jonskom obliku.

U aerobnim sistemima brojni helati Fe male molekulske mase, a posebno slobodno gvožđe, u  $\text{Fe}^{2+}$  ili  $\text{Fe}^{3+}$  obliku, su vrlo efikasni u nastanku reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS; eng. *Reactive Oxygen Species*), kao što su superoksid anjon ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) i hidrosil ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) radikali i slična jedinjenja (Halliwell *et* Gutteridge, 1986; Halliwell, 2009), kroz Fenton-ovu (2) i Haber-Weissovu (3) reakciju.





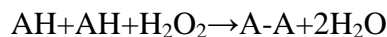


Ovi radikali su visoko toksični i odgovorni su za oštećenja proteina, nukleinskih kiselina i polinezasićenih masnih kiselina koje ulaze u sastav membranskih lipida. Kako bi se sprečilo oksidativno oštećenje ćelija (posebno ćelijskih membrana), Fe mora da bude ili čvrsto vezano ili ugrađeno u strukture (npr. hem ili nehem proteine) koje omogućavaju kontrolisane reverzibilne oksido-redukcijske reakcije, uključujući i one u antioksidativnoj zaštiti (Broadley *et al.*, 2012).

## 1.1.1 Konstituenti redoks sistema koji sadrže gvožđe

### 1.1.1.1 Hem proteini

Najpoznatiji hem proteini su citohromi, koji sadrže hem Fe-porfirinski kompleks kao prostetičnu grupu. Citohromi su konstituenti redoks sistema u hloroplastima, mitohondrijama, kao i komponenta u redoks lancu nitrata reduktaze. Ostali hem proteini uključuju katalazu, peroksidaze i leghemoglobin. Katalaza katalizuje konverziju vodonik peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) u vodu i  $\text{O}_2$  (reakcija A), dok peroksidaze katalizuju konverziju  $\text{H}_2\text{O}_2$  u vodu (reakcija B):



Glavna uloga katalaze je u reakcijama fotorespiracije, kao i u glikolatskom putu, i uključena je u zaštitu hloroplasta od slobodnih radikala tokom reakcije cepanja vode u procesu fotosinteze. Peroksidaze katalizuju reakciju oksidacije više vrsta supstrata (npr. askorbata u antioksidativnoj zaštiti ili fenola u ćelijskom zidu, gde katalizuju reakciju polimerizacije

radi formiranja lignina) pomoću vodonik peroksida (Römheld *et* Nikolic, 2006). Oba enzima su, stoga, veoma osetljiva na nedostatak Fe. U takvim uslovima njihova aktivnost rapidno opada u biljnim tkivima, pa je aktivnost ova dva enzima dobar indikator statusa snabdevenosti biljaka gvoždem. U korenu biljaka sa nedostatkom Fe, zbog smanjene aktivnosti peroksidaze dolazi do povećanja produkcije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i akumulacije fenola, a takođe i do povećanog oslobađanja fenola iz ćelija korena. Određeni fenoli, kao npr. kafeična kiselina, veoma su efikasni u heliranju i redukciji neorganskog Fe<sup>III</sup> i predstavljaju značajnu komponentu sistema odgovornog za usvajanje Fe određenih biljaka. Na taj način, određene biljne vrste, kao npr. crvena detelina, mogu oslobađati značajne količine fenola kao odgovor na deficit Fe. Leghemoglobin ima funkciju da održava nisku koncentraciju O<sub>2</sub> u citoplazmi ćelija korena leguminoza koje formiraju nodule i tako obezbeđuje pravilno funkcionisanje nitrogenaze (enzim koji redukuje N<sub>2</sub> do NH<sub>3</sub>), koja je izuzetno osetljiva na visoke koncentracije O<sub>2</sub>. Leghemoglobin takođe može biti prisutan i u ćelijama korena biljaka koje ne formiraju nodule, gde ima ulogu indikatora deficita O<sub>2</sub> (hipoksije), inicirajući metabolički prelaz ka fermentaciji (Broadley *et al.*, 2012).

### ***1.1.1.2 Fe-S proteini***

U okviru Fe-S proteina, koji imaju veoma značajnu ulogu u reakcijama svetle faze fotosinteze, Fe je koordinacionim vezama vezano za tiolnu grupu cisteina ili za neorganski sumpor (S) u vidu klastera, ili čak za oba. Najpoznatiji Fe-S protein je feredoksin, koji vrši prenos elektrona u velikom broju metaboličkih procesa.

Još jedan primer Fe-S proteina predstavljaju izoenzimi superoksid dismutaze (SOD), koji sadrže Fe kao metalnu komponentu prostetičke grupe (FeSOD). Superoksid dismutaza detoksifikuje O<sub>2</sub><sup>-</sup> formiranjem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i može sadržati Cu (bakar), Zn (cink), Mn (mangan) ili Fe kao metalnu komponentu (Fridovich, 1983; Sevilla *et al.*, 1984). U hloroplastima, FeSOD je glavni izoenzim superoksid dismutaze, ali se može naći i u mitohondrijama i peroksizomima (Broadley *et al.*, 2012). Kod biljaka sa deficitom Fe, aktivnost FeSOD je niska, dok je aktivnost CuZnSOD povišena, što dovodi do velike

produkcije  $H_2O_2$ . Iako biljke sa deficitom Fe imaju smanjeni nivo antioksidativnih enzima, kao što su katalaza i askorbat peroksidaza, i povišene koncentracije  $H_2O_2$ , ipak ne dolazi do pojave povećanog oksidativnog oštećenja ćelije (npr. lipidne peroksidacije; Raineri *et al.*, 2001), najverovatnije zbog veoma niskih koncentracija Fe koje je neophodno za generisanje ROS putem Fentonove reakcije.

Stres izazvan nedostatkom Fe je povezan sa pojačanom sintezom organskih kiselina, posebno citrata. Smanjena aktivnost akonitaze može poslužiti kao objašnjenje za povećanu sintezu organskih kiselina u tkivima biljaka deficitarnim Fe. Akonitaza je Fe-S protein koja katalizuje izomeraciju citrata u izocitrat u Krebsovom (TCA) ciklusu (Broquisse *et al.*, 1986). Gvožđe kao metalna komponenta prostetičke grupe, potrebno je za stabilnost i aktivnost enzima, a kao komponenta Fe-klaster enzima odgovorno je za prostornu orijentaciju supstrata (citrata i izocitrata). Kod biljaka koje pate od nedostatka Fe, aktivnost akonitaze je smanjena, i reakcije u TCA ciklusu su poremećene, što za posledicu ima nagomilavanje organskih kiselina u korenu, ksilemskom soku i fluidu apoplasta kod različitih biljnih vrsta (Nikolic *et Römheld*, 1999; López-Millán *et al.*, 2000; Abadía *et al.*, 2002). Visoka koncentracija citrata u ksilemu u vezi je sa činjenicom da se Fe u ksilemu transportuje u vidu stabilnog, u vodi rastvorljivog Fe-citratnog kompleksa (Rellan-Alvarez *et al.*, 2010). U korenu paradajza sa nedostatkom Fe, povećana koncentracija organskih kiselina je u vezi sa povećanom fiksacijom  $CO_2$  u mraku i ekskrecijom protona ( $H^+$ ), tj. acidifikacijom rizosfere (Miller *et al.*, 1990). Fiksacija  $CO_2$  indukovana nedostatkom Fe i visoka aktivnost fosfoenolpiruvatne karboksilaze (PEPC) u ćelijama korena su verovatno glavni uzroci akumulacije organskih kiselina kod biljaka koje pate od nedostatka Fe (Abadia *et al.*, 2002). Povećana aktivnost PEPC je takođe u vezi sa adaptivnim odgovorima korena na nedostatak Fe, kao što je oslobađanje  $H^+$  i redukcija  $Fe^{3+}$  na plazma membrani (Rombola *et al.*, 2002; M'sehli *et al.*, 2009).

Riboflavin se takođe akumulira kod većine dikotiledonih vrsta pri nedostaku Fe, i njegovo oslobađanje iz korena može biti i do 200 puta veće kod Fe-deficitarnih biljaka (Venkat Raju *et al.*, 1972; Andaluz *et al.*, 2009). Povećane koncentracije riboflavina u korenu biljaka u vezi su sa aktivnosti 6,7-dimetil 1-8-ribitilumazin sintazom koja doprinosi poslednjem koraku biosinteze riboflavina (Andaluz *et al.*, 2009). Akumulacija riboflavina

se najverovatnije javlja zbog izmenjenog metabolizma purina kao posledica oštećenja ksantin oksidaze (Schlee *et al.*, 1968), još jednog enzima sa Fe-S klasterima kao prostetičnoj grupi.

### 1.1.2 Ostali enzimi koji zahtevaju gvožđe

Postoji još veliki broj slabije izučenih enzima u kojima se Fe ponaša ili kao metalna komponenta u redoks reakcijama ili kao vezujući element između enzima i supstrata. Kod biljaka sa nedostatkom Fe, aktivnosti takvih enzima su niske, što može dovesti do promena u metaboličkim procesima.

Aminokiselina metionin je, na primer, i prekursor za sintezu etilena. Duž biosintetskog puta pri konverziji 1-aminociklopropan-1-karboksilne kiseline (ACC) u etilen, dešava se dvostepena jednoelektonska oksidacije, koju katalizuje Fe<sup>II</sup>. Iz tog razloga, kod biljaka koje pate od nedostatka Fe produkcija etilena je jako niska (Bouzayen *et al.*, 1991).

Lipoksigenaze su enzimi koji sadrže jedan atom Fe po molekulu (Hildebrand, 1989), koji katalizuju peroksidaciju linolne i linolenske kiseline tj. polinezasićenih masnih kiselina koje su značajne komponente ćelijskih membrana. Stoga, visoka aktivnost lipoksigenaza je karakteristična za brzorastuća tkiva i organe, i može biti krucijalna za stabilnost membrane.

Niska koncentracija hlorofila mladih listova je najočigledniji vizuelni simptom nedostatka Fe, poznat pod nazivom žutilo listova ili hloroza. Brojni faktori su odgovorni za to smanjene, gde je najdirektniji zapravo uloga Fe u biosintezi hlorofila. Prekursor hlorofila i sinteze hema je aminolevulinska kiselina (ALA), a stopa formiranja ALA je pod kontrolom Fe (Pushnik *et Miller*, 1989). Takođe, Fe je neophodno i za formiranje protohlorofilida od Mg-protoporfirina (Spiller *et al.*, 1982). Koproporfirinogen oksidaza je protein koji sadrži Fe (Chereskin *et Castelfranco*, 1982), a konvezija koproporfirinogena do protoporfirina IX, takođe zahteva prisustvo ovog mikroelementa (Hsu *et Miller*, 1969).

## 1.2 Gvožđe u zemljištu

Gvožđe je četvrti po zastupljenost element u Zemljinoj kori i u zemljištu se javlja u koncentracijama od čak 7.000 do 500.000 mg kg<sup>-1</sup>. Međutim, u dobro aerisanim zemljištima u oblasti fiziološke pH, Fe je izuzetno nerastvorljivo i nalazi se pretežno u formi Fe<sup>III</sup> oksida i hidroksida [Fe(OH)<sub>2</sub>, Fe(OH)<sub>3</sub>, i Fe(OH)<sub>4</sub>], koji su slabo dostupni za više biljke. Koncentracija slobodnih Fe<sup>2+</sup> i Fe<sup>3+</sup> jona u zemljišnom rastvoru opada sa povećanjem pH i izuzetno je niska u krečnim i alkalnim zemljištima (oko 10<sup>-10</sup> M; Boukhalfa *et* Crumbliss, 2002). Iz tog razloga, uzgajanje biljaka na krečnim zemljištima i na zemljištima koja su prekomerno đubrena krečom dovodi do pojave hloroze indukovane nedostatkom Fe. Procenjuje se da je skoro 30% svetskog obradivog zemljišta previše karbonatno za optimalno uzgajanje useva (Guerinot *et* Yi, 1994).

Helati Fe<sup>III</sup>, retko Fe<sup>II</sup>, koji predstavljaju stabilne i dobro rastvorljive organske komplekse Fe sa huminskim kiselinama, organskim kiselinama, fenolima (produkti degradacije organske materije u zemljištu) i mikrobiološkim sideroforama, čine dominantne forme rastvorljivog Fe u zemljištu (Lindsay, 1995). Smatra se da koncentracija helatnog Fe, koje je potrebno za optimalno rastenje i razviće biljaka iznosi 10<sup>-6</sup> do 10<sup>-5</sup> M. U zemljištima sa visokim sadržajem organske materije koncentracija Fe helata dostiže i do 10<sup>-4</sup> do 10<sup>-3</sup> M. Međutim, u dobro aerisanim zemljištima sa malim sadržajem organske materije, koncentracija Fe u zemljišnom rastvoru nalazi se u opsegu od 10<sup>-8</sup> do 10<sup>-7</sup> M, što je nedovoljno za normalno rastenje većine biljnih vrsta (Römheld *et* Marschner, 1986). Iz tog razloga, rastvorljivost Fe u rizosferi je uglavnom regulisana fiziološkim i morfološkim promenama korena, posebno izraženim u uslovima njegovog nedostatka.

## 1.3 Usvajanje gvožđa korenovim sistemom

Kod biljaka su se tokom evolucije razvila dva različita mehanizma za mobilizaciju gvožđa u rizosferi i njegovog usvajanja preko plazma membrane ćelija korena. Sve dikotile

i monokotile biljke osim trava (Poaceae) koriste takozvanu strategiju I za usvajanje Fe, dok strategiju II koriste biljke iz familije trava (Romheld *et* Marschner, 1986).

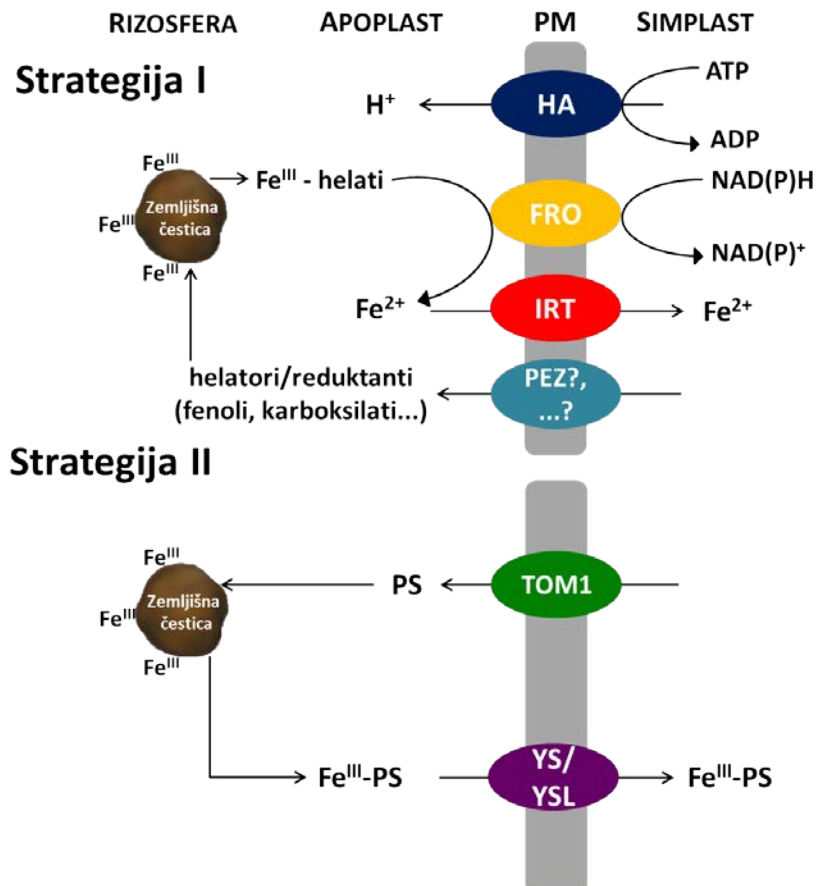
### 1.1.3 Adaptivni mehanizam biljaka strategije I

Karakterističan odgovor korena biljaka strategije I (Slika 1, gore) na smanjenu dostupnost Fe u zemljištu predstavljen je indukcijom tri ključna procesa: (a) otpuštanja protona putem plazma membranske ATPaze P-tipa, kako bi se zakiselila okolina korena (rizosfera) i tako povećala rastvorljivost Fe<sup>III</sup> (Santi *et* Schmidt, 2009); (b) redukcije Fe<sup>3+</sup> do Fe<sup>2+</sup> jona od strane enzima Fe<sup>III</sup>-helatne reduktaze (FRO) na plazma membrani ćelija korena; (c) transporta Fe<sup>2+</sup> kroz plazma membranu preko specifičnog regulisanog transportnog proteina, IRT1 (eng. *iron regulated transporter 1*) (Vert *et al.*, 2002). Dodatni adaptivni mehanizam predstavljaju i morfološke promene korena, koje uključuju povećanje ukupne površine korena formiranjem lateralnih korenova, korenskih dlačica u apikalnoj zoni, kao i razviće takozvanih transfernih ćelija (Schmidt, 1999). Takođe, u uslovima nedostatka Fe, mnoge biljke strategije I povećavaju akumulaciju, a potom i izlučivanje (eksudaciju) organskih jedinjenja (npr. karboksilata, fenola i flavina), koji mogu povećati dostupnost Fe putem heliranja i potencijalne redukcije Fe<sup>III</sup> (Ohwaki *et* Sugahara, 1997; Welkie, 2000; Jin *et al.*, 2007). Smatra se da se eksudacija fenolnih jedinjenja vrši posredstvom PEZ (eng. *phenolics efflux zero*) transportera (Slika 1, gore; Kobayashi *et* Nishizawa, 2012).

Acidifikacija rizosfere je naverovatnije posledica aktiviranja jednog ili više pripadnika familije H<sup>+</sup>-ATPaza kod biljaka. Nedavne studije su pokazale da H<sup>+</sup>-ATPaza krastavca (*Cucumis sativus*) (CsHA1) doprinosi adaptivnom mehanizmu strategije I (Hell *et* Stephan, 2003). Iako je kod arabidopsisa (*Arabidopsis thaliana*) povećana ekspresija AtHA1, AtHA2 i AtHA7 (H<sup>+</sup>-ATPaze arabidopsisa) u epidermisu korena u odgovoru na nedostatak Fe, AtHA2 je primarna H<sup>+</sup>-ATPaza korena u odgovoru na nedostatak Fe (Morrissey *et* Guerinot, 2009). Indukcija aktivnosti H<sup>+</sup>-ATPaza zavisi od FIT

transkripcionog faktora, koji predstavlja ključnu komponentu u signalnom putu nedostatka Fe (Hell *et* Stephan, 2003).

Nakon oslobađanja  $\text{Fe}^{3+}$  iz zemljišnih čestica koje sadrže minerale Fe, enzim feri-helatna reduktaza (FRO) lokalizovana na plazma membrani rizodermalnih ćelija vrši transport elektrona preko plazma membrana kako bi redukovala  $\text{Fe}^{3+}$  do  $\text{Fe}^{2+}$ .



**Slika 1.** Strategije usvajanja Fe iz zemljišta kod viših biljaka. Strategija I, redukciona strategija, prisutna je kod svih viših biljaka osim trava (gore); u odgovoru na nedostatak Fe dolazi do eksudacije protona od strane HA  $\text{H}^+$  ATP-aze; feri helatna reduktaza, FRO, vrši redukciju  $\text{Fe}^{III}$  do  $\text{Fe}^{II}$ , koje se zatim transportuje u epidermalne ćelije korena putem IRT, transportera divalentnih katjona; PEZ vrši eksudaciju fenolnih jedinjenja, koja mogu povećati dostupnost Fe u rizosferi. Strategija II (dole), helataciona strategija, prisutna je kod trava (dole); u odgovoru na nedostatak Fe vrši se sekrecija fitosiderofora (PS) u rizosferu posredstvom TOM1 transportera; PS heliraju  $\text{Fe}^{3+}$  i  $\text{Fe}^{III}$ -PS kompleks se transportuje u ćelije posredstvom članova YS/YSL familije transportera (dopunjeno prema Römheld *et* Marschner, 1986).

---

FRO je integralni membranski protein i pripada familiji proteina koja vrši prenos elektrona od citosolnog NADPH do FAD, a zatim preko hem grupa do akceptora elektrona ( $\text{Fe}^{3+}$ ) na spoljašnjoj strani plazma membrane. Do sada je okarakterisano nekoliko pripadnika FRO familije proteina, koji kod različitih biljnih vrsta doprinose odgovoru strategije I, kao npr. AtFRO2 arabidopsisa, PsFRO1 graška, LeFRO1 paradajza i CsFRO1 krastavca, čija je aktivnost povećana u odgovoru na nedostatak Fe (Jeong *et Connolly*, 2009). Redukovano Fe se transportuje preko plazm amembrane u simplast korena putem specifičnih IRT1 transportera iz familije ZIP transportera metala [eng. *zincregulated transporter (ZRT) iron-regulated transporterlike proteins, ZIP*]. Gen koji kodira za IRT1 transporter Fe kloniran je iz arabidopsisa (Eide *et al.*, 1996), kao i njegovi ortolozi RIT iz graška i paradajza (Cohen *et al.*, 1998; Eckhardt *et al.*, 2001).

Takođe, sve je više istraživanja koja ukazuju da, pored IRT1, transporteri Fe visokog afiniteta iz NRAMP (eng. *natural resistance-associated macrophage protein*) klase proteina imaju određenu ulogu u usvajanju i transportu Fe. NRAMP predstavlja grupu visoko konzervativnih integralnih membranskih proteina, koji se javljaju kod bakterija, gljiva, biljaka i životinja (Xiao *et al.*, 2008). NRAMP proteini su tokom evolucije razvili funkcionalnu divergenciju i tako specifičnost za veliki broj supstrata kod različitih vrsta. LeNRAMP1 paradajza (*Lycopersicon esculentum*) pokazuje ekspresiju specifično za tkivo korena koja je regulisana statusom Fe (Bereczky *et al.*, 2003). AtNRAMP1 predstavlja funkcionalni transporter metala kod arabidopsisa, i pokazuje pojačanu ekspresiju u uslovima smanjene snabdevenosti biljaka Fe (Curie *et al.*, 2000). Kod pirinča (*Oryza sativa*), geni za *OsNRAMP1* takođe pokazuju povišenu ekspresiju u korenovima biljaka izloženih nedostatku Fe (Takahashi *et al.*, 2011). Xiao *et al.* (2008) su pokazali da je transkripcija *MbNRAMP1* kod divlje jabuke (*Malus baccata*) regulisana statusom Fe u korenovima i izdancima. Kod kikirikija (*Arachis hypogaea*) AhNRAMP1 je verovatno uključen u proces usvajanja Fe (Xiong *et al.*, 2012), gde je ekspresija *AhNRAMP1* snažno indukovana nedostatkom Fe u korenu i listu. Stoga, smatra se da ovi NRAMP geni pripadaju potklasi indukovanoj nedostatkom Fe, što ukazuje na ulogu u održavanju homeostaze ovog mikroelementa. Međutim, najskorije istraživanje Castaings *et al.* (2016)



---

nedvosmisleno je pokazalo da NRAMP1 ima ključnu ulogu u transportu Fe na nivou korena (u sadejstvu sa IRT1), posebno u uslovima normalne snabdevenosti Fe.

### 1.3.1 Adaptivni mehanizam biljaka strategije II

Biljke iz familije trava (Poaceae) razvile su poseban mehanizam za akviziciju Fe iz zemljišta, poznata kao helataciona strategija ili strategija II (za detaljan prikaz videti Sliku 1, dole) (Römheld, 1990). Heliranje se postiže posredstvom snažnih Fe<sup>III</sup>-helatora, derivata mugineinske kiseline (MA), poznatih pod nazivom fitosiderofore (PS) (Kobayashi *et Nishizawa*, 2012). Analizom gena indukovanih nedostatkom Fe kod pirinča identifikovan je pretpostavljeni efluks transporter malih molekula, TOM1 (Nozoye *et al.*, 2011). TOM1 posreduje u efluku deoksimugineinske kiseline (DMA) u ćelijama korena pirinča. Prirodna mutacija kod kukuruza (*Zea mays*) pod nazivom *yellow stripe3* (*ys3*) sprečava izlučivanje fitosiderofora iako sama biosinteza fitosiderofora nije narušena (Basso *et al.*, 1994). Buduća israživanja bi trebalo da pokažu da li je *ys3* mutacija gubitka funkcije TOM1 ortologa kukuruza. Kompleks Fe<sup>III</sup>-fitosiderofora ulazi u ćelije korena putem YS1 (eng. *yellow stripe* 1) i YSL (eng. *yellow stripe-like*) transportera kod različitih vrsta trava (npr. ZmYS1, HvYS1 i OsYSL15) (Kobayashi *et Nishizawa*, 2012). Pirinač je atipičan zato što usvaja Fe koristeći osobine obe strategije, uključujući Fe<sup>II</sup> transporter OsIRT1 i usvajanje kompleksa Fe<sup>III</sup>-fitosiderofora posredstvom OsYSL15 (Inoue *et al.*, 2009), što nije iznenađujuće budući da se ova kultura gaji na plavljenom zemljištu gde su povećani reduktivni uslovi. Stoga, koren pirinča pokazuje jako mali kapacitet za redukciju Fe<sup>III</sup>, i najverovatnije da je pirinač evoluirao i adaptirao se na svoje stanište, gde je sadržaj kiseonika smanjen zbog plavljenja, pa je dominantna forma Fe<sup>II</sup> i gde, upravo zbog toga, čak može da pati i od Fe toksičnosti (Ishimaru *et al.*, 2006).

## 1.4 Transport i distribucija gvožđa u biljci

### 1.4.1 Translokacija gvožđa iz korena u nadzemni deo biljke

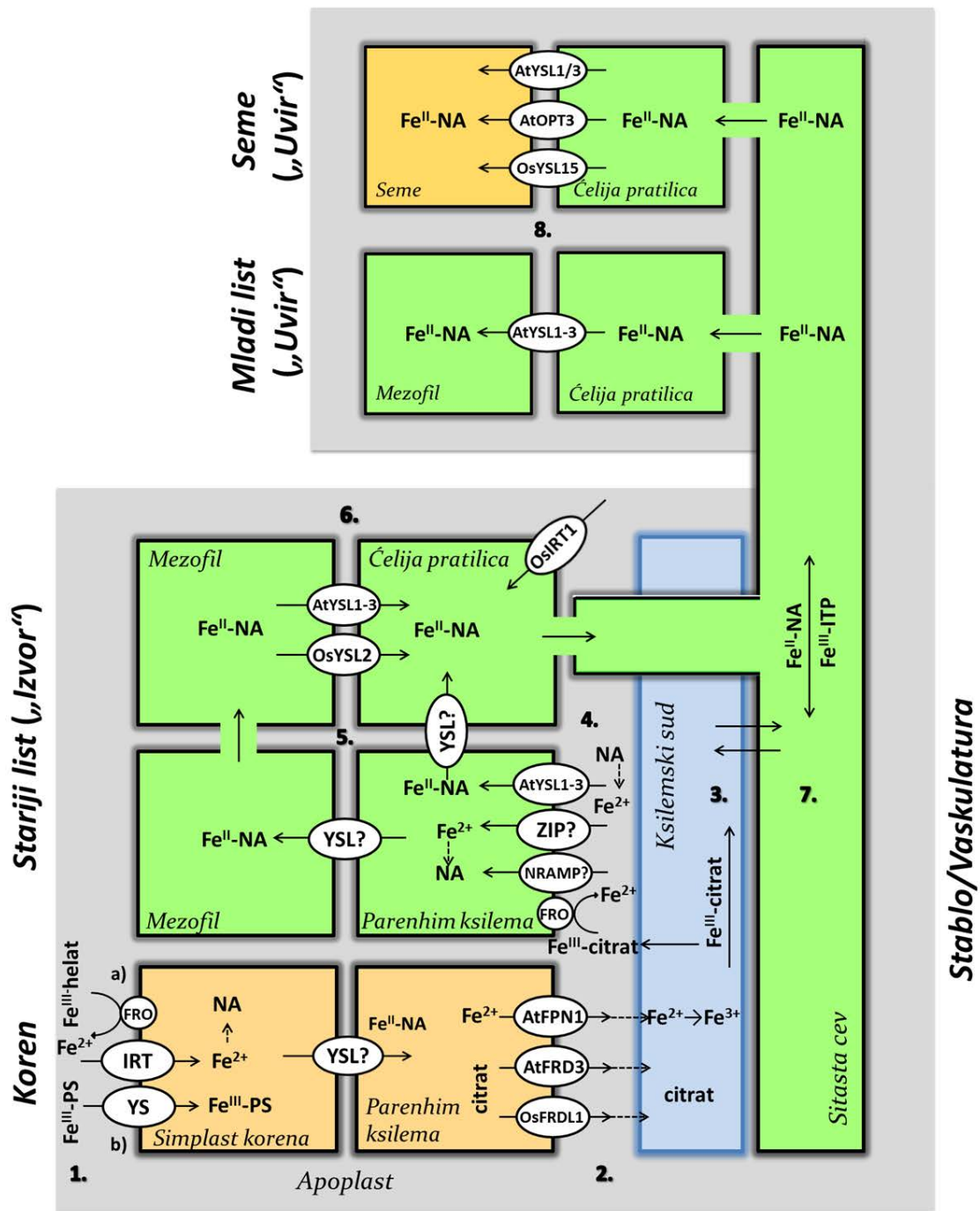
Akvizicija Fe i drugih mikroelemenata u biljci započinje u apoplastu epidermalnih ćelija korena (Sattelmacher, 2001). Gvožđe difunduje kroz slobodni prostor apoplasta do plazma membrane, ali nakon što se redukuje (FRO) ili helira, ne mora u potpunosti biti usvojeno putem nekog od ranije pomenutih sistema za usvajanje (Slika 1; Slika 2.1). U prisustvu kiseonika, deo Fe se reoksiduje i taloži u vidu hidroksida ili soli fosfata, formirajući tako značajne rezerve Fe u apoplastu (Bienfait *et al.*, 1985). Ove rezerve čine i do 95% od ukupnog sadržaja Fe u korenu biljaka i biljka ih može koristiti u uslovima nedostatka Fe (Becker *et al.*, 1995). Kada Fe uđe u simplast korena putem već opisanih transportnih sistema (IRT i NRAMP kod biljaka strategije I; YS1 i YSL kod biljaka strategije II), opet se mora zaštititi od kiseonika, kako bi se sprečila precipitacija i nastanak kiseoničnih radikala. Iako je nekoliko organskih i amino kiselina u ćeliji pogodno za heliranje Fe, nikocijanamin (NA) izgleda predstavlja najpovoljnijeg kandidata iz nekoliko razloga: (a) formira stabilne komplekse sa oba oksidaciona stanja Fe na neutralnoj i blago alkalnoj pH (Stephan *et al.*, 1996); iako  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-NA}$  kompleks poseduje mnogo veću konstantu stabilnosti,  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NA}$  kompleks je kinetički stabilniji u aerobnim uslovima (von Wirén *et al.*, 1999). (b) NA je prisutan kod svih viših biljaka i nalazi se u svim tkivima (Scholz *et al.*, 1992). (c) Fe-NA kompleksi su relativno slabi reagensi u Fentonovoj reakciji (von Wiren *et al.*, 1999). (d) mutan paradajza sa nedostatkom NA (hloronerva), pokazuje povećanu aktivnost antioksidativnih enzima (Herbik *et al.*, 1996) i precipitaciju Fe u vakuolama i mitohondrijama (Liu *et al.*, 1998). (e) koncentracije NA su povećane u vrhovima korena suncokreta i ječma u regionima najvećeg usvajanja Fe i njegovog radijalnog transporta (Stephan *et al.*, 1990); koncentracije NA su u korelaciji sa lokalizacijom i nivoima Fe kod graška i paradajza (Pich *et al.*, 2001).

Biohemijski posmatrano, NA je amino kiselina, derivat metionina, koja ne ulazi u izgradnju proteina i specifična je za biljno carstvo. Nikocijanamin se sintetiše u

korenovima, listovima i cvetovima posredstvom NA sintaze (NAS) koristeći S-adenozil metionin (SAM) kao prekursor (Scholz *et al.*, 1992; Ling *et al.*, 1999). Ovo jedinjenje igra ključnu ulogu kao glavni helator slobodnog Fe u ćelijama kada god ono nije vezano za ciljne strukture, kao što je na primer hem, ili nije uskladišteno u vidu fitoferitina. Pored toga što ujedno predstavlja prekursor za biosintezu fitosoderofora kod biljaka strategije II, NA takođe može imati i druge uloge u transportu Fe, Cu i drugih metala (mikroelemenata) između ćelija i posebno u floemu.

Radijalni transport Fe od epidermisa korena do centralnog cilindra (ksilemskih sudova) se najverovatnije odvija putem simplasta, preko plazmodezmi, duž koncentracionog gradijenta u obliku kompleksa Fe<sup>II</sup>-NA (Stephan *et al.*, 1996). Punjenje sudova ksilema Fe predstavlja ponovni transfer iz simplasta u apoplast preko parenhimskih ćelijam ksilema ili uključivanjem transfernih ćelija u komunikaciji ksilema i floema (Slika 2.2). U ksilemu, najveći deo Fe je kompleksiran i prenosi se u vidu Fe<sup>III</sup>-citrata (Slika 2.3). Tačan mehanizam punjenja ksilema Fe<sup>3+</sup> nakon prethodne oksidacije Fe<sup>II</sup> ili Fe<sup>III</sup> kompleksa sa citratom, i njegovog oslobađanja u nadzemnim tkivima (listovima) do danas nije opisan. Smatra se da AtFPN1 (eng. *feroportin 1*) arabidopsisa vrši efluks Fe preko plazma membrane parenhimskih ćelika ksilema u prostor apoplasta (Morrissey *et al.*, 2009). Takođe, poznato je da AtFRD3 (eng. *ferric reductase defective 3*) protein, član MATE (eng. *multidrug and toxin efflux*) familije, lokalizovan na plazma membrani ćelija pericikla i vaskulature, ima ulogu u translokaciji Fe iz korena u izdanak ubacujući citrat u ksilem (Jeong *et* Guerinot, 2009). Kod pirinča, funkciju punjenja ksilema citratom vrši OsFRDL1 (eng. *ferric reductase defective like 1*) transporter (Morrissey *et* Guerinot, 2009).

Nakon što citrat koji je ubačen u ksilem helira Fe<sup>3+</sup>, kompleks Fe<sup>III</sup>-citrata se kroz ksilemske sudove transportuje do listova, gde se ponovo mora usvojiti u ćelije, ovog puta iz prostora apoplasta (pražnjenje ksilema; Slika 2.4). Tako, kompleksi Fe<sup>III</sup>-citrata iz ksilemskih sudova ili bivaju usvojeni od strane ćelija posredstvom još neidentifikovanih transportera, ili možda dolazi do redukcije kompleksa od strane nekog FRO proteina, nakon čega se u obliku Fe<sup>II</sup> transporuje u različite biljne delove (Jeong *et* Guerinot, 2009).



**Slika 2.** Transport Fe kroz biljku. 1. Usvajanje Fe iz rizosfere/apoplasta u epidermalne ćelije korena; a) Strategija I i b) strategija II; 2. Punjenje ksilema Fe; 3. Ksilemski transport; 4. Pražnjenje ksilema; 5. Međućelijski transport u listu; 6. Punjenje floema u starijim listovima („izvor“); 7. Floemski transport; 8. Pražnjenje floema u tkivu „uvira“ (npr. mladi listovi, seme itd.). Ovalni simboli predstavljaju proteine koji učestvuju u transportu Fe u različitim biljnim tkivima i organima; strelice indikuju kretanje Fe.

Fotoredukcija posredstvom svetlosne energije niskih talasnih dužina (UV i plava svetlost) ksilemom transportovanog  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -citrata izgleda igra važnu ulogu u ponovnoj redukciji Fe u izdanku (Bienfait *et Scheffers* 1992; za detalje videti Nikolic *et Römheld*, 2007). Hipoteza o značaju enzimske redukcije  $\text{Fe}^{\text{III}}$  u listovima i dalje predstavlja predmet kontroverzi (Schmidt, 1999), iako je aktivnost  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -helatne reduktaze jasno pokazana (Larbi *et al.*, 2001) i FRO1 gen graška ne samo da je eksprimiran u listovima, već i indukovan nedostatkom Fe (Waters *et al.*, 2002).

Kod arabidopsisa, određeni članovi YSL  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -NA transportera iz OPT (eng. *oligopeptide transporter*) familije proteina su predloženi kao ključni medijatori u usvajanju Fe iz ksilema. Ekspresija AtYSL1, AtYSL2 i AtYSL3 je smanjena u uslovima nedostatka Fe, što govori da verovatno poseduju određenu ulogu u održavanje homeostaze Fe. Pored toga, AtYSL1, AtYSL2 i AtYSL3 su najjače eksprimirani u listovima, na lateralnoj membrani parenhimskim ćelija ksilema (DiDonato *et al.*, 2004; Waters *et al.*, 2006). Conte *et Walker* (2011) predlažu da je prevashodna fiziološka uloga AtYSL1, AtYSL2 i AtYSL3 da vrše usvajanje Fe koje je došlo do tkiva putem ksilema u ćelije, tako ga premeštajući iz apoplasata u simplast (Slika 2.4). Kako je najveći deo Fe koji dospeva do listova putem ksilema vezano za citrat u  $\text{Fe}^{\text{III}}$  obliku, pre nego što se  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -NA kompleks transportuje u ćelije mezofila lista putem YSL transportera, prethodno mora doći do redukcije  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -citrata i izmene liganda (citrata) sa NA (Conte *et Walker*, 2011).

#### 1.4.2 Međućelijski transport gvožđa

Distribucija Fe iz ćelija koje okružuju nerve do ćelija lamine lista je verovatno ponovo posredovana kompleksiranjem sa NA. Takva translokacija  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -NA kompleksa na male udaljenosti preko ćelijskih membrana se postiže aktivnošću više transportnih proteina koji uključuju određene članove YSL (videti Sliku 2.5) (Curie *et al.*, 2009). Ovi YSL transporteri verovatno posreduju u lateralnom premeštanju Fe-NA kompleksa iz ksilema i floema, i u generativnim organima učestvuju u punjenju semena Fe (Le Jean *et al.*, 2005; Waters *et al.*, 2006; Chu *et al.*, 2010). Takođe, u ćelije lista Fe se može usvojiti iz

apoplasta, slično usvajanju Fe iz rizosfere u epidermalne ćelije korena. Kod arabidopsisa, pokazano je da su *FRO* i geni slični *IRT* (*ZIP* familija gena) eksprimirani i u listu, ne samo u korenu, gde njihova aktivnost može biti regulisana Fe (Slika 2.5) (Eng *et al.*, 1998; Bauer *et al.*, 2004). Pored toga, u okviru organa, Fe se može kretati i putem simplasta (Slika 2.5) (Edding *et Brown*, 1967).

### 1.4.3 Remobilizacija i redistribucija gvožđa u izdanku

Kao posledica toga što poseduju nedovršene ksilemske strukture (protoskilem) i malu stopu transpiracije, mladi listovi se skoro potpuno snabdevaju Fe i drugim mikroelemntima putem floema. Dobro je poznato da se Fe iz organa koji predstavljaju izvor (eng. *source*) do tkiva koji predstavljaju uvir (eng. *sink*), kao što su semena i mladi listovi, može mobilisati posredstvom floema (Slika 2.6-8) (Hell *et Stephan*, 2003). Međutim, mehanizam transporta Fe od tkiva izvora do tkiva uvira floemom i dalje je slabo razjašnjen.

Poznato je da NA ima značajnu ulogu u međućelijskom i unutarćelijskom transportu Fe i punjenju i pražnjenju ksilema, ali takođe i u transportu Fe na veća rastojanja floemskim putem (Hell *et Stephan*, 2003). Mutant paradajza hloronerva (nema sposobnost sinteze NA) pokazuje internervalnu hlorozu malđih listova, iako stariji listovi sadrže veće koncentracije Fe, ukazujući tako na ulogu NA u floemskom transportu Fe (Stephan *et Scholz* 1993). Remobilizacija Fe stoga jasno zavisi od prisustva NA, premda se izostanak redistribucije Fe između starijih i malđih listova kod hloronerva mutanta može prevazići egzogenom primenom NA (Scholz, 1989). Takođe, upotrebom mutanata arabidopsisa *nas4x-1* i *nas4x-2*, jasno je pokazano da je NA uključen u transport Fe do madih listova putem floema, kao i u lateralni transport Fe iz provodnog tkiva do ćelija mezofila (Schuler *et al.*, 2012). Međutim, kako je samo 4% od ukupnog Fe u floemu u Fe<sup>II</sup> obliku (Schmidke *et al.*, 1999), pretpostavlja se da kompleks sa NA zapravo predstavlja transporni oblik Fe za pražnjenje simplastnog puta. U floemskom soku Fe je, čini se, najvećim delom vezano za proteinsku frakciju, konkretno za specifični protein poznat po nazivom ITP (eng. *iron transport protein*) koji pripada LEA (eng. *late embryogenesis abundant*) familiji proteina (Slika 2.6)

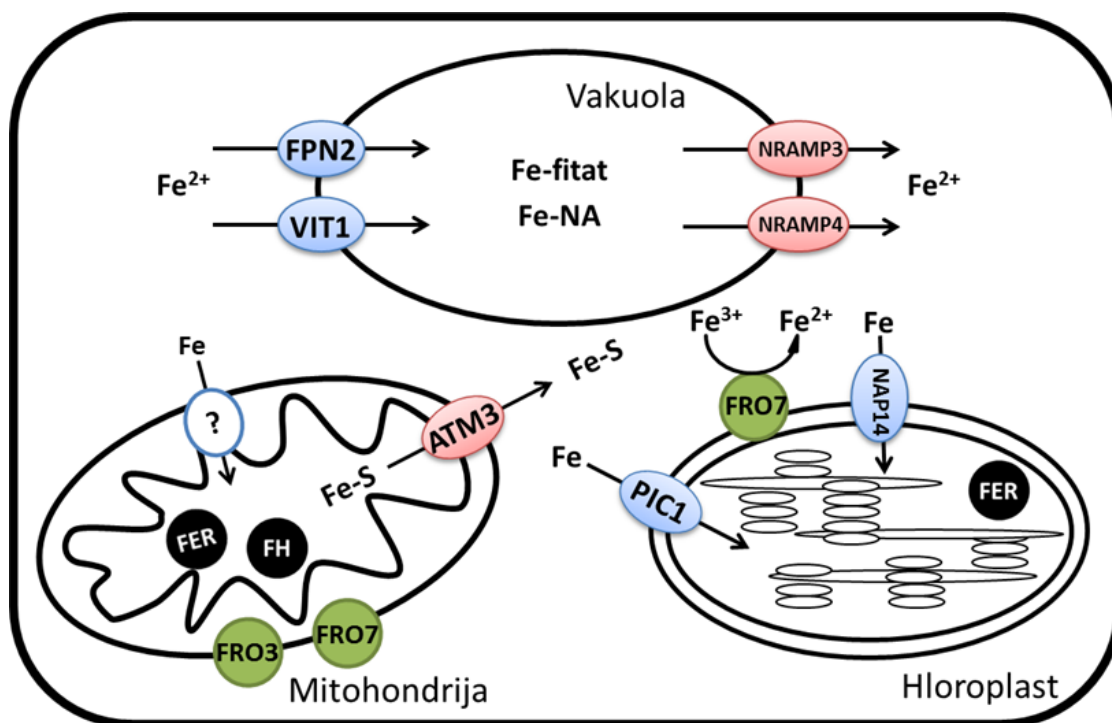
(Krüger *et al.*, 2002). Tako je pretpostavljena uloga NA da služi kao šatl za primopredaju Fe sa ITP (Bauer *et Hell*, 2006).

Kod arabidopsisa, AtYSL1 i AtYSL3 su izgleda neophodni u procesu remobilizacije Fe iz senescentnih listova i njegovu translokaciju u tkiva uvira, mada je njihova konkretna uloga u tom procesu još uvek predmet rasprave (Slik 2.6 i 2.8) (Conte *et Walker*, 2011). Poznato je da AtOPT3 posreduje u punjenju floema Fe u listovima kao i da učestvuje u transportu Fe do tkiva u razvoju (npr. mladih listova, semena) (Zhai *et al.*, 2014). Iako njegov supstrat do danas nije poznat, pretpostavlja se da transportuje Fe-helat ili helator Fe (Slika 2.8) (Morrissey *et Guerinot*, 2009). Kod pirinča, OsYSL2 je eksprimiran u ćelijama pratilecama i funkcioniše kao transporter koji prebacuje Fe<sup>II</sup>-NA komplekse u floem (punjenje floema, Slika 2.6) (Koike *et al.*, 2004), dok je OsYSL15 izgleda uključen u pražnjenje floema i punjenje semena (Slika 2.8) (Morrissey *et Guerinot*, 2009). Takođe, ekspresije OsIRT1 je povećana pri nedostatku Fe posebno u ćelijama pratilecama, pa se pretpostavlja da OsIRT1 vrši transport Fe<sup>II</sup> u floem, gde biva helirano sa NA (Slika 2.6) (Morrissey *et Guerinot*, 2009).

#### 1.4.4 Subćelijski transport i lokalizacija gvožđa

Uprkos strogoj kontroli sistema za usvajanje na nivou korena, ipak može doći do preteranog unosa Fe u biljku, kao posledica nepovoljnih uslova životne sredine (npr. redukovani uslovi u zemljištu). Kako bi se uklonio višak slobodnog Fe u ćeliji, indukuje se sinteza fitoferitina. Feritini predstavljaju sveprisutne multimerne proteinske komplekse sačinjene od 24 homologe ili heterologe subjedinice koje imaju sposobnost da skladište i do 4000 atoma Fe u centralnoj šupljini. Njihova zastupljenost je kontrolisana preciznim regulatornim mehanizmima, kao odgovor na potrebu da u ćeliji postoji precizna homeostaza Fe (Briat *et al.*, 1999). Fitofertin je obično lokalizovan u plastidima korena i izdanaka (hloroplasti), gde vrši važnu funkciju skladištenja viška Fe kako bi se izbegao oksidativni stres (Savino *et al.*, 1997; Deák *et al.*, 1999). U ćelijama lista 90% Fe se nalazi upravo u hloroplastima, gde je najveći deo lokalizovan u stromi vezan za feritin. (Buglio *et*

al., 1997). Unos Fe u hloroplast do sada nije razjašnjen, međutim spekuliše se o potencijalnoj ulozi hloroplastne FRO7 i PIC1 (eng. *permease in chloroplasts 1*) proteina na unutrašnjoj ovojnici hloroplasta (Slika 3) (Jeong *et* Guerinot, 2009). AtNAP14 (eng. *non-intrinsic ABC transporter protein*) takođe može predstavljati influks transporter za Fe na membrani hloroplasta arabidopsisa ili, kao alternativa, može predstavljati senzor za Fe na plastidima koji prati status Fe i kontroliše kretanje Fe od korena ka izdanku (Slika 3) (Conte *et* Walker, 2010.)



**Slika 3.** Intracelularni transport i sekvencijacija Fe. Fe se transportuje u vakuolu posredstvom FPN2 (ekspimiran u korenu) i VIT1 (ekspimiran u embrionu). Unutar vakuole Fe biva kompleksirano fitatom i NA. NRAMP3 i NRAMP4 transportuju Fe izvan vakuole, najviše tokom nedostatka Fe i germinacije. FRO3 i FRO7 verovatno redukuju  $\text{Fe}^{\text{III}}$  na membrani mitohondrija. U mitohondrijama, Fe je sekvencirano feritinom (FER) i frataksinom (FH). FH takođe igra ulogu u spajanju i reparaciji Fe-S klastera, koji se transportuju izvan mitohondrija putem ATM3. Pre nego što uđe u hloroplasti,  $\text{Fe}^{\text{III}}$  biva redukovano od strane FRO7, a zatim usvojeno putem  $\text{Fe}^{\text{II}}$  transportera PIC1. Unutar hloroplasta, Fe je sekvencirano u feritinu.

Mitohondrije, kao glavno mesto biosinteze Fe-S klastera, takođe doprinose održavanju homeostaze Fe. Iako mitohondrijalni transporteri za Fe još nisu identifikovani,



tri ortologa ATM1 transportera (eng. *ABC transporter of the mitochondrion 1*) iz kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*) su pronađena kod arabidopsisa, gde je AtATM3 najverovatniji kandidat za eksportovanje Fe-S klastere iz mitohondrija (Slika 3) (Jeong *et* Guerinot, 2009). Na mitohondrijama su detektovane i FRO7 i FRO3, koje isto mogu imati ulogu u transportu Fe u mitohondrijama (Sliak 3) (Jeong *et* Guerinot, 2009). U mitohondrijama, Fe je takođe sekvestrirano feritinom i frataksinom (Morrissey *et* Guerinot, 2009).

Vakuole su veoma značajne za sladištenje i sekvestaciju Fe i drugih mineralnih elemenata u biljnim ćelijama, posebno u semenima. Do sada je identifikovan VIT1 transporter (eng. *vacuolar iron transporter 1*) koji ubacuje Fe u vakuolu i dva transportera metala iz NRAMP familije, NRAMP3 i NRAMP4, koji izbacuju Fe iz vakuole, a indukovani su u uslovima nedostatka Fe (Slika 3) (Thomine *et* Vert, 2013). Influx prelaznih metala u vakuolu u ćelijama korena obavlja se posredstvom AtFPN2 transportera arabidopsisa, koji je indukovano u uslovima nedostatka Fe i vrši sekvestaciju toksičnih metala i viška Fe (Sliak 3) (Morrissey *et* Guerinot, 2009).

## 1.5 Nedostatak gvožđa kao globalni problem

Nedostatak Fe kod poljoprivrednih kultura, kao posledica njegove slabe biološke dostupnosti najčešće se javljaju na alkalnim i krečnim zemljištima, koja obuhvataju 30% obradivih površina u svetu (Vose, 1982). Nedostatak Fe stoga predstavlja jedan od glavnih ograničavajućih faktora u uzgajanju useva, izazivajući značajne gubitke u prinosu ekonomski značajnih kultura širom sveta. U mnogim zemljama, a posebno u ekonomski nerazvijenim zemljama i zemljama u razvoju (uključujući i Srbiju), biljna hrana predstavlja osnovu u ljudskoj ishrani (Nikolic *et al.*, 2016). Tako se procenjuje da preko 30% svetske populacije pati od anemije izazvane nedovoljnim unosom Fe (WHO, 2009). Iz tog razloga, pored mera selekcije i oplemenjivanja u cilju povećane efikasnosti useva da iskorišćavaju mikroelemente i bolje ih akumuliraju u jestivim delovima (Welch *et* Graham, 2004), upotreba mineralnih đubriva predstavlja brži i neposredan način ne samo da se poveća prinos useva na neplodnim zemljištima, već i da se poveća sadržaj Fe u hrani (White *et*

Broadley, 2009). Sa druge strane, đubriva Fe u helatnom obliku, koja su jedina efikasna na krečnim zemljištima, su vrlo skupa i stoga nedostupna za siromašne zemlje, a takođe ona predstavljaju i veliki rizik za životnu sredinu zbog mogućnosti da sintetički helatori povećaju mobilnost teških metala u zemljištu i njihov ulazak u lance ishrane (Römheld *et al.*, 2006). Zbog svega toga tekuća istraživanja u ovoj oblasti usmerena su pre svega na razvoj novih strategija za održivu kontrolu Fe hloroze i biofortifikaciju useva Fe.

## 1.6 Silicijum kao koristan element za više biljke

Silicijum (Si), drugi po zastupljenosti element u Zemljinoj kori, još uvek nije u potpunosti prihvaćen kao esencijalni element za više biljke u svetskoj naučnoj javnosti i zakonodavstvu koje reguliše promet đubriva, najviše iz razloga jer njegovo odsustvo ne sprečava završavanje životnog ciklusa biljke izuzev za Equisetaceae (Chen *et al.*, 1969) i neke alge (Likhoshway *et al.*, 2006), i na taj način ne zadovoljava prvo pravilo esencijalnosti mineralnih elemenata koje su postavili Arnon *et al.* (1939). Međutim, pozitivan efekat Si na rastenje, razviće i prinos mnogih useva poznat je više od 150 godina. Takođe, Si je jedini do sada poznati element koji uspešno ublažava različite oblike biotskog i abiotskog stresa kod mnogih biljnih vrsta, kao što su zaslanjenost i sodnost zemljišta (Ahmad *et al.*, 1992; Zhu *et al.*, 2004; Liang *et al.*, 2007), suša (Hattori *et al.*, 2005; Gong *et al.*, 2005), toksičnost metala (Wu *et al.*, 2013; Pontigo *et al.*, 2015), disbalans i nedostatak hraniva (Hernandez-Apaolaza, 2014; Liang *et al.*, 2015), UV radijacija, visoke i niske temperature (Liang *et al.*, 2015), kao i povećanje tolerancije na biljne bolesti i napade štetočina (Fauteux *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2011).

Mnogi pozitivni efekti Si na vaskularne biljke dovode se u vezu sa povećanom akumulacijom ovog elementa u različitim biljnim tkivima. Poslednjih godina načinjeni su veliki napor u razjašnjavanju mehanizama koji stoje u osnovi ovakvog delovanja Si. Uloga Si u prevazilaženju različitih tipova biotskog i abiotskog stresa je, pre svega, protektivana i to fizički i hemijski (Epstine, 2009). Silicijum se kod mnogih biljaka, posebno trava vlažnih staništa, ugrađuje u ćelijske zidove u vidu čvrstih depozicija amorfne opala, i na taj način

pruža svojevrsnu mehaničku potporu tj. barijeru, štiteći tako biljku od različitih nepovoljnih uticaja iz životne sredine (npr. napadi štetočina/patogena, poleganje, zaštita od herbivora itd.). Sa druge strane, pokazano je da Si promoviše i biosintezu velikog broja sekundarnih metabolita, koji su od izuzetnog značaja u zaštiti biljaka od, pre svega, bioloških napada, posebno od strane insekata. Takva jedinjenja obuhvataju terpenoide, alkaloidne i različita fenolna jedinjenja (fitoaleksini) koja mogu biti repelenti ili toksični agensi za štetočine/patogene (Buchanan *et al.*, 2000). Takođe, veliki je broj biohemijskih entiteta, koji su deo primarnog metabolizma, i na čiju biosintezu utiče Si, a koji su značajni u odbrani biljke od stresa. To su, pre svega, fitohormoni, uključujući salicilnu kiselinu, jasmoničnu kiselinu i etilen. Takođe, Fauteux *et al.* (2006) su pokazali da je kod arabidopsisa inficiranog pepelnicom Si promovisao različitu ekspresiju velikog broja gena, gde kod nezaraženih biljaka Si nije značajno uticao na ekspresiju gena. Kada su biljke napadnute od strane spoljnih agenasa indukovane su signalne kaskade, koje za posledicu imaju ulazak proteina u nukleus gde regulišu transkripciju ciljnih gena. Silicijum u čvrstoj formi je inertan i ne može uticati na biohemiju i molekularnu biologiju biljke; samo Si u rastvorljivom obliku (ortosilicijumska kiselina) može ostvariti takav uticaj (Chérif *et al.*, 1992). Silicijumska kiselina, ne može uticati na metabolizam samim svojim prisustvom, već ona najverovatnije u biljci postaje ligand nekog metabolita. Tako, postoje brojni dokazi da mnoga organska jedinjenja i kompleksi poseduju afinitet prema Si (Kinrade *et al.*, 1999; Balec *et al.*, 2005).

Kada je u pitanju abiotski stres, najveći napredak zadnjih godina načinjen je u rasvetljavanju mehanizama putem kojih Si posreduje u ublažavanju toksičnosti metala kao što su Al (aluminijum), Mn, Cd (kadmijum) i Zn, kod viših biljaka (Song *et al.*, 2009, 2011; Frantz *et al.*, 2011; Prabagar *et al.*, 2011; Dragisic Maksimovic *et al.*, 2012). Tako je poznato da Si svoju zaštitnu ulogu od toksičnosti metala ostvaruje: (a) imobilizacijom toksičnih metala u rizosferi i apoplastu korena; (b) kompleksiranjem ili koprecipitacijom toksičnih metalnih jona u biljci; (c) kompartmentacijom metala u biljci; i d) stimulacijom antioksidativnih sistema u biljci. Takođe, zadnjih godina pojavili su se prvi dokazi da Si može uticati na ekspresiju određenih transportera u uslovima stresa toksičnosti različitih mineralnih elemenata (Tabela 1.). Međutim, podaci o značaju ishrane biljaka Si u stresu

nedostatka različitih hraniva, a posebno mikroelemenata veoma su oskudni (Liang *et al.*, 2015). Skori je, po prvi put, eksperimentalno pokazano da su dodavanjem Si delimično ili u potpunosti eliminisani simptomi nedostatka Fe (hloroza) kod dikotiledonih biljaka (strategija I) (Gonzalo *et al.*, 2013; Pavlovic *et al.*, 2013; Bityutskii *et al.*, 2014), ali do sada mehanizam delovanja Si u uslovima stresa nedostatka Fe kod biljaka nije bio poznat.

**Tabela 1.** Dokazi o uticaju Si na ekspresiju pojedinih gena u uslovima strasa toksičnosti mineralnih elementa

Stres toksičnosti	Biljna vrsta	Gen za transporter	Lokalizacija/funkcija/obrazac ekspresije	Reference
Mn	Pirinač	<i>Nramp5</i>	Koren/transport Mn/smanjena ekspresija pod uticajem Si	Che <i>et al.</i> (2016)
Cu	Arabidopsis	<i>COPT1, HMA5</i>	Koren/transport Cu/smanjena ekspresija pod uticajem Si	Li <i>et al.</i> (2008)
Cd/Cu	Pirinač	<i>HMA2, HMA3</i>	Koren/ transport metala/smanjena ekspresija pod uticajem Si	Kim <i>et al.</i> (2014)
B	Ječam	<i>BOR1, PIP1, PIP1;1</i>	Koren/ transport B/povećana ekspresija pod uticajem Si	Ackay <i>et Erkan</i> (2016)

## 1.7 Silicijum u zemljištu

Silicijum je drugi po zastupljenosti element u Zemljinoj kori (posle O<sub>2</sub>) i glavni je konstituent većine zemljišta (Epstein, 1999). Javlja se u vidu minerala u formi primarnih (npr. pesak) i sekundarnih (minerali gline) silikata. Pored toga, u zemljištu se mogu naći različite amorfne forme neorganskih i biogenih silikata (Cornelis *et al.*, 2011). Svi ovi oblici Si prolaze kroz fizičke i hemijske promene pod dejstvom atmosferilija, što dovodi do oslobađanja Si u zemljišni rastvor odkle dospeva u vodotokove i okeane (Guntzer *et al.*, 2012). Monosilicijumska kiselina (orto oblik) je slaba kiselina (pKa<sub>1</sub> = 9.83 i pKa<sub>2</sub> = 13.17) i predstavlja rastvorljivi oblik Si u zemljišnom rastvoru. Obično se nalazi u vidu nenaelektrisanog monomernog molekula (H<sub>4</sub>SiO<sub>4</sub><sup>0</sup>) u opsegu pH od 2 do 9, ili u

jonizovanom obliku ( $\text{H}_3\text{SiO}_4^-/\text{H}_2\text{SiO}_4^{2-}$ ) na pH vrednostima većim od 9.0 (Knight *et* Kinrade, 2001). Stoga, imajući u vidu da je pH vrednost većine zemljišta ispod 9.0, nedisosovana silicijumska kiselina je najčešći oblik Si u zemljištu sa koncentracijama koje variraju između 0.1 i 0.6 mM (Epstein, 1999). Koncentracija Si u zemljištu zavisi najviše od rastvaranja jedinjenja koja sadrže Si kao i od reakcija sorpcije između rastvorljivog Si i sastavnih delova zamljišnih čestica (Wickramasinghe *et* Rowell 2006). Silicijum se može adsorbovati putem razmene liganada za okside i hidrokside Fe i Al, a mogu biti i u kompeticiji za sorpciona mesta sa drugim anjonima na površini minerala. Takođe, Si može kompleksirati i sa teškim metalima, ali retko formira komplekse sa rastvorenim organskom materijom (Cornelis *et al.*, 2011). Prema tome, uprkos zastupljenosti Si u zemljištu, količina rastvorljivog Si koji je dostupan biljkama za usvajanje može biti ograničen (Pontigo *et al.*, 2015).

## 1.8 Usvajanje i transport silicijuma kod vaskularnih biljaka

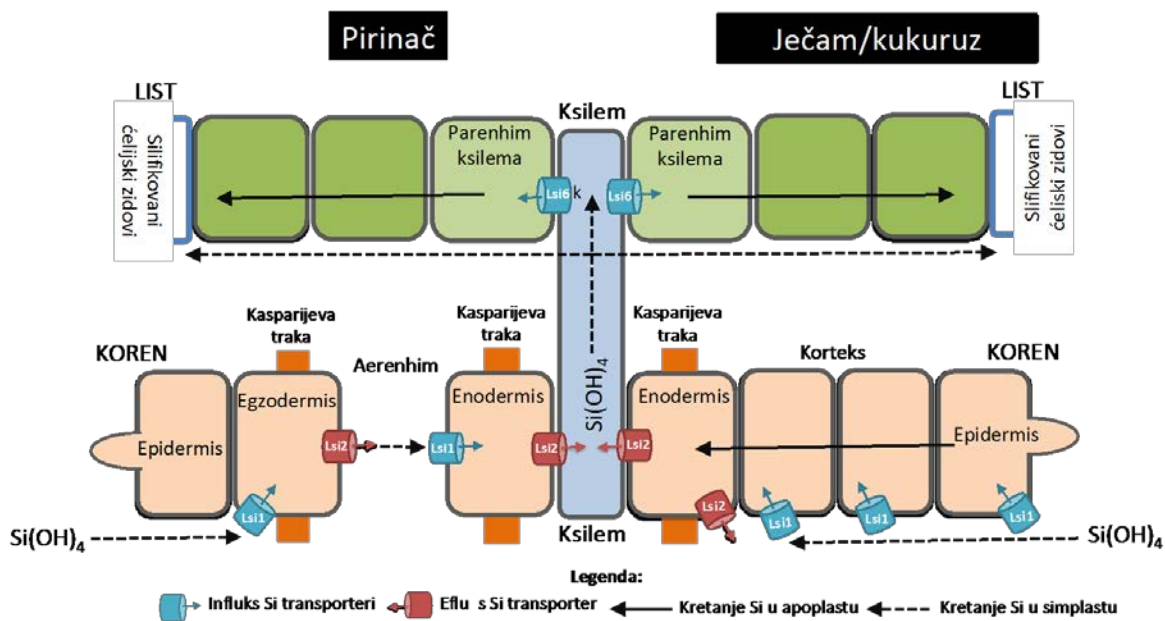
Iako sve kopnene biljke sadrže određenu količinu Si u svojim tkivima, koncentracija Si u izdancima značajno varira među biljnim vrstama (od 0.1 do 10 % Si suve mase), pokazujući izuzetno nejednaku zastupljenost u biljnom carstvu (Epstein, 1999 ; Ma *et al.*, 2001; Richmond *et* Sussman, 2003). U izrazite akumulatore Si spadaju, na primer, Bryophyta, Lycopsida i Equisetopsida iz grupe Pteridophyta, dok se Si akumulira slabije kod Filicopsida iz grupe Pteridophyta, Gymnospermae i većina pripadnika grupe Angiospermae (Ma *et al.*, 2001; Ma *et* Takahashi, 2002; Liang *et al.*, 2015). Kod viših biljaka (Angiospermae), samo nekoliko taksona pokazuje visoku (>4 % Si; Cyperaceae, Poaceae i Balsaminaceae) do srednju (2–4 % Si; Cucurbitales, Urticales i Commelinaceae) akumulaciju Si (Ma *et* Takahashi, 2002; Hodson *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2015).

Usvajanje Si kod vaskularnih biljaka predstavlja veoma složen proces koji karakteriše selektivnost transporta i akumulacije Si u određenim tkivima, što se može razlikovati kako između vrsta tako i u okviru iste vrste. Ukratko, kada silicijumska kiselina dospe u ćelije korena, transportuje se od ćelija korteksa do stele. Potom, Si dospeva u ksilem i translocira

se u nadzemni deo biljke (Slika 4; Ma *et Yamaji* 2006). Tu se koncentruje zbog gubitka vode kao posledice procesa transpiracije i transformiše u amorfni Si ( $\text{SiO}_2\text{-nH}_2\text{O}$ ) putem polimerizacije Si (Ma *et Yamaji* 2006). Stoga, amorfni Si (opal) se većinom akumulira u ćelijskom zidu listova, stabala i ljuski (Prychid *et al.*, 2004; Ma *et Yamaji* 2006). Silicijum takođe može biti deponovan u ćelijama korena, krtola i cvasti velikog broja biljnih vrsta (Hodson *et Sangster*, 1989; Lux *et al.*, 1999; Chandler-Ezell *et al.*, 2006). Postoje indicije da Si može da interaguje sa komponentama ćelijskog zida kao što su polisaharidi, lignini ili proteini, ali priroda ove asocijacije još nije dovoljno razjašnjena (Currie *et Perry*, 2007). Dobro je poznato da se mineralni elementi mogu transportovati kroz korenov sistem kako posredstvom pasivnog (nezavisnog od energije), tako i putem aktivnog (zavisnog od energije) transporta, koji se dešava niz i nasuprot elektrohemijском gradijentu koncentracije. Tako su tri različita načina usvajanja Si zaslužna za postojanje visokih, srednjih i niskih koncentracija Si kod različitih vrsta biljaka (Takahashi *et al.*, 1990). Biljke koje poseduju mehanizam za usvajanje Si zavistan od energije pokazuju značajno smanjenje koncentracije Si u hranljivom rastvoru, dok kod biljaka kod kojih je usvajanje Si posredovano transportnim sistemom nezavisnim od energije, nema značajnijih promena. Nasuprot tome, kod biljaka koje su ekskluderi Si (aktivno izbacuju Si iz ćelija korena) dolazi do povećanja koncentracije Si u rastvoru. Većina monokotila, kao npr. pirinač (*Oryza sativa*) (Takahashi *et al.*, 1990; Tamai *et Ma*, 2003), pšenica (*Triticum aestivum*) (Van der Vorm, 1980; Jarvis, 1987; Rains *et al.*, 2006), raž (*Lolium perenne*) (Jarvis 1987; Nanayakkara *et al.*, 2008) i ječam (*Hordeum vulgare*) (Liang *et al.*, 2006; Nikolic *et al.*, 2007) i neke Cyperaceae, usvajaju veće količine Si u odnosu na druge biljke, što ukazuje na postojanje aktivnog transportnog sistema. Nasuprot, većina dikotila usvaja manje Si prateći gradijent koncentracije (Takahashi *et al.*, 1990). Međutim, postoje određene vrste dikotila, kao što je krastavac, koje usvajaju Si efikasnije (Liang *et al.*, 2005), dok paradajz (*Solanum lycopersicum*) (Nikolic *et al.*, 2007) i grašak (*Phaseolus vulgaris*) (Liang *et al.*, 2005) slabo usvajaju Si ili ga čak izbacuju iz korena (ekskluderi).

Među dikotilama, krastavac je vrsta koja akumulira Si u izdanku u mnogo većem stepenu od drugih vrsta (Wiese *et al.*, 2007). Koncentracija Si u listovima krastavca se kreće u opsegu od 1.8–2.9 % (Miyake *et Takahashi* 1983a, b; Wiese *et al.*, 2007), i

koncentracija Si u ksilemskom soku je nekoliko puta veća nego u spoljašnjem rastvoru, nezavisno od spoljašnjeg izvora Si (Liang *et al.*, 2005). Liang *et al.*, (2005) su prvi ukazali na to da je usvajanje Si kod krastavca metabolički aktivan proces nezavistan od koncentracije, snažno inhibiran niskim temperaturama i metaboličkim inhibitorima. Više od polovine Si usvojenog korenom biva translocirano u nadzemni deo krastavca (Nikolic *et al.*, 2007). Takođe, pokazano je da kinetika usvajanja Si kod krastavca sledi tipičnu Mihelis-Mentenovu krivu, ali sa značajno nižom vrednosti za  $V_{max}$  u odnosu na pirinač (Mitani *et al.*, 2005; Nikolic *et al.*, 2007). Nedavno su Sun *et al.* (2017) izolovali i okarakterisali *CsLsi1* (eng. *low silicon 1*), gen koji kodira transporter Si kod krastavca. Autori su pokazali da *CsLsi1* predstavlja influks transporter za Si, lokalizovan na plazma membrani, na distalnoj strani endodermisa i ćelija korteksa vrhova korena i korenskih dlačica koje ih okružuju, i da je ekspresija ovog gena suprimirana egzogenim dodavanjem Si.



**Slika 4.** Pojednostavljen shematski prikaz usvajanja i punjenja ksilema Si u korenu i njegovo pražnjenje iz ksilema u listu sa Si transporterima koji su uključeni u te procese (modifikovano prema Ma *et Yamaji*, 2015).

Kada su u pitanju transporteri za Si ključeni u proces usvajanja i translokacije Si kod viših biljaka, do sada su identifikovana dva tipa (influks i efluks) Si transportera. Transporteri odgovorni za usvajanje Si putem korena (Lsi1 i Lsi2) identifikovani su kod nekoliko vrsta monokotila i dikotola, dok je influks transporter, Lsi6, uključen u pražnjenje Si iz ksilema identifikovan kod Gramineae (Liang *et al.*, 2015).

Lsi1 je influks transporter odgovoran za transport Si iz zemljišnog rastvora u ćelije korena (Slika 4.), a gen koji ga kodira, *Lsi1*, prvi put je identifikovan kod pirinča (*OsLsi1*; Ma *et al.*, 2006). Ovaj gen je kloniran upotrebom mutanta pirinča (*lsi1*; *low silicon 1*) koji nema sposobnost aktivnog transporta Si (Ma *et al.*, 2002). *Lsi1* gen je takođe identifikovan kod ječma (*HvLsi1*) (Chiba *et al.*, 2009), kukuruza (*Zea mays*; *ZmLsi1*) (Mitani *et al.*, 2009a), pšenice (*TaLsi1*) (Montpetit *et al.*, 2012) i bundeve (*Cucurbita moschata*; *CmLsi1*) (Mitani *et al.*, 2011a). *HvLsi1* ječma, *ZmLsi1* kukuruza i *TsLsi1* pšenice pokazuju visoki stepen homologije sa *OsLsi1* pirinča (Ma *et al.*, 2011; Montpetit *et al.*, 2012). *OsLsi1* i njegovi homolozi pripadaju NIP3 (eng. *noduline-26 major intrinsic protein 3*) familiji proteina, potfamiliji biljnih akvaporina (Ma et Yamaji, 2008). Nedavno su identifikovani, okarakterisani i klonirani geni *GmNIP2-1* i *GmNIP2-2* iz soje (*Glycine max*), koji kodiraju influks transportere za Si iz potfamilije NIP2 akvaporina (Deshmukh *et al.*, 2013). *OsLsi1* je konstitutivno eksprimiran u korenu i njegova ekspresija se smanjuje sa dodatkom Si (Ma *et al.*, 2006). *OsLsi1* transporter je lokalizovan na distalnoj strani plazma membrane egzodermisa i endodermisa, gde Kasparijeva traka sprečava transport putem apoplasta u centralni cilindar korena (Yamaji et Ma, 2007). *HvLsi1* i *ZmLsi1* su lokalizovani u epidermalnim, hipodermalnim i kortikalnim ćelijama, i snabdevenost Si ne utiče na nivo njihove ekspresije (Chiba *et al.*, 2009; Mitani *et al.*, 2009b). Iako *TaLsi1* i dalje nije okarakterisan u istoj meri kao *OsLsi1*, pretpostavlja se da *TaLsi1* takođe funkcioniše kao influks transporter Si kod pšenice (Montpetit *et al.*, 2012). Za razliku od *OsLsi1* transportera, *CmLsi1* bundeve je lokalizovan na svim ćelijama korena, slično kao kod ječma i kukuruza (Ma *et al.*, 2006; Chiba *et al.*, 2009; Mitani *et al.*, 2009b). Takođe, za razliku od *Lsi1* pirinča, ječma i kukuruza, *CmLsi1* ne pokazuje polarizovanu lokalizaciju (Mitani *et al.*, 2011). Nasuprot tome, *GmNIP2-1* soje je eksprimiran i u korenu i u izdanku,



ali je slično kao i kod drugih vrsta njegova ekspresija smanjena sa dodavanjem Si (Deshmukh *et al.*, 2013).

*Lsi2* pirinča (*OsLsi2*), koji je kloniran upotrebom novog mutanta pirinča (*Lsi2*; *low silicon 2*) defektnog u usvajanju Si, je takođe prvi gen za efluks transporter Si koji je identifikovan kod viših biljaka (Ma *et al.*, 2007). *Lsi2* protein predstavlja anjonski kanal i ne poseduje nikakvu sličnost sa *Lsi1* (Yamaji *et Ma*, 2011). Za razliku od *Lsi1*, *Lsi2* predstavlja aktivni efluks transporter gde pogonsku silu čini protonski gradijent ( $H^+/Si(OH)_4$  antiport), pomoću koje se silicijumska kiselina može transportovati nasuprot gradijentu koncentracije (Slika 4.). Obrazac ekspresije, kao i lokalizacija na nivou tkiva i ćelije *OsLsi2* isti su kao kod *OsLsi1* (Yamaji *et Ma*, 2011). Kao *Lsi1*, *Lsi2* je takođe lokalizovan na plazma membrani egzodermalnih i endodermalnih ćelija korena, ali nasuprot *Lsi1*, lokalizovan je na njihovoj proksimalnoj strani (Yamaji *et Ma*, 2011). Homolozi *OsLsi2* pirinča, efluks transporteri Si kod ječma (*HvLsi2*) i kukuruza (*ZmLsi2*) takođe pokazuju sličan obrazac ekspresije kao *OsLsi2* (Mitani *et al.*, 2009a). Ekspresija *Lsi2* kod sve tri gore pomenute vrste se smanjuje dodavanjem Si (Ma *et al.*, 2007). Za razliku od *OsLsi2*, *HvLsi2* i *ZmLsi2* su ograničeni na endodermis i ne pokazuju polarnost u lokalizaciji (Ma *et al.*, 2011). Dva efluks transportera Si (*CmLsi2-1* i *CmLsi2-2*) su takođe izolovana iz dva različita kultivara bundeve korišćena kao podloge za dobijanje krastavca sa ili bez cveta (Mitani-Ueno *et al.*, 2011). *CmLsi2-1* i *CmLsi2-2* se ponašaju kao efluks transporteri Si i eksprimirani su u korenu i u izdanaku.

Nakon što se transportuje u stelu posredstvom *Lsi1* i *Lsi2*, Si se translocira u izdanak pomoću toka transpiracije kroz ksilem (Slika 4.). Više od 90% Si koji se usvoji korenom biva translocirano u izdanak (Ma *et Takahashi*, 2002), iako određena količina Si može biti deponovana u ćelijskom zidu ksilemskih sudova (Balasta *et al.*, 1989), što može sprečiti kompresiju sudova kada je stopa transpiracije visoka (Raven, 1983). Koncentracija Si u ksilemskom soku biljnih vrsta akumulatora Si može biti i nekoliko puta veća od kritične koncentracije za polimerizaciju silicijumske kiseline *in vitro*, međutim, tako visoke koncentracije su prisutne samo u prolazu bez sklonosti ka polimerizaciji (Mitani *et al.*, 2005).

Konačno, pre nego što se deponuje na ćelijskom zidu epidermisa, Si se mora transportovati van ksilema putem specifičnog Lsi6 transportera (Slika 4.). Ovaj protein je odgovoran za transport silicijumske kiseline iz ksilema u parenhumske ćelije koje ga okružuju (pražnjenje ksilema), na taj način utičući na kasniju distribuciju Si u izdanku. Gen koji kodira Lsi6 transporter je okarakterisan kod pirinča (*OsLsi6*) (Yamaji *et al.*, 2008), ječma (*HvLsi6*) (Yamaji *et al.*, 2012) i kukuruza (*ZmLsi6*) (Mitani *et al.*, 2009a). *OsLsi6* pirinča je influks transporter Si i homolog Lsi1 (Yamaji *et al.*, 2008). Kao i *OsLsi6*, njegovi homolozi *ZmLsi6* i *HvLsi6* koji su takođe eksprimirani u korenu i u izdanku, pokazuju polarizovanu lokalizaciju u parenhimskim ćelijama ksilema koje okružuju sudove kako u lisnom rukavcu tako i u lisnoj dršci (Mitani *et al.*, 2009b; Yamaji *et al.*, 2012). Međutim, nasuprot *OsLsi6* čija se ekspresija smanjuje sa dodatkom Si (Yamaji *et al.*, 2008), obrazac ekspresije *ZmLsi6* i *HvLsi6* nije pod uticajem snabdevenosti Si (Mitani *et al.*, 2009a; Yamaji *et al.*, 2012).

## 2 Ciljevi istraživanja

Cilj istraživanja ove doktorske disertacije je razjašnjavanje uloge Si u ublažavanju stresa izazvanog nedostatkom Fe kod krastavca, kao model biljke strategije I, sa stanovišta fizioloških i molekularnih mehanizama koji su uključeni u skladištenje i mobilizaciju Fe u apoplastu korena, njegovo usvajanje simplastom, kao i na dalju translokaciju ksilemom i redistribuciju Fe u nadzemnom delu biljke putem floema.

## 3 Materijal i metode

### 3.1 Biljni materijal i uslovi gajenja

Sterilisano seme krastavca (*Cucumis sativus* L. cv. Kineski dugi i cv. Semkross) je nakon potapanja u 1 mM  $\text{CaSO}_4$  tokom noći, naklijavano između dva lista filter papira nakvašena zasićenim rastvorom  $\text{CaSO}_4$ . Klijanci krastavca stari četiri dana su zatim prebačeni u hranljivi rastvor (četiri biljke po plastičnom sudu zapremine 2.5 l) koji je sadržao (u mM):  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 0.1 KCl, 2.0  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 0.5  $\text{MgSO}_4$ , 0.1  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , i (u  $\mu\text{M}$ ): 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  $\text{H}_3\text{BO}_3$ . Fe je obezbeđeno u vidu  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{EDTA}$  u različitim koncentracijama, osim ako nije drugačije naglašeno. Si, ukoliko je primenjen, nalazio se u obliku  $\text{Si}(\text{OH})_4$  (silicijumske kiseline) u koncentraciji 1.5 mM. Rastvor silicijumske kiseline sveže je pripreman dnevno, propuštanjem  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$  (“tečno staklo”) kroz plastičnu kolonu ispunjenu smolom za razmenu katjona (Amberlite IR-120,  $\text{H}^+$  form; Fluka, Buchs SG, Switzerland). Amberlite IR-120 takođe poseduje sposobnost uklanjanja jonskih oblika Fe (Schmid *et Gerloff*, 1961) iz  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ , sprečavajući tako svaku moguću kontaminaciju hranljivog rastvora Fe. Koncentracija rastvorljivog Si u hranljivom rastvoru (svakodnevno proveravana) nalazila se u opsegu 1.3–1.5 mM.

Biljke su gajene u kontrolisanim uslovima sredine u klima komori sa fotoperiodom od 16 h : 8 h (svetlost : mrak) i temperaturnim režimom od 24°C : 20°C, gustine fluksa fotona 250  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  na visini biljke, i relativnoj vlažnosti vazduha od 70%.

### 3.2 Eksperiment 1: Interakcija Si i Fe u ishrani biljaka

Prvi set eksperimenata je sproveden kako bi se izučio uticaj ishrane Si na pojedine opšte fiziološke parametre, kao i na adaptivne mehanizme korena biljaka strategije I u uslovima normalne snabdevenosti Fe i u uslovima nedostatka Fe.

### 3.2.1 Dizajn eksperimenta

Biljke su podvrgnute pretretmanu tokom 7 dana u hranljivom rastvoru sa dodatkom 1  $\mu\text{M}$  Fe, a potom su gajene još 7 dana ili u hranljivom rastvoru sa dodatkom 50  $\mu\text{M}$  Fe (+Fe) ili bez dodatog Fe (-Fe), bez (-Si) ili sa dodatkom (+Si) Si. pH vrednost hranljivog rastvora je podešena na 6.0 i svakodnevno kontrolisana. Hranljivi rastvori su u potpunosti obnavljani svakog drugog dana, i vršena je kontinuirana aeracija.

Pri uzorkovanju, Fe iz apoplasta korena je uklonjeno prema dole opisanoj metodi, nakon čega su biljke podeljene na dva dela, koren i izdanak. Nakon sušenja tokom 48 h na 70°C, izmerena je suva biomasa korena i izdanka i materijal je usitnjen pomoću mlina. Za biohemijske i molekularne analize korišćen je svež biljni materijal trenutno smrznut u tečnom  $\text{N}_2$  i spraćen u avanu.

U ovom eksperimentu praćeni su sledeći parametri: sadržaj hlorofila, parametri rasta (suva biomasa korena i izdanka), pojava određenih vizuelnih simptoma (interkostalna hloroza na mladim listovima i morfološke adaptacije korena) i koncentracija Fe i Si u korenu i listu. Pored toga, urađena je analiza ekspresije gena ukljućenih u akviziciju Fe kod biljaka strategije I (*HAI*, *FRO2* i *IRT1*), izmeren je kapacitet korena za redukciju  $\text{Fe}^{\text{III}}$  (aktivnost enzima FRO), kao i stopa usvajanja i stopa translokacije  $^{57}\text{Fe}$ .

## 3.3 Eksperiment 2: Uticaj Si na usvajanje Fe na nivou korena na biljke krastavca u uslovima nedostatka Fe

### 3.3.1 Vremenska dinamika fizioloških činilaca mašinerije za usvajanje Fe biljaka strategije I

Dati set eksperimenata je sproveden radi proućavanje dinamike u vremenu znaćajnih fizioloških markera u fiziološkom odgovoru biljaka strategije I na deficit Fe, kako bi se

dalje rasvetlili mehanizmi koji leže u osnovi blagotvornog efekta Si na stres izazvan nedostatkom Fe kod krastavca.

### **3.3.1.1 Dizajn eksperimenta**

Biljke su gajene u prekulturi tokom sedam dana sa dodatkom 10  $\mu\text{M}$  Fe, u –Si ili +Si hranljivom rastvoru. Nakon prekulture, biljke su gajene dodatnih sedam dana u –Si i +Si hranljivih rastvora, ali bez dodatka Fe. pH vrednost hranljivog rastvora je podešena na 6.0 i svakodnevno kontrolisana. Hranljivi rastvori su u potpunosti obnavljani svakog drugog dana i vršena je kontinuirana aeracija.

Pri uzorkovanju biljke su podeljene na dva dela, koren i izdanak. Nakon sušenja tokom 48 h na 70°C, izmerena je suva biomasa korena i izdanka i materijal je usitnjen pomoću mlina. Materijal namenjen za biohemijske i molekularne analize trenutno je smrznut u tečnom N<sub>2</sub> i čuvan na –80°C.

Radi izučavanja sposobnosti mobilizacije Fe iz rizosfere i apoplasta korena izmerena je koncentracija Fe u apoplastu korena, kao i koncentracija organskih kiselina (citrata i malata), fenolnih jedinjenja (katehini i galna kiselina) i riboflavina, kao potencijalnih Fe mobilizirajućih/redukujućih komponenti. Takođe, praćena je i ekspresija gena iz relevantnih biosintetskih puteva: *ICD* (kodira za izocitrat dehidrogenazu) i *MDH* (koji kodira za malat dehidrogenazu) iz Krebsovog ciklusa, *PEPC* (kodira za fosfoenolpiruvat karboksilazu), *SK* (kodira za šikimat kinazu) iz šikimatskog puta i *PAL* (kodira za fenilalanin amonijumliazu) iz fenilpropanoidnog puta. Praćena je i dinamika parametara komponenti mašinerije za akviziciju Fe: aktivnost enzima *FRO*, kao i ekspresija *FRO2*, *IRT1*, *HAI*. Translokacija Fe putem ksilema u nadzemni deo biljke ispraćena je merenjem koncentracije Fe i citrata u ksilemskom soku.

### 3.3.2 Uticaj Si na usvajanje Fe iz slabo rastvorljivog Fe<sup>III</sup>hidroksida

Dati set eksperimenata je imao za cilj da dalje potvrdi povećani kapacitet korena krastavca da mobilize Fe biljaka koje su tretirane Si.

#### 3.3.2.1 Dizajn eksperimenta

Biljke su gajene u prekulturni u hranljivom rastvoru bez Fe i Si tokom sedam dana, a zatim su prebačene u -Si ili +Si hranljivi rastvor sa dodatkom 1  $\mu\text{M}$  Fe u vidu Fe<sup>III</sup>EDTA (kontrola, rastvorljivi izvor Fe) ili Fe(OH)<sub>3</sub>. FeCl<sub>3</sub> je konvertovan u Fe(OH)<sub>3</sub> dodatkom 1 mM KOH, uz mešanje tokom 30 min. Kako bi se umanjio uticaj zakišeljavanja površine korena na usvajanje Fe, pH hranljivog rastvora je podešen na 6.5 i održavan konstantnim dodavanjem CaCO<sub>3</sub> (10 mg l<sup>-1</sup>). Biljke su uzorkovane 10-og dana tretmana. Hranljivi rastvori su u potpunosti obnavljani svakog drugog dana i vršena je kontinuirana aeracija.

Pri uzorkovanju biljke su podeljene na dva dela, koren i izdanak. Nakon sušenja tokom 48 h na 70°C, izmerena je suva biomasa korena i izdanka i materijal je usitnjen pomoću mlina.

U ovom eksperimentu izmereni su sledeći parametri: suvabiomasa korena i izdanka, sadržaj hlorofila. Ukupna količina usvojenog Fe je izračunata kao zbir količina Fe u simplastu korena (nakon uklanjanja Fe iz apoplasta korena) i količina Fe u izdanku.

### 3.3.3 Uticaj Si na sintezu organskih kiselina u listu krastavca

Dati set eksperimenata sproveden je kako bi se istražio efekat Si na sintezu organskih kiselina u listovima krastavca, koje mogu imati ulogu u translokaciji i distribuciji Fe ka apikalnim delovima izdanka.

### 3.3.3.1 Dizajn eksperimenta

Biljke su gajene dve nedelje u hranljivom rastvoru sa  $10 \mu\text{M Fe}^{\text{III}}\text{EDTA}$  ili bez Fe, bez (-Si) ili sa dodatkom Si (+Si). pH vrednost hranljivog rastvora je podešena na 6.0 i svakodnevno kontrolisana. Hranljivi rastvori su u potpunosti obnavljani svakog drugog dana i vršena je kontinuirana aeracija.

Nakon 14 dana, sveže tkivo lista je sprašeno u avanu pomoću tečnog  $\text{N}_2$  i izvršena je ekstrakcija organskih kiselina prema metodi opisanoj u daljem tekstu.

U ovom eksperimentu izmerena je koncentracija citrata, malata, fumarata, oksalata i sukcinata u listu.

## 3.4 Eksperiment 4: Uticaj Si na remobilizaciju Fe u listovima krastavca u uslovima nedostatka Fe

Četvrti set eksperimenata je imao za cilj da istraži mehanizme remobilizacije Fe iz starijih listova i njegovu naknadnu retranslokaciju u mlađe listove posredovane Si kod biljaka gajenih u uslovima nedostatka Fe.

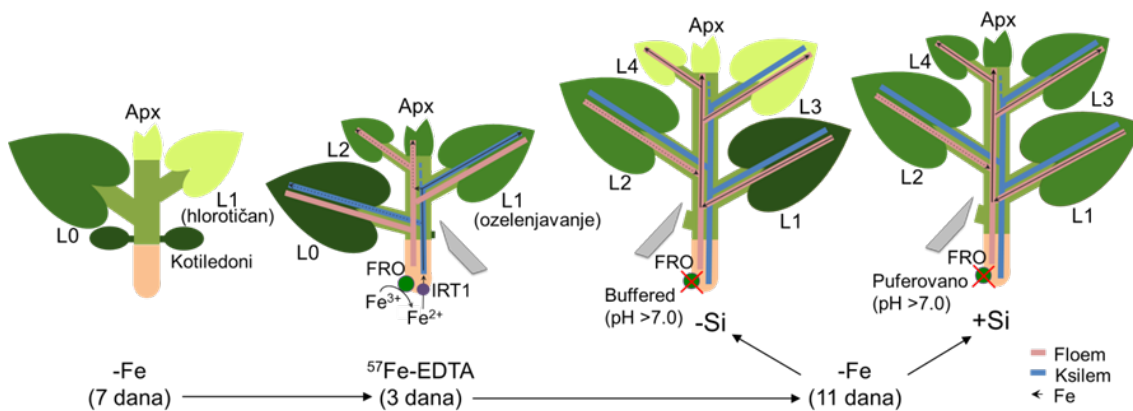
### 3.4.1 Dizajn eksperimenta

Nakon sedam dana prekulture u -Fe hranljivom rastvoru, uklonjeni su kotiledoni i biljke su prebačene u hranljivi rastvor sa  $10 \mu\text{M Fe}^{\text{III}}\text{-EDTA}$ , obogaćenim  $^{57}\text{Fe}$  ili sa prirodnom zastupljenosti izotopa (ovde označen kao Fe). Nakon tri dana, Fe je ponovo uklonjeno iz hranljivog rastvora i biljke su gajene narednih 11 dana u hranljivom rastvoru bez Fe, bez ili sa dodatkom Si. Prvi zeleni list (L0), potpuno formiran tokom prekulture, je uklonjen u trenutku isključivanja Fe iz hranljivog rastvora (Slika 5.). Pored toga, kako bi se minimalizovala mobilizacija Fe iz apoplasta korena i naknadna enzimska  $\text{Fe}^{\text{III}}$  redukcija koja prethodi usvajanju  $\text{Fe}^{2+}$ , pH vrednost hranljivog rastvora je održavana na 7.0 pomoću



$\text{CaCO}_3$  kao pufera i svakodnevno je proveravana. Hranljivi rastvori su u potpunosti obnavljani na svaka dva dana i vršena je kontinuirana aeracija.

Pri uzorkovanju, uklonjeno je Fe iz apoplasta prema metodi opisanoj u daljem tekstu. Potom, biljke su podeljene na sledeće delove: koren, stablo (zajedno sa lisnim drškama i centralnim nervom) i listove (lisne ploče bez centralnog nerva) uzorkovane na četiri različite pozicije (od baze do najmlađeg lista): L1 (razvijen tokom tri dana tretmana sa Fe), L2, L3 i L4 (uključujući apeks). Nakon sušenja tokom 48 h na  $70^\circ\text{C}$ , izmerena je suva biomasa i materijal je sprашen pomoću mlina. Za analizu NA i molekularne analize korišćen je svež biljni materijal trenutno smrznut u tečnom  $\text{N}_2$  i sprашen u avanu.



**Slika 5.** Shematski prikaz postavke eksperimenta remobilizacije Fe i kretanja Fe kroz biljku

U ovom eksperimentu izmerena je suva biomasa korena, stabla i listova. Mineralna analiza obuhvatala je određivanje koncentracije Si u korenu, stablu i listovima, kao i sadržaj Fe u korenu (apoplast + simplast), stablu i listovima. Praćena je koncentracija Fe u ksilemskom soku u nekoliko vremenskih tačaka tokom eksperimenta. Pomoću izmerenih vrednosti sadržaja  $^{57}\text{Fe}$ , izračunata je relativna distribucija  $^{57}\text{Fe}$  u listovima na različitim pozicijama (L1-L4). Takođe, utvrđen je sadržaj hlorofila i koncentracija Fe u listovima na različitim pozicijama (L1-L4). Izmerena je koncentracija NA i ispitana je i relativna ekspresija dva gena koja kodiraju za NA, *NAS1* i *NAS4*, kao i dva gena koja kodiraju za Fe-NA transportere, *YSL1* i *YSL3*, u listovima na različitim pozicijama (L1-L4). Dodatno je

merena i ekspresija gena *NRAMP1* koji kodira transporter redukovano  $\text{Fe}^{2+}$  (FRO enzimom i/ili fotohemijski) iz apoplast u simplast lista, odnosno za pražnjenje ksilema.

Ispitivanje uticaja pH vrednosti hranljivog rastvora ( $-/+ \text{CaCO}_3$ ) na količinu Fe u apoplastu korena izvršeno je tako što su biljke gajene u hranljivom rastvoru bez Fe tokom sedam dana, a zatim je u hranljivi rastvor dodato  $10 \mu\text{M}$  Fe tokom tri dana, naokon čega su biljke prebačene u hranljivi rastvor bez Fe, nepuferovan ( $\text{pH} < 5.0$ ) ili puferovan sa  $\text{CaCO}_3$ , ( $0.2 \text{ g l}^{-1}$ ;  $\text{pH} > 7.0$ ) bez ili sa dodatkom Si. Nakon 11 dana izmeren je sadržaj Fe u apoplastu biljaka prema metodi opisanoj u daljem tekstu.

Kako bi se ispitao uticaj  $\text{CaCO}_3$  na normalan rast krastavca, biljke su gajene hranljivom rastvoru bez Fe tokom sedam dana, a zatim je u hranljivi rastvor dodato  $10 \mu\text{M}$  Fe tokom tri dana naokon čega su biljke prebačene u hranljivi rastvor bez Fe tokom 11 dana (-Fe). Kontrolne biljke su snabdevane  $10 \mu\text{M}$  Fe tokom čitavog trajanja eksperimenta (+Fe). Održavana je visoka pH ( $> 7.0$ ) dodavanjem  $0.2 \text{ g l}^{-1} \text{ CaCO}_3$ . Po završetku eksperimenta biljke su podeljene na koren i nadzemni deo i, nakon sušenja tokom 48 h na  $70^\circ\text{C}$ , izmerena je suva biomasa uzoraka.

### 3.5 Određivanje hlorofila

Sadržaj hlorofila je izmeren nedestruktivno, upotrebom prenosivog uređaja za merenje hlorofila SPAD-502 (Spectral Plant Analysis Diagnostic; Minolta Camera Co., Osaka, Japan).

### 3.6 Sakupljanje ksilemskog soka

Ksilemski sok je sakupljen eksudacijom nakon dekapitovanja biljaka 2 cm iznad baze korena. Meka silikonska creva su pričvršćena preko dekapitovanog stabla i ksilemski sok je sakupljan pomoću mikropipete tokom 1 h, nakon odbacivanja eksudata sakupljenih tokom prvih par minuta.

### 3.7 Određivanje Fe u apoplastu korena

Nakon ispiranja u rastvoru 0.5mM CaSO<sub>4</sub> i 5 mM MES [(2-(N-morfolino)etansulfonska kiselina)] tokom 10 minuta, intaktni korenovi svake biljke su prebačeni u inkubacioni rastvor koji je sadržao 5 mM MES (pH 5.5), 0.5mM CaSO<sub>4</sub> i 1.5mM 2,2'-bipiridil, a zatim inkubirani 10 minuta u redukujućim uslovima dodavanjem 0.5g Na-ditionita u čvrstom stanju i kontinuiranim uduvavanjem N<sub>2</sub> u inkubacioni rastvor. Tako redukovano, Fe iz apoplasta je uklonjeno formiranjem crvenog kompleksa Fe<sup>II</sup>(bipiridil)<sub>3</sub> i izmereno spektrofotometrijski, merenjem apsorbanca na 520 nm i primenom ekstinkcionog koeficijenta od 8.65 mM<sup>-1</sup> (Bienfait *et al.*, 1985).

### 3.8 Određivanje Fe u biljnim tkivima

Suvi biljni materijal (0.2 g) je digeriran u 3 ml koncentrovane HNO<sub>3</sub> + 2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tokom 1 h u mikrotalasnoj pećnici (Speedwave MWS-3+; Berghof Products + Instruments GmbH, Eningen, Germany). Uzorci su zatim prebačeni u normalne sudove zapremine 25 ml i zapremina uzorka je podešena do 25 ml upotrebom dejonizovane H<sub>2</sub>O. Fe je izmereno induktivno spregnutom plazmom optički emisionom spektroskopijom (ICP-OES, Spectro-Genesis EOP II; Spectro Analytical Instruments GmbH, Kleve, Germany).

### 3.9 Određivanje Fe u ksilemskom soku

Koncentracije Fe u sveže sakupljenom ksilemskom soku izmerena je primenom ICP-OES odmah nakon što su uzorci razblaženi 10 puta (v/v) sa 1M HNO<sub>3</sub>.

### 3.10 Određivanje Si u biljnim tkivima

Suvi biljni materijal (0.2 g) je digeriran u mikrotalasnoj pećnici u 3 ml koncentrovane  $\text{HNO}_3$  + 2 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  tokom 1 h. Uzorci su razblaženi sa 15 ml dejonizovane  $\text{H}_2\text{O}$ , prebačeni u plastične normalne sudove zapremine 25 ml, dodat je 1 ml koncentrovane HF i ostavljeni su da tako odstoje preko noći. Nakon dodavanja 2.5 ml 2% (w/v)  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , zapremina u sudu je podešena do 25 ml upotrebom dejonizovane  $\text{H}_2\text{O}_2$  i Si je izmeran pomoću ICP-OES, nakon finalnog razblaženja uzorka u razmeri 1:100 (v/v) dejonizovanom  $\text{H}_2\text{O}$ .

### 3.11 Određivanje Si u hranljivom rastvoru

Rastvorljivi Si u hranljivom rastvoru je izmeren upotrebom ICP-OES odmah nakon što je 1 ml alikvota razblažen 100 puta (v/v) dejonizovanom  $\text{H}_2\text{O}$ .

### 3.12 Određivanje organskih kiselina, fenolnih jedinjenja i riboflavina u različitim biljnim tkivima i ksilemskom soku

Organske kiseline, fenolna jedinjenja i riboflavin su ekstrahovani iz svežeg tkiva korena (vrhovi korenova dužine 0.5 - 1 cm, 0.1 g sveže mase). Takođe, ekstrakcija organskih kiselina i fenolnih jedinjenja izvršena je iz tkiva lista (~0.1 g sveže mase). Uzorci su trenutno smrznuti u tečnom  $\text{N}_2$ , dobro samleveni i ekstrahovani u 1 ml rastvora metanola i dejonizovane  $\text{H}_2\text{O}$  (3:1, v/v). Organske kiseline iz ksilemskog soka ekstrahovane su dodavanjem metanola (3:1, v/v). Pre analize, svi uzorci su profiltrirani kroz najlonske špric filtere sa promerom pora od 0.22  $\mu\text{m}$  (Phenomenex, Torrance, CA, USA).

Razdvajanje organskih kiselina iz različitih uzoraka vršeno je na HPLC (tečna hromatografija pod visokim pritiskom) sistemu (Waters, Milford, MA, USA), koji se sastoji od 1525 binarnih pumpi, termostata i 717+ autosemplera povezanog sa Waters 2996 detektorom diodnog polja (DAD; Waters) podešenog na 210 nm. Korišćena je kolona za

razmenu anjona, Aminex HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) dimenzija 300 x 7.8 mm sa H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kao mobilnom fazom. Primenjeno je izokratsko ispiranje sa protokom od 0.6 ml min<sup>-1</sup> na 40°C.

Fenolna jedinjenja i riboflavin iz različitih uzoraka su kvantifikovani primenom HPLC/DAD analize na reverznim fazama. Uzorci su ubrizgani u Waters HPLC sistem sa gore pomenutim specifikacijama. Razdvajanje fenolnih jedinjenja i riboflavina vršeno je na Symmetry C-18 RP koloni dimenzija 125 x 4 mm sa česticama dijametra 5 µm (Waters) povezanoj sa odgovarajućom zaštitnom kolonom. Korišćene su dve mobilne faze, A (0.1 % fosforna kiselina) i B (acetonitril) sa protokom od 1 ml min<sup>-1</sup> sa sledećim profilom gradijenta: prvih 20 min od 10% do 22% B; narednih 20 min sa linearnim povećanjem do 40%, praćeno sa 5 min reverzije do 10% B i dodatnih 5 min vremena ekvibracije. Hromatogrami su snimljeni u 3D režimu sa uzastopnim izdvajanjem kanala na specifičnim talasnim dužinama za dato fenolno jedinjenje (220 i 309 nm) i na 445 nm za riboflavin.

Pik za riboflavin je dalje potvrđen primenom HPLC-MS analize na reverznim fazama upotrebom Waters HPLC sistema povezanim sa EMD 1000 jednostrukim kvadrupolnim detektorom sa ESI (eng. *electrospray ionization*) sondom (Waters). Razdvajanje riboflavina je postignuto u istim uslovima kao što je prethodno opisano za fenolna jedinjenja, izuzev upotrebe 0.1% mravlje umesto fosforne kiseline. Kako bi se dobio optimalni priliv mobilne faze od 200 µl min<sup>-1</sup> za ESI sondu, korišćen je razdelnik protoka (ASI, Richmond, CA, USA) sa deljenjem u odnosu 5:1. Za LC-MS analizu, signali za svako jedinjenje su detektovani na pozitivnom ESI snimku (od 100 do 600 m/z) i SIR režimu (377 m/z) sa sledećim parametrima: napon kapilare 3.0 kV, konusni napon 40 V, napon ekstraktora i RF sočiva od 3.0 odnosno 0.2 V. Izvorna i temperatura desolvacije bile su 120°C odnosno 400°C, sa protokom N<sub>2</sub> od 600 h<sup>-1</sup>.

Detektovani metaboliti su locirani i identifikovani na odgovarajućim hromatogramima kroz poređenje standarda (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) sa autentičnim uzorcima, kombinovanjem njihovih retencionih vremena i UV spektara dobijenih pomoću DAD. Kalibracione krive su dobijene ubrizgavanjem različitih zapremina stok rastvora u opsegu koncentracija dobijenih za svako jedinjenje, primenom linearne regresije na odnos ukupne površine ispod pika i koncentracije, pod istim uslovima

kao i pri analizi uzoraka. Svaka komponenta je kvantifikovana primenom metode eksternog standarda upotrebom čistih jedinjenja kao reference za koncentraciju, retenciono vreme odnosno karakteristični UV spektar. Količina uzorka koja je ubrizgavana podešena je tako da se uklopi u linearni kalibracioni opseg dobijen ubrizgavanjem komercijalnih standarda. Za obradu podataka je korišćen Empower 2 softver (Waters).

### 3.13 Određivanje redukcionog kapaciteta Fe<sup>III</sup> helata

Intaktni korenovi krastavca su isprani u 30 ml rastvora 0.5 mM CaSO<sub>4</sub> uz neprekidnu aeraciju. Potom, korenovi su inkubirani u 30 ml rastvora koji je sadržao 0.5 mM CaSO<sub>4</sub>, 5 mM MES, 0.3 mM BPDS (betafenantrolin disulfonsa kiselina) i Fe<sup>III</sup>EDTA u mraku tokom 1 h na 25°C. Stope redukcije su određene preko formiranja crvenog kompleksa Fe<sup>II</sup>(BPDS)<sub>3</sub> merenjem apsorbance na 535 nm primenom spektrofotometrije u odnosu na blank (bez korena) i primenom ekstinkcionog koeficijenta od 22.14 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

### 3.14 Priprema <sup>57</sup>Fe<sup>III</sup>EDTA, usvajanje <sup>57</sup>Fe i određivanje <sup>57</sup>Fe u biljnim tkivima

Obogaćeni <sup>57</sup>Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (96.64% obogaćenost izotopom; Isoflex, San Francisco, CA, USA) je konvertovan u <sup>57</sup>FeCl<sub>3</sub> rastvaranjem u minimalnoj količini skoro proključale koncentrovane HCl (35% suprapur; Merck, Darmstadt, Germany) i ponovljenim koncentrovanjem u ultra čistoj H<sub>2</sub>O (18 M; Millipore, Bedford, MA, USA) pod reflusom. EDTA (Sigma-Aldrich) je rastvoren u dovoljnoj količini NaOH (1 : 3 molarni odnos). <sup>57</sup>FeCl<sub>3</sub> je polako dodavan u rastvor liganda (<sup>57</sup>Fe : EDTA molarni odnos od 1 : 1.1) i ostavljen tokom noći da dostigne ravnotežu dok se meša sa komadićem filter papira u rastvoru kako bi se apsorbovali mogući nehelirani precipitati. Nakon toga, rastvor je filtriran kroz membranski filter (veličina pora od 0.45 μm) i podešen do konačne

zapremine. Tokom procesa heliranja sprečeno je izlaganje rastvora svetlosti, kako bi se izbegla potencijalna fotodestrukcija kompleksa.

Za eksperiment usvajanja  $^{57}\text{Fe}$ , korenovi intaktnih biljaka su ispirani tokom 30 min u hranljivom rastvoru bez Fe, a zatim su prebačeni u neprovidne plastične sudove koji su sadržali 250 ml sveže pripremljenog hranljivog rastvora bez dodatog Fe. Dodat je prethodno pripremljeni rastvor  $^{57}\text{FeEDTA}$  tako da je krajnja koncentracija Fe iznosila 10  $\mu\text{M}$ . pH vrednost rastvora je podešena na 5.5 pomoću 10 mM MES/KOH i rastvor je kontinuirano aerisan tokom perioda usvajanja od 8 h. Nakon perioda usvajanja, biljke su prebačene u sveže pripremljeni hranljivi rastvor bez Fe tokom 15 min.  $^{57}\text{Fe}$  iz apoplasta korena izmereno je primenom redukcione ekstrakcije prema metodu Bienfait *et al.* (1985), neznatno modifikovanom kao što je gore opisano, a biljke su zatim podeljene na koren i izdanak. Uzorci su osušeni na 70 °C tokom 48 h, izmerena je suva biomasa i izvršena je digestija materijala u mikrotalasnoj pećnici u 10 ml  $\text{HNO}_3$  tokom 1 h.

Na sličan način izvršena je i priprema uzoraka, osušeno (na 70 °C tokom 48 h) tkivo lista (oko 0.5 g) iz eksperimenta remobilizacije  $^{57}\text{Fe}$  je razoreno u mikrotalasnoj pećnici u 8 ml koncentrovane  $\text{HNO}_3$  tokom 1 h.

$^{57}\text{Fe}$  je izmereno pomoću kvadrupolna induktivno spregnuta plazma masene spektroskopije (ICP-MS, Agilent 7500ce; Agilent Technologies, Manchester, UK). Instrument je opremljen sa PFA nebulajzerom sa mikro protokom i korišćen je u vodoničnom režimu kako bi se eliminisale spektralne interference. Podešavanja instrumenta su kao što je prethodno opisano (Laursen *et al.*, 2009); međutim, neposredno pre analize protok  $\text{H}_2$  oktopolnog provodnika jona je optimizovan za dobijanje  $^{56}\text{Fe}$  i  $^{57}\text{Fe}$  signala sa minimumom interferenci, najmanjim mogućim pozadinskim šumom i tačnim vrednostima za  $^{56}\text{Fe}/^{57}\text{Fe}$  prema odnosu zastupljenosti u prirodi od 43.3 (vrednosti prema IUPAC). Ovo je procenjeno vodoničnim rampingom na neobogaćenim uzorcima i standardima, čime je dobijena tačnost od > 95% od realnog odnosa na optimalnom protoku  $\text{H}_2$  (7 ml  $\text{min}^{-1}$ ). Pre analize, svi uzorci su razblaženi do 3.5% (v/v)  $\text{HNO}_3$  i sprovedena je eksterna kalibracija za dobijanje ukupnih koncentracija  $^{56}\text{Fe}$  i  $^{57}\text{Fe}$  upotrebom komercijalno dostupnog standardnog rastvora (P/N 4400-132565; CPI International, Amsterdam, the Netherlands). Analitička tačnost ukupnih koncentracija je određena primenom sertifikovanog referentnog

materijala (Spinach NCS ZC73013; China National Analysis Center for Iron and Steel, Beijing, China). Vrednosti koncentracije su prihvatane ukoliko je tačnost prelazila 90% referentne vrednosti. Tačnost odnosa izotopa  $^{56}\text{Fe}/^{57}\text{Fe}$  je procenjena analizom četiri neobogaćena uzorka rezultirajući u prosečnom odnosu izotopa od  $44.3 \pm 2.3$ . Obrada podataka je izvršena primenom B.02.01 verzije Masshunter Workstation softvera (Agilent Technologies).

### 3.15 Ekstrakcija i određivanje NA

Duboko zamrznuti uzorci lista su homogenizovani upotrebom avana u tečnom  $\text{N}_2$ , a zatim ekstrahovani u dejonizovanoj vodi na  $80\text{ }^\circ\text{C}$  tokom 30 min. Nakon centrifugiranja na 5000 g tokom 30 min na  $4\text{ }^\circ\text{C}$ , izdvojen je supernatant i podvrgnut analizi NA primenom tečne hromatografije masene spektroskopije (LC-MS), prema modifikovanoj metodi Yamaguchi *et Uchida* (2012).

Razdvajanje uzoraka izvršeno je na Synchronis C18 koloni (100 x 2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ) (Thermo Fisher Scientific Inc., Bremen, Germany). Mobilna faza se sastojala od A ( $\text{H}_2\text{O}$  +0.01% sirćetna kiselina) i B (acetonitril). Primenjen je program linearnog gradijenta na protoku od  $0.25\text{ ml min}^{-1}$ : 0.0-1.0 min 5% B, 1.0-2.0 min od 5 do 95% B, 5.0-7.0 min 95% B, zatim 5% B tokom 8 min. Injekciona zapremina je iznosila 5  $\mu\text{l}$ . Thermo Scientific Orbitrap LC-MS se sastojao od kvartarne pumpe (Accela 600), autosemplera i linearnog hibridnog jonskog trap-orbitrap MS (LTQ Orbitrap XL) sa HESI (eng. *heated electrospray ionization*). Standardni rastvor NA koncentracije  $100\text{ mg l}^{-1}$  (Toronto Research Chemicals, North York, Canada) je pripremljen rastvaranjem u ultra čistoj  $\text{H}_2\text{O}$  ( $0.055\text{ IS cm}^{-1}$ ), koji je dalje razblažen u koncentracijama od 0.050, 0.075, 0.100, 0.250, 0.500, 0.750, i  $1.000\text{ mg l}^{-1}$  za izradu kalibracione krive. Masenim spektrometrom je rukovano u pozitivnom režimu; Parametri za HESI izvor su bili sledeći: napon izvora 5 kV, napon kapilare 30V, napon cevastog sočiva 90V, temperatura kapilare  $300\text{ }^\circ\text{C}$ , aksilarni protok  $\text{N}_2$  od 232 i 8 arbitrarnih jedinica. Maseni spektri su dobijeni iz punog opsega koji je pokrивao od 230-



1000 m/z. Normalizovana energija sudara ćelije sudarom indukovane ćelije za disocijaciju podešena na 35 eV.

Thermo Xcalibur softver (verzija 2.1) je korišćen za kontrolu instrumenta, dobijanje i analizu podataka. NA je kvantifikovan prema odgovarajućim spektralnim karakteristikama: masenom spektru, tačnoj masi, karakterističnoj fragmentaciji i karakterističnim retencionim vremenom. Kvantifikacija je izvršena metodom pretraživanja tačne mase poređenjem retencionih vremena i tačne mase dostupnih standarda.

### **3.16 Ekstrakcija RNK, semikvantitativni RT-PCR i kvantitativni PCR u realnom vremenu (Real-time PCR)**

Uzorci biljnih tkiva (0.5-1 g sveže mase) su smrznuti u tečnom N<sub>2</sub> i samleveni u avanu do finog praha. RNK je izolovana upotrebom RNeasy® Mini Kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany), kao što je opisano u uputstvu za upotrebu RNeasy® Mini Handbook.

Pre sinteze cDNK, DNK je uklonjena iz uzoraka sa izolovanom RNK upotrebom reagenasa Ambion DNA-free DNase Treatment and Removal Reagents. Jednolančana cDNK je sintetisana od 5 µg RNK upotrebom M-MuLV reverzne transkriptaze (Fermentas, Vilnius, Lithuania) i nasumičnih heksamernih prajmera (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) prema uputstvima proizvođača. cDNK je zatim razblažena u odnosu 1:5 (v/v) H<sub>2</sub>O bez nukleaze. Alikvoti iz istih uzoraka su korišćeni za standardni i PCR u realnom vremenu sa prajmerima dizajniranim za krastavac; sekvence prajmera i pristupni brojevi sekvenci korišćenih za dizajn prajmera u NCBI Reference Sequence Database, su dati u Tabeli 2. U semikvantitativnom PCR, reakcije su prošle 25 puta kroz ciklus od 30 s na 95°C, 30 s na 60°C i 30 s na 72°C, koristeći 100 ng cDNK kao matricu, 450 nM prajmera i 0.5 U polimeraze Fermentas Taq Polymerase. Produkti umnožavanja su podvrgnuti elektroforezi na 1.5% (w/v) agaroznom gelu.

**Tabela 2.** Prajmeri i pristupni brojevi analiziranih gena

Gen	Pristupni br.	Direktan prajmer (5'-3')	Reverzni prajmer (5'-3')
ACT	AB010922	GCTGGCATATGTTGCTCTTG	CGATGGTGATGACTTGTCCA
FRO2	AY590765	AGTTTCCCTCGAAGGTCCAT	TGGAAATGAATGGGGTGATT
HA1	AJ703810	GGAGACAGGAAGTGCCTGAG	TTCTCCACTGTCATGCCTTG
ICD	AJ437269	CAGAGGACCTGGGAAATTGA	AAGGGGCCATTTCTTCTCAT
IRT1	AY590764	AATAGCCCTGTTGCACTCGT	GGCCCATAAAATCAGCAGAA
MDH	CU096020	GGGCAACCATTCAACAACCTC	TCCCCACTTTCTCAATCAGC
PAL	AF475285	CTTTGCATGGAGGCAACTTT	GCTCGGGTTTCTACTTGCAG
PEPC	AJ417435	CTACTTGAGGCAGCGACTCC	GCTCGGGTTTCTACTTGCAG
SK	AY596190	AGAGAAAGGGAGACGGAAGC	GCACATCCAACCAAACACTG
NRAMP1	XM_004160286.1	CGATTTGCTTCTTCTGAG	GGGAACGGGGTATTTTCT
NAS1	XM004158701	GGAGTTCGAGGTGGTGTTC	CCACCACCGGATAAACAAC
NAS4	XP004144812	CCCAAAAACCGAGTTTCAC	GAAACACCACCTCGAACTCC
YSL1	XM004163525	TGCTTTTGCTTTCTTGACCTC	AGGAGCCATCTTATCTTATGGC
YSL3	XP004150025	TCCATGCTTTTAAGCCAAGC	CGGGACCTTGACTCACCAT

Real-time PCR (reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu) reakcije su izvedene u 25 µl rastvora koji je sadržao 500 nM svakog prajmera i 1X SYBER Green PCR master mix (Applied Biosystems). Real-time PCR je izveden na aparatu ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystem), koristeći parametre koje je preporučio proizvođač (2 min na 50°C, 10 min na 95°C i 40 ciklusa na 95°C tokom 15 s i 60°C tokom 1 min). Svaka PCR reakcija je sprovedena u tri ponavljanja i uključene su i kontrole bez matrice. Akumulacija produkata PCR je detektovana u realnom vremenu i rezultati su analizirani upotrebom softvera 7500 System (Applied Biosystems) i prikazani kao  $2^{-dCt}$  (dCt, razlika između Ct vrednosti ciljnog gena i referentnog gena za aktin *ACT*). Kako bi se odredila efikasnost amplifikacije u reakcijama real-time PCR sa novodizajnim parovima prajmera, korišćena je cDNK razblažena 5, 10, 20 i 40 puta kao matrica za PCR. Sa grafika srednjih Ct vrednost i  $\log_{10}$  razblaženja uzoraka izračunati su nagibi

amplifikacione krive. Efikasnost PCR je utvrđena pomoću formule:  $E = 10^{-1/\text{nagib}} - 1$ . Za svaki par prajmera efikasnost reakcije je bila između 90 i 100% ( $-3.6 > \text{nagib} > -3.1$ ). Prajmeri i pristupni brojevi analiziranih gena navedeni su u Tabeli 2, a sekvencama analiziranih gena može se pristupiti preko NCBI Reference Sequence Database base podataka i EST baze podataka (<http://www.icugi.org/>).

### 3.17 Filogenetska analiza

Evolutivni odnosi NAS i YSL aminokiselinskih sekvenci krastavca (*Cucumis sativus*) i arabidopsisa (*Arabidopsis thaliana*) dostupnih u banci gena GenBank (pristupljeno 20.09.2015) su ustanovljeni konstrukcijom filogenetskih stabala primenom “neighbor joining” (NJ) metode upotrebom softvera MEGA (verzija 6.06). Za analizu su korišćene sledeće sekvence krastavca: četiri NAS sekvence (dve sekvence koje odgovaraju NAS4, jedna NAS1, i jedna NAS-like genu; pristupni brojevi XP\_004144750\_NAS4, XP\_004135580\_NAS\_LIKE GENE, XP\_004146360\_NAS4, XP\_004144812\_NAS1) i pet YSL sekvenci (jedna sekvenca koja odgovara YSL1, jedna YSL1-like genu, jedna YSL3 i jedna YSL6; pristupni brojevi XP\_004143842\_YSL1, XP\_004143944\_YSL1 LIKE, XP\_004146239\_YSL3, XP\_004150025\_YSL3, XP\_004148009\_YSL6). Kod arabidopsisa korišćeno je sedam NAS sekvenci (dve sekvence koje odgovaraju NAS1, jedna NAS2, dve NAS3 i dve NAS4; pristupni brojevi NP\_196114\_NAS1, NM\_120577\_NAS1, NP\_200419\_NAS2, NP\_172395\_NAS3, NM\_100794\_NAS3, NP\_176038\_NAS4, AB181237\_NAS4) i 10 sekvenci YSL (YSL1, YSL2, YSL4, YSL5 i YSL6 geni sa po jednom sekvencom; pristupni brojevi: AAS00691\_YSL1, NP\_197826\_YSL2, NP\_198916\_YSL4, NP\_566584\_YSL5, AAS00695\_YSL6, i YSL3 sa ukupno pet sekvenci; pristupni brojevi: Q2EF88\_YSL3, NP\_00190532\_YSL3, AED96376\_YSL3, AED96375\_YSL3, NP\_200167\_YSL3). Optimalni model evolucije oba seta podataka je utvrđen koršćenjem BIC (Bajesov kriterijum informativnosti) koji je izračunat u MEGA 6.06. Najmanje BIC vrednosti za NAS matriks su imali WAG (*Whelan and Goldman*) i Dayhoff model sa gama korekcijom (G) po kojoj se podrazumeva heterogena stopa

mutacija pozicija (nukleotida) u matriksu, tako da je za NAS matriks odabran Dayhoff + G model. Najniža BIC vrednost za YLS matriks je dobijena za Jones-Taylor-Thornton model evolucije sa gama korekcijom (JTT + G). Filogenetska stabla su konstruisana u MEGA 6.06 paketu, korišćenjem odgovarajućih modela evolucije peptidnih sekvenci za svaki od matriksa, i opcije kompletna delecija indela u poređenjima parova sekvenci. Statistička podrška stabala je dobijena korišćenjem 1000 ne-parametrijskih bootstrap replikacija (BS), pri čemu su vrednosti  $BS \geq 75\%$  smatrane dobrom podrškom, a vrednosti  $50 - 75\%$  umerenom podrškom.

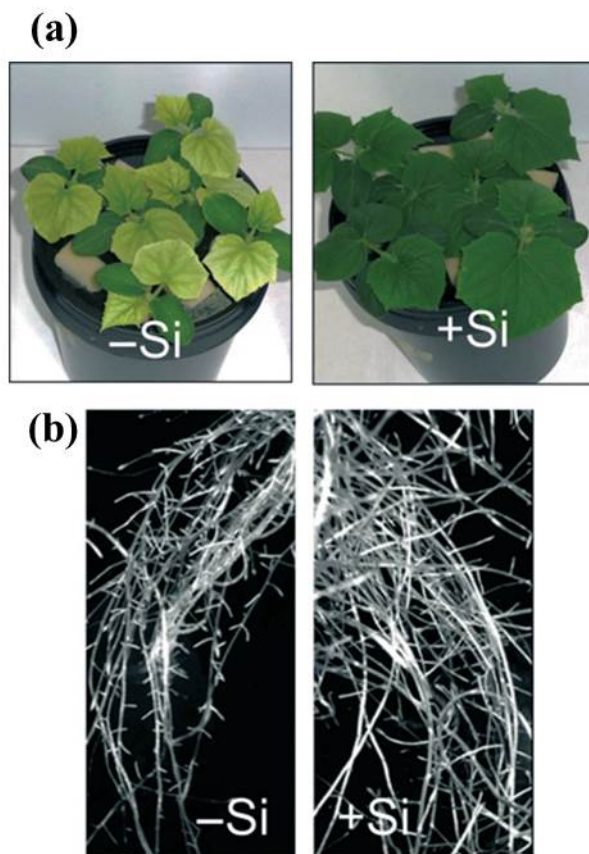
### **3.18 Statistička analiza podataka**

Podaci su podvrgnuti analizi varijanse primenom statističkog softvera Statistica 6 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) i srednje vrednosti su poređene primenom Tukey-ovog testa na nivou značajnosti od 5% ( $P < 0.05$ ). Za grafički prikaz podataka korišćen je softver Sigma Plot 12 (Systat Software Inc., Erkrath, Germany).

## 4 Rezultati

### 4.1 Interakcija Fe i Si u ishrani krastavca

Dodavanje Si u hranljivi rastvor uspešno je eliminisalo pojavu simptoma nedostatka Fe (hloroza mlađih listova) kod biljaka gajenih u prekulturi tokom sedam dana u hranljivom rastvoru bez Si sa  $1 \mu\text{M Fe}^{\text{III}}\text{EDTA}$ , a zatim još sedam dana u hranljivom rastvoru bez Fe (Slika 6.). Nasuprot, biljke gajene bez Si postale su izrazito hlorotične (Slika 6a), dok su se na korenu mogle uočiti specifične morfološke promene kao što je formiranje lateralnih korenova (Slika 6b).



**Slika 6.** Uticaj ishrane Si na vizuelne simptome nedostatka Fe kod krastavca. Biljke stare dve nedelje (a); morfološke promene na korenu (b).

Kako bi se dodatno potvrdila uloga Si u ublažavanju stresa izazvanog deficitom Fe, izmeren je relativan sadržaj hlorofila izražen SPAD-indeksom, izmerena je suva biomasa korena i nadzemnog dela, kao i koncentracija Fe u listu (Tabela 3.). Za razliku od biljaka adekvatno snabdevenih Fe (+Fe), gde Si nije uticao ni na jedan od ispitivanih parametara, kod biljaka sa nedostatkom Fe (-Fe) Si je doveo do značajnog povećanja pomenutih parametara. Tako su SPAD očitavanja kod mladih listova biljaka tretiranih Si (+Si) bila tri puta veća nego kod biljaka gajenih bez Si (-Si). U skladu sa tim, i koncentracija Fe u listovima +Si biljaka bila je preko 50% veća nego kod -Si biljaka. Ishrana Si je takođe stimulisala rastenje -Si biljaka, što je zabeleženo značajnim povećanjem suve biomase korena i nadzemnog dela biljaka. Međutim, hlorofil, koncentracija Fe u listu i biomasa nadzemnog dela -Fe/+Si biljaka su pokazali značajno niže vrednosti od biljaka adekvatno snabdevenih Fe (+Fe), nezavisno od dodatka Si. Sa druge strane, ishrana Fe nije uticala na koncentraciju Si u listu, koja je zavisila isključivo od dodavanja Si u hranljivi rastvor (Tabela 3.).

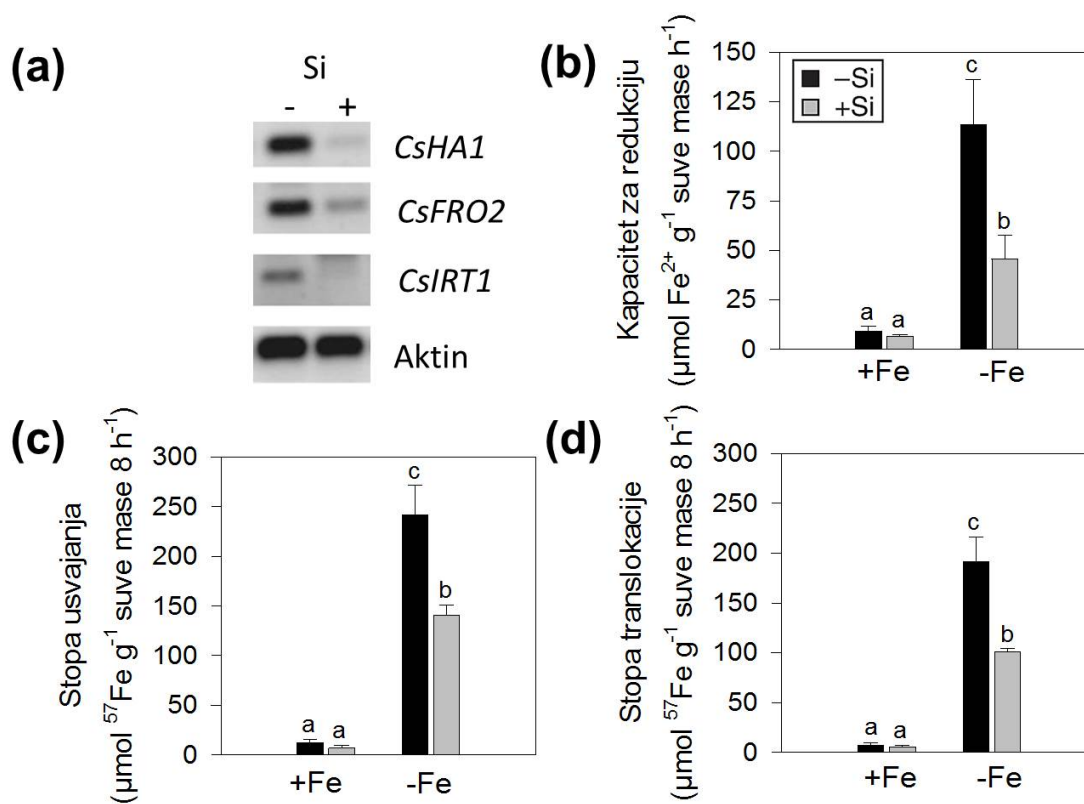
**Tabela 3.** Interakcija između ishrane Fe i Si kod krastavca

Tretmani	Si	Hlorofil (SPAD- jedinice)	Suva biomasa (mg po biljci)		Koncentracija Fe u listu ( $\mu\text{g g}^{-1}$ suve mase)	Koncentracija Si u listu (% suve mase)
			Koren	Nadzemni deo		
+Fe	-	37.6±2.1 <sup>c</sup>	41.7±17.6 <sup>c</sup>	296.3±94.3 <sup>c</sup>	88.2±19.1 <sup>c</sup>	0.36±0.05 <sup>a</sup>
	+	36.5±1.5 <sup>c</sup>	41.6±11.5 <sup>c</sup>	362.7±82.6 <sup>c</sup>	97.7±28.9 <sup>c</sup>	1.40±0.11 <sup>b</sup>
-Fe	-	8.7±1.3 <sup>a</sup>	12.3±5.4 <sup>a</sup>	119.8±46.9 <sup>a</sup>	19.4±3.7 <sup>a</sup>	0.37±0.08 <sup>a</sup>
	+	24.9±4.9 <sup>b</sup>	29.1±10.9 <sup>b</sup>	216.2±45.2 <sup>b</sup>	48.1± 5.0 <sup>b</sup>	1.57±0.23 <sup>b</sup>

Rezultati predstavljaju srednje vrednosti 4 ponavljanja ± SD. Statistički značajne razlike između efekta različitih tretmana označene su različitim malim slovima na osnovu Tukey-ovog testa,  $p < 0.05$ .

## 4.2 Uticaj Si na komponente mašinerije za usvajanje Fe biljaka strategije I

Ekspresija gena uključenih u usvajanje Fe kod krastavca (*FRO2*, *IRT1*, *HAI*) kod biljaka sa nedostatkom Fe tretiranih Si pokazala je sličan obrazac ekspresije kao kod biljaka adekvatno snabdevenih Fe, dok je u odsustvu Si ekspresija sva tri navedena gena bila značajno povećana (Slika 7a).



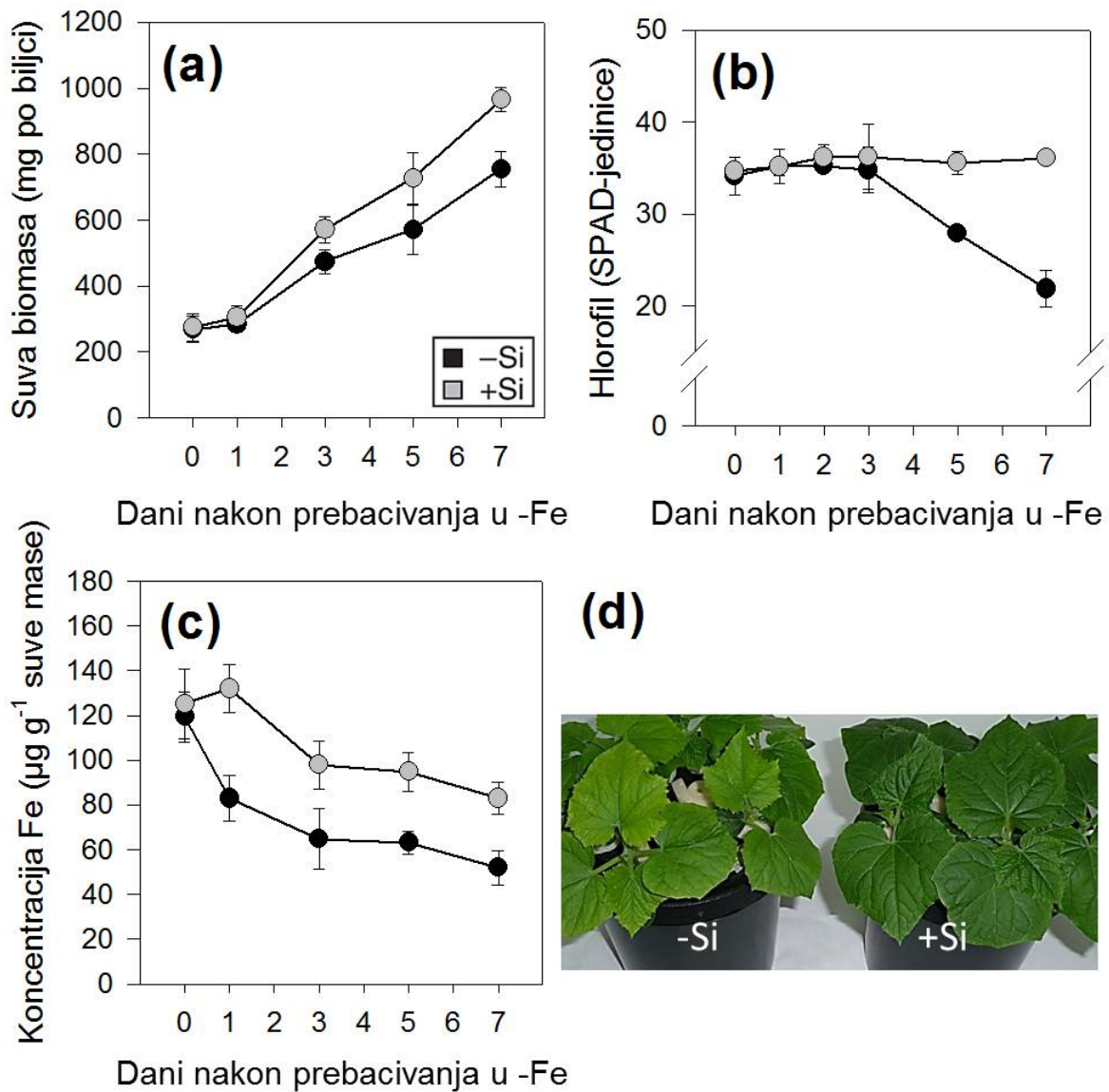
**Slika 7.** Uticaj ishrane Fe i Si na komponente uključene u usvajanje Fe i njegovu translokaciju iz korena u nadzemni deo kod krastavca. Ekspresija *HAI*, *FRO2* i *IRT1* (a); kapacitet za redukciju  $\text{Fe}^{\text{III}}$  helata (b); usvajanje (c) i translokacija  $^{57}\text{Fe}$  iz korena u nadzemni deo (d) krastavca. Amplifikacija aktina je prikazana kao kontrola. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti 4 ponavljanja  $\pm$  SD. Statistički značajne razlike između efekta različitih tretmana označene su različitim malim slovima na osnovu Tukey-ovog testa,  $p < 0.05$ .

Ove promene u nivou ekspresije *FRO2* i *IRT1* dovele su do povećanog kapaciteta za redukciju  $\text{Fe}^{\text{III}}$  (aktivnost *FRO2*) i pojačanog usvajanja  $^{57}\text{Fe}$  (putem *IRT1* transportera) kod biljaka gajenih u hranljivom rastvoru –Fe bez dodatka Si (Slika 7b,c). Takođe, stopa translokacije  $^{57}\text{Fe}$  iz korena u nadzemni deo bila je skoro dva puta veća u odnosu na biljke snabdevene Si (Slika 7d). Međutim, kod biljaka adekvatno snabdevenih Fe, kapacitet korena za redukciju  $\text{Fe}^{\text{III}}$  i usvajanje i translokaciju  $^{57}\text{Fe}$  ostao je veoma nizak nezavisno od ishrane Si.

### **4.3 Dinamika korisnog efekta Si na ublažavanje hloroze izazvane deficitom Fe**

Eksperimenti u vremenu sprovedeni su kako bi se istražila dinamika relevantnih fizioloških markera i dalje rasvetlili mehanizmi ublažavanja streasa nedostatka Fe posredovanog Si. Biljke su gajene u prekulturi sedam dana sa dodatkom  $10\ \mu\text{M}$  Fe, sa (+Si) ili bez (-Si) dodatka monosilicijumske kiseline, a zatim prebačene u hranljivi rastvor bez Fe (-Fe), ponovo sa ili bez dodatka Si. Biljke tretirane Si pokazale su značajno povećanje u ukupnoj biomasi na kraju eksperimenta (sedam dana –Fe tretmana, Slika 8a) i održale približno istu visoku koncentraciju hlorofila od 36 SPAD-jedinica tokom čitavog perioda nedostatka Fe (Slika 8b). Tokom prva četiri dana od ukidanja Fe iz hranljivog rastvora nisu primećene značajne razlike između Si tretmana. Međutim, petog dana mladi listovi –Si biljaka počeli su da razvijaju simptome hloroze i nakon sedam dana bez dodatka Fe ove biljke su postale vidno hlorotične, dok su + Si biljke ostale zelene (Slika 8d), što su takođe potvrdile veće vrednosti SPAD-jedinica, u odnosu na –Si biljke (Slika 8a). Shodno tome, koncentracija Fe u listu +Si biljaka je bile značajno veća nego kod –Si biljaka tokom čitavog eksperimenta (Slika 8c).

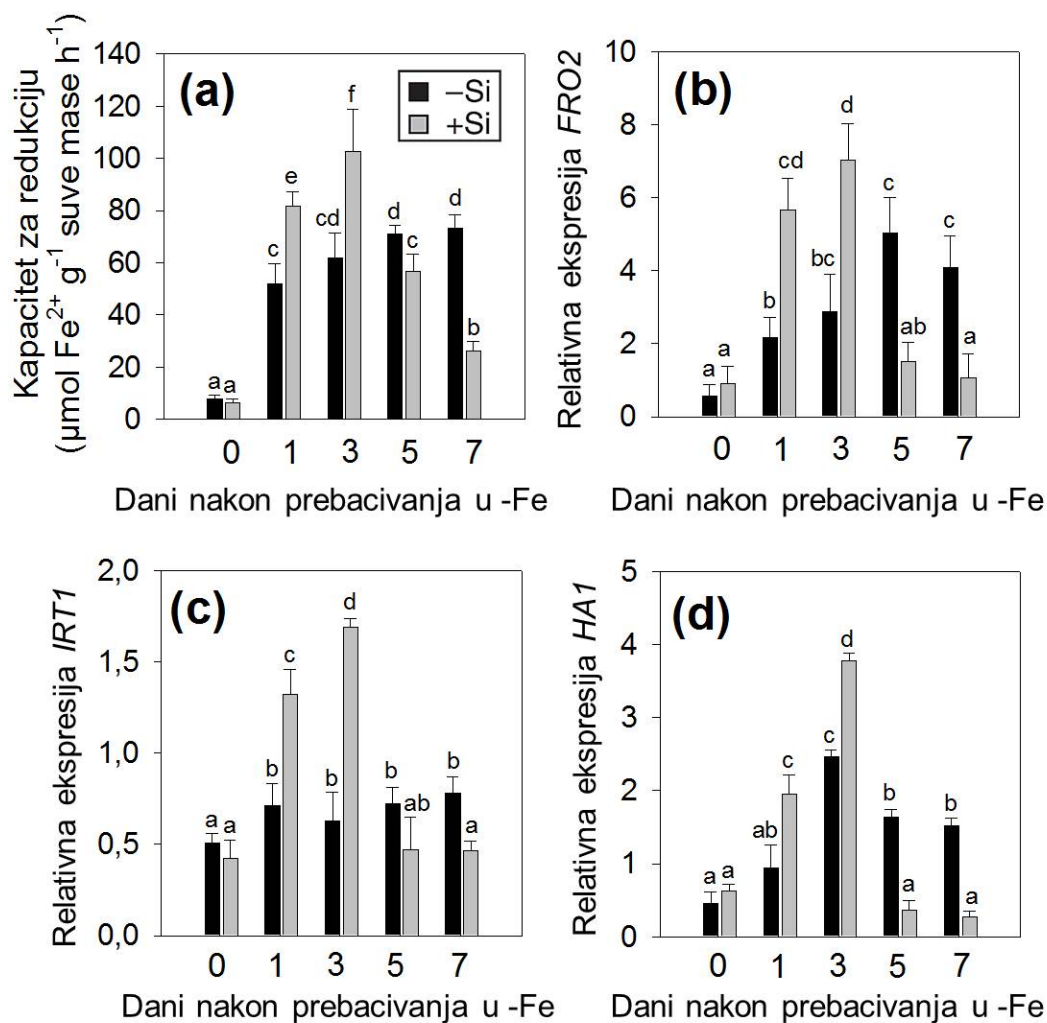




**Slika 8.** Uticaj trajanja nedostatka Fe i snabdevenosti Si na porast biljke i nutritivni status lista krastavca. Suva biomasa (koren + nadzemni deo) (a); sadržaj hlorofila (b); koncentracija Fe u listu (c). Rezultati predstavljaju srednje vrednosti 4 ponavljanja  $\pm$  SD.

#### 4.4 Uticaj Si na dinamiku ekspresije gena i aktivnosti proteina uključenih u usvajanje Fe

Tokom čitavog perioda trajanja – Fe tretmana, aktivnost  $\text{Fe}^{\text{III}}$  helatne reduktaze je značajno varirala zavisno od tretmana Si (Slika 9a).



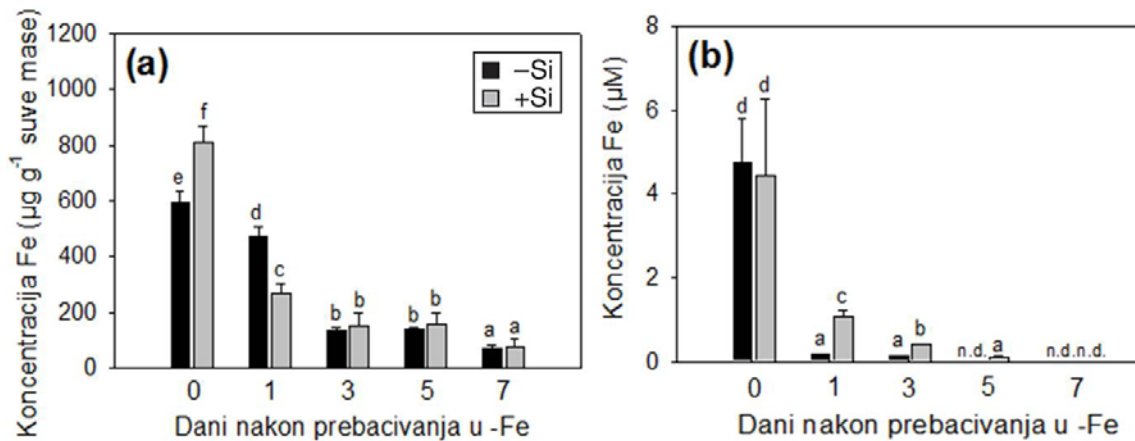
**Slika 9.** Uticaj Si na odgovor biljaka na nedostatak Fe kod krastavca tokom sedam dana nedostatka Fe. Aktivnost  $\text{Fe}^{\text{III}}$  helatne reduktaze (a); relativna ekspresija *FRO2* (b); relativna ekspresija *IRT1* (c); relativna ekspresija *HAI1* (d). Rezultati predstavljaju srednje vrednosti 4 ponavljanja  $\pm$  SD. Statistički značajne razlike između efekta različitih tretmana označene su različitim malim slovima na osnovu Tukey-ovog testa,  $p < 0.05$ .

Već prvog dana nakon isključivanja Fe iz hranljivog rastvora, aktivnost Fe<sup>III</sup> helatne reduktaze se značajno povećala, i tokom naredna tri dana postala značajno veća kod biljaka tretiranih Si nego kod onih iz –Si tretmana. Međutim, u periodu između trećeg i sedmog dana od isključivanja Fe, aktivnost Fe<sup>III</sup> helatne reduktaze se postepeno smanjivala i na kraju eksperimenta bila je skoro tri puta niža kod biljaka kojima je dodat Si u poređenju sa biljkama gajenim bez Si. Profil ekspresije *FRO2* gena u odgovoru na nedostatak Fe pokazao je visok stepen podudarnosti sa rezultatima merenja aktivnosti Fe<sup>III</sup> helatne reduktaze (Slika 9c,d). Za razliku od toga, ekspresija sva tri ispitivana gena bila je smanjena između trećeg i sedmog dana kod biljaka snabdevenih Si.

### **4.5 Uticaj Si na iskorišćavanje Fe iz apoplasta korena i njegovu translokaciju putem ksilema u nadzemne delove biljke**

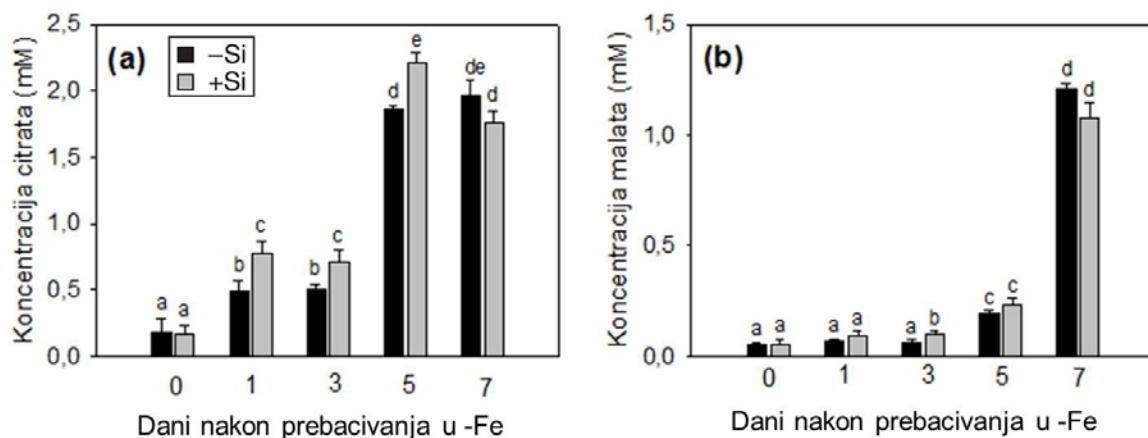
Koncentracija Fe u apoplastu korena postepeno se smanjivala tokom –Fe tretmana bez obzira na ishranu Si (Slika 10a). Interesantno, dodatak Si u hranljivi rastvor tokom prekulture doveo je do povećanja koncentracije Fe u apoplastu korena (dan 0, Slika 10a). Nakon prvog dana od nastupanja deficita Fe, kontinuirano snabdevanje Si je značajno smanjilo koncentracije Fe u apoplastu korena (Slika 10a), dok su koncentracije Fe izmerene u ksilemskom soku bile izrazito veće u +Si tretmanu nego u –Si tretmanu (Slika 10b).

Koncentracija citrata u ksilemskom soku se značajno povećala nakon prvog dana uskraćivanja Fe, i dostigla je najveću vrednost kod biljaka tretiranih Si petog dana od ukidanja Fe (Slika 11a). Na kraju eksperimenta (sedam dana nakon ukidanja Fe), koncentracija citrata u ksilemu se značajno smanjila kod +Si biljaka, dok su se visoke vrednosti održale u ksilemskom soku –Si biljaka. Koncentracija malata je ostala na relativno niskom nivou tokom prvih pet dana –Fe tretmana, ali se drastično povećala na kraju eksperimenta, najizraženije kod –Si biljaka (Slika 11b).

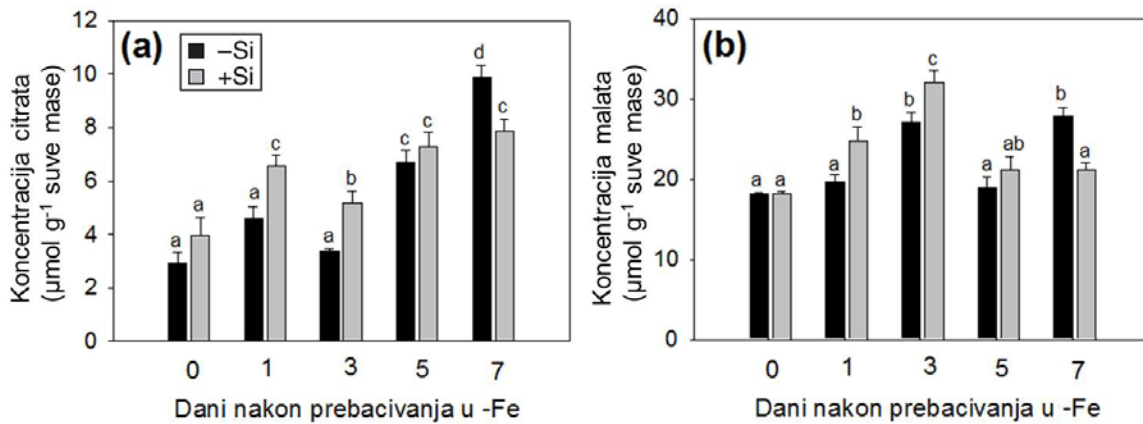


**Slika 10.** Uticaj trajanja nedostatka Fe i snabdevenosti Si na koncentracije Fe u apoplastu korena (a) i ksilemskom soku (b) krastavca. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti 4 ponavljanja  $\pm$  SD. Statistički značajne razlike između efekta različitih tretmana označene su različitim malim slovima na osnovu Tukey-ovog testa,  $p < 0.05$ . n.d., nije detektovano.

Dodavanje Si je takođe uticalo na povećanje koncentracija malata i citrata (helatora  $\text{Fe}^{3+}$ ) u vrhovima korena u odgovoru na nedostatak Fe (Slika 12a,b). Koncentracije obe organske kiseline su bile značajno veće kod +Si biljaka tokom pet dana -Fe tretmana, dok su na kraju eksperimenta bile ispod koncentracija zabeleženih kod -Si biljaka.



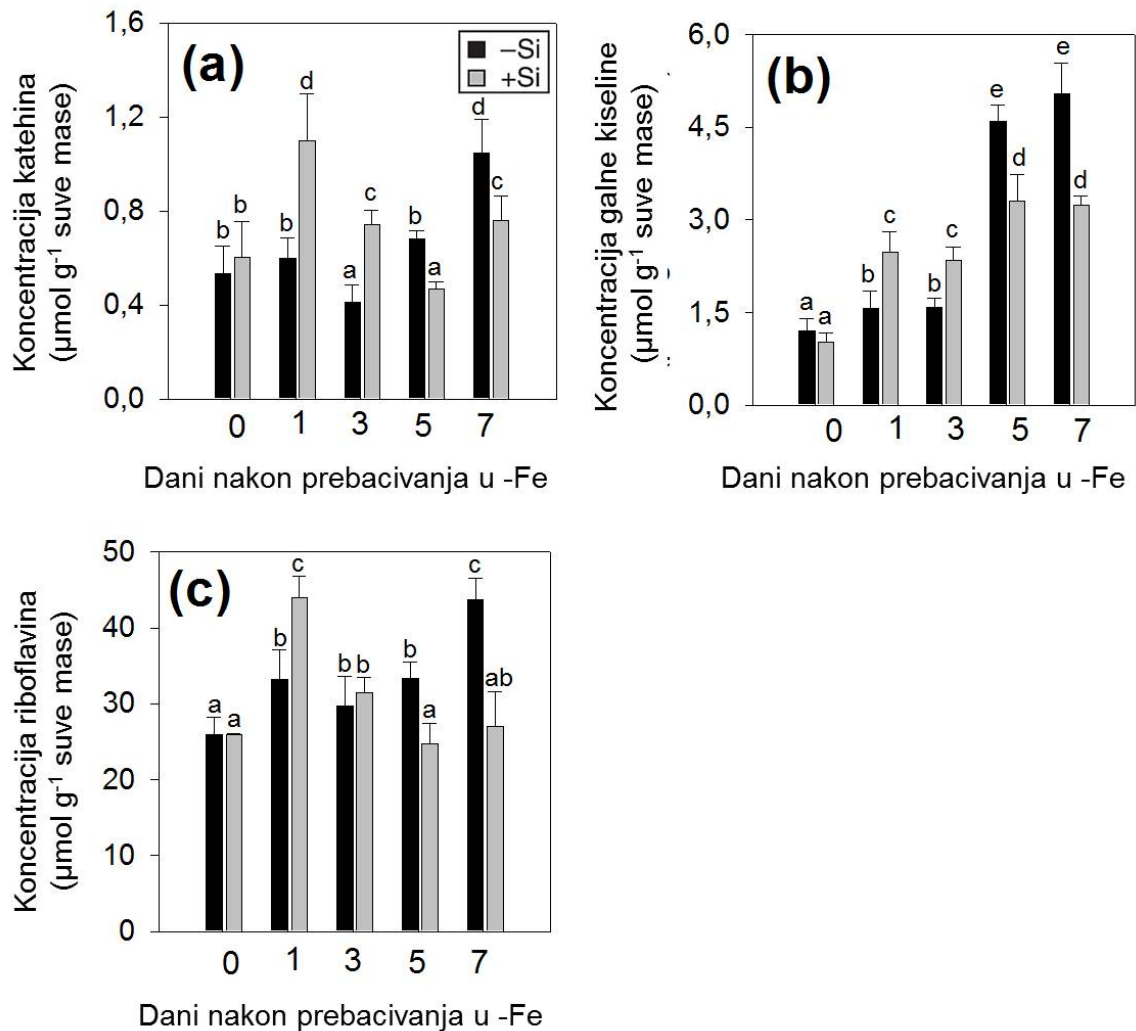
**Slika 11.** Uticaj trajanja nedostatka Fe i snabdevenosti Si na koncentracije citrata (a) i malata (b) u ksilemskom soku krastavca. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti 4 ponavljanja  $\pm$  SD. Statistički značajne razlike između efekta različitih tretmana označene su različitim malim slovima na osnovu Tukey-ovog testa,  $p < 0.05$ .



**Slika 12.** Uticaj trajanja nedostatka Fe i snabdevenosti Si na koncentracije citrata (a) i malata (b) u apikalnom tkivu korena krastavca. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti 4 ponavljanja  $\pm$  SD. Statistički značajne razlike između efekta različitih tretmana označene su različitim malim slovima na osnovu Tukey-ovog testa,  $p < 0.05$

#### 4.6 Uticaj Si na akumulaciju Fe-mobilizirajućih/redukujućih jedinjenja i ekspresiju gena ključnih za njihovu biosintezu u korenu

Konzentracija katehina (prikazani kao suma katehina i epikatehina) i galne kiseline se postepeno povećavala u tkivu korena -Si biljaka tokom eksperimenta (Slika 13a,b). Međutim, u periodu od trećeg do petog dana deficita Fe, detektovane su značajno veće koncentracije oba fenolna jedinjenja u tkivu korena biljaka snabdevanih Si. Na kraju eksperimenta (sedam dana nakon ukidanja Fe), koncentracija katehina i galne kiseline kod +Si biljaka bila je ispod vrednosti izmerenih kod -Si biljaka. Koncentracija riboflavina u tkivu korena biljaka tretiranih Si značajno se povećala tokom prvog dana po ukidanju Fe, a potom je postepeno opadala (Slika 13c). Ova vremenska dinamika bila je u suprotnosti sa onom kod -Si biljaka kod kojih se koncentracija riboflavina u korenu postepeno povećavala da bi na kraju dostigla vrednost  $> 1.5$  puta veću nego na početku -Fe tretmana.

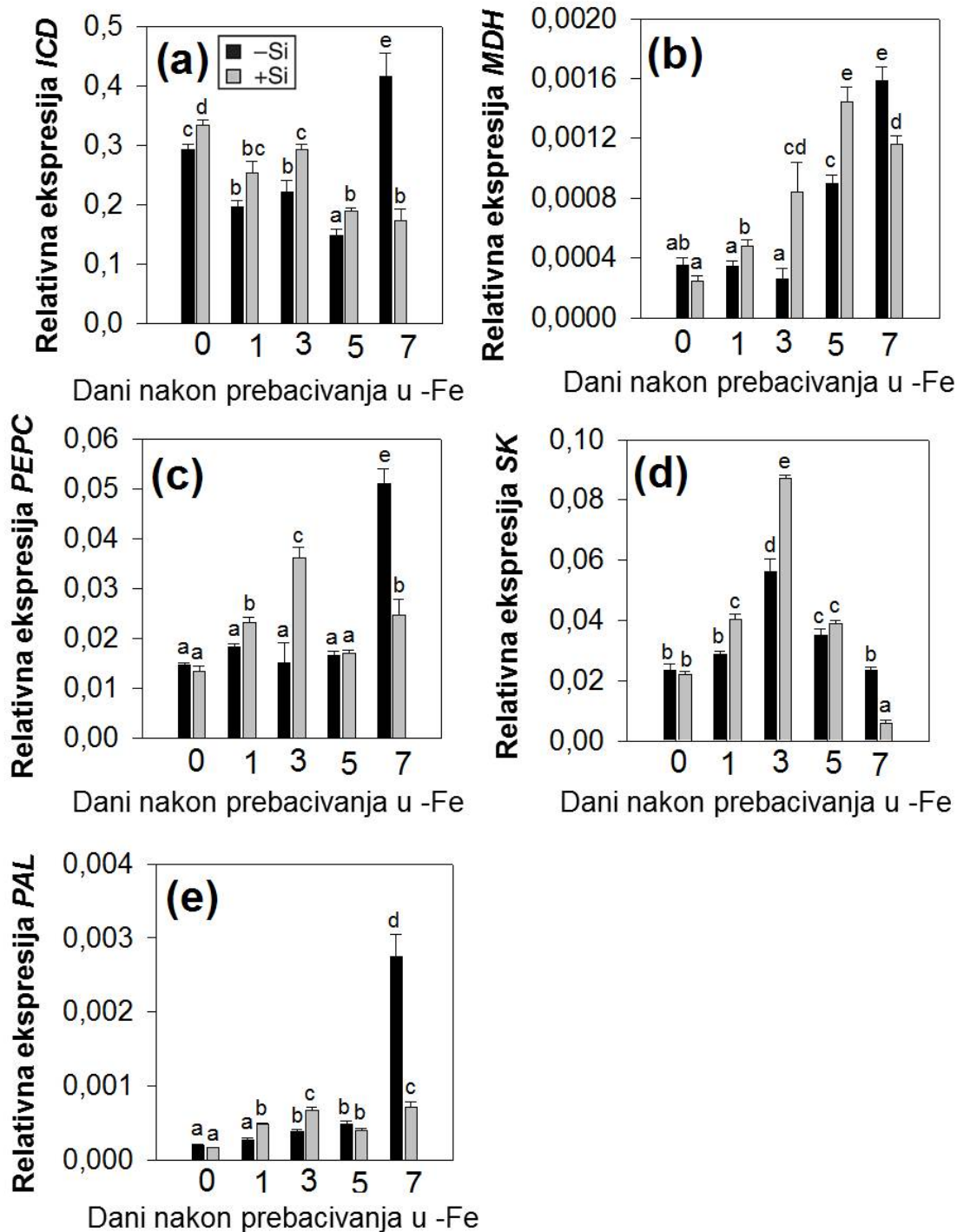


**Slika 13.** Dinamika akumulacije Fe<sup>III</sup>-mobilizirajućih/redukujućih jedinjenja u apikalnom tkivu korena krastavca u odnosu na trajanje nedostatka Fe i snabdevenost Si. Katehin + epikatehin (a); galna kiselina (b); riboflavin (c). Rezultati predstavljaju srednje vrednosti 4 ponavljanja ± SD. Statistički značajne razlike između efekta različitih tretmana označene su različitim malim slovima na osnovu Tukey-ovog testa,  $p < 0.05$ .

Uticaj trajanja nedostatka Fe i tretmana Si je ispitan kroz praćenje promena u relativnoj ekspresiji: dva gena vezana za Krebsov ciklus, *ICD* i *MDH* (kodira izocitrat dehidrogenazu, odnosno malat dehidrogenazu); *PEPC* (kodira fosfoenolpiruvat karboksilazu), *SK* (kodira šikimat kinazu; šikimatni put) i *PAL* (kodira fenilalanin amonijumliazu; fenilpropanoidni put) u korenu krastavca (Slika 14.). Dodavanje Si je

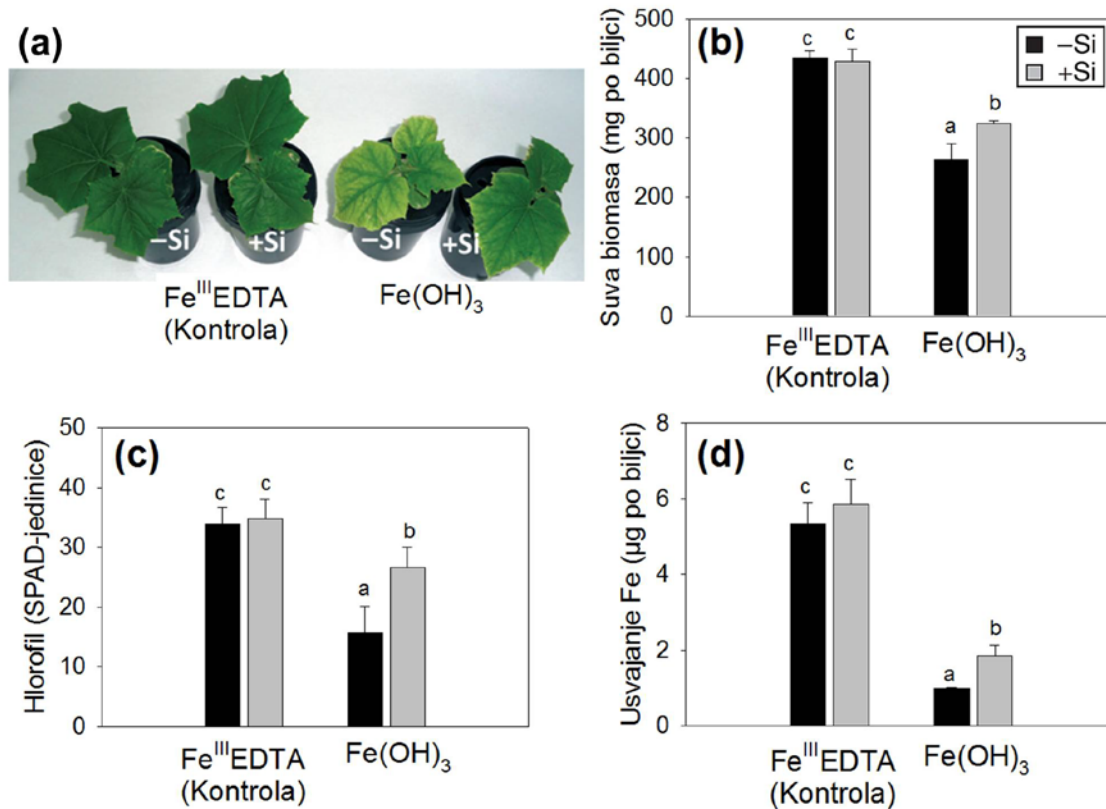
pruzrokovalo značajno povećanje nivoa ekspresije *MDH*, *PEPC* i *SK* na početku –Fe tretmana (Slika 14b–d). Na kraju ekperimentalnog perioda u trajanju od sedam dana zastupljenost transkripata svih ispitivanih gena je smanjena kod +Si biljaka, i bila je značajno niža nego kod –Si biljaka. Nasuprot tome, primećeno je značajno povećanje zastupljenosti transkripata *ICD*, *MDH*, *PEPC* i *PAL* kod –Si biljaka u ovom stadijumu (Slika 14a–d), dok je ekspresija *SK* opala (Slika 14e).

Dodatno, efekat akumulacije Fe-mobilizirajućih jedinjenja u apoplastu korena/rizosferi indukovano ishranom Si dalje je ispitan sprovođenjem eksperimenta sa slabo rastvorljivim  $\text{Fe}^{\text{III}}$  hidroksidom, koji biljke strategije I ne mogu da koriste kao direktan izvor Fe (Slika 15.). Biljke gajene u hranljivom rastvoru sa  $\text{Fe}^{\text{III}}$  hidroksidom koje nisu tretirane Si postale su hlorotične, i u skladu sa tim usvojile su malu količinu Fe tokom 10 dana tretmana Fe (Slika 15a,b). Snabdevanje biljaka Si značajno je povećalo ukupnu suhu biomasu i sadržaj hlorofila u listu i ukupnu količinu usvojenog Fe biljaka krastavca podvrgnutih tretmanu  $\text{Fe}^{\text{III}}$  hidroksidom (Slika 15b-d).



**Slika 14.** Uticaj dužine trajanja nedostatka Fe i snabdevenosti Si na relativnu ekspresiju određenih gena uključenih u biosintetske puteve karboksilata i fenola u tkivu korena krastavca. *ICD* (a); *MDH* (b); *PEPC* (c); *SK* (d); *PAL* (e). Rezultati predstavljaju srednje vrednosti 4 ponavljanja  $\pm$  SD. Statistički značajne razlike između efekta različitih tretmana označene su različitim malim slovima na osnovu Tukey-ovog testa,  $p < 0.05$ .



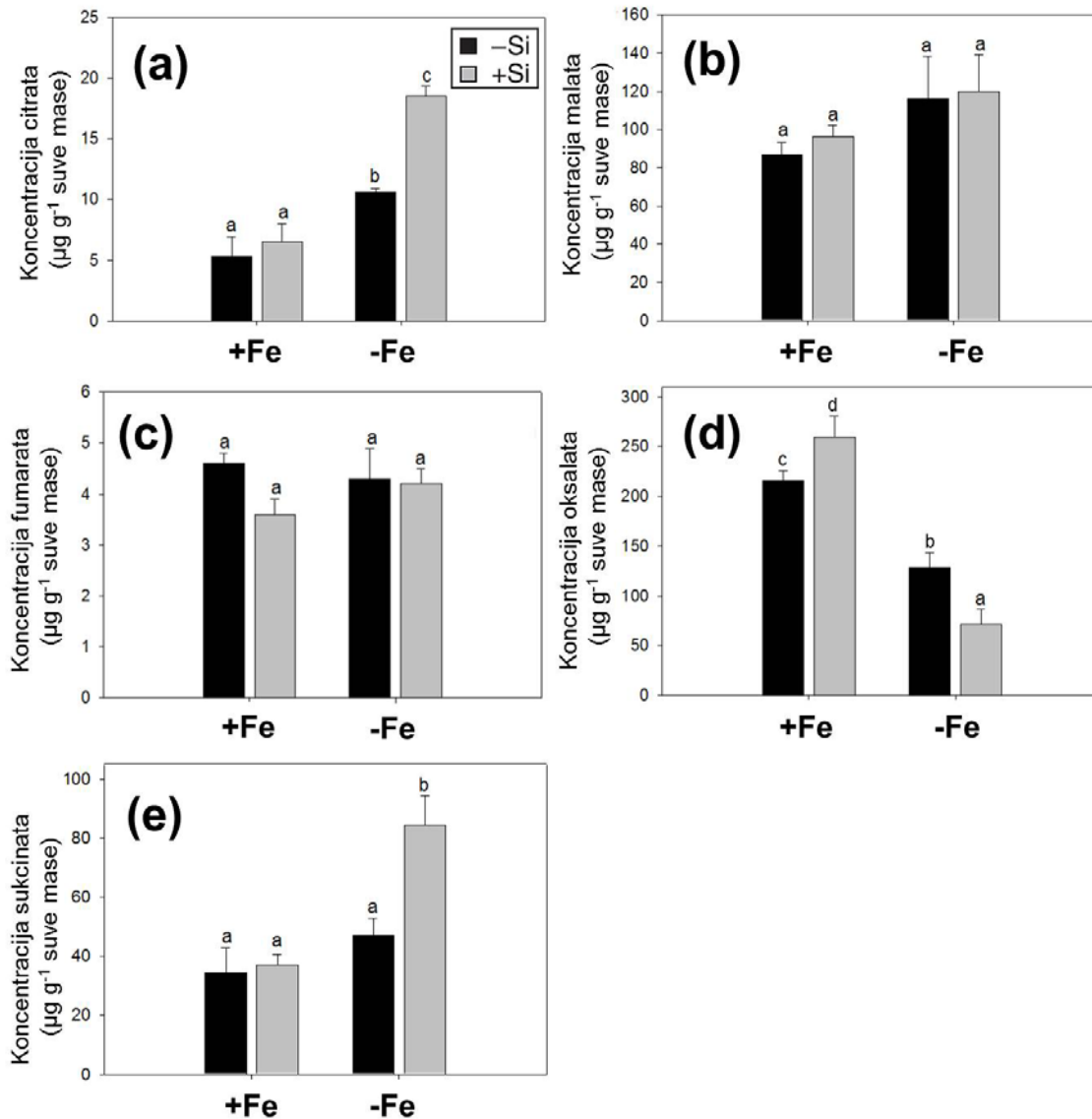


**Slika 15.** Uticaj ishrane Si na iskorišćavanje Fe iz slabo rastvorljivog Fe<sup>III</sup> hidroksida od strane krastavca. Biljke na kraju eksperimenta (10 dana tretmana Fe) (a); suva biomasa koren + nadzemni deo (b); sadržaj hlorofila (c); usvajanje Fe (d). Rezultati predstavljaju srednje vrednosti 4 ponavljanja ± SD. Statistički značajne razlike između efekta različitih tretmana označene su različitim malim slovima na osnovu Tukey-ovog testa,  $p < 0.05$ .

## 4.7 Uticaj Si na akumulaciju organskih kiselina u listu krastavca

Koncentracija citrata se značajno povećala u listovima biljaka koje su patile od nedostatka Fe, i bila je veća kod biljaka tretiranih Si (Slika 16a). Međutim, koncentracija malata i fumarata nije značajno varirala u zavisnosti od Fe ni Si tretmana (Slika 16b-c), iako se mogla uočiti tendencija porasta koncentracije malata kod biljaka podvrgnutih deficitu Fe, nezavisno od dodavanja Si (Slika 16b). Interesantno, nedostatak Fe je doveo do

drastičnog smanjenja u akumulaciji oksalata u listovima krastavca u odnosu na biljke normalno snabdevene Fe, dok je dodavanje Si kod +Fe biljaka dovelo do značajnog povećanja, a kod -Fe biljaka do značajnog smanjenja u odnosu na -Si tretman (Slika 16d).



**Slika 16.** Uticaj ishrane Si na koncentracije organskih kiselina u listovima krastavca kod biljaka normalno snabdevenih Fe (+Fe) i biljaka podvrgnutih nedostatku Fe (-Fe). Koncentracija citrata (a); koncentracija malata (b); koncentracija fumarata (c); koncentracija oksalata (d); koncentracija sukcinata (e). Rezultati predstavljaju srednje vrednosti 4 ponavljanja  $\pm$  SD. Statistički značajne razlike između efekta različitih tretmana označene su različitim malim slovima na osnovu Tukey-ovog testa,  $p < 0.05$ .

Tretman biljaka Si snažno je indukovao akumulaciju sukcinata kod –Fe, gde su izmerene dva puta veće vrednosti koncentracije u odnosu na –Si tretman. Međutim, Si nije imao nikakvog efekta na koncentracije sukcinata kod biljaka sa normalnim statusom Fe.

## 4.8 Uticaj Si na retranslokaciju Fe kod krastavca

### 4.8.1 Uticaj eksperimentalnih uslova na rastenje biljaka i mobilnost Fe tokom trajanja eksperimenta

Radi proučavanja uticaja Si na mobilnost Fe u listovima, sproveden je eksperiment sa biljkama krastavca gajenim u uslovima nedostatka Fe u prekulturni i koje su u kraćem vremenskom periodu (tri dana) bile u kontaktu sa Fe (obogaćenim stabilnim izotopom  $^{57}\text{Fe}$  ili izotopima, koji su normalno zastupljeni u prirodi, gde preovlađuje  $^{56}\text{Fe}$ ), a zatim prebačene u hranljivi rastvor bez Fe, bez ili sa dodatkom Si tokom 11 dana (Materijal i metode, Slika 5.). Koncentracija Si u listovima biljaka tretiranih Si je bila šest puta veća nego kod biljaka gajenih bez Si (Tabela 4.). Dodavanje Si nije uticalo na suhu biomasu korena i stabla, ali je snažno stimulisalo rast listova dovodeći do čak 30% povećanja ukupne suve biomase kod biljaka tretiranih Si (Tabela 5.). Puferovanje pH hranljivog rastvora iznad 7.0  $\text{CaCO}_3$  značajno je smanjilo mobilizaciju Fe iz apoplasta korena (Tabela 6.), stoga je ukupni sadržaj Fe u apoplastu korena po završetku eksperimenta ostao na istom nivou kod tretiranih i kod netretiranih biljaka Si (Tabela 7.).

**Tabela 4.** Koncentracije Si u različitim tkivima krastavca.

Treatment	Koncentracija Si ( $\text{mg g}^{-1}$ suve mase)		
	Koren	Stablo	Listovi
–Si	4.0±0.5 <sup>a</sup>	7.5±1.5 <sup>a</sup>	3.4±0.2 <sup>a</sup>
+Si	5.9±0.8 <sup>b</sup>	12.0±1.4 <sup>b</sup>	21.5±1.8 <sup>b</sup>

Rezultati predstavljaju srednje vrednosti 4 ponavljanja ± SD. Statistički značajne razlike između efekta različitih tretmana označene su različitim malim slovima na osnovu Tukey-ovog testa,  $p < 0.05$ .

**Tabela 5.** Uticaj Si na suhu biomasu krastavca.

Treatment	Dry biomass (g per plant)			
	Root	Stem	Leaves	Total
-Si	0.52±0.04 <sup>a</sup>	0.9±0.1 <sup>a</sup>	2.2±0.2 <sup>a</sup>	3.6±0.1 <sup>a</sup>
+Si	0.58±0.07 <sup>a</sup>	1.0±0.2 <sup>a</sup>	3.2±0.1 <sup>b</sup>	4.8±0.1 <sup>b</sup>

Rezultati predstavljaju srednje vrednosti 4 ponavljanja ± SD. Statistički značajne razlike između efekta različitih tretmana označene su različitim malim slovima na osnovu Tukey-ovog testa, p<0.05.

**Table 6.** Uticaj pH vrednosti hranljivog rastvora (-/+CaCO<sub>3</sub>) na količinu Fe uklonjenu iz apoplasta korena krastavca tokom celog eksperimenta.

Tretman Si	Količina Fe (µg po biljci)		Relativno smanjenje (%)
	-CaCO <sub>3</sub> (pH 5.0)	+CaCO <sub>3</sub> (pH 7.0)	
-Si	66.2±6.7 <sup>b</sup>	11.7±2.1 <sup>a</sup>	92
+Si	87.8±6.7 <sup>c</sup>	17.0±2.3 <sup>a</sup>	81

Rezultati predstavljaju srednje vrednosti 4 ponavljanja ± SD. Statistički značajne razlike između efekta različitih tretmana označene su različitim malim slovima na osnovu Tukey-ovog testa, p<0.05.

**Tabela 7.** Uticaj Si na sadržaj Fe u različitim tkivima krastavca.

Tretman	Sadržaj Fe (µg po biljci)			
	Koren		Stablo	Listovi
	Apoplast	Simplast		
-Si	103±11 <sup>a</sup>	14±2 <sup>a</sup>	28±3 <sup>a</sup>	141±16 <sup>a</sup>
+Si	92±16 <sup>a</sup>	17±3 <sup>a</sup>	31±5 <sup>a</sup>	150±13 <sup>a</sup>

Rezultati predstavljaju srednje vrednosti 4 ponavljanja ± SD. Statistički značajne razlike između efekta različitih tretmana označene su različitim malim slovima na osnovu Tukey-ovog testa, p<0.05.

Štaviše, koncentracija Fe u ksilemskom soku je bila jako niska tokom prva dva dana od isključivanja Fe iz hranljivog rastvora, dok u preostalom periodu trajanja eksperimenta Fe nije detektovano u ksilemskom soku krastavca (Tabela 8.). Dodavanje  $\text{CaCO}_3$  nije *per se* imalo negativan efekat na rastenje biljaka, koji je bilo inhibirano isključivo deficitom Fe, ali značajno manje kod biljaka tretiranih Si (Tabela 9.)

**Tabela 8.** Koncentracija Fe u ksilemskom soku krastavca nakon ukidanja Fe iz hranljivog rastvora.

Dan nakon prebacivanja u -Fe	Koncentracija Fe u ksilemskom soku ( $\mu\text{M}$ )	
	-Si	+Si
1	$0.07 \pm 0.02^b$	$0.18 \pm 0.04^b$
2	$0.01 \pm 0.00^a$	$0.03 \pm 0.01^a$
5	n.d.	n.d.
10	n.d.	n.d.

Rezultati predstavljaju srednje vrednosti 4 ponavljanja  $\pm$  SD. Statistički značajne razlike između efekta različitih tretmana označene su različitim malim slovima na osnovu Tukey-ovog testa,  $p < 0.05$ . n.d. nije detektovano.

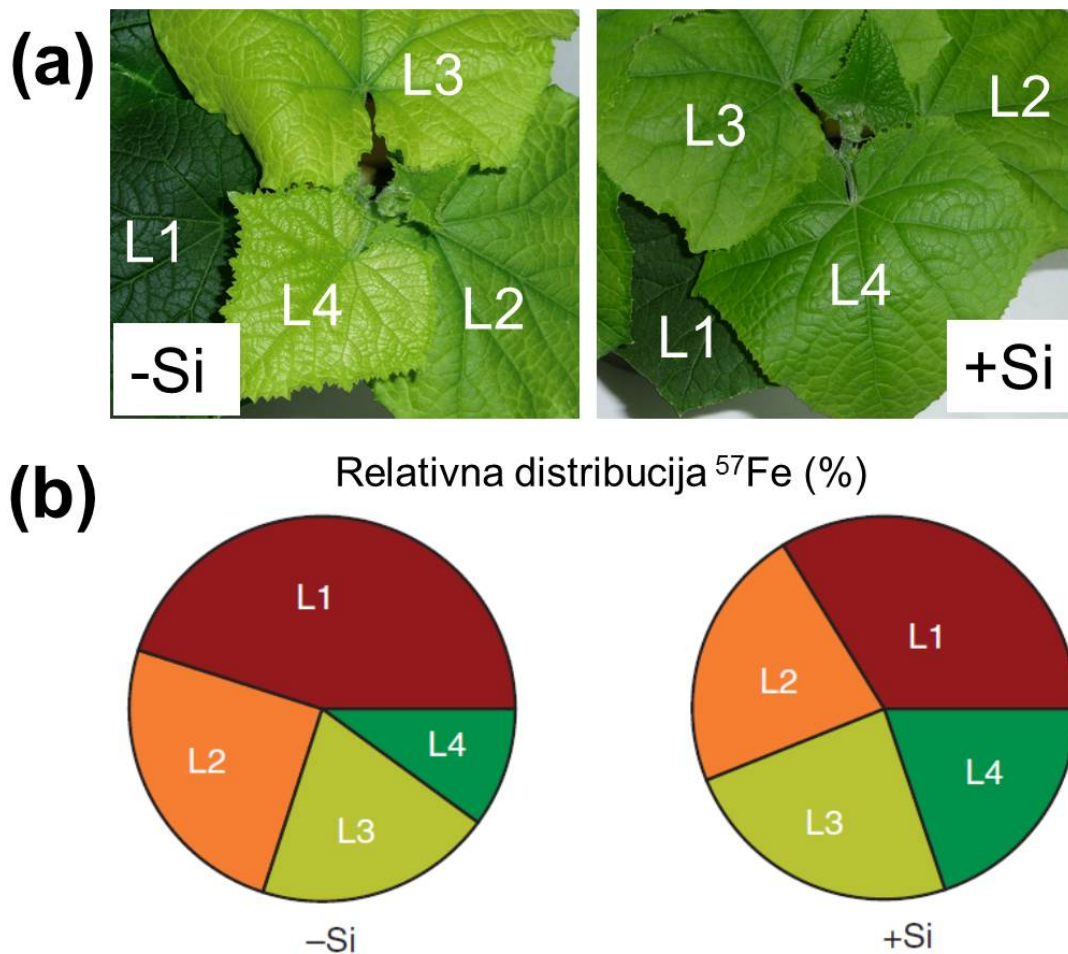
**Tabela 9.** Suva biomasa biljaka gajenih u hranljivom rastvoru sa dodatkom  $\text{CaCO}_3$ .

Treatment	Suva biomasa (g po biljci)			
	Koren		Nadzemni deo	
	-Si	+Si	-Si	+Si
Kontrola (+Fe)	$1.05 \pm 0.09^b$	$1.33 \pm 0.26^b$	$4.5 \pm 0.7^d$	$4.5 \pm 0.8^d$
-Fe	$0.52 \pm 0.04^a$	$0.58 \pm 0.07^a$	$3.0 \pm 0.3^c$	$4.3 \pm 0.2^d$

Rezultati predstavljaju srednje vrednosti 4 ponavljanja  $\pm$  SD. Statistički značajne razlike između efekta različitih tretmana označene su različitim malim slovima na osnovu Tukey-ovog testa,  $p < 0.05$ .

#### 4.8.2 Uticaj Si na remobilizaciju Fe iz starijih u mlade listove

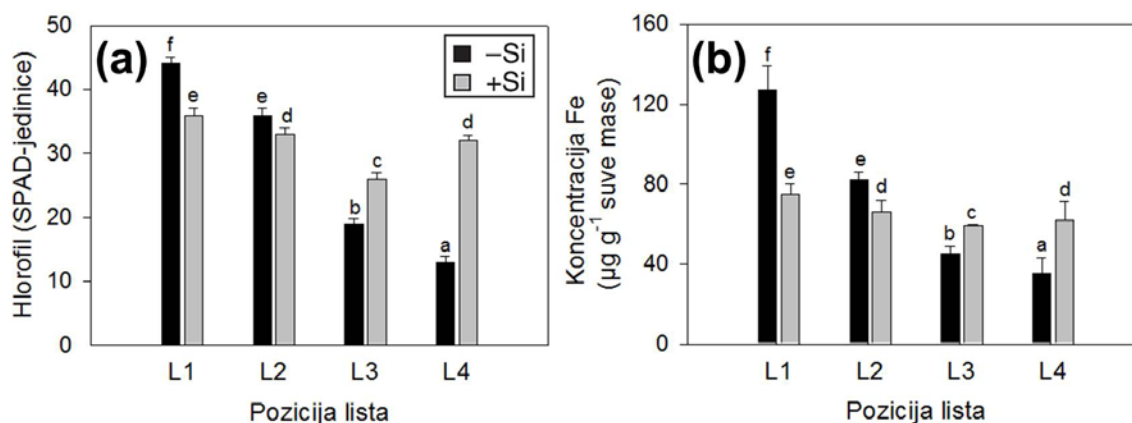
Iako nisu postojale značajne razlike u vrednostima ukupnog sadržaja Fe između Si tretmana izmerenim u simplastu korena, stablu i listovima (Tabela 7), dodavanje Si je uspešno sprečilo pojavu simptoma Fe hloroze na mladim listovima u preiodu od 11 dana nedostatka Fe (Slika 17a).



**Slika 17.** Uticaj Si na redistribuciju  $^{57}\text{Fe}$  u listovima krastavca nakon 11 dana od ukidanja  $^{57}\text{Fe}$  iz hranljivog rastvora. Biljke krastavca na kraju eksperimenta (a); relativna distribucija  $^{57}\text{Fe}$ . Pozicije listova (od najstarijeg do najmlađeg lista): L1, L2, L3 i L4. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti 4 ponavljanja  $\pm$  SD.

Za razliku od toga, biljke gajene u odsustvu Si razvile su hlorotične listove nakon ukidanja Fe iz hranljivog rastvora. Očitavanja SPAD-vrednosti na mladim listovima na L3 i L4 poziciji (za pozicije listova, videti Sliku 18a i Materijal i metode, Slika 5.) biljaka tretiranih Si bila su značajno veća nego na listovima na istoj poziciji biljka gajenih bez Si (Slika 18a). Međutim, sadržaj hlorofila u starijim listovima na pozicijama L1 i L2 bio je značajno manji u poređenju sa –Si biljkama.

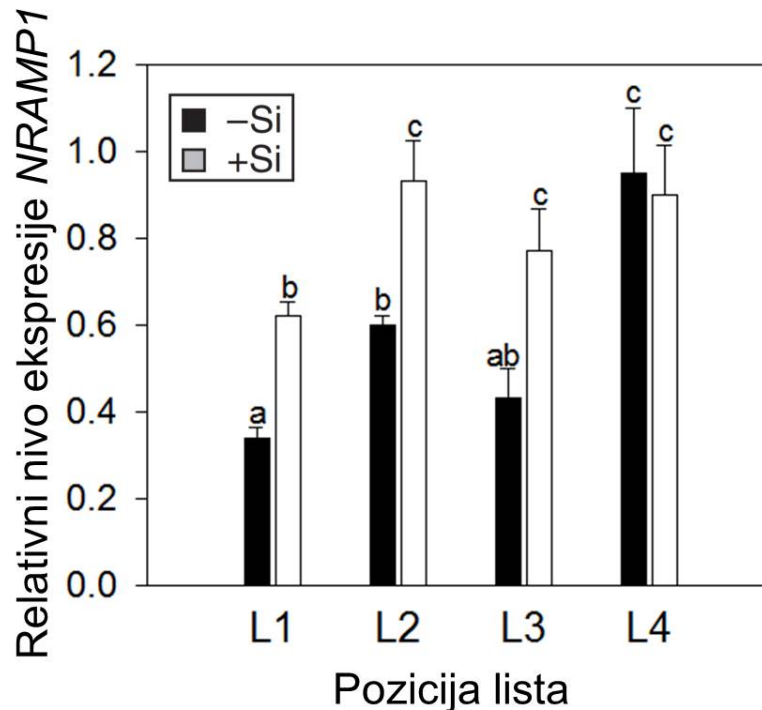
Koncentracija Fe u mladim listovima (L4) biljaka tretiranih Si je bila oko dva puta veća nego kod netretiranih biljaka, dok je u starijim listovima (L1) bila značajno manja (Slika 18b). Ishrana Si je, dakle, povećala remobilizaciju Fe iz starijih u malde, nepotpuno razvijene listove, što je dalje potvrđeno u eksperimentu sa obeleženim  $^{57}\text{Fe}$ . Iako je ukupni sadržaj Fe u nadzemnom delu ostao isti i kod –Si i +Si biljaka (Tabela 7.), dodavanje Si je uticalo na relativnu distribuciju  $^{57}\text{Fe}$  u listovima (Slika 17b). Kod biljaka gajenih bez Si, približno 50% od ukupnog sadržaja  $^{57}\text{Fe}$  ostalo je u najstarijem listu (L1), dok se kod biljaka tretiranih Si mogla uočiti skoro jednaka distribucija  $^{57}\text{Fe}$  između listova na različitim pozicijama, što je dovelo do ublažavanja simptoma deficita Fe (Slika 17a).



**Slika 18.** Uticaj Si na sadržaj hlorofila (a) i koncentraciju Fe (b) u listovima krastavca na različitim pozicijama. Pozicije listova (od najstarijeg do najmlađeg lista): L1, L2, L3 i L4. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti 4 ponavljanja  $\pm$  SD. Statistički značajne razlike između efekta različitih tretmana označene su različitim malim slovima na osnovu Tukey-ovog testa,  $p < 0.05$ .

### 4.8.3 Uticaj Si na ekspresiju *NRAMP1* gena u listovima

Snabdevanje biljaka Si snažno je indukovalo ekspresije *NRAMP1* gena u starijim (L1, L2) i mlađim (L3, potpuno razvijen) listovima, međutim nisu uočene značajne razlike između tretmana u nivoima ekspresije u najmlađem nepotpuno razvijenom listu (L4) (Slika 19.).

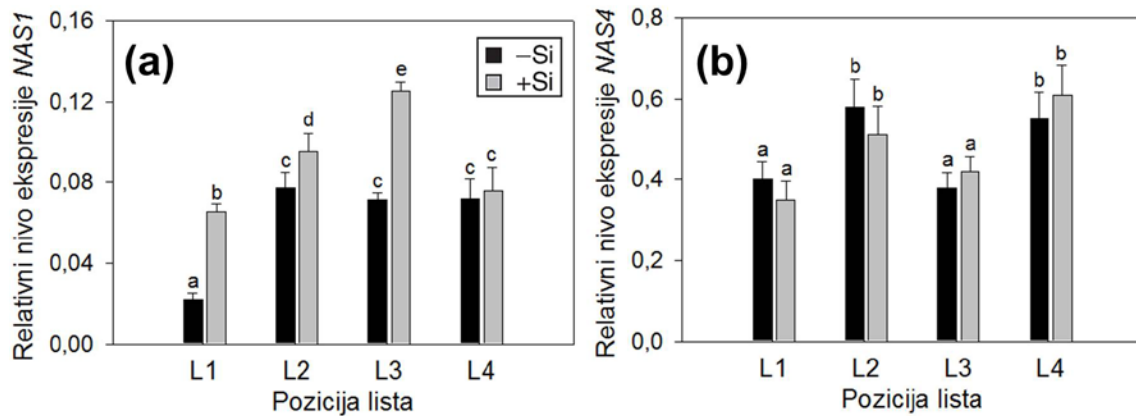


**Slika 19.** Relativni nivo ekspresije *NRAMP1* u listovima krastavca na različitim pozicijama. Pozicije listova (od najstarijeg do najmlađeg lista): L1, L2, L3 i L4. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti 4 ponavljanja  $\pm$  SD. Statistički značajne razlike između efekta različitih tretmana označene su različitim malim slovima na osnovu Tukey-ovog testa,  $p < 0.05$ .

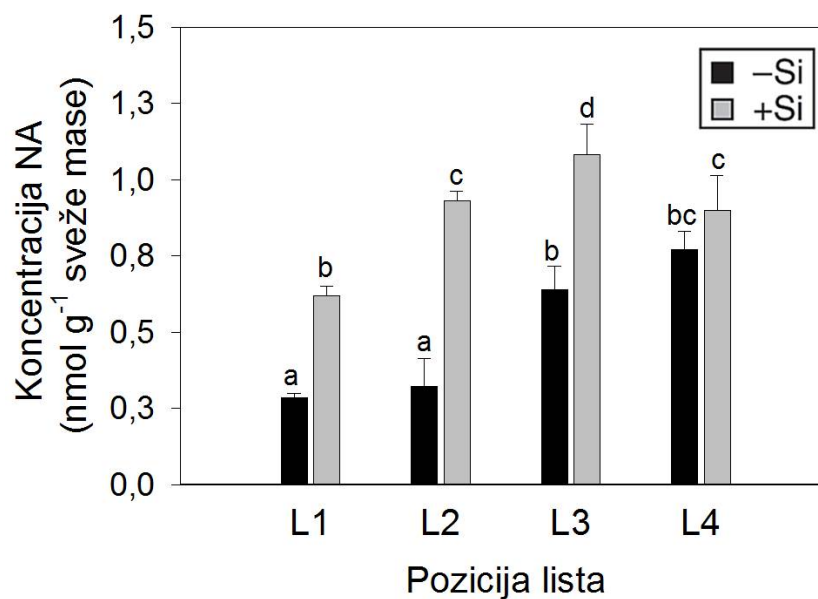
### 4.8.4 Uticaj Si na koncentraciju NA i ekspresiju *NAS* gena u listu

Kod biljaka koje nisu tretirane Si mogao se uočiti jasan profil nivoa ekspresije *NAS1* u zavisnosti od pozicije lista, gde su najniže vrednosti nivoa relativne ekspresije zabeležene u najstarijim listovima (L1) (Slika 20a).





**Slika 20.** Uticaj Si na nivo relativne ekspresije *NAS1* (a) i *NAS4* (b) u listovima krastavca na različitim pozicijama. Pozicije listova (od najstarijeg do najmlađeg lista): L1, L2, L3 i L4. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti 4 ponavljanja  $\pm$  SD. Statistički značajne razlike između efekta različitih tretmana označene su različitim malim slovima na osnovu Tukey-ovog testa,  $p < 0.05$ .



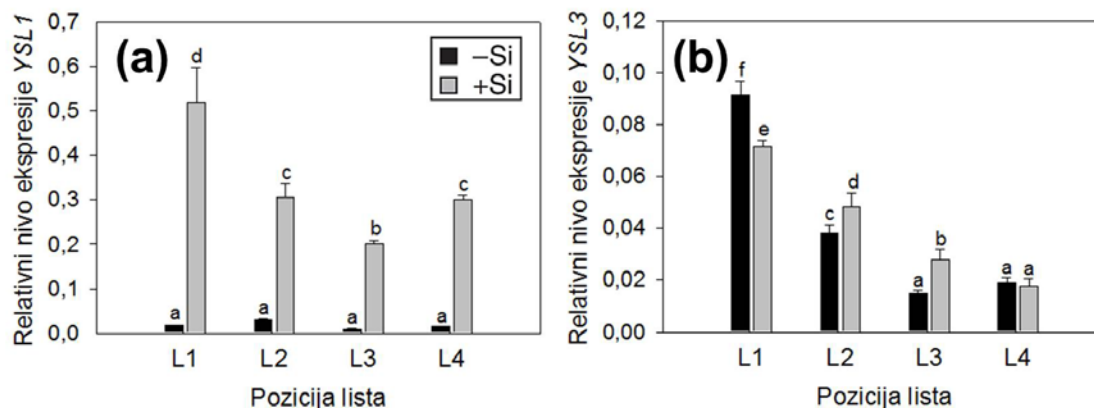
**Slika 21.** Uticaj Si na ukupnu koncentraciju NA u listovima krastavca na različitim pozicijama. Pozicije listova (od najstarijeg do najmlađeg lista): L1, L2, L3 i L4. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti 4 ponavljanja  $\pm$  SD. Statistički značajne razlike između efekta različitih tretmana označene su različitim malim slovima na osnovu Tukey-ovog testa,  $p < 0.05$ .

Dodavanje Si povećalo je ekspresiju *NAS1* i u starijim (L1, L2) i u mlađim (L3) potpuno razvijenim listovima. Međutim, nisu postojale značajne razlike između  $-Si$  i  $+Si$  tretmana u nivoima ekspresije *NAS1* u najmlađem (L4) nepotpuno razvijenom listu (Slika 20a). Na ekspresiju *NAS4* nije uticao ni razvojni stadijum lista (za razliku od jasnog obrasca zavisnog od starosti kod *NAS1*, videti Sliku 20a) ni snabdevanje Si (Slika 20b).

Koncentracija NA se postepeno povećavala od starijih ka mlađim listovima (Slika 21.) Ishrana Si dovela je do značajnog povećanja koncentracije NA u L1, L2 i posebno L3 listovima, dok je u manjoj meri uticala na koncentracije NA u najmlađim (L4) listovima (Slika 21.).

#### 4.9 Uticaj Si na ekspresiju *YSL1* i *YSL3* transportera za Fe-NA kompleks u listu

Ekspresija *YSL1* je snažno pojačana u listovima biljaka tretiranih Si, gde su najveći nivoi ekspresije uočeni u najstarijim (L1) listovima (Slika 21a).

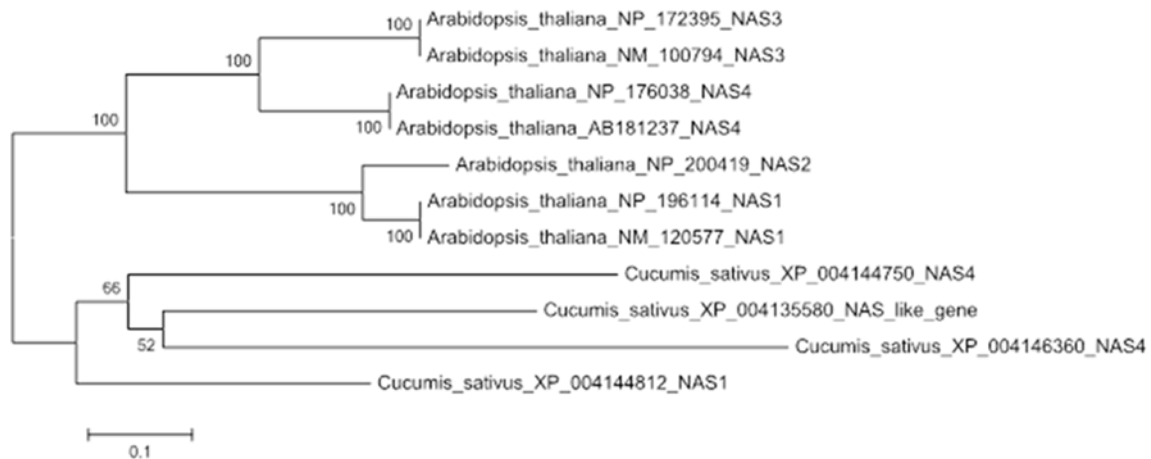


**Slika 22.** Uticaj Si na nivo relativne ekspresije *YSL1* (a) i *YSL3* (b) u listovima krastavca na različitim pozicijama. Pozicije listova (od najstarijeg do najmlađeg lista): L1, L2, L3 i L4. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti 4 ponavljanja  $\pm$  SD. Statistički značajne razlike između efekta različitih tretmana označene su različitim malim slovima na osnovu Tukey-ovog testa,  $p < 0.05$ .

Zatupljenost transkripta *YSL3* bila je najveća u najstarijim listovima i postepeno se smanjivala idući ka vrhu izdanka, nezavisno od Si tretmana. Isharana Si uticala je na pojavu izrazito većih nivoa ekspresije *YSL3* u mlađim potpuno razvijenim listovima (L2 i L3), dok je u najstarijem (L1) listu nivo ekspresije bio niži, a u najmlađem nerazvijenom (L4) listu na nivou zabeleženom kod –Si biljaka (Slika 21b).

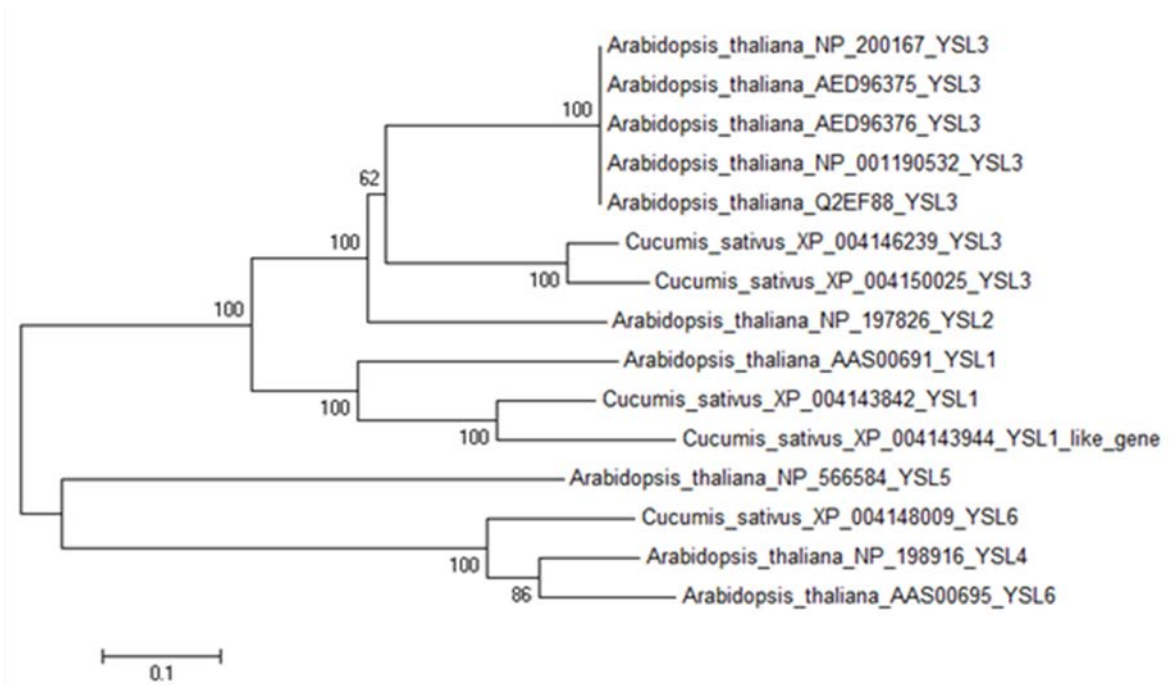
#### **4.10 Filogenetska analiza aminokiselinskih sekvenci NAS i YSL kod krastavca i arabidopsisa**

U cilju boljeg razumevanja funkcije NAS i YSL proteina kod krastavca, koji do sada nisu dovoljno proučeni kod ove biljne vrste, sprovedena je i dodatna filogenetska analiza aminokiselinskih sekvenci data dva proteina kod krastavca (*Cucumis sativus*) i arabidopsisa (*Arabidopsis thaliana*), biljne vrste kod koje je do sada najbolje izučena njihova fiziološka uloga. Tako se na NJ (*Neighbor joining*) filogenetskom stablu prikazanom na Slici 23, može uočiti da su NAS sekvence za *Cucumis sativus* i *Arabidopsis thaliana* grupisane u dve odvojene klade, što ukazuje da su NAS geni verovatno specifični za vrstu. Međutim, samo su *Arabidopsis thaliana* NAS klada i njene dve potklade, koje se sastoje od NAS1/NAS2 i NAS3/NAS4 sekvenci, maksimalno podržane (100% BS). Posmatrani obrazac ukazuje da su *Arabidopsis thaliana* NAS1 i NAS2 u bližem srodstvu međusobno nego sa NAS3 i NAS4 sekvencama, i obratno. Takođe, uočene su dve potklade u okviru *Cucumis sativus* NAS klade, jedna koja se sastoji od samo jedne NAS1 sekvence, i druga sačinjena od dve NAS4 i jedne sekvence NAS-like gena. Međutim, odnosi u okviru potonje potklade ostali su nejasni zbog izuzetno male statističke podrške.



**Slika 23.** NJ filogenetsko stablo NAS familije proteina krastavca (*Cucumis sativus*) i arabidopsisa (*Arabidopsis thaliana*).

Interesantno, na NJ filogenetskom stablu zasnovanom na YSL sekvencama (Slika 24.), grupisanje u klade nije bilo zasnovano na pripadnosti taksonu već fiziološkoj funkciji, kako se prva maksimalno podržana klada sastojala od YSL1, YSL2 i YSL3 sekvenci obe vrste, a druga klada bez statističke podrške sastojala se od YSL4 i YSL5 sekvenci *Arabidopsis thaliana* i YSL6 sekvenci obe vrste. U okviru prve klade, prva linija divergencije sastojala se od YSL1 sekvenci *Cucumis sativus* i *Arabidopsis thaliana* koje su sestre, dok su YSL2 *Arabidopsis thaliana* i YSL3 sekvence obe vrste organizovane u dve podlinije. U okviru druge klade, YSL5 *Arabidopsis thaliana* čini prvu liniju divergencije, dok je druga linija sačinjena od YSL6 *Cucumis sativus*, koja je sestra YSL4 i YSL6 *Arabidopsis thaliana*. Poslednji obrazac ukazuje na to da evolucija na osnovu funkcije YSL sekvenci nije bila toliko očigledna u slučaju YSL4, YSL5 i YSL6 sekvenci.



**Slika 24.** NJ filogenetsko stablo YSL proteina krastavca (*Cucumis sativus*) i arabidopsisa (*Arabidopsis thaliana*).

## 5 Diskusija

### 5.1 Uticaj Si na mobilizaciju i usvajanje Fe korenom i njegovu translokaciju do listova

U prvom setu eksperimenata je pokazano da dodavanje Si u hranljivi rastvor sprečava ili barem odlaže pojavu hloroze izazvane nedostatkom Fe, iako su biljke rasle u uslovima umanjenog prisustva Fe ili njegovog potpunog izostanka u hranljivom medijumu (Tabela 3; Slika 6a). Silicijum je, dakle, indirektno uticao na utišavanje isfiziološkog odgovora korena na nedostatak Fe (npr. morfološke promene na korenu, Slika 1b; usvajanje  $^{57}\text{Fe}$  na bazi redukcije, Slika 7b-d), što bi pre mogla biti posledica poboljšanog statusa Fe u celoj biljci, nego direktnog moduliranja ekspresije gena uključenih u adaptivni odgovor strategije I (*FRO2*, *IRT1* i *HAI*; Slika 7a). Međutim, u ovom setu eksperimenata nije bilo moguće detaljno razjasniti mehanizam delovanja Si na ublažavanje stresa izazvanog deficitom Fe, gde su izmereni samo krajnji efekti dugoročnog tretmana Si. Očigledno je, stoga, da je odgovor biljaka na nedostatak Fe bio zamaskiran očigledno poboljšanim statusom Fe kod biljaka krastavca tretiranih Si (Tabla 3.).

Kako bismo rasvetlili mehanizme koji leže u osnovi korisnog delovanja Si tokom stresa izazvanog nedostatkom Fe, sprovedeni su eksperimenti u različitim vremenskim tačkama, u kojima je registrovana dinamika iskorišćavanja Fe u apoplastu korena i adaptivnog odgovora strategije I. Kod biljaka gajenih bez dodatka Si, prvi vizuelni simptomi nedostatka Fe (hloroza na mladim listovima) postali su uočljivi petog dana od prebacivanja biljaka u hranljivi rastvor bez Fe i vremenom su postajali sve intenzivniji, dok su biljke tretirane Si ostale zelene tokom čitavog eksperimenta (Slika 8b).

### 5.1.1 Mobilizacija Fe iz apoplasta korena

Apoplast korena je od izuzetnog značaja za akviziciju hraniva iz razloga što ćelijski zid epidermisa sadrži negativno naelektrisana mesta (npr. pektinske polisaharide bogate karboksilnim grupama), koja mogu služiti kao skladište za većinu katjonskih hraniva (Sattelmacher, 2001). Tako se, na primer, oko 80% od ukupnog Fe u korenu nalazi u apoplastu, koji predstavlja značajno skladište rezervi Fe kod viših biljaka (Bienfait *et al.*, 1985; Strasser *et al.*, 1999; Cesco *et al.*, 2002). U ovoj studiji, dodavanje Si dovelo je do značajno veće akumulacije Fe u apoplastu korena krastavca u poređenju sa –Si tretmanom (Slika 10a). Iako asocijacija Si sa komponentama ćelijskog zida, uključujući polisaharide, lignine i proteine, nije u potpunosti razjašnjena (Currie *et Perry*, 2007), poznato je da Si može biti čvrsto vezan za pektine bogate galakturonskim ostacima *in vitro* Si (Schwarz, 1973) i, stoga, može doprineti u povezivanju strukturnih komponenti ćelijskog zida. Sa druge strane, polisilikati mogu vezati jone metala u vidu kompleksa nalik helatima (Iler, 1979), koji se takođe mogu naći u ćelijskom zidu biljaka tokom polimerizacije ortosilicijumske kiseline. Ovo proširivanje mesta za vezivanje Fe<sup>III</sup> u apoplastu korena indukovano Si može da posluži kao objašnjenje za povećanu koncentraciju Fe u apoplastu korena biljaka tretiranih Si tokom prekulturne sa Fe (dan 0, Slika 10a). Ubrzo nakon prebacivanja biljaka tretiranih Si u hranljivi rastvor bez Fe (dan 1, Slika 10a), došlo je do intenzivnog smanjenja Fe u apoplastu korena, što je praćeno značajno većim koncentracijama Fe izmerenim u ksilemskom soku biljaka tretiranih Si (Slika 10b), a čime je omogućeno neometano kretanje Fe ka nadzemnim delovima biljke tokom prva tri dana po isključivanju Fe iz hranljivog rastvora.

Pokazano je da je smanjenje u količini Fe u apoplastu dovelo do dislociranja odgovarajuće količine Fe u nadzemni deo biljke po prebacivanju biljaka iz medijuma sa optimalnom količinom Fe u medijum bez Fe (Zhang *et al.*, 1991). Jin *et al.* (2007) su pokazali da eksudati korena, kao što su fenolna jedinjenja, igraju ključnu ulogu u iskorišćavanju Fe u apoplastu korena bele deteline (*Trifolium repens*). Iako se fenolna jedinjenja često navode kao glavne komponente eksudata korena u odgovoru na nedostatak Fe kod vrsta strategije I (npr. Römheld *et Marschner*, 1983; Jin *et al.*, 2007; Cesco *et al.*,

2010), mehanizam iskorišćavanja Fe iz apoplasta posredstvom fenolnih jedinjenja i dalje ostaje nerazjašnjen. Jedan od mogućih mehanizama u osnovi bi mogao uključivati heliranje Fe vezanog u apoplastu korena od strane sekretovanih fenola, čineći ga tako dostupnim za redukciju i usvajanje korenom i translokaciju u nadzemne delove biljke. Pokazano je da se rastvorljivi Si može ponašati i kao modulator rezistencije biljaka na patogene, uključujući i pojačanu sintezu fenolnih jedinjenja (npr. lignina i fitoaleksina) u odgovoru na gljivične infekcije (Fauteux *et al.*, 2006). Do sada, promene u metabolizmu fenola pod uticajem Si uočene su u korenu kukuruza biljaka izloženih Al (Kidd *et al.*, 2001), kao i u korenu krastavca podvrgnutom visokim koncentracijama Mn (Dragišić Maksimović *et al.*, 2007). Put šikiminske kiseline se tipično navodi kao veza između metabolizma ugljenih hidrata i biosinteze aromatičnih jedinjenja putem fenilpropanoidnog puta (Herrmann *et Weaver*, 1999). Pojačana sinteza fenilpropanoida i terminalnih flavonoida u simplastu može zatim olakšati njihovu sekreciju u apoplast. U ovom istraživanju, dodavanje Si u hranljivi medijum dovelo je do povećanja ekspresije gena u oba metabolička puta, šikimatnom (SK) i fenilpropanoidnom (PAL), u vrhovima korena od prvog do trećeg dana od povlačenja Fe iz hranljivog rastvora (Slika 14d,e). Kao posledica, tokom najranijeg stadijuma nedostatka Fe, zabeležena je akumulacija fenolnih jedinjenja tipa flavonoida (npr. katehina) u apikalnom tkivu korena (Slika 13a). Pored toga, sekrecija riboflavina iz korena indukovana nedostatkom Fe je takođe zabeležena kod pojedinih biljnih vrsta (Venkat Raju *et al.*, 1972; Sušin *et al.*, 1996; Welkie, 2000). Jasna uloga riboflavina i jedinjenja sličnih riboflavinu kod biljaka koje pate od nedostatka Fe je i dalje nepoznata, mada je ponuđeno nekoliko pretpostavki u vezi njihove funkcije, kao na primer: 1) akumulacija u ćelijama korena, gde bi imali funkciju kofaktora ili komponenata redoks reakcija, ili 2) eksportovanje u rizosferu radi povećanja dostupnosti Fe za koren biljaka (Rodríguez-Celma *et al.*, 2011). Galna kiselina, pored toga što verovatno predstavlja agens za heliranje Fe (Fazary *et al.*, 2009), pokazuje i snažan potencijal da redukuje Fe<sup>III</sup> u biljnim tkivima (Mehrotra *et Gupta*, 1990). Stoga, akumulacija galne kiseline i riboflavina u korenu indukovana Si na početku povlačenja Fe iz hranljivog rastvora (Slika 13b,c), a potom i njihova ekskrecija u apoplast, mogu takođe pojačati iskorišćavanje Fe<sup>III</sup> i njegovu redukciju koja prethodi transportu Fe<sup>2+</sup> preko plazma membrane putem Fe<sup>II</sup> transportera (IRT). Pojačani potencijal korena za



mobilizaciju Fe je dalje potvrđen povećanim usvajanjem Fe i pratećim ozelenjavanjem biljaka krastavca gajenih u hranljivom rastvoru sa slabo rastvorljivim  $\text{Fe}^{\text{III}}$  hidroksidom kao izvorom Fe (Slika 15a,d).

Takođe, Stevic *et al.* (2016) su pokazali da je ishrana krastavca ortosilicijumskom kiselinom povećala biološku dostupnost Fe kroz formiranje Fe-Si kompleksa još uvek nepoznate strukture, a takođe je ispoljila uticaj i na oksido-redukcione uslove kako u eksternom rastvoru (tj. zemljišnom rastvoru i fluidu apoplasta korena) tako i u ksilemskom soku, po prvi put ukazujući na direktan uticaj Si u ublažavanju stresa nedostatka Fe.

### 5.1.2 Uticaj Si na mašineriju za usvajanje Fe u korenu

Kapacitet korena za redukciju  $\text{Fe}^{\text{III}}$  (aktivnost FRO enzima) bio je značajno veći kod biljaka tretiranih Si tokom prva tri dana nakon isključivanja Fe iz hranljivog rastvora, nakon čega je kontinuirano opadalo do kraja eksperimenta (Slika 9a). Ekspresija gena vezanih za adaptivni odgovor biljaka na nedostatak Fe kao što su *FRO2*, *IRT1* i *HAI* pratila je isti obrazac, što može da ukaže da je ekspresija ovih gena indukovana Si na početku stresa izazvanog nedostatkom Fe (Slika 9b–d). Kasnije tokom eksperimenta, kako su biljke tretirane Si održale kritičan status Fe za rast, kao posledica boljeg iskorišćavanja Fe iz apoplasta korena posredovanog Si (videti Sliku 10a,b), ekspresija *FRO2*, *IRT1* i *HAI* je smanjena, najverovatnije prenošenjem Fe-zavisnog signala iz listova do korena (Kobayashi *et Nishizawa*, 2014). Iz tog razloga je efekat Si bio zamaskiran u prvom setu eksperimenata gde su sve reakcije korena osetljive na status Fe kod biljaka krastavca tretiranih Si već bili utišani (videti Sliku 7).

### 5.1.3 Uticaj Si na translokaciju Fe putem ksilema i iskorišćavanje Fe u listovima

Među organskim kiselinama prisutnim u ksilemskom soku, soli limunske kiseline, citrati, se prevashodno smatraju glavnim kandidatom za helator-prenosilac u transportu Fe

ksilemom (Rellán-Álvarez *et al.*, 2010). Takođe je moguće da pod određenim uslovima (npr. različita biljna vrsta ili varirajući status Fe) budu uključeni i neki drugi helatori. Tako, na primer, i jabučna kiselina, kao i neke aminokiseline (najpre NA), mogu formirati stabilne komplekse sa Fe<sup>III</sup> u ksilemskom soku. U ovoj studiji, koncentracija citrata u ksilemskom soku se povećavala kako su se razvijali simptomi deficita Fe (Slika 8b, 11a) i bila je značajno veća kod biljaka tretiranih Si, posebno prvog dana od uskraćivanja Fe. Odnos Fe:citrat u ksilemskom soku je iznosio 1:700 kod +Si biljaka, dok je kod -Si biljaka prevazilazio odnos od 1:3000 (preračunato iz Slika 10b, 11a). Pokazano je da povećanje molarnog odnosa Fe:citrat inhibira redukciju Fe<sup>III</sup>-citrat u listu (González-Vallejo *et al.*, 1999; Nikolic *et Römheld*, 1999), te je stoga usvajanje Fe u mladim hlorotičnim listovima - Si biljaka i dodatno smanjeno. Međutim, izgleda da je povećana koncentracija citrata u ksilemskom soku +Si biljaka, koja ne prelazi 1:1000, od velikog značaja za olakšavanje transporta Fe na veće udaljenosti i iskorišćavanja Fe od strane ćelija lista (Nikolic *et Römheld*, 2007).

Povećana koncentracija citrata i malata (Slika 12a,b), koju prati i povećana ekspresija gena uključenih u Krebsov ciklus i anaplerotičku biosintezu karboksilata posredstvom PEPC (Slika 14a-c) u tkivu korena biljaka tretiranih Si su u saglasnosti sa povećanom koncentracijom citrata u ksilemskom soku (Slika 11a) i listovima (Slika 16.) kod krastavca. Smatra se da je upravo citrat ključni ligand za transport kompleksiranog Fe ksilemom (Abadía *et al.*, 2002; Hell *et Stephan*, 2003; Rellán-Álvarez *et al.*, 2010). U ovoj studiji, koncentracija citrata u tkivu korena i lista povećala se pod uticajem nedostatka Fe i bila je značajno veća kod biljaka tretiranih Si (Slika 12 i Slika 16). Stoga, povećana koncentracija citrata u korenu i listovima biljaka tretiranih Si, je izgleda od izuzetnog značaja i za olakšavanje transporta Fe na veće udaljenosti kao i njegovo iskorišćavanje u listovima.

Donedavno je postojalo vrlo malo, uglavnom kontrastnih podataka u literaturi o delovanju Si na metabolizam organskih kiselina. Na primer, Wang *et al.* (2004) su pokazali da Si nije uticao na eksudaciju organskih anjona indukovanu Al<sup>3+</sup> iz apeksa korena kukuruza, dok je, sa druge strane, pokazano da Si utiče na povećanje koncentracije sukcinata i koncentracije malata u korenu i nadzemnom delu kod kukuruza izloženog Al<sup>3+</sup> (Barceló *et al.*, 1993). Uopšte, pokazalo se da je Si odgovoran za promene u sadržaju

metabolita u određenim uslovima stresa (npr. napad patogena, toksičnost metala; Fauteux *et al.*, 2006; Führs *et al.*, 2012), iako je ostalo nerazjašnjeno da li je to primarni ili sekundarni efeket Si (videti 5.3).

U saglasnosti sa povećanom koncentracijom citrata u listovima (Slika 16.) su i rezultati ekspresije *NRAMP1* gena za funkcionalni transporter divalentnih katjona lokalizovanog na plazma membrani ćelija korena i lista, koji predstavlja primarnog kandidata za usvajanje  $\text{Fe}^{2+}$  od strane ćelija lista kod različitih biljnih vrsta (Slika 19.) (Curie *et al.*, 2000; Bereczky *et al.*, 2003; Xiong *et al.*, 2012). Najveći deo Fe koji dospeva do starijih listova putem ksilema nalazi se u formi  $\text{Fe}^{\text{III}}$  u kompleksu sa citratom. Pre nego što se transportuje u simplast lista, naverovatnije posredstvom  $\text{Fe}^{\text{II}}$  transportera NRAMP1 (npr. Curie *et al.*, 2000; Thomine *et al.*, 2000), Fe mora biti redukovano ili putem direktne fotoredukcije (Bienfait *et Scheffers*, 1992; Nikolic *et Römheld*, 2007) ili od strane  $\text{Fe}^{\text{III}}$  helatne reduktaze na plazma membrani (Brüggemann *et al.*, 1993; Nikolic *et Römheld*, 1999). Zastupljenost transkripta *NRAMP1* se povećala u listovima biljaka tretiranih Si (Slika 19.) ukazujući na ulogu NRAMP1 u transportu  $\text{Fe}^{2+}$  indukovanom Si generisanog putem enzimske (FRO proteini) i/ili ne-enzimske (UV i plava svetlost) redukcije  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -citrat kompleksa u apoplastu lista. Za razliku od dobro poznate uloge u usvajanju Fe u korenu, značaj plazmavmembranske  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -helatne reduktaze iz FRO familije proteina u usvajanju Fe od strane ćelija lista je još uvek predmet rasprave (Jeong *et Connolly*, 2008; Abadía *et al.*, 2011). Međutim, FRO proteini eksprimirani na membranama organela izgleda imaju značajnu ulogu u održavanju Fe homeostaze na subćelijskom nivou (Jeong *et Connolly*, 2008). Na žalost, do danas se jako malo zna o funkciji FRO proteina eksprimiranih u listovima krastavca.

## 5.2 Uticaj Si na retranslokaciju Fe u nadzemnom delu biljke

U daljem istraživanju testirali smo i potvrdili hipotezu da ishrana biljaka Si pospešuje remobilizaciju Fe iz starijih u mlade listove krastavca. U prethodnim eksperimentima je pokazano da Si uspešno ublažava deficit Fe kod krastavca utičući na povećanje rezervi Fe u

apoplastu korena i na akumulaciju Fe-mobilizujućih jedinjenja u korenu (citrat i katehin) i listovima (citrat), tako povećavajući akviziciju i translokaciju Fe u apikalne delove izdanka (videti 5.1). Najveće ograničenje u mnogim istraživanjima retranslokacije Fe kod biljaka, koja su do danas sprovedena, je to da doprinos rezervi Fe u apoplastu korena nije na adekvatan način uzet u razmatranje, kako su to istakli Shi *et al.*, (2012). Premda su rezerve Fe u apoplastu korena kod krastavca obično velike (Cesco *et al.*, 2002), i najmanja promena u ovom rezervoaru Fe tokom dugoročnog eksperimenta može značajno doprineti povećanoj translokaciji Fe u listove uvira. U ovom eksperimentu, mobilizacija Fe iz rezervi u apoplastu korena i njegova naknadna translokacija iz korena u nadzemni deo biljke je onemogućena održavanjem visoke pH u hranljivom rastvoru bez dodatka Fe (Tabele 6, 8).

Eksperiment sa stabilnim izotopom  $^{57}\text{Fe}$  je jasno pokazao da ishrana Si može da indukuje mobilizaciju  $^{57}\text{Fe}$  iz starijih listova kao i da poveća njegovu retranslokaciju u mlađe listove koji su se razvili nakon ukidanja  $^{57}\text{Fe}$  iz hranljivog rastvora (Slika 17b). Kao posledica posedovanja nerazvijenih ksilemskih struktura i niske stope transpiracije, mladi nepotpuno razvijeni listovi se skoro u potpunosti snabdevaju Fe (i drugim mikroelementima) posredstvom floema. Dobro je dokumentovano da Fe može biti mobilisano iz organa koji čine izvor u tkiva uvira, uključujući i mlade listove putem floema. (Hell *et* Stephan, 2003; Römheld *et* Schaaf, 2004). Na primer, Zhang *et al.* (1995, 1996) su pokazali da u uslovima nedostatka Fe i do 20% od ukupne količine Fe iz apoplasta i simplasta može biti mobilisano iz primarnih listova pasulja (*Phaseolus vulgaris*) i retranslocirano ka mladim listovima i apeksu stabla, pri čemu retranslokacija Fe može biti još izraženija u uslovima indukovane senescencije (Shi *et al.*, 2012).

### **5.2.1 Uticaj Si na NA-posredovanu redistribuciju Fe u listovima krastavca**

Remobilizacija Fe u nadzemnom delu biljke zavisi od prisustva NA, premda je poznato da izostanak redistribucije Fe između starijih i mlađih listova kod mutanta paradajza hloronerva koji nema sposobnost da sintetiše NA, može biti prevaziđeno egzogenom

primenom NA (Scholz, 1989; Stephan *et al.* Scholz, 1993). Pomoću *nas4x-1* i *nas4x-2* mutanata arabidopsisa, Schuler *et al.* (2012) su pokazali da je NA uključen u transport Fe na veće udaljenosti do mladih listova putem floema, kao i u lateralni transport Fe iz provodnih sudova u ćelije mezofila lista. Do sada su kod krastavca identifikovana dva pripadnika NAS familije proteina (CsNAS1 i CsNAS4). Međutim, u literaturi ne postoje podaci o njihovom obrascu ekspresije i određenim funkcijama u različitim tkivima i organima krastavca. Filogenetsko stablo aminokiselinskih sekvenci NAS krastavca i arabidopsisa (Slika 24.) ukazuje da su NAS geni najverovatnije specifični za takson, tako ostavljajući otvoreno pitanje da li je njihova fiziološka funkcija kod krastavca slična onoj kod arabidopsisa. U ovoj studiji, ispitana je akumulacija NA zajedno sa ekspresijom *NAS1* i *NAS4* gena kako bi se rasvetlili mehanizmi distribucije Fe posredovane Si u listovima krastavca u uslovima smanjene dostupnosti Fe. Dodavanje Si je dovelo do pojačane transkripcije *NAS1* gena (slika 20a), a zatim i povećane koncentracije NA u potpuno razvijenim listovima krastavca (Slika 21), što je dovelo do pojačane remobilizacije Fe iz starijih listova (L1, L2) i povećane koncentracije Fe u malđim listovima (L3, L4) na kojima su izostali simptomi hloroze izazvane nedostatkom Fe (Slika 18b; takođe videti Sliku 17a). Nasuprot *NAS1*, Si nije uticao na profil ekspresije *NAS4* gena (Slika 20b). Jednaka relativna zastupljenost transkripata *NAS4* (pojačano eksprimiran pod uticajem nedostatka Fe, Klatter *et al.*, 2009) se izgleda može pripisati sličnom statusu Fe –Si i +Si biljaka (183 odnosno 198 µg Fe po biljci; preračunato iz Tabele 7). Stoga se čini da je uticaj Si na povećanje ekspresije *NAS1* gena koji nije regulisan statusom Fe od presudnog značaja za povećanje koncentracije NA kod biljaka tretiranih Si, iako tačan mehanizam ovakvog delovanja ostaje da se razjasni u budućim istraživanjima.

Obrazac ekspresije AtYSL1 i AtYSL3 kod arabidopsisa koji posreduju u transportu Fe-NA kompleksa zavisi od statusa Fe i starosti lista tako da je nivo ekspresije veći u prisustvu Fe i u starijim listovima (Le Jean *et al.*, 2005; Waters *et al.*, 2006; Curie *et al.*, 2009). Dvostruki mutant arabidopsisa *ysl1ysl3* pokazuje snažne simptome internervalne hloroze i poseduje smanjenu koncentraciju Fe u listu (Waters *et al.*, 2006), što ukazuje da YSL1 i YSL3 deluju kao ključni posrednici u transportu Fe u listu (ulazak i izlazak). Iz filogenetskog stabla YSL sekvenci krastavca i arabidopsisa, CsYSL1 krastavca je u

najbližem srodstvu sa AtYSL1 arabidopsisa kao i CsYSL3 sa AtYSL3, što u kazuje na verovatnu sličnost u njihovim fiziološkim funkcijama (Slika 24.). U ovom istraživanju je pokazano da tretiranje krastavca Si nije uticalo na isti način na ekspresiju YSL1 i YSL3 gena (Slika 22.). Waters *et al.* (2006) su predložili da tokom vegetativnog rasteanja, smanjena ekspresija YSL u uslovima deficita Fe ograničava isporučivanje Fe u starije listove, čineći ga tako više dostupnim za mlađa tkiva koja aktivno rastu. Dodavanja Si u hranljivi medijum dovelo je do povećanja ekspresije *YSL1*, posebno u starijim listovima ukazujući da ovaj transporter igra značajnu ulogu u translokaciji Fe u mlađe listove (Slika 22a). Obrazac ekspresije *YSL3* je zavisio od razvojnog stupnja lista (smanjujući se idući od starijeg ka mlađim listovima), mada je nivo ekspresije ipak bio nešto veći u mlađim potpuno diferenciranim listovima +Si biljaka (L2 i L3; Slika 22b). Ovo dalje ukazuje da su povećani nivoi ekspresije *YSL3* pre posledica povećanog sadržaja Fe u listovima biljaka tretiranih Si nego direktnog uticaja Si. Interesantno, transkripti *YSL1* su bili skoro odsutni u svim ispitivanim listovima –Si biljaka i dodavanje Si je dramatično povećalo relativnu ekspresiju tog gena (Slika 22a). To ukazuje da povećana ekspresija *YSL1* nije uzrokovana promenom statusa Fe koju indukuje Si (Tabela 7), već pre akumulacijom Si (najverovatnije u nepolimerizovanom, bioaktivnom obliku) u tkivu lista (Tabela 4). Međutim i dalje ostaje nerazjašnjeno pitanje na koji način Si utiče na aktivaciju transkripcije *YSL1*, ali i drugih gena.

### **5.3 Delovanje Si na metabolizam biljaka izloženih stresu:**

#### **direktno *versus* indirektno**

Da li i na koji način Si pomaže u pripremi biljaka da efikasno odgovore na delovanje biotskog, a možda i abiotskog stresa, i dalje ostaje nejasno. Jasno je, međutim, da Si u svom amorfnom (polimerizovanom) obliku biljnog opala ili samim svojim prisustvom u vidu rastvorljive ortosilicijumske kiseline, ne može direktno uticati na metabolom biljaka koje nisu pod stresom (Epstein, 2009), ali bi Si mogao delovati kao pojačivač ili pozitivni modulator ćelijskog odgovora na nedostatak Fe. Na žalost, eksperimentalni podaci vezani

za uticaj Si na transkripciju gena su poprilično oskudni. Fauteux *et al.* (2006) su u svojim istraživanjima sprovedenim na modelu arabidopsis-patogena gljiva pokazali da snabdevanje biljaka Si nije uticalo na ekspresiju gena vezanih za odgovor na stres izazvan napadom patogena ukoliko biljke nisu prethodno bile inficirane pepelnicom. Ovi rezultati ukazuju da tretman Si nije imao uticaj na metabolizam nestresiranih biljaka, ali da je imao koristan efekat u vidu postizanja jednog mnogo efikasnijeg odgovora na stres izazvan napadom patogena. Međutim, dok se ne sprovedu slična istraživanja na biljkama koje poseduju sposobnost akumuliranja visokih koncentracija Si, nalazi prethodno spomenute studije na arabidopsisu moraju se interpretirati veoma oprezno iz razloga što ova vrsta ne poseduje Lsi1 transporter (Ma *et Yamaji*, 2015), pa stoga ne poseduje ni sposobnost da usvoji fiziološki značajnije količine Si. Takođe, pokazano je da Si efikasno ublažava stres kod biljaka izazvan različitim abiotским faktorima, kao što su suša i toksični metali, ali ponovo nije imao uticaj na nestresirane biljke (npr. Hittori *et al.*, 2003; Liang *et al.*, 2007). Relativno malo se zna o aktivnoj ulozi Si u metabolizmu biljaka u usloviama abiotskog stresa, posebno o molekularnim aspektima efikasnosti iskorišćavanja hraniva posredovanj Si (Liang *et al.*, 2015). Zadnjih godina, objavljene su prva istraživanja koja jasno pokazuju da Si može da utiče na ekspresiju gena i u uslovima mineralne toksičnosti (videti 1.6, Tabela 2). U našim eksperimentima sprovedenim na korenu krastavca, pokazano je da Si poseduje sposobnost da modulira aktivnost korena vezanu za usvajanje Fe kod krastavca po modelu strategije I u ranim stadijuma stresa nedostatka Fe, pre svega kroz regulaciju nivoa ekspresije gena za adaptivne proteine (FRO2, IRT1 i HA1) uključene u taj proces (videti 2.1.2). Međutim, u slučaju da su biljke podvrgnute nedostatku Fe tokom dužeg vremenskog perioda, ove reakcije se (pojačane na početku uskraćivanja Fe) smanjuju kao posledica poboljšanog statusa Fe posredovanog Si. Takođe, jasno je pokazan i efekat Si na moduliranje primarnog i sekundarnog metabolizama korena, gde je potvrđeno da Si igra ograničenu ulogu u promenama nivoa transkripcije ove biljne vrste u odsustvu stresa (videti 5.1.1.). Zatim, u daljim ekspreimantima sprovedenim na nivou lista, pokazano je da ishrana Si modulira ekspresiju *NAS1* uključenog u biosintezu NA, što za posledicu ima mnogo efikasniju remobilizaciju Fe iz starijih u mlađe listove putem povećane ekspresije YSL1 transportera za Fe-NA kompleks pod uticajem Si (videti 5.2.1). Kada se sve uzme u obzir,

korisni efekti Si su u skladu sa odgovorom na promene u transkriptomu indukovanim nedostatkom Fe na nivou korena i lista.

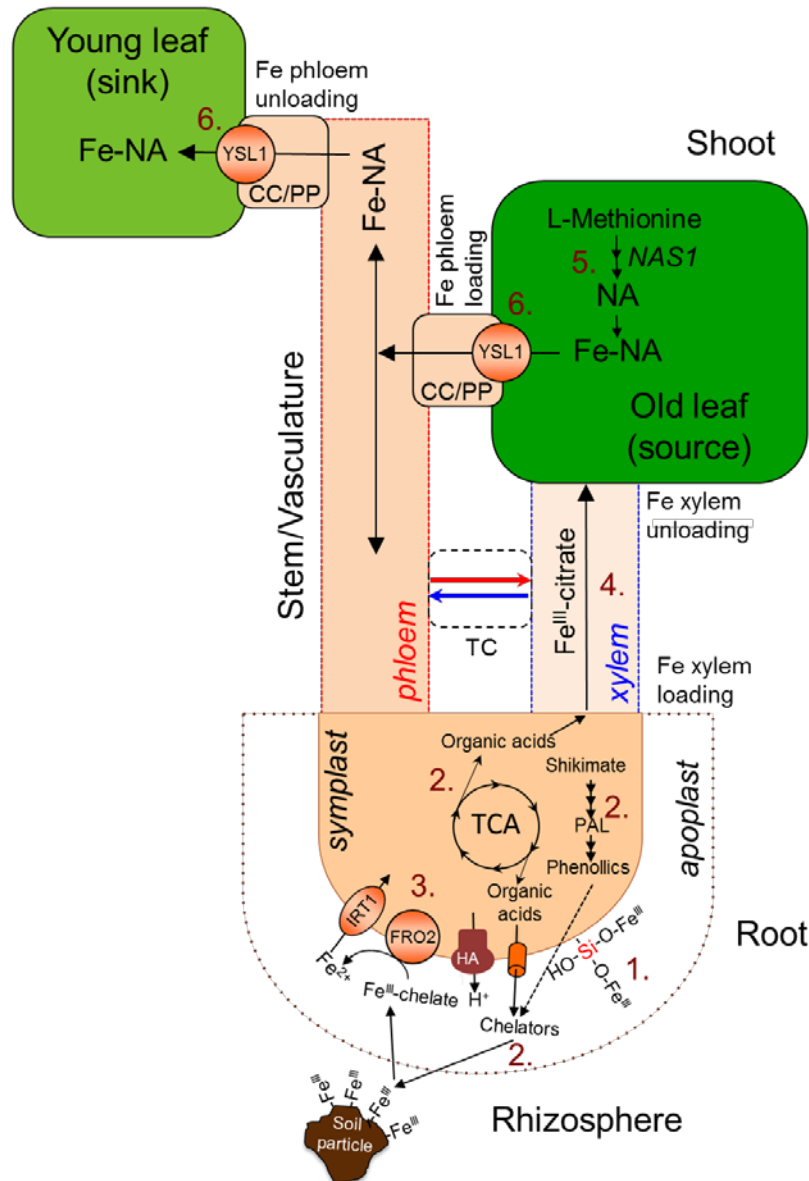
Moguće je da Si ima sposobnost da omogući pojedinačnoj biljci da aktivira adaptivne reakcije sa promenom biotskih ili abiotskih uslova. Kako Si nema uticaj na ekspresiju gena *per se*, kod nestresiranih (+Fe) biljaka (videti Sliku 7a), može se samo spekulirati kako Si može indirektno uticati na transkripcione faktore koji dovode do aktivacije transkripcije gena povezanih sa odgovorom na nedostatak Fe. Istraživanja sprovedena u ovoj doktorskoj disertaciji, nedvosmisleno ukazuju na urgentnu potrebu usmeravanja daljih interdisciplinarnih istraživanja prema ulozi Si u nastajanju i prenosu signala u uslovima višestrukog stresa biljaka.

## 5.4 Mehanizam delovanja Si na homeostazu Fe kod krastavca

Uzimajući u obzir sve rezultate prikazane u ovoj doktorskoj disertaciji, predlaže se mehanizam delovanja Si na poboljšanje homeostaze Fe u uslovima nedostatka Fe kod krastavca (Slika 25.). Na nivou korena, Si povećava rezerve Fe u apoplastu korena (1) i povećava akumulaciju jedinjenja koja heliraju/mobilišu Fe u korenu (organske kiseline i fenoli), ujedno stimulišući i ekspresiju ključnih gena uključenih u njihovu biosintezu (Krebsov ciklus, put šikiminske kiseline i fenilpropanoidni put), što dovodi do povećane mobilizacije Fe iz rizosfere i boljeg iskorišćavanja Fe iz apoplasta korena (2). Ovo je dalje praćeno povećanom ekspresijom plazma mebranskih proteina korena uključenih u usvajanje Fe baziranog na redukciji (strategija I), HA1, FRO2 (kod krastavca poznat i kao CsFRO1; Waters *et al.*, 2007) i IRT1 (3). Silicijum takođe podstiče i translokaciju Fe u kompleksu sa citratom (i malatom) iz korena u nadzemni deo biljke putem ksilema (4). Dodatno, Si bi takođe mogao da doprinese i povećanom ulazu Fe<sup>2+</sup> (nakon prethodne redukcije Fe<sup>III</sup> citrata; Nikolic *et Römheld*, 2007) iz ksilema i apoplasta lista duž glavnih nerava u simplast starijih listova posredstvom pojačane ekspresije NRAMP1 transportera. U listovima, Si utiče na povećanje ekspresije *NASI* gena odgovornog za biosintezu NA u starijim listovima (5) i ekspresiju *YSLI* koji kodira za transporter odgovoran za punjenje



floema Fe i floemski transport Fe-NA kompleksa iz starijih listova (izvora) do mlađih listova (uvira), kao i za dopremanje Fe-NA kompleksa floemom do mlađih listova (6).



**Slika 25.** Predloženi model Si posredovanog ublažavanja stresa deficita Fe kod krastavca. *Rhizosphere*, rizosfera; *Root*, koren; *Shoot*, nadzemni deo biljke; *Stem/Vasculature*, stablo/vaskulatura; *Soil particle*, zemljišna čestice; *Chelators*, helatori; *TCA*, Krebsov ciklus; *Apoplast*, apoplast; *Symplast*, simplast; *Fe<sup>III</sup>-chelate*, Fe<sup>III</sup>-helat; *Organic acids*, organske kiseline; *Phenolics*, fenoli; *Shikimate*, šikimat; *PAL*, fenilalanin amonijumliaza; *Xylem*, ksilem; *Phloem*, floem; *Fe<sup>III</sup>-citrate*, Fe<sup>III</sup>-citrat; *Fe xylem loading*, punjenje ksilema Fe; *Fe xylem unloading*, preženjenje Fe iz ksilema; *Fe phloem loading*, punjenje floema Fe; *Fe phloem unloading*, pražnjenje Fe iz floema; *L-Methionine*, L-metionin; *Old leaf (source)*, stari list (izvor); *Young leaf (sink)*, mladi list (uvir); *CC/SE*, ćelije pratilice/sitasti elementi; *TC*, transferne ćelije (Pavlovic *et al.*, 2016, reprodukovano uz dozvolu dobijenu od *Oxford University Press*).

---

## 6 Zaključci

Na osnovu rezultata dobijenih iz različitih eksperimenata koji su imali za cilj ispitivanje uloge Si u prevazilaženju nedostatka Fe kod krastavca mogu se izvući sledeći glavni zaključci:

1. Silicijum efikasno ublažava stres izazvan nedostatkom Fe kod krastavca (model biljke strategije I), što je dokumentovano odsustvom Fe hloroze i adaptivnih promena na korenu, kao i povećanom biomasom biljaka tretiranih Si u uslovima nedostatka Fe.
2. Na nivou korena, pretretman Si dovodi do povećanja rezervi Fe u apoplastu korena i povećane mobilizacije Fe iz rizosfere, kao i efikasnijeg iskorišćavanja Fe iz apoplasta korena, tako što Si pojačava ekspresiju ključnih gena u biosintezi jedinjenja koja imaju sposobnost da heliraju Fe (npr. karboksilati i fenolna jedinjenja) i povećava njihovu akumulaciju u apikalnom tkivu korena. Takođe, Si utiče i na povećanje ekspresije gena za proteine na plazma membrani ćelija korena (HA1, FRO2 i IRT1) koji su uključeni u mašineriju za usvajanje Fe na bazi redukcije (strategija I) i, stoga do povećanog unosa Fe korenom.
3. Si takođe podstiče translokaciju Fe u kompleksu sa citratom (i malatom) iz korena u nadzemni deo biljke putem ksilema i bolje iskorišćavanje Fe u listovima, modulirajući metabolizam organskih kiselina u listu.
4. U listovima, Si indukuje mobilizaciju Fe u starijim listovima i povećava njegovu retranslokaciju u mlađe nepotpuno razvijene listove, tako što utiče na povećanje ekspresije *NAS1* gena odgovornog za biosintezu NA u starijim listovima (izvor), pa stoga i na povećanu akumulaciju NA koji helira Fe. Ovo je praćeno i Si indukovanom ekspresijom YSL1 transportera za punjenje floema Fe i povećanim dopremanjem Fe-NA kompleksa floemom iz starijih listova (izvora) do mladih listova (uvira).

5. U perspektivi, ova otkrića mogu biti od izuzetnog značaja za poljoprivrednu praksu, jer daju teoretsku osnovu za razvoj novih održivih mera kontrole Fe hloroze na krečnim zemljištima, kao alternative sintetičkim helatnim preparatima Fe.

---

## 7 Literatura

- Abadía J, López-Millán AF, Rombola A, Abadía A. 2002. Organic acids and Fe deficiency: a review. *Plant and Soil* 241: 75-86.
- Abadía J, Vázquez S, Rellán-Álvarez R, El-Jendoubi H, Abadía A, Álvarez-Fernández A, López-Millán AF. 2011. Towards a knowledge-based correction of iron chlorosis. *Plant Physiology and Biochemistry* 49: 471-482.
- Ahmad R, Zaheer SH, Ismail S. 1992. Role of silicon in salt tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Science* 85: 43-50.
- Akcay UC, Erkan IE. 2016. Silicon induced antioxidative responses and expression of BOR2 and two PIP family aquaporin genes in barley grown under boron toxicity. *Plant Molecular Biology Reporter* 34: 318-326.
- Andaluz S, Rodriguez-Celma J, Abadía A, Abadía J, López-Millán AF. 2009. Time course induction of several key enzymes in *Medicago truncatula* roots in response to Fe deficiency. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 1082-1088.
- Arnon DI, Stout PR. 1939. The essentiality of certain elements in minute quantity for plant with special reference to copper. *Plant Physiology* 14: 371-375.
- Balasta MLFC, Perez CM, Juliano BO, Villareal CP, Lott JNA, Roxas DB. 1989. Effect of silica level on some properties of *Oriza sativa* straw and hull. *Canadian Journal of Botany* 67: 2356-63.
- Balec R, Belanger R, Chapman DM, Epstein E, Guevel M-H, Kinrade SD, Knight CTG, Rains DW, Terill M, Wang J. 2005. Organosilicate chemistry: evidence for a cross-linking role in plants. In: Korndörfer GH (ed.). III Silicon in Agriculture Conference. Ed Uberlândia, 76. Brazil: Universidad Federal de Uberlândia.
- Barceló J, Guevara P, Poschenrieder Ch. 1993. Silicon amelioration of aluminium toxicity in teosinte (*Zea mays* L. sp. *mexicana*). *Plant and Soil* 154: 249-255.
- Basso B, Bagnaresi P, Bracale M, Soave C. 1994. The yellow stripe 1 and 3 mutants of maize: nutritional and biochemical studies. *Maydica* 39: 97-105.

- Bauer P, Hell R. 2006. Translocation of iron in plant tissues. In: Barton LL, Abadía J. (eds.) Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms. Netherlands: Springer, pp 279-288.
- Bauer P, Thiel T, Klatte M, Berezky Z, Brumbarova T, Hell R, Grosse I. 2004 Analysis of sequence, map position and gene expression reveals conserved essential genes for iron uptake in Arabidopsis and tomato. *Plant Physiology* 136: 4169-4183.
- Becker R, Fritz E, Manteuffel R. 1995. Subcellular localization and characterization of excessive iron in the nicotianamine-less tomato mutant *chloronerva*. *Plant Physiology* 108: 269-275.
- Berezky Z, Wang HY, Schubert V, Ganai M, Bauer P. 2003. Differential regulation of nramp and irt metal transporter genes in wild type and iron uptake mutants of tomato. *Journal of Biological Chemistry* 278: 24697-24704.
- Bienfait FH, Scheffers MR. 1992. Some properties of ferric citrate relevant to the iron nutrition of plants. *Plant and Soil* 143: 141-144.
- Bienfait HF, van den Briel W, Mesland-Mul NT. 1985. Free space iron pools in roots. Generation and mobilization. *Plant Physiology* 78: 596-600.
- Bityutskii N, Pavlovic J, Yakkonen K, Maksimovic 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 Physiology and Biochemistry* 74: 205-211.
- Boukhalfa H, Crumbliss AL. 2002. Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *Biometals* 15: 325-339.
- Bouzayen M, Felix G, Latché A, Pech J-C, Boller T. 1991. Iron: an essential cofactor for the conversion of 1-aminocyclopropane- 1-carboxylic acid to ethylene. *Planta* 184: 244-247.
- Briat JF, Lobréaux S, Grignon N, Vansuyt G. 1999. Regulation of plant ferritin synthesis: how and why. *Cellular and Molecular Life Sciences* 56: 155-166.
- Broadley M, Brown P, Cakmak I, Rengel Z, Zhao F. 2012. Function of Nutrients: Micronutrients. In: Marschner P (ed.). *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. London: Academic Press, 119-284.

- Brouquisse R, Gaillard J, Douce R. 1986. Electron paramagnetic resonance characterization of membrane bound iron-sulfur clusters and aconitase in plant mitochondria. *Plant Physiology* 81: 247-252.
- Brüggemann W, Maas-Kantel K, Moog PR. 1993. Iron uptake by leaf mesophyll cells: the role of the plasma membrane-bound ferric-chelate reductase. *Planta* 190: 151–155.
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL. 2000. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists.
- Bughio N, Takahashi M, Yoshimura E, Nishizawa NK, Mori S. 1997. Light-dependent iron transport into isolated barley chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 38: 101-105.
- Castaigns L, Caquot A, Loubet S, Curie C. 2016. The high-affinity metal Transporters NRAMP1 and IRT1 Team up to Take up Iron under Sufficient Metal Provision. *Scientific reports* 6: 37222; doi: 10.1038/srep37222.
- Cesco S, Neumann G, Tomasi N, Pinton R, Weiskopf L. 2010. Release of plant-borne flavonoids into the rhizosphere and their role in plant nutrition. *Plant and Soil* 329: 1-25.
- Cesco S, Nikolic M, Römheld V, Varanini Z, Pinton R. 2002. Uptake of <sup>59</sup>Fe from soluble <sup>59</sup>Fe-humate complexes by cucumber and barley plants. *Plant and Soil* 241: 121-128.
- Chandler-Ezell K, Pearsall D, Zeidler J. 2006. Root and tuber phytoliths and starch grains document manioc (*Manihot esculenta*), arrowroot (*Maranta arundinacea*), and Llerén (*Calathea* sp.) at the Real Alto site, Ecuador. *Economic Botany* 60: 103-120.
- Che J, Yamaji N, Shao JF, Ma JF, Shen RF. 2016. Silicon decreases both uptake and root-to-shoot translocation of manganese in rice. *Journal of Experimental Botany* 675: 1535-1544.
- Chen CH, Lewin J. 1969. Silicon as a nutrient element for *Equisetum arvense*. *Canadian Journal of Botany* 47: 125-131.
- Chereskin BM, Castelfranco PA. 1982. Effects of iron and oxygen on chlorophyll biosynthesis. II. Observations on the biosynthetic pathway in isolated etiochloroplasts. *Plant Physiology* 69: 112-116.

- Chérif M, Benhamou N, Menzies JG, Bélanger RR. 1992. Studies of silicon distribution in wounded and *Pythium ultimum* infected cucumber plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 41: 371-85.
- Chiba Y, Mitani N, Yamaji N, Ma JF. 2009. HvLsi1 is a silicon influx transporter in barley. *The Plant Journal* 57: 810-818.
- Cohen CK, Fox TC, Garvin D F, Kochian LV. 1998. The role of iron-deficiency stress responses in stimulating heavy metal transport in plants. *Plant Physiology* 116: 1063-1072.
- Chu HH, 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 Physiology* 154: 197-210.
- Conte SS, Walker EL. 2011. Transporters Contributing to Iron Trafficking in Plants. *Molecular Plant* 4(3): 464-76.
- Cornelis JT, Delvaux B, Georg RB, Lucas Y, Ranger J, Opfergelt S. 2011. Tracing the origin of dissolved silicon transferred from various soil-plant systems towards rivers: a review. *Biogeosciences* 8: 89-112.
- Curie C, Alonso JM, Le Jean M, Ecker JR, Briat JF. 2000. Involvement of NRAMP1 from Arabidopsis thaliana in iron transport. *Biochemical Journal* 347: 749-755.
- 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. *Annals of Botany* 103: 1-11.
- Currie HA, Perry CC. 2007. Silica in plants: biological, biochemical and chemical studies. *Annals of Botany* 100: 1383-1389.
- Deák M, Horvath GV, Davletova S, Torok K, Sass L, Vass I, Barna B, Kiraly Z, Dudits D. 1999. Plants ectopically expressing the iron-binding protein, ferritin, are tolerant to oxidative damage and pathogens. *Nature Biotechnology* 17: 192-196.
- Deshmukh R, Vivancos J, Guérin V, Sonah H, Labbé C, Belzile F, Bélanger R. 2013. Identification and functional characterization of silicon transporters in soybean using

- comparative genomics of major intrinsic proteins in Arabidopsis and rice. *Plant Molecular Biology* 83: 303-315.
- DiDonato RJ, Jr Roberts LA, Sanderson T, Eislely RB, Walker EL. 2004. Arabidopsis Yellow Stripe-Like2 (YSL2): a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine–metal complexes. *The Plant Journal* 39: 403-414.
- 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. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 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. *Journal of Experimental Botany* 63: 2411-2420.
- Edding JL, Brown AL. 1967. Absorption and translocation of foliar-applied iron. *Plant Physiology* 42: 15-19.
- Eide D, Broderius M, Fett J, Guerinot ML. 1996. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 93: 5624-5628.
- Eng BH, Guerinot ML, Eide D, Saier MH. 1998. Sequence analyses and phylogenetic characterization of the zip family of metal ion transport proteins. *The Journal of membrane biology* 166: 1-7.
- Epstein E. 2009. Silicon: its manifold roles in plants. *Annals of Applied Biology* 155: 155-160.
- Fauteux F, Chain F, Belzile F, Menzies JG, Bélanger RR. 2006. The protective role of silicon in the Arabidopsis–powdery mildew pathosystem. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 103: 17554-17559.
- Fauteux F, Rémus-Borel W, Menzies J, Bélanger R. 2005. Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters* 249: 1-6.
- Fazary AE, Taha M, Ju H. 2009. Iron complexation studies of gallic acid. *Journal of Chemical and Engineering Data* 54: 35-42.



- Frantz JM, Khandekar S, Leisner S. 2011. Silicon differentially influences copper toxicity in silicon-accumulator and non-accumulator species. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 136: 329-338.
- Fridovich I. 1983. Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annual review of pharmacology and toxicology* 23: 239-257.
- Führs F, Specht A, Erban A, Kopka J, Horst WJ. 2012. Functional associations between the metabolome and manganese tolerance in *Vigna unguiculata*. *Journal of Experimental Botany* 63: 329-340.
- Gong H, Zhu X, Chen K, Wang S, Zhang C. 2005. Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought. *Plant Science* 169: 313-321.
- González-Vallejo EB, González-Reyes JA, Abadía A, López-Millán AF, Yunta F, Lucena JJ, Abadía J. 1999. Reduction of ferric chelates by leaf plasma membrane preparations from Fe-deficient and Fe-sufficient sugar beet. *Australian Journal of Plant Physiology* 26: 601-611.
- Gonzalo MJ, Lucena JJ, Hernández-Apaolaza L. 2013. Effect of silicon addition on soybean (*Glycine max*) and cucumber (*Cucumis sativus*) plants grown under iron deficiency. *Plant Physiology and Biochemistry* 70: 455-461.
- Guerinot ML, Yi Y. 1994. Iron: nutritious, noxious, and not readily available. *Plant Physiology* 104: 815-820.
- Guntzer F, Keller C, Meunier JD. 2012. Benefits of plant silicon for crops: a review. *Agronomy for Sustainable Development* 32: 201-213.
- Halliwell B. 2009. The wanderings of a free radical. *Free Radical Biology and Medicine* 46: 531-542.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1986. Iron and free radical reactions: two aspects of antioxidant protection. *Trends in biochemical sciences* 11: 372-375.
- Hattori T, Inanaga S, Araki H, An P, Morita S, Luxová M, Lux A. 2005. Application of silicon enhanced drought tolerance in *Sorghum bicolor*. *Physiolgia Plantarum* 123: 459-466.

- Hattori T, Inanaga S, Tanimoto E, Lux A, Luxova M, Sugimoto Y. 2003. Silicon-induced changes in viscoelastic properties of sorghum root cell walls. *Plant and Cell Physiology* 44: 743-9.
- Hell R, Stephan UW. 2003. Iron uptake, trafficking and homeostasis. *Planta* 216: 541-551.
- Herbik A, Giritch A, Horstmann C, Becker R, Balzer H-J, Bäumlein 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 Physiology* 111: 533-540.
- Hernandez-Apaolaza L. 2014. Can silicon partially alleviate micronutrient deficiency in plants? A review. *Planta* 240: 447-458.
- Herrmann KM, Weaver LM. 1999. The shikimate pathway. *Annual Review of Plant Physiology* 50: 473-503.
- Hildebrand DF. 1989. Lipoxygenases. *Physiologia Plantarum* 76: 249-253.
- Hodson MJ, Sangster AG. 1989. X-ray microanalysis of the seminal root of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. with particular reference to silicon. *Annals of Botany* 64: 659-667.
- Hodson MJ, White PJ, Mead A, Broadley MR. 2005. Phylogenetic variation in the silicon composition of plants. *Annals of Botany*. 96: 1027-46.
- Hsu W, Miller GW. 1968. Iron in relation to aconitate hydratase activity in *Glycine max.* Merr. *Biochimica et biophysica acta* 151: 711-713.
- Iler RK. 1979. *The Chemistry of Silica*. New York, USA: John Wiley.
- Inoue H, Kobayashi T, Nozoye T, Takahashi M, Kakei Y, Suzuki K, Nakazono M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK. 2009. Rice OsYSL15 is an iron-regulated iron(III)-deoxymugineic acid transporter expressed in the roots and is essential for iron uptake in early growth of the seedlings. *The Journal of biological chemistry* 284: 3470-79.
- Ishimaru Y, Masuda H, Bashir K, Inoue H, Tsukamoto T, Takahashi M, Nakanishi H, Aoki N, Hirose T, Ohsugi R, Nishizawa NK. 2010. Rice metal-nicotianamine transporter, OsYSL2, is required for the long-distance transport of iron and manganese. *The Plant Journal* 62: 379-390.

- Ishimaru Y, Suzuki M, Tsukamoto T, Suzuki K, Nakazono M, Kobayashi T, Wada Y, Watanabe S, Matsushashi S, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK. 2006. Rice plants take up iron as an Fe<sup>3+</sup>-phytosiderophore and as Fe<sup>2+</sup>. *The Plant Journal* 45: 335-46.
- Jarvis SC. 1987. The uptake and transport of silicon by perennial ryegrass and wheat. *Plant and Soil* 97: 429-437.
- Jeong J, Connolly EL. 2009. Iron uptake mechanisms in plants: functions of the FRO family of ferric reductases. *Plant Science* 176: 709-714.
- Jeong J, Guerinot ML. 2009. Homing in on iron homeostasis in plants. *Trends in Plant Science* 14: 280-285.
- Jin CW, You GY, He YF, Tang C, Wu P, Zheng SJ. 2007. Iron deficiency-induced secretion of phenolics facilitates the reutilization of root apoplastic iron in red clover. *Plant Physiology* 144: 278-285.
- Kidd PS, Llugany M, Poschenrieder C, Gunsé B, Barceló J. 2001. The role of root exudates in aluminum resistance and silicon-induced amelioration of aluminum toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany* 52: 1339-1352.
- Kim SA, Guerinot ML. 2007. Mining iron: iron uptake and transport in plants. *Federation of European Biochemical Societies letters* 581: 2273-2280.
- Kim YH, Khan AL, Kim DH, Lee SY, Kim KM, Waqas M, Jung HY, Shin JH, Kim JG, Lee IJ. 2014. Silicon mitigates heavy metal stress by regulating P-type heavy metal ATPases, *Oryza sativa* low silicon genes, and endogenous phytohormones. *BMC Plant Biology* 14:13.
- Kinrade SD, Del Nin JW, Schach AS, Sloan TA, Wilson KL, Knight CTG. 1999. Stable five- and sixcoordinated silicate anions in aqueous solution. *Science* 285: 1542-1545.
- 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 Physiology* 150: 257-271.
- Knight CTG, Kinrade SD. 2001. A primer on the aqueous chemistry of silicon. In: Datnoff LE, Snyder GH, Korndorfer GH (eds.). *Studies in Plant Science*, Elsevier 8: 57-84.

- Kobayashi T, Nishizawa NK. 2012. Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Biology* 63:131-152.
- Koike S, Inoue H, Mizuno D, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa, NK. 2004. OsYSL2 is a rice metal-nicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the phloem. *The Plant Journal* 39: 415-424.
- Krüger C, Berkowitz O, Stephan UW, Hell R. 2002. A metal-binding member of the late embryogenesis abundant protein family transports iron in the phloem of *Ricinus communis* L. *Journal of Biological Chemistry* 277: 25062-25069.
- Larbi A, Morales F, López-Millán A-F, Gogorcena Y, Abadía A, Moog PR, Abadía J. 2001. Technical advance: reduction of Fe(III)-chelates by mesophyll leaf discs of sugar beet. Multi-component origin and effects of Fe deficiency. *Plant and Cell Physiology* 42: 94-105.
- Laursen KH, Hansen TH, Persson DP, Schjoerring JK, Husted S. 2009. Multi-elemental fingerprinting of plant tissue by semi-quantitative ICP-MS and chemometrics. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 24: 1198-1207.
- Le Jean M, Schikora A, Mari S, Briat JF, Curie C. 2005. A loss-of-function mutation in AtYSL1 reveals its role in iron and nicotianamine seed loading. *The Plant Journal* 44: 769-782.
- Li J, Lesiner SM, Frantz J. 2008. Alleviation of copper toxicity in *Arabidopsis thaliana* by silicon addition to hydroponic solutions. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 133: 670-677.
- Liang Y, Hua H, Zhu YG, Zhang J, Cheng C, Römheld V. 2006. Importance of plant species and external silicon concentration to active silicon uptake and transport. *New Phytologist* 172: 63-72.
- Liang Y, Nikolic M, Bélanger R, Gong H, Song A. 2015. Silicon in agriculture. From theory to practice. Dordrecht: Springer.
- Liang Y, Si J, Römheld V. 2005. Silicon uptake and transport is an active process in *Cucumis sativus* L. *New Phytologist* 167: 797-804.
- Liang Y, Sun W, Zhu Y-G, Christie P. 2007. Mechanisms of silicon-mediated alleviation of abiotic stresses in higher plants: A review. *Environmental Pollution* 147: 422-428.

- Likhoshway YV, Masyukova YA, Sherbakova TA, Petrova DP, Grachev MA. 2006. Detection of the gene responsible for silicic acid transport in Chrysophycean algae. *Doklady Biological Sciences* 408: 256-260.
- Lindsay WL. 1995. Chemical reactions in soils that affect iron availability to plants. A quantitative approach. In: Abadía J (ed.). *Iron nutrition in soils and plants*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 7-14.
- Ling HQ, Koch G, Baumlein H, Ganai, M. 1999. Map-based cloning of chloronerva, a gene involved in iron uptake of higher plants encoding nicotianamine synthase. *proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 7098-7103.
- Liu DH, Adler K, Stephan UW. 1998. Iron-containing particles accumulate in organelles and vacuoles of leaf and root cells in the nicotianamine-free tomato mutant chloronerva. *Protoplasma* 201: 213-220.
- López-Millán A F, Morales F, Abadía A, Abadía, J. 2000. Effects of iron deficiency on the composition of the leaf apoplastic fluid and xylem sap in sugar beet. Implications for iron and carbon transport. *Plant Physiology* 124: 873-884.
- Lux A, Luxová M, Morita S, Abe J, Inanaga S. 1999. Endodermal silicification in developing seminal roots of lowland and upland cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). *Canadian Journal of Botany* 77: 955-960.
- M'sehli W, Dell'Orto M, Donnini S, De Nisi P, Zocchi G, Abdelly C, Gharsalli M. 2009. Variability of metabolic responses and antioxidant defence in two lines of *Medicago ciliaris* to Fe deficiency. *Plant and Soil* 320: 219-230.
- Ma JF, Miyake Y, Takahashi E. 2001. Silicon as a beneficial element for crop plants. In: Datnoff LE, Snyder GH, Korndörfer GH (eds.). *Studies in Plant Science*, Elsevier 8: 17-39.
- Ma JF, Takahashi E. 2002. *Soil, fertilizer, and plant silicon research in Japan*. Amsterdam: Elsevier.
- Ma JF, Tamai K, Ichii M, Wu K. 2002. A rice mutant defective in active Si uptake. *Plant Physiology* 130: 2111-2117.
- 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, Mitani N. 2011. Transport of silicon from roots to panicles in plants. *Proceedings of the Japan Academy Series B* 87: 377-385.
- Ma JF, Yamaji N, Tamai K, Mitani N. 2007. Genotypic difference in silicon uptake and expression of silicon transporter genes in rice. *Plant Physiology* 145: 919-924.
- Ma JF, Yamaji N. 2006. Silicon uptake and accumulation in higher plants. *Trends in Plant Science*. 11: 392-7.
- Ma JF, Yamaji N. 2015. A cooperative system of silicon transport in plants. *Trends in Plant Science* 20: 399-462.
- Ma JF. 2004. Role of silicon in enhancing the resistance of plants to biotic and abiotic stresses. *Soil Science and Plant Nutrition* 50: 11-18.
- Ma, J.F., and Yamaji, N. 2008. Functions and transport of silicon in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65: 3049-3057.
- Mehrotra SC, Gupta P. 1990. Reduction of iron by leaf extracts and its significance for the assay of Fe(II) iron in plants. *Plant Physiology* 93: 1017-1020.
- Miller GW, Shigematsu A, Welkie GW, Motoji N, Szlek M. 1990. Potassium effect on iron stress in tomato. II. The effects on root CO<sub>2</sub>-fixation and organic acid formation. *Journal of Plant Nutrition* 13: 1355-1370.
- 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. *The Plant Cell* 21: 2133-2142.
- Mitani N, Ma JF, Iwashita T. 2005. Identification of silicon form in the xylem of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant and Cell Physiology* 46: 279-83.
- 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. *The Plant Journal* 66: 231-240.
- Mitani N, Yamaji N, Ma JF. 2009b. Identification of maize silicon influx transporters. *Plant and Cell Physiol* 50: 5-12.
- Mitani-Ueno N, Yamaji N, Ma JF. 2011. Silicon efflux transporters isolated from two pumpkin cultivars contrasting in Si uptake. *Plant Signaling and Behavior* 6: 991-4.

- Miyake Y, Takahashi E. 1983a. Effect of silicon on the growth of solution-cultured cucumber plant. *Soil Science and Plant Nutrition* 29: 71-83.
- Miyake Y, Takahashi E. 1983b. Effect of silicon on the growth of cucumber plant in soil culture. *Soil Science and Plant Nutrition* 29: 463-71.
- Montpetit J, Vivancos J, Mitani N, Yamaji N, Re´mus-Borel W, Belzile F, Ma JF, B´elanger RR. 2012. Cloning, functional characterization and heterologous expression of TaLsi1, a wheat silicon transporter gene. *Plant Molecular Biology* 79: 35-46
- Morrissey J, Baxter IR, Lee J, Li L, Lahner B, Grotz N, Kaplan J, Salt DE, Guerinota ML. 2009. The ferroportin metal efflux proteins function in iron and cobalt homeostasis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 21: 3326-3338.
- Morrissey J, Guerinot ML. 2009. Iron uptake and transport in plants: the good, the bad, and the ionome. *Chemical Reviews* 109: 4553-4567.
- Nanayakkara UN, Uddin W, Datnoff L. 2008. Application of silicon sources increases silicon accumulation in perennial ryegrass turf on two soil types. *Plant and Soil* 303: 83-94.
- Nikolic M, Nikolic N, Kostic L, Pavlovic J, Bosnic P, Stevic N, Savic J, Hristov N. 2016. The assessment of soil availability and wheat grain status of zinc and iron in Serbia: implications for human nutrition. *Science of the Total Environment* 553: 141-148.
- 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 Physiology* 143: 495-503.
- Nikolic M, Römheld V. 1999. Mechanism of Fe uptake by the leaf symplast: Is Fe inactivation in leaf a cause of Fe deficiency chlorosis? *Plant and Soil* 215: 229-237.
- Nikolic M, Römheld V. 2007. The dynamics of iron in the leaf apoplast. In: *The Apoplast of Higher Plants: Compartment of Storage, Transport and Reactions*, Netherlands: Springer, pp 353-371.
- Nozoye T, Nagasaka S, Kobayashi T, Takahashi M, Sato Y, Sato Y, Uozumi N, Nakanishi H, Nishizawa NK. 2011. Phytosiderophore efflux transporters are crucial for iron acquisition in graminaceous plants. *The Journal of biological chemistry* 286: 5446-5454.

- Ohwaki Y, Sugahara K. 1997. Active extrusion of protons and exudation of carboxylic acids in response to iron deficiency by roots of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant and Soil* 189: 49-55.
- Pavlovic J, Samardzic J, Kostic L, Laursen K.H, Natic M, Timotijevic G, Schjoerring JK, Nikolic M. 2016. Silicon enhances leaf remobilization of iron in cucumber under limited iron conditions. *Annals of Botany* 118: 271-280.
- Pavlovic J, Samardzic J, Maksimovic V, Timotijevic G, Stevic N, Laursen KH, Hansen TH, Husted S, Schjoerring JK, Liang Y, Nikolic M. 2013. Silicon alleviates iron deficiency in cucumber by promoting mobilization of iron in the root apoplast. *New Phytologist* 198: 1096-1107.
- 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.
- Pontigo S, Ribera A, Gianfreda L, de la Luz Mora M, Nikolic M, Cartes P. 2015. Silicon in vascular plants: uptake, transport and its influence on mineral stress under acidic conditions. *Planta* 242: 23-37.
- Prabagar S, Hodson MJ, Evans DE. 2011. Silicon amelioration of aluminium toxicity and cell death in suspension cultures of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *Environmental and Experimental Botany* 70: 266-276.
- Prychid CJ, Rudall PJ, Gregory M. 2004. Systematics and biology of silica bodies in monocotyledons. *The Botanical Review* 69: 377-440.
- Pushnik JC, Miller GW. 1989. Iron regulation of chloroplast photosynthetic function: mediation of PS I development. *Journal of Plant Nutrition* 12: 407-421.
- Rains DW, Epstein E, Zasoski RJ, Aslam M. 2006. Active silicon uptake by wheat. *Plant and Soil* 280: 223-228.
- Rombola AD, Brüggemann W, López-Millán AF, Abadía J, Tagliavini M, Marangoni B, Moog PR. 2002. Biochemical mechanisms of tolerance to Fe-deficiency on kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Tree Physiology* 22: 869-875.
- Ranieri A, Castagna A, Baldan B, Soldatini GF. 2001. Iron deficiency differently affects peroxidase isoforms in sunflower. *Journal of Experimental Botany* 52: 25-35.



- Raven JA. 1983. The transport and function of Si in plants. *Biological Reviews* 58: 179-207.
- Rellán-Álvarez R, Giner-Martínez-Sierra J, Orduna J, Orera I, Rodríguez-Castrillón JA, García-Alonso JI, Abadía J, Álvarez-Fernández A. 2010. Identification of a tri-iron(III), tri-citrate complex in the xylem sap of iron-deficient tomato resupplied with iron: new insights into plant iron long-distance transport. *Plant and Cell Physiology* 51: 91-102.
- Rellán-Álvarez R, Giner-Martínez-Sierra J, Orduna J, Orera I, Rodríguez-Castrillón JA, García-Alonso J, Abadía J, Álvarez-Fernández A. 2010. Identification of a Tri-Iron (III), Tri- Citrate complex in the xylem sap of iron-deficient tomato resupplied with iron: new insights into plant iron long-distance transport. *Plant and Cell Physiology* 51: 91-102.
- Richmond KE, Sussman M. 2003. Got silicon? The non-essential beneficial plant nutrient. *Current Opinion in Plant Biology*. 6: 268-72.
- Rodríguez-Celma J, Vázquez-Reina S, Orduna J, Abadía A, Abadía J, Álvarez-Fernández A, López-Millán AF. 2011. Characterization of flavins in roots of Fe-deficient strategy I plants, with a focus on *Medicago truncatula*. *Plant and Cell Physiology* 52: 2173-2189.
- Romero A, Munévar F, Cayón G. 2011. Silicon and plant diseases. A Review. *Agron Colomb* 29: 473-480.
- Römheld V, Marschner H. 1986. Mobilization of iron in the rhizosphere of different plant species. In: Tinker B, A. Läuchli A (eds.). *Advances in Plant Nutrition*, New York: Praeger Scientific 2: 155-204.
- Römheld V, Marschner H. 1983. Mechanisms of iron uptake by peanut plants: I. Reduction, chelate splitting, and release of phenolics. *Plant Physiology* 71: 949–954.
- Römheld V, Nikolic M. 2006. Iron. AV Barker, DJ Pilbeam (eds.) In: *Handbook of plant nutrition*. Boca Raton: CRC Press, 329-350.
- Römheld V, Schaaf G. 2004. Iron transport in plants: Future research in view of a plant nutritionist and a molecular biologist. *Soil Science and Plant Nutrition* 50: 1003-1012.

- Römheld V. 1990. The soil–root interface in relation to mineral nutrition. *Symbiosis* 9: 19-27.
- Römheld V. 1991. The role of phytosiderophores in acquisition of iron and other micronutrients in graminaceous species: An ecological approach. *Plant and Soil* 130: 159-166.
- Santi S, Schmidt W. 2009. Dissecting iron deficiency-induced proton extrusion in *Arabidopsis* roots. *New Phytologist* 183: 1072-1084.
- Sattelmacher B. 2001. The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. *New Phytologist* 149: 167-192.
- Savino G, Briat JF, Lobréaux S. 1997. Inhibition of the iron-induced ZmFer1 maize ferritin gene expression by antioxidants and serine/threonine phosphatase inhibitors. *Journal of Biological Chemistry* 272: 33319-33326.
- Schlee D, Reinbothe D, Fritsche W. 1968. Der Einfluß von Eisen auf den Purinstoffwechsel und die Riboflavinbildung von *Candida guilliermondii* (Cast.) Lang et G. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie* 8: 127-138.
- Schmid WE, Gerloff GC. 1961. A naturally occurring chelate of iron in xylem exudate. *Plant Physiology* 36: 226-231.
- Schmidke I, Kruger C, Frommichen R, Scholz G, Stephan UW. 1999. Phloem loading and transport characteristics of iron in interaction with plant-endogenous ligands in castor bean seedlings. *Physiologia Plantarum* 106: 82-89.
- Schmidt W. 1999. Mechanisms and regulation of reduction-based iron uptake in plants. *New Phytologist* 141: 1-26.
- Scholz G, Becker R, Pich A, Stephan UW. 1992. Nicotianamine: a common constituent of strategies I and II of iron acquisition by plants: a review. *Journal of Plant Nutrition* 15: 1647-1665.
- Scholz G. 1989. Effect of nicotianamine on iron-remobilisation in de-rooted tomato seedlings. *Biology of Metals* 2: 89-91.
- Schuler M, Rellán-Álvarez R, Fink-Straube C, Abadía J, Bauer P. 2012. Nicotianamine functions in the Phloem-based transport of iron to sink organs, in pollen development and pollen tube growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 24: 2380-400.

- Schwarz K. 1973. A bound form silicon in glycosaminoglycans and polyuronides. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 70: 1608-1612.
- Sevilla F, del Rio LA, Hellin E. 1984. Superoxide dismutases from a citrus plant: Presence of two iron-containing isoenzymes in leaves of lemon trees (*Citrus limonum* L.). Journal of plant physiology 116: 381-387.
- Shi R, Bäßler R, Zou C, Römheld V. 2011. Is iron phloem mobile during senescence in trees? A reinvestigation of Rissmüller's finding of 1874. Plant Physiology and Biochemistry 49: 489-493.
- Shi R, Weber G, Köster J, Reza-Hajirezaei M, Zou C, Zhang F, von Wirén N. 2012. Senescence-induced iron mobilization in source leaves of barley (*Hordeum vulgare*) plants. New Phytologist 195: 372-383.
- 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 and Soil 344: 319-333.
- Song AL, Li ZJ, Zhang J, Xue GF, Fan FL, Liang YC. 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. Journal of Hazardous Materials 172: 74-83.
- Spiller SC, Castelfranco AM, Castelfranco PA. 1982. Effects of iron and oxygen on chlorophyll biosynthesis. I. In vivo observations on iron and oxygen-deficient plants. Plant Physiology 69: 107-111.
- Stephan UW, Schmidke I, Stephan VW, Scholz, G. 1996. The nicotianamine molecule is made-to-measure for complexation of metal micronutrients in plants. BioMetals 9: 84-90.
- Stephan UW, Scholz G. 1990. Nicotianamine concentrations in iron sufficient and iron deficient sunflower and barley roots Journal of Plant Physiology 136: 631-634.
- Stephan UW, Scholz G. 1993. Nicotianamine: mediator of transport of iron and heavy metals in the phloem? Physiologia Plantarum 88: 522-529.

- Stevic N, Korac J, Pavlovic J, Nikolic M. 2016. Binding of transition metals to monosilicic acid in aqueous and xylem (*Cucumis sativus* L.) solutions: A low-T electron paramagnetic resonance study. *Biometals* 29: 945-951.
- Strasser O, Köhl K, Römheld V. 1999. Overestimation of apo- plastic Fe in roots of soil grown plants. *Plant and Soil* 210: 179-189.
- 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*. *Physiologia Plantarum* 159: 201-214.
- Susín S, Abián J, Sánchez-Beyes JA, Peleato ML, Abadía A, Gelpi E, Abadía J. 1996. Riboflavin 3'- and 5'-sulphate, two novel flavins accumulating in the roots of iron-deficient sugar beet (*Beta vulgaris*). *Journal of Biological Chemistry* 268: 20958-20965.
- Takahashi E, Ma JF, Miyake Y. 1990. The possibility of silicon as an essential element for higher plants. *Comments on Agricultural and Food Chemistry* 2: 99-102.
- Takahashi R, Ishimaru Y, Senoura T, Shimo H, Ishikawa S, Arao T, Nakanishi H, Nishizawa NK. 2011. The OsNRAMP1 iron transporter is involved in Cd accumulation in rice. *Journal of Experimental Botany* 62: 4843-4850.
- Tamai K, Ma JF. 2003. Characterization of silicon uptake by rice roots. *New Phytologist* 158: 431-436.
- Thomine S, Vert G. 2013. Iron transport in plants: better be safe than sorry. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 1-6.
- Thomine S, Wang R, Ward JM, Crawford NM, Schroeder JI. 2000. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 97: 4991-4996.
- Van der Vorm PDJ. 1980. Uptake of Si by five plant species, as influenced by variation in Si-supply. *Plant and Soil* 56: 153-156.
- Venkat-Raju K, Marschner H, Römheld V. 1972. Effect of iron nutritional status on iron uptake, substrate pH and production and release of organic acids and riboflavin by sunflower plants. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 132: 177-190.

- Vert G, Grotz N, Dedaldechamp F, Gaymard F, Guerinot ML, Briat JF, Curie C. 2002. IRT1, an Arabidopsis transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *The Plant Cell* 14: 1223-1233.
- von Wirén N, Klair S, Bansal S, Briat JF, Khodr H, Shioiri T, Leigh RA, Hider RC. 1999. Nicotianamine chelates both FeIII and FeII. Implications for metal transport in plants. *Plant Physiology* 119: 1107-1114.
- Vose PB. 1982. Iron nutrition in plants: a world overview. *Journal of Plant Nutrition* 5: 233-249.
- Walker E, Connolly EL. 2008. Time to pump iron: iron-deficiency-signaling mechanisms of higher plants. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 530-535.
- Wang Y, Stass A, Horst WJ. 2004. Apoplastic binding of aluminum is involved in silicon-induced amelioration of aluminum toxicity in maize. *Plant Physiology* 136: 3762-3770.
- Waters BM, Blevins DG, Eide DJ. 2002. Characterization of FRO1, a pea ferric-chelate reductase involved in root iron acquisition. *Plant Physiology* 129: 85-94.
- Waters BM, Chu HH, Didonato RJ, Roberts LA, Eislely 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 Physiology* 141: 1446-1458.
- Waters BM, Lucena C, Romera FJ, Jester GG, Wynn AN, Rojas CL, Alcantara E, Perez-Vicente R. 2007. Ethylene involvement in the regulation of the H<sup>+</sup>-ATPase *CsHAI* gene and of the new isolated ferric reductase *CsFRO1* and iron transporter *CsIRT1* genes in cucumber plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 293-301.
- Waters BM, Sankaran RP. 2011. Moving micronutrients from the soil to the seeds: Genes and physiological processes from a biofortification perspective. *Plant Science* 180: 562-574.
- Welch RM, Graham RD. 2004. Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. *Journal of Experimental Botany* 55: 353-364.
- Welch RM. 2002. The impact of mineral nutrients in food crops on global human health. *Plant and Soil* 247: 83-90.

- Welkie GW. 2000. Taxonomic distribution of dicotyledonous species capable of root excretion of riboflavin under iron deficiency. *Journal of Plant Nutrition* 23: 1819-1831.
- White PJ, Broadley MR. 2005. Biofortifying crops with essential mineral elements. *Trends Plant Science* 10: 596-593.
- 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 Phytologist* 182: 49-84.
- WHO, 2009. Recommendations on wheat and maize flour fortification. [http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/wheat\\_maize\\_fort.pdf](http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/wheat_maize_fort.pdf).
- Wickramasinghe DB, Rowell DL. 2006. The release of silicon from amorphous silica and rice straw in Sri Lankan soils. *Biology and Fertility of Soils* 42: 231-240.
- Wiese H, Nikolic M, Römheld V. 2007. Silicon in plant nutrition. In: Sattelmacher B, Horst WJ (eds.). *The apoplast of higher plants: compartment of storage. Transport and reactions*. Heidelberg: Springer, pp. 33–47.
- Wu JW, Shi Y, Zhu YX, Wang YC, Gong HJ. 2013. Mechanisms of enhanced heavy metal tolerance in plants by silicon: a review. *Pedosphere* 23: 815-825.
- Xiao H, Yin L, Xu X, Li T, Han Z. 2008. The iron-regulated transporter, MbNRAMP1, isolated from *Malus baccata* is involved in Fe, Mn and Cd trafficking. *Annals of Botany*. 102: 881-889.
- Xiong H, Kobayashi T, Kakei Y, Senoura T, Nakazono M, Takahashi H, Nakanishi H, Shen H, Duan P, Guo X, Nishizawa NK, Zuo Y. 2012. AhNRAMP1 iron transporter is involved in iron acquisition in peanut. *Journal of Experimental Botany* 63: 4437-46.
- Yamaguchi H, Uchida R. 2012. Determination of nicotianamine in soy sauce and other plant-based foods by LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 10000-10006.
- Yamaji N, Chiba Y, Mitani N, Ma JF. 2012. Functional characterization of a silicon transporter gene implicated in silicon distribution in barley. *Plant Physiology* 160: 1491-1497.
- Yamaji N, Ma JF. 2007. Spatial distribution and temporal variation of the rice silicon transporter Lsi1. *Plant Physiology* 143: 1306-1313.

- Yamaji N, Ma JF. 2011. Further characterization of a rice silicon efflux transporter, Lsi2. *Soil Science and Plant Nutrition* 57: 259-264.
- Yamaji N, Mitani N, Ma JF. 2008. A transporter regulating silicon distribution in rice shoots. *The Plant Cell* 20:1381-1389.
- Zhai Z, Gayomba SR, Jung H, Vimalakumari NK, Piñeros M, Craft E, Rutzke MA, Danku J, Lahner B, Punshon T, Guerinot ML, Salt DE, Kochian LV, Vatamaniuka OK. 2014. OPT3 is a phloem-specific iron transporter that is essential for systemic iron signaling and redistribution of iron and cadmium in Arabidopsis. *The Plant Cell* 26: 2249-2264.
- Zhang C, Römheld V, Marschner H. 1995. Retranslocation of iron from primary leaves of bean plants grown under iron deficiency. *Journal of Plant Physiology* 146: 268-272.
- Zhang C, Römheld V, Marschner H. 1996. Effect of primary leaves on <sup>59</sup>Fe uptake by roots and <sup>59</sup>Fe distribution in the shoot of iron sufficient and iron deficient bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants. *Plant and Soil* 182: 75-81.
- Zhang F, Römheld V, Marschner H. 1991. Role of the root apoplasm for iron acquisition by wheat plants. *Plant Physiology* 97: 1302-1305.
- Zhu ZJ, Wei GQ, Li T, Qian QQ, Yu JQ. 2004. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Science* 167: 527-533.

## Biografija autora



**Jelena Pavlović** rođena je u Beogradu 09.06.1983. godine, gde je završila osnovnu i srednju školu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu završila je 2010. godine. Diplomirala je na studijskoj grupi Ekologija i zaštita životne sredine sa opštim uspehom 9.40 i diplomskim radom „Klijavost semena vrsta *Brassica oleraceae* L. var. *capitata* L., *Lycopersicon lycopersicum* L. i *Medicago sativa* L. u stersnim uslovima“, koji je ocenjen najvišom ocenom (10.00) i time je stekla stručni naziv diplomirani biolog zaštite životne sredine. Doktorske studije na studijskom programu Biologija, modul Fiziologija i molekularna biologija biljaka, na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je 2010. godine. U zvanje istraživač-pripravnik izabrana je u decembru 2010. godine, a od početka 2011. godine zaposlena je u Institutu za multidisciplinarna istraživanja, gde započinje izradu svoje doktorske disertacije u okviru projekta osnovnih istraživanja 173028 “Mineralni stres i adaptacije biljaka na marginalnim poljoprivrednim zemljištima”. U januaru 2013. godine izabrana je u zvanje istraživač-saradnik. Oblast njenih istraživanja je fiziologija mineralne ishrane biljaka, sa posebnim interesovanjem za deficit mikroelementa i njihovu interakciju sa silicijumom. Kao autor ili koautor publikovala je 5 radova u časopisima sa SCI liste, od čega dva prvoautorska rada u međunarodnim časopisima izuzetnih vrednosti u oblasti biljnih nauka (*New Phytologist*, IF=7,210 i *Annals of Botany*, IF=3,982), koji su do sada citirani preko 50 puta (*Google Scholar*).



# Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Јелена Павловић

Број индекса Б3027/2010

## Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Улога силицијума у превазилажењу недостатка гвожђа код краставца

(*Cucumis sativus* L.)“

- 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, 13.02.2017.



---

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Павловић Јелена

Број индекса Б3027/2010

Студијски програм Биологија - Физиологија и молекуларна биологија биљака

Наслов рада “Улога силицијума у превазилажењу недостатка гвожђа ко краставца  
(*Cucumis sativus* L.)

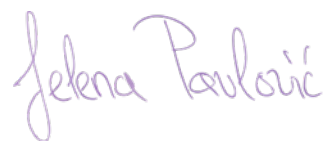
Ментор др Мирослав Николић, научни саветник, Институт за мултидисциплинарна  
истраживања, Универзитет у Београду

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, 13.02.2017.

---

## Изјава о коришћењу

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

„Улога силицијума у превазилажењу недостатка гвожђа код краставца

---

(*Cucumis sativus* L.)“

---

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, 13.02.2017.

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.