

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Vojin M. Tadić

UKLANJANJE FENOLA IZ OTPADNIH VODA  
SORTAMA ZELENE SALATE

*(Lactuca sativa L.)*

doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Vojin M. Tadić

REMOVAL OF PHENOL FROM  
WASTEWATER USING DIFFERENT  
VARIETIES OF LETTUCE  
(*Lactuca sativa* L.)

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

---

Dr Zlatko Giba, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet - mentor

---

Dr Marija Petrić, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, IBISS - mentor

---

Dr Zoran Vujčić, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet - član

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

*Ova disertacija urađena je u Odeljenju za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja »Siniša Stanković« Univerziteta u Beogradu.*

*Veliku zahvalnost za izradu ove doktorske disertacije dugujem svom mentoru dr Zlatku Gibi koji je svojim savetima doprineo osmišljavanju eksperimenata i tumačenju istih, kao i uobličavanju ove doktorske disertacije na samom kraju.*

*Svom mentoru dr Mariji Petrić dugujem iskrenu zahvalnost za nesebičnu pomoć prilikom eksperimentalnog rada, tumačenje rezultata i podrški koju mi je pružala dugi niz godina.*

*Iskrenu zahvalnost upućujem dr Zoranu Vujčiću koji je uvek bio prisutan kada je trebalo tumačiti rezultate ili probleme na koje sam nailazio.*

*Posebno se zahvaljujem dragoj kolegici dr Snežani Milošević, za predanu i nikad odbijenu pomoć prilikom niza godina koje sam proveo na IBISS-u, kao i za veliku podršku u eksperimentalnom određivanju antioksidativnih enzima, fotosintetičkih pigmenata kao i za transformaciju zelene salate.*

*Dr Martinu Rasporu zahvaljujem se za veliku pomoć prilikom tumačenja rezultata i statističke obrade podataka, a ni najmanje ne bih zanemario njegovo učešće u gramatičkim korekcijama ovog teksta.*

*Dr Aleksandru Cingelu zahvaljujem se za učestvovanje u eksperimentima koji se odnose na genetičke transformacije zelene salate kao i za aktivnu saradnju pri rešavanju tekućih problema iz date oblasti.*

*Kvantitativnu analizu koncentracije fenola u rastvoru uradile su kolege sa Instituta Mol, Stara Pazova, a ovom prilikom izdvojio bih prof. Iliju Brčeskog i mr Bojanu Stanimirović.*

*Dr Jovanu Tadiću dugujem zahvalnost za pomoć prilikom statističke obrade podataka.*

*Zahvalan sam i dr Angelini Subotić na podrški i korisnim sugestijama.*

*Veliku zahvalnost dugujem svojim bliskim kolegama iz JP EPS, a posebno mr Aleksandri Čanak-Nedić, dr Saši Miletiću i Mihajlu Gavriću, koji su mi pružali kontinuiranu podršku prilikom izrade ovog rada.*

*Veliku zahvalnost dugujem mojoj porodici i prijateljima na podrški koju su mi davali godinama unazad i sa mnom istrajali u dobrim i lošim trenucima, od kojih bih naročito istakao dr Anu Krivokuću.*

*Zahvaljujem se svim kolegama sa Odeljenja za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" koji su na bilo koji način učestvovali u izradi ove disertacije.*

# UKLANJANJE FENOLA IZ OTPADNIH VODA SORTAMA ZELENE SALATE

(*Lactuca sativa* L.)

## Rezime

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitivana je mogućnost uklanjanja fenola iz rastvora, korišćenjem različitih sorti zelene salate, sa ciljem njihove upotrebe u procesu fitoremedijacije. Ispitivano je 11 različitih sorti zelene salate, čija semena su klijala na podlogama sa različitim koncentracijama fenola ( $0-400 \text{ mgL}^{-1}$ ) tokom 20 dana. Pokazano je da dve sorte zelene salate mogu klijati na visokim koncentracijama fenola. Sorta Ljubljanska ledenka (LJL) klija na koncentraciji fenola do  $350 \text{ mgL}^{-1}$  i sorta Nansen (N) podnosi koncentraciju fenola do  $300 \text{ mgL}^{-1}$ . Dalja istraživanja aktivnosti antioksidativnih enzima peroksidaza (POX), katalaza (CAT), kao polifenol oksidaza (PPO) rađena su na klijancima koji su gajeni na inhibitronim koncentracijama fenola (IK50), odnosno onim koncentracijama fenola, specifičnim za svaku sortu, na kojima klija 50% semena. Rezultati su prikazani za četiri sorte zelene salate i pokazano je da je aktivnost POX relativno niska, dok je aktivnost CAT i PPO viša u odnosu na klijance koji su gajeni bez prisustva fenola. Uporedo je praćena i morfologija klijanaca koji su gajeni na IK50 fenola. Praćen je tempo uklanjanja fenola iz otpadne vode i analiziran je tokom gajenja odrasle zelene salate u hidroponičnim uslovima. Odabrane su dve sorte zelene salate (LJL i N) koje su pokazale najveću otpornost na prisustvo fenola, i gajene su na koncentraciji fenola u rastvoru od  $200 \text{ mgL}^{-1}$ . Ova koncentracija fenola je najviša koncentracija ispod IK50 na kojoj klija 100% semena. Pomenuta koncentracija fenola dodavana je u hidroponični rastvor na početku eksperimenta (početna koncentracija fenola) ili svaka dva dana tokom trajanja eksperimenta (konstantna koncentracija fenola). Praćena je promena koncentracije fenola u rastvoru posle 2, 4, 6, 8 i 10 dana gajenja, kao i aktivnost enzima (POX, CAT, SOD i PPO) u korenu i listovima zelene salate. Obe sorte zelene salate uklanjaju fenol iz rastvora za osam dana, a brzina uklanjanja fenola je veća kod sorte LJL u odnosu na sortu N. Fenol konstantne koncentracije biljke obe sorte nisu u mogućnosti da u potpunosti uklone, a kapacitet za uklanjanje fenola konstantne koncentracije gubi se posle osam dana gajenja. Kod svih ispitivanih enzima, osim POX, primećen je porast

aktivnosti tokom gajenja biljaka na fenolu. Pored promena u enzimskoj aktivnosti, primećena je promena u koncentraciji prolina, hlorofila, ukupnih pigmenata, kao i anatomiji korena zelene salate koja je gajena na fenolu. Uspešno je dobijena kultura *hairy roots* zelene salate genetičkom transformacijom pomoću *Agrobacterium rhizogenes* A4M70GUS, a najveći prinos biomase imala je linija Ljubljanska ledenka 18 (LJL18), koja je dalje gajena na različitim koncentracijama fenola u rastvoru, da bi se ispitala mogućnost fitoremedijacije pomoću kontinualne kulture korenova. Pokazano je da linija LJL18 uklanja fenol početne koncentracije od  $100 \text{ mgL}^{-1}$  iz rastvora za deset dana, dok kultura netransformisanih korenova iste sorte može ukoliniti najviše  $50 \text{ mgL}^{-1}$  fenola. Pored praćenja morfologije transformisanih korenova gajenih na fenolu, analizirana je i aktivnost enzima (POX, CAT, SOD i PPO) posle 2, 4, 6, 8 i 10 dana gajenja. Primećena je značajna promena u aktivnosti enzima tokom gajenja *hairy roots* na početnoj ili konstantnoj koncentraciji, kao i razlika u odnosu na netransformisane korenove podvrgunte istom tretmanu. Rezultati ove doktorske disertacije dokazuju da se zelena salata može uspešno koristiti za uklanjanje fenola iz otpadnih voda korišćenjem celih biljaka ili *hairy roots* kulture.

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Fiziologija biljaka

**UDK broj:** 581.1:635.52]:502.175:547.56(043.3)

Ključne reči: *Lactuca sativa* L., fenol, hidroponika, fitoremedijacija, *hairy roots*

# REMOVAL OF PHENOL FROM WASTEWATER USING DIFFERENT VARIETIES OF LETTUCE

*(Lactuca sativa L.)*

## Abstract

In this doctoral dissertation, the possibilities of use of various cultivars of lettuce have been investigated for removal of dissolved phenol in the process of phytoremediation. Seeds of 11 different cultivars of lettuce germinated on media with different phenol concentrations (0-400 mgL<sup>-1</sup>) over 20 days. It has been shown that seeds of two cultivars of lettuce can germinate even on high phenol concentrations: Seeds of Ljubljanska ledenka (LJL) can germinate on 350 mgL<sup>-1</sup>, while Nansen (N) tolerates as high as 300 mgL<sup>-1</sup>. Further investigation of antioxidant enzyme proxidases (POX), cataleses (CAT) and polyphenol oxidase (PPO) activity was carried out on seedlings grown on inhibitory concentrations of phenol (IC50), that is, the cultivar-specific concentration of phenol reducing the germination efficiency to 50% for the seeds of a given cultivar. Results are shown for four lettuce cultivars, revealing that POX activity is relatively low, while CAT and PPO activity show higher values compared to seedlings grown without phenol. Morphological features of seedlings grown on IC50 of phenol were also recorded. Dynamics of phenol removal from waste water were recorded in adult lettuce plants grown hydroponically. Two lettuce cultivars that showed the highest tolerance to phenol, were chosen for hydroponic growth at 200 mgL<sup>-1</sup> phenol, which is the highest concentration on which 100% germination has been recorded for these cultivars. This concentration of phenol was either established in the hydroponic solution once, at the beginning of the experiment (this was called the "starting phenol concentration") or maintained by supplying additional phenol to the solution every two days (which was called the "constant phenol concentration"). Changes in phenol concentration in the solution, as well as enzyme activity (POX, CAT, SOD and PPO) in lettuce roots and leaves were recorded after 2, 4, 6, 8 and 10 days of growth. Both lettuce cultivars are able to completely remove the starting concentration of phenol from the solution within eight days, the cultivar LJL being more efficient than N. Plants of both cultivars were unable to completely remove the phenol at constant concentration. Furthermore, they lost the capacity for removing constant concentrations of phenol after eight days. All the investigated enzymes except POX show a

trend of activity increase over the course of growth on media containing phenol. Beside changes in enzyme activity, changes in endogenous concentrations of proline, chlorophyll, total pigments, as well as changes in root anatomy of lettuce grown on phenol, were also recorded. A culture of lettuce *hairy roots* was successfully established with the use of *Agrobacterium rhizogenes* A4M70GUS, with the highest value for biomass yield being recorded for the clone Ljubljanska ledenka 18 (LJL 18), which was further cultivated on different concentrations of phenol in the solution, in order to investigate the potential of use of continuous root cultures for phytoremediation purposes. It has been shown that LJL18 can remove the 100 mgL<sup>-1</sup> starting concentration of phenol from the solution within 10 days, while the culture of non-transformed roots of the same cultivar can remove only 50 mgL<sup>-1</sup> phenol. Significant changes in POX, CAT, SOD and PPO activity were recorded over the course of *hairy roots* growth on starting or constant concentrations of phenol, as well as a difference in comparison to non-transformed roots growing in the same conditions. The results of this doctoral dissertation show that lettuce, either in the form of intact plants or *hairy roots* cultures, can be successfully used for removing phenol from waste waters.

**Scientific field:** Biology

**Specific scientific field:** Plant Physiology

**UDC number:** 581.1:635.52]:502.175:547.56(043.3)

**Key words:** *Lactuca sativa* L., phenol, hydroponic culture, phytoremediation, *hairy roots*



# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
1.1. Opšte karakteristike zelene salate ( <i>Lactuca sativa</i> L.)	1
1.1.1. Taksonomija roda <i>Lactuca</i>	1
1.1.2. Poreklo zelene salate	2
1.2. Hidroponično gajenje biljaka	4
1.2.1. Istorijat hidroponičnog gajenja biljaka	4
1.2.2. Hidroponično gajenje zelene salate	7
1.3. Fenol: fizičke i hemijske karakteristike i pregled mogućih načina uklanjanja	9
1.4. Oksidativni stres biljaka	13
1.4.1. Antioksidativni enzimi kod biljaka	16
1.4.1.1. Peroksidaze (POX, 1.11.1.x)	17
1.4.1.2. Katalaze (CAT, 1.11.1.6.)	18
1.4.1.3. Superoksid dismutaze (SOD, 1.15.1.1.)	19
1.4.2. Neenzimska komponenta antioksidativnog sistema biljaka	20
1.5. Polifenol oksidaze (PPO, 1.10.3.1.)	20
1.6. Genetičke transformacija biljaka pomoću <i>A. rhizogenes</i>	22
1.7. Fitoremedijacija	25
1.8. Proizvodnja <i>hairy roots</i> zelene salate i njihova potencijalna primena u procesu fitoremedijacije	26
<b>2. CILJEVI RADA</b>	<b>30</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE</b>	<b>31</b>
3.1. Biljni materijal	31
3.2. Priprema biljnog materijala za eksperimente <i>in vitro</i>	31
3.2.1. Hranljiva podloga za gajenje biljaka <i>in vitro</i>	32
3.2.2. Hranljiva pogloga za gajenje kultura <i>A. rhizogenes</i> A4M70GUS	33
3.3. Ispitivanje uticaja fenola na klijanje zelene salate	33
3.4. Gajenje u hidroponičnim uslovima	34
3.5. Ispitivanje uticaja fenola rastvorenog u vodi na rasteenje zelene salate	36
3.6. Anatomsko istraživanje korena	39
3.7. Određivanje sadržaja hlorofila i ukupnih pigmenata u listovima zelene salate	39
3.8. Analiza enzima	40
3.8.1. Izolovanje i određivanje ukupnih proteina	40
3.8.2. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze	41
3.8.3. Određivanje aktivnosti ukupnih katalaza	42
3.8.4. Određivanje aktivnosti ukupnih peroksidaza	43
3.8.4.1. Zimogramska detekcija peroksidaza	44
3.8.5. Određivanje aktivnosti polifenol oksidaze	44
3.8.5.1. Zimogramska detekcija polifenol oksidaze	45
3.9. Određivanje koncentracije prolina	46
3.10. Određivanje koncentracije fenola rastvorenog u vodi	46
3.11. Transformacija zelene salate pomoću <i>Agrobacterium rhizogenes</i> A4M70GUS	47

3.11.1. Priprema <i>A. rhizogenes</i> i indukcija <i>hairy roots</i>	47
3.11.2. Određivanje selektivne koncentracije kanamicina	48
3.11.3. Transformacija biljaka pomoću <i>A. rhizogenes</i> A4M70GUS	49
3.11.4. Histochemijski GUS test	49
3.11.5. PCR analiza	49
3.11.6. Elektroforeza DNK	51
3.11.7. Ispitivanje uticaja fenola na rast transgenih korenova zelene salate	52
3.12. Statistička obrada podataka	52
3.13. Grafička obrada podataka	52
<b>4. REZULTATI</b>	<b>53</b>
4.1. Zelena salata gajena <i>in vitro</i>	53
4.2. Klijanje semena različitih sorti zelene salate na rastućim koncentracijama fenola	53
4.3. Određivanje aktivnosti enzima kod klijanaca različitih sorti zelene salate gajenih na inhibitornim koncentracijama fenola	56
4.3.1. Analiza aktivnosti peroksidaza kod klijanaca različitih sorti zelene salate gajenih na inhibitornim koncentracijama fenola	56
4.3.2. Analiza aktivnosti katalaza kod klijanaca različitih sorti zelene salate gajenih na inhibitornim koncentracijama fenola	58
4.3.3. Aktivnost PPO kod različitih sorti zelene salate određena različitim supstratima	60
4.3.4. Analiza aktivnosti polifenol oksidaza kod klijanaca različitih sorti zelene salate gajenih na inhibitornim koncentracijama fenola	61
4.4. Morfološke karakteristike klijanaca različitih sorti zelene salate tokom klijanja na fenolu	63
4.5. Gajenje različitih sorti zelene salate na odabranoj koncentraciji fenola u hidroponičnim uslovima	64
4.5.1. Morfološke karakteristike različitih sorti zelene salate tokom gajenja na početnoj i konstantnoj koncentraciji fenola	65
4.5.2. Promena koncentracije fenola u hidroponičnom rastvoru tokom gajenja različitih sorti zelene salate	66
4.5.3. Određivanje aktivnosti enzima kod različitih sorti zelene salate gajenih na početnoj i konstantnoj koncentraciji fenola	72
4.5.3.1. Analiza aktivnosti peroksidaza kod različitih sorti zelene salate gajenih na početnoj i konstantnoj koncentraciji fenola	72
4.5.3.2. Analiza aktivnosti katalaza kod različitih sorti zelene salate gajenih na početnoj i konstantnoj koncentraciji fenola	75
4.5.3.3. Analiza aktivnosti PPO kod različitih sorti zelene salate gajenih na početnoj i konstantnoj koncentraciji fenola	78
4.5.3.3.1. Analiza aktivnosti PPO kod različitih sorti zelene salate gajenih na početnoj i konstantnoj koncentraciji fenola određivane uz pomoć L-DOPA kao supstrata	78
4.5.3.3.2. Analiza aktivnosti PPO kod različitih sorti zelene salate gajenih na početnoj i konstantnoj koncentraciji fenola određivane pomoću supstrata 4-MC	81

4.5.3.4. Analiza aktivnosti superoksid dismutaze kod različitih sorti zelene salate gajenih na početnoj i konstantnoj koncentraciji fenola	84
4.5.4. Zimogramska detekcija peroksidaza i polifenol oksidaze kod različitih sorti zelene salate gajenih na početnoj i konstantnoj koncentraciji fenola	87
4.5.5. Sadržaj prolina kod različitih sorti zelene salate gajenih na početnoj i konstantnoj koncentraciji fenola	89
4.5.6. Morfološke promene zelene salate gajene na početnoj koncentraciji fenola	90
4.5.6.1. Koren različitih sorti zelene salate gajenih na početnoj koncentraciji fenola	90
4.5.6.2. Anatomska istraživanja korena različitih sorti zelene salate gajenih na početnoj koncentraciji fenola	93
4.5.6.3. Izgled rozete različitih sorti zelene salate gajenih na početnoj koncentraciji fenola	96
4.5.6.3.1. Određivanje sadržaja hlorofila a i b i ukupnih pigmentata kod biljaka gajenih na početnoj koncentraciji fenola	97
4.6. Transformacija različitih sorti zelene salate uz pomoć <i>A. rhizogenes</i>	98
4.6.1. Histoemijski GUS test	101
4.6.2. PCR analiza	102
4.6.3. Formiranje tečne kulture transformisanih korenova i ispitivanje uklanjanja fenola iz rastvora	104
4.6.4. Aktivnost enzima kod transformisanih korenova zelene salate sorte Ljubljanska ledenka tokom gajenja na početnoj i konstantnoj koncentraciji fenola	111
4.6.4.1. Aktivnost peroksidaza kod transformisanih korenova zelene salate sorte Ljubljanska ledenka tokom gajenja na početnoj i konstantnoj koncentraciji fenola	111
4.6.4.2. Aktivnost katalaza kod transformisanih korenova zelene salate sorte Ljubljanska ledenka tokom gajenja na početnoj i konstantnoj koncentraciji fenola	112
4.6.4.3. Aktivnost polifenol oksidaza kod transformisanih korenova zelene salate sorte Ljubljanska ledenka tokom gajenja na početnoj i konstantnoj koncentraciji fenola	113
4.6.4.4. Aktivnost superoksid dismutaze kod transformisanih korenova zelene salate sorte Ljubljanska ledenka tokom gajenja na početnoj i konstantnoj koncentraciji fenola	114
<b>5. DISKUSIJA</b>	<b>116</b>
5.1. Zelena salata <i>in vitro</i>	116
5.2. Klijanje semena različitih sorti zelene salate na rastućim koncentracijama fenola sa praćenjem aktivnosti antioksidativnih enzima i PPO	117
5.3. Gajenje zelene salate na odabranoj koncentraciji fenola sa praćenjem aktivnosti antioksidativnih enzima i PPO	121
5.4. Neenzimska komponenta antioksidativne zaštite kod zelene salate gajene na fenolu: prolin i fotosintetički pigmenti	131
5.5. Promena koncentracije fenola u rastvoru prilikom gajenja zelene salate	134
5.6. Analiza moguće primene zelene salate za uklanjanje fenola iz otpadnih voda	135

5.7. Anatomska istraživanja korena zelene salate gajene na početnoj koncentraciji fenola	136
5.8. Transformacija korenova zelene salate uz pomoć <i>A. rhizogenes</i> , uklanjanje fenola uz pomoć <i>hairy roots</i> i analiza antioksidativnih enzima i PPO iz rastvora	137
5.9. Analiza moguće primene transformisanih korenova za uklanjanje fenola iz otpadnih voda	144
<b>6. ZAKLJUČCI</b>	<b>145</b>
<b>7. LITERATURA</b>	<b>147</b>
<b>8. BIOGRAFIJA AUTORA</b>	<b>180</b>

## SKRAĆENICE

APX	askorbat peroksidaza
BAP	6-benzilaminopurin
BSA	bovin serum albumin
CAT	katalaze
CBB	komazi plavo boja
CH	kazein hidrolizat
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
2,4-D	2,4-dihlorofenoksi sirćetna kiselina
DTT	ditriotreitol
EDTA	etilendiamintetrasirćetna kiselina
FAA	formalin acetoacid etil alkohol
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	vodonik peroksid
IAA	indol-3-sirćetna kiselina
IBA	indol-3-buterna kiselina
IEF	izoelektrično fokusiranje
KIN	kinetin, 6-furfurilaminopurin
MS	Murashige i Skoog podloga
NAA	α-naftil sirćetna kiselina
NBT	nitroblu tetrazolium hlorid
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	singlet kiseonik
O <sub>2</sub> <sup>-·</sup>	superoksid anjon radikal
OH <sup>·</sup>	hidroksil radikal
POX	peroksidaze
PMSF	fenilmetilsulfonil fluorid
PVPP	polivinilpirolidon
ROS	reaktivne kiseonične vrste
RO <sub>2</sub> <sup>·</sup>	peroksil radikal
SOD	superoksid dismutaza
TEMED	tetrametiletildiamin
TDZ	tidiazuron
TRIS	tris (hidroksimetil) aminometan

## 1. UVOD

### 1.1. Opšte karakteristike zelene salate (*Lactuca sativa* L.)

Zelena salata se smatra jednim od najvažnijih pripadnika grupe zeljastog/lisnatog povrća koje se koristi u ljudskoj ishrani. Na listi koja sadrži 39 vrsta voća i povrća, koje se najčešće koristi u ljudskoj ishrani, zauzima 26. mesto po svojoj nutritivnoj vrednosti, dok se na četvrtom mestu nalazi po zastupljenosti i učestalosti upotrebe u ishrani (Khazei i sar. 2013). Uzgaja se zbog produkcije lisnatog dela biljke koji se koristi za jelo, a pored toga gaji se i zbog dobijanja izdanaka i semena za dalju proizvodnju. Sadrži velike količine vitamina A, kalcijuma i gvoždja, kao i biljnih vlakana (Khazei i sar. 2013), koja ubrzavaju i poboljšavaju crevnu peristaltiku. Nutricionisti je često prepisuju osobama sa koje imaju problem sa gojaznošću jer ima nisku kalorijsku vrednost (Niederwieser 2001; Maboko 2007).

Uglavnom se konzumira u svežem stanju kao deo salata, ali postoje i neke sorte koje se mogu kuvati ili grilovati (Rubatzky i Yamaguchi 1997; Lebeda i sar. 2007). Zelena salata se proizvodi u mnogim zemljama širom sveta. Vrlo je rasprostranjena kao povrtarska kultura u baštama, platenicima ili staklenicima (Rubatzky i Yamaguchi 1997). Smatra se veoma važnom komercijalnom, ratarskom kulturom u Aziji, SAD, Španiji, Italiji i Indiji, koji ujedno spadaju i u najveće proizvodjače zelene salate u svetu (Lebeda i sar. 2007; Mou 2008). Različite autohtone vrste i lokalni varijeteti se proizvode u različitim geografskim regionima. Takođe, širok spektar autohtonih vrsta i starih varijeteta (sorti) se čuva u svetskoj banci gena (Lebeda et al. 2007). Konvencionalnim i modernim metodama ukrštanja proizvode se nove sorte koje bi trebalo da zadovolje posebne potrebe, kako proizvodjača, tako i potrošača.

#### 1.1.1. Taksonomija roda *Lactuca*

Rod *Lactuca* pripada familiji glavočika - *Asteraceae* (*Compositae*), najvećoj familiji dikotiledonih biljaka (Judd i sar. 1999; Funk i sar. 2005). Podfamilija *Lactuceae* (*Cichlorioideae*), kojoj pripada zelena salata, verovatno je najpoznatija i najprepoznatljivija

grupa u okviru familije *Asteraceae* (Tomb 1977). Na osnovu dostupne literature, rod *Lactuca* sadrži oko 100 poznatih vrsta, pri čemu broj vrsta, varira od autora do autora (Ferakova 1977; Meusel i Jager 1992; Bremer i sar. 1994; Lebeda 1998; Lebeda i Astley 1999; Lebeda i sar. 2004a, Lebeda i sar. 2007).

### 1.1.2. Poreklo zelene salate

Poreklo zelene salate vezuje se za regione današnjih država Egipta i Irana. Mnogi divljji tipovi pripadnici roda *Lactuca* i danas se mogu naći na prostoru između Tigra i Eufrata (Zohary 1991).

U drevnom Egiptu zelenu salatu su prvobitno koristili za dobijanje semena, bogatog uljem, dok je u kasnijem periodu došlo do uzgajanja radi dobijanja sočnih listova za jelo (Katz i Weaver 2003). Najranije pominjanje uzgajanja zelene salate vezuje se za 2690. godinu p.n.e (Weaver 1997). Uzgajanje zelene salate širi se na drevnu Grčku i Rimsko carstvo gde je nazivana *Lactuca* (lac-mleko, *lat.*) zbog bele supstance, kasnije nazvane *latex*, koja se luči iz zasečenih izdanaka (Weaver 1997). Ovo ime je iskorišćeno za ceo rod, dok je *sativa* (zasejana ili pripitomljena) dodana za naziv vrste (Katz i Weaver 2003). Zelena salata, kao vrsta, je prvi put opisana 1753. od strane Karl Linea (Linneaus 1753).

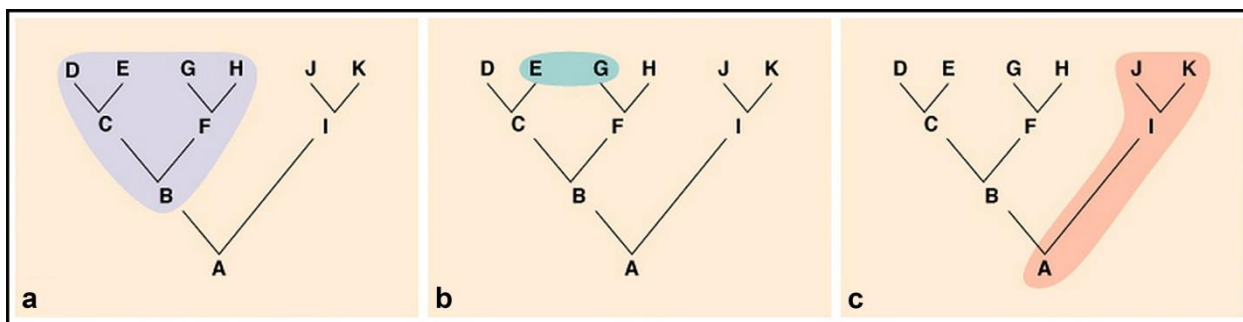
Genski pul *L. sativa* potiče od različitih kultivara, autohtonih vrsta i divljih sorti koje su se u prošlosti ukrštale međusobno. Poznati su primeri ukrštanja *L. serriola* sa *L. aculeata*, *L. scarioloides*, *L. azerbaijanica*, *L. georgic* i *L. altaica* sa prebivalštem u Aziji, kao i sa *L. dregeana* iz Južne Afrike (Zohary 1991). Pored ovih ukrštanja u okviru primarnog genskog pula posle kojih se dobijaju vijabilne biljke, postoje i vrste koje pripadaju sekundarnom (*L. saligna*) i tercijarnom genskom pulu (*L. virosa* i neke druge divlje vrste) koje se teško mogu ukrštati sa *L. sativa* usled nekompatibilnosti hromozoma i dobijanja fertilnih biljaka u sledećoj generaciji (DeVries 1990; van Soest, Boukema 1997; Lebeda et al. 2002, Lebeda et al. 2007).

Noviji dokazi ukazuju da je poreklo zelene salate polifiletsko, odnosno da svi članovi taksona nemaju jednog, već više različitih predaka (DeVries 1997). Šematski prikaz

najverovatnijeg nastanka taksona današnje zelene salate prikazan je na Slici 1b. Pojava savremene zelene salate je posledica selektivnog ukrštanja od strane čoveka, u koje su bili uključeni geni poreklom od *L. serriola* (Lindqvist 1960).

Vrstu *L. sativa* karakterišu visok morfološki i genetički diverzitet, nastali kao rezultat polifiletskog porekla, kombinovanog sa kompleksnim procesom domestifikacije (Kesseli et al. 1991). Pregled različitih sorti zelene salate i njihovu klasifikaciju izvršio je Rodenburg (1960). Dopunu taksonomije i fenotipske analize sorti zelene salate izvršili su De Vries i van Raamsdonk (1994), DeVries (1997) i Mou (2008) koji su vrstu *L. sativa* podelili na sedam morfotipova.

Pored nesporne, već opisane uloge, koju zelena salata ima u ekonomskom, nutritivnom i sistematskom smislu za čoveka, postoje podaci o usvajanju teških metala iz zemljišta i vode i njihovoj akumulaciji u listovima ove biljke (Zhenyan i sar. 2005; Benzarti i sar. 2008; Lamb i sar. 2010). Istraživanja koja su rađena u okviru pomenutih radova, a i šire, najviše se tiču mogućnosti uklanjanja teških metala iz industrijski zagađenih područja u kojima su najviše zastupljeni Cd, Hg i Pb. Podataka o usvajanju i eventualnom polimerizovanju fenola od strane zelene salate nema.



Slika 1. Glavni načini nastanka taksona zelene salate a) monofiletski; b) polifiletski; c) parafiletski. Preuzeto sa [https://www.mun.ca/biology/scarr/Taxon\\_types.htm](https://www.mun.ca/biology/scarr/Taxon_types.htm)



## **1.2. Hidroponično gajenje biljaka**

Po definiciji hidroponično gajenje biljaka ili hidroponika je termin koji označava gajenje biljaka u tečnom hranljivom medijumu sa, ili bez, korišćenja dodatnih potpornih materijala. Kao potporni, noseći materijal najčešće se koriste ekspanzirana glina, kvarcni kamen, perlit, vermikulit, vlakna kokosove ljuske, kamena vuna i dr.

Hidroponika je danas prepoznata kao značajan metod za intenzivnu proizvodnju nekih povrtarskih kultura (paradajz, zelena salata, krastavac i paprika). Na ovaj način moguće je proizvoditi i druge vrste povrća, neke vrste ukrasnih i lekovitih biljaka.

### **1.2.1. Istorijat hidroponičnog gajenja biljaka**

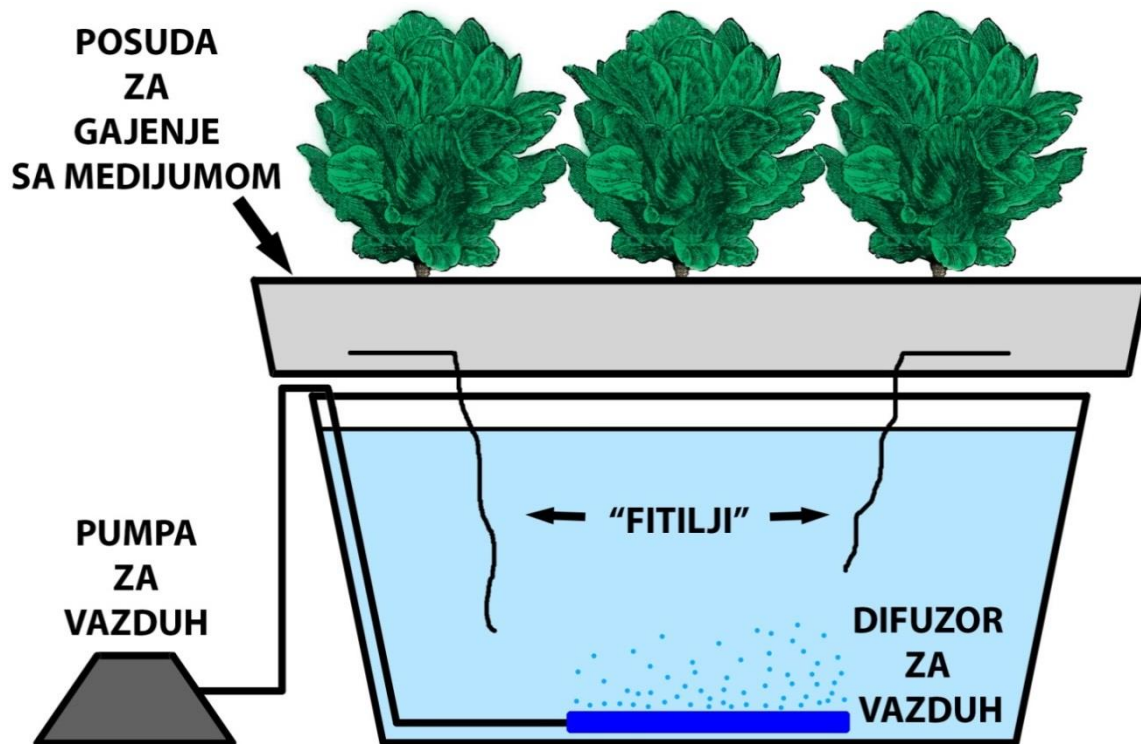
Reč hidroponika potiče od dve grčke reči: *hidro* što znači voda i *ponos* što znači rad. Ova reč je prvi put ušla u zvaničnu terminologiju 1929. godine, a uvedena je od strane dr William Frederick Gericke, profesora sa Berkeley, Univerziteta iz Kalifornije (SAD). Dr William se smatra rodonačelnikom hidroponičnog gajenja biljaka, a upotrebio je ovu tehniku gajenja za proizvodnju biljaka u komercijalne svrhe (Dunn 1929; Thiyagarajan i sar. 2007). Vojska SAD je koristila ovu metodu za uzgoj svežeg povrća namenjenog ishrani vojnika na Pacifičkim ostrvima, tokom Drugog svetskog rata. Do 1950. godine razvoj farmi koje primenjuju ovu metodu širi se i na Evropu, Afriku i Aziju.

Prednosti hidroponskog gajenja u odnosu na klasično gajenje biljaka su:

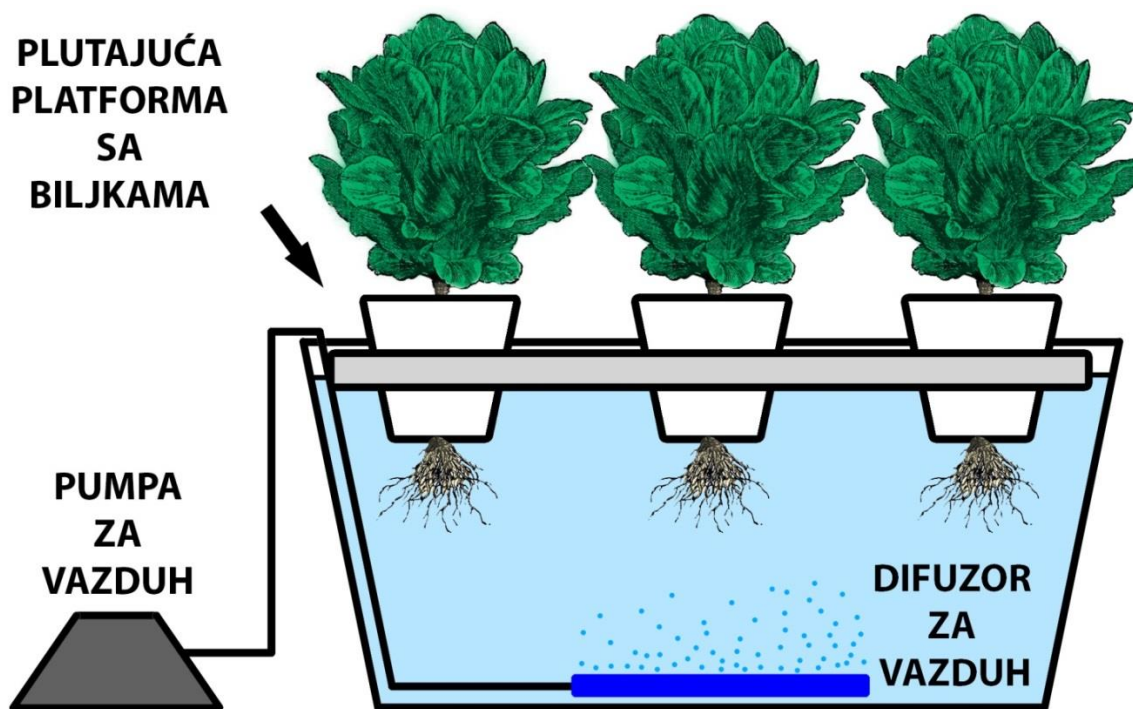
1. Mogućnost korišćenja i na mestima gde je onemogućeno gajenje biljaka tradicionalnim metodama na čvrstom zemljištu (suvi pustinjski predeli ili hladni klimatski regioni).
2. Veoma dobra kontrola nutritivnog sastava medijuma, pH vrednosti i drugih faktora sredine.
3. Snižena potrošnja vode i nutrijenata zbog unutrašnjeg reciklažnog sistema.

4. Ubrzano rastenje povezano sa povišenom koncentracijom kiseonika u hidroponičnom rastvoru koji je mnogo dostupniji korenovom sistemu u odnosu na klasično gajenje biljaka.
5. Eliminacija, odnosno redukcija prisustva insekata, gljiva i bakterija prisutnih u zemljištu.
6. Veći prinosi.
7. Odsustvo potrebe za suzbijanjem korova i pripreme zemljišta.
8. Olakšana manipulacija biljkama tokom sađenja, pripreme rastvora i berbe što olakšava uslove rada, a time i smanjuje troškove proizvodnje.
9. Odsustvo potrebe za rotacijom useva.

Osnovna podela hidroponskih sistema odnosi se na tečne sisteme i tečne sisteme sa agregatima. Kod tečnih sistema nema potpornih struktura korenu biljaka koje se gaje, dok kod tečnih sistema sa agregatima čvrsti materijal daje mehaničku potporu biljci, odnosno samom korenu. Hidroponični sistemi mogu biti otvoreni (rastvor sa nutrijentima se ne koristi ponovo) ili zatvoreni (višak rastvora se sakuplja, osvežava nedostajućim nutritivnim komponentama i reciklira). U odnosu na dopremanje i protok rastvora sa nutrijentima hidroponični sistem može biti pasivan ili aktivan. Pasivni sistemi koriste takozvane fitilje pomoću kojih dopremaju tečni rastvor koristeći jake kapilarne sile. Ovaj sistem omogućava dopremanje vode do korenovih sistema gajenih biljaka. Smatra se najjednostavnijim sistemom za hidroponično gajenje biljaka (Slika 2). Necirkulišući pasivni sistem može biti i hidroponično gajenje biljaka na stiropornom “splavu” sa korenovima uronjenim u rastvor (Kratky 2010). Aktivni sistemi omogućavaju cirkulaciju rastvora sa nutrijentima između korenova biljaka koje se uzgajaju. Aktivnih sistema ima više vrsta od kojih je najpopularniji sistem vodene kulture koji je ujedno i najjednostavniji aktivni hidroponski sistem, a podrazumeva platformu na kojoj se gaje biljke koja omogućava plutanje biljaka na površini rastvora za gajenje. Najčešće je u pitanju platforma od polistirena. Pumpa za vazduh doprema kiseonik u rastvor kroz adekvatan raspršivač (Slika 3).



Slika 2. Primer pasivnog hidroponičnog sistema za gajenje biljaka sa fitiljima za dopremanje rastvora do korenovog sistema



Slika 3. Primer najjednostavnijeg aktivnog hidroponskog Sistema

### 1.2.2. Hidroponično gajenje zelene salate

Metod za hidroponično gajenje zelene salate razvijen je pre 30 godina na Univerzitetu u Arizoni i podrazumevao je klijance zelene salate koji su postavljani na stiroporske splavove sa uronjenim korenovima u aerisani rastvor za gajenje. Ovaj sistem je dobio ime “Deep Flow Hydroponics” (Jensen i Collins 1985). Originalni sistem za gajenje zelene salate je do danas pretrpeo više različitih modifikacija, pa je danas prisutan veliki broj različitih hidroponskih modela za komercijalno gajenje ove biljke, ali je osnovni sistem za hidroponično gajenje i danas u upotrebi širom sveta.

Da bi se zelena salata uspešno uzgajala u hidroponičnom sistemu, neophodno je zadovoljiti nekoliko preduslova koji se donose na njene fiziološke karakteristike.

Zelena salata je biljka kratkog vegetacionog perioda od 50 do 120 dana (Lorenz i Maynard 1988), koji zavisi od tipa, sorte, sezone i uslova gajenja. Rastenje i razviće odvija se na temperaturama od 7 do 24 °C sa prosečnom temperaturom oko 18 °C (Lorenz i Maynard

1988). Rayder (1999) i Jenni (2005) pokazali su da gajenje salate na temperaturama preko 24 °C dovodi do ubrzanog cvetanja, kao i do produkcije niskokvalitetne lisne mase. U kontrolisanim uslovima, najpovoljnija temperatura za klijanje je između 12 i 15 °C. Tokom sađenja i ukorenjavanja zelene salate, optimalna temperatura je između 12 i 14 °C, da bi do kraja vegetativnog perioda trebalo obezbediti temperaturu zemljišta (rastvora) do 15 (8) °C tokom dana i 4-8 °C nižu temperaturu tokom noći. Na višim temperaturama rastvorljivost kiseonika je umanjena, a na nižim metabolička aktivnost korenova je usporena.

Moniruzzaman (2006) pokazao je da je gustina sađenja zelene salate važan faktor koji može uticati na prinos i kvalitet biljaka gajenih na zemljištu. Optimalna gustinja sadnica obezbeđuje ujednačen i adekvatan rast kroz efikasno korišćenje vlage, nutrijenata i svetla što dovodi do maksimalnog prinosa zelene salate (Firoz i sar. 2009). Povećanje rastojanja između pojedinačnih biljaka dovodi do povećanja mase biljaka, broja i dužine listova i sveže i suve mase listova. Povećanje rastojanja među biljkama dovodi do pomenutih poboljšanja, ali je i preveliko rastojanje među sadnicama podjednako loše.

Istraživanja su pokazala da optimalno rastojanje za gajenje zelene salate u hidroponičnom sistemu iznosi 10 x 20 cm (50 biljaka po m<sup>2</sup>) (Maboko MM i Plooy CP 2009). Prinos zelene salate, u slučaju optimalnog razmaka među salatama, zavisi od varijeteta koji se gaji, a dostiže vrednost od 2905 g/m<sup>2</sup>/mesečno do 5948 g/m<sup>2</sup>/mesečno tokom prvih mesec dana gajenja (Maboko MM i Du Plooy CP 2009).

Nedostatak rastvorenog kiseonika dovodi do smanjene deobe ćelija korena kao i do njegove usporene elongacije (Atwell i sar. 1985; Gimenez-Abian i sar. 1987), što dovodi do smanjenog usvajanja vode (Yoshida i sar. 1996). Gajenjem zelene salate u rastvoru sa smanjenom koncentracijom rastvorenog kiseonika, primećena je i smanjena respirativna aktivnost korena (Chun i Takakura 1994), pad vodnog potencijala lista, provodljivosti stoma (Neuman i Smith 1991, Smit i sar. 1989) i gubitka turgora u listovima što dovodi do njihovog smanjenog rasta i razvoja (Lockhart 1965).

S obzirom na to da komercijalno gajenje zelene salate podrazumeva visok prinos biomase visokokvalitetnih listova neophodno je koristiti adekvatne mineralne soli za hidroponični

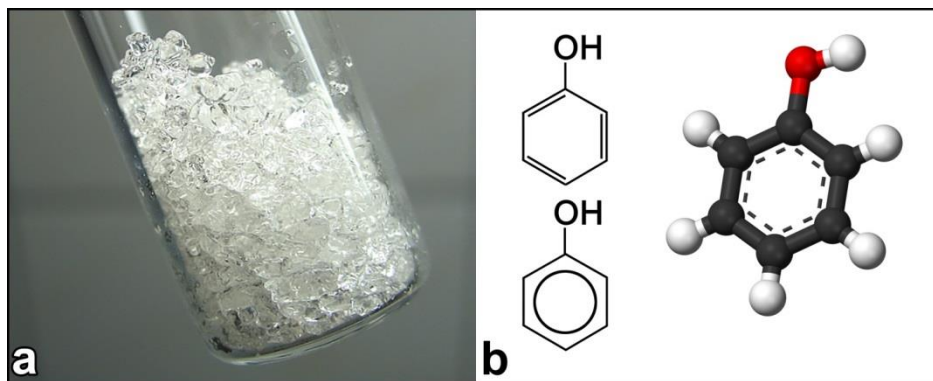
rastvor. Rastvori sa mineralnim solima koji pospešuju vegetacionu fazu biljaka sadrže više azota od onih koji pospešuju cvetanje. Obično se koristi sa N-P-K (azot-fosfor-kalijum) mineralni rastvor sa odnosom 3-5-1 (Miladinović i sar. 1997). Najpoželjnija forma u kojoj se koristi azot u hidroponičnom rastvoru je nitratna, dok se azot u formi amonijum jona može koristiti najviše od 3 do 10 %. Azot iz amonijum jona, zastupljen preko 10 % u rastvoru, ubrzano se apsorbuje, dovodi do ubrzanog rasta i naglog “bujanja” salata, što uzrokuje pojavu mekih, prozračnih listova slabe mehaničke strukture i bržeg umiranja biljke. Azot, u formi nitrata, sporije se apsorbuje i dovodi do jačih, čvršćih i zdravijih listova. Za optimalni rast zelene salate neophodno je koristiti čistu vodu, meke tvrdoće sa nižom koncentracijom mineralnih soli i veoma niskim sadržajem natrijuma (Miladinović i sar. 1997). Zelena salata najbolje raste u slabo kiselom rastvoru, pH od 5,8 do 6,4. Optimalan pH je 6,0. Rastvor u kome se gaji zelena salata mora se kontinuirano menjati i dopunjavati mineralnim solima i ukoliko se gaji u manjim, zatvorenim prostorima, kompletnu zapreminu rastvora treba menjati na 10 do 14 dana. Za obrazovanje kvalitetnih i dobro razvijenih rozeta zelene salate, neophodna je dužina dana od 10 do 12 sati, a kod letnjih sorti čak od 12 do 16 sati.

Vlažnost sredine u kojoj se gaji zelena salata je takođe važan preduslov koji mora biti obezbeđen. Ukoliko je vlažnost vazduha prevelika dolazi do sušenja vrhova listova zelene salate usled nemogućnosti apsorpcije kalcijuma, pa čak i ako je koncentracija kalcijumovih jona visoka, jer je za optimalnu apsorpciju kalcijuma neophodan proces transpiracije koji je moguć samo u uslovima idealne vlažnosti koja iznosi 40-60% (Yang i Jie 2005). Povećana vlažnost vazduha dovodi i do povećane mogućnosti za gljivične infekcije. Preterana vlaga, a naročito zadržavanje vode pri dnu rozete može dovesti do truljenja listova (Miladinović i sar. 1997).

### **1.3. Fenol: fizičke i hemijske karakteristike i pregled mogućih načina uklanjanja**

Fenol, ranije poznat kao karbolna kiselina, je aromatično, organsko jedinjenje, molekulske formule  $C_6H_5OH$ . To je bela, kristalna, čvrsta (Slika 4 a) i lako isparljiva supstanca. Molekul fenola sastavljen je od fenil grupe ( $-C_6H_5$ ) za koju je vezana hidroksilna grupa (-

OH) (Slika 4 b). Rastvorljivost fenola u vodi je 8,42 g na 100 ml vode (0.88 M). U vodenim rastvorima ponaša se kao kiselina umerene jačine. Rad sa fenolom zahteva pažnju jer u kontaktu sa kožom izaziva hemijske opekotine.



Slika 4. Fenol a) kristalna struktura; b) strukturna formula

Iako je prvobitno izolovan iz katrana, danas se proizvodi iz sirove nafte, zahvaljujući razvoju petrohemijske industrije, i dostiže 7 milijardi kg/god (Jordan i sar. 2002). Fenol je važno jedinjenje u industriji, najčešće kao prekursor u proizvodnji različitih materijala (Weber i sar. 2004) od kojih najčešće u proizvodnji plastičnih materijala i sličnih proizvoda. Takodje, fenol i njegovi derivati su ključne komponente i u proizvodnji polikarbonata, epoksida, bakelita, najlona, deterdženata, herbicida (grupa fenil herbicida) i lekova (aspirin). Upotrebljava se i kao oralni anestetik/analgetik u proizvodima kao što je *Chloraseptic*, kao sredstvo za ublažavanje posledica faringitisa.

Povećana proizvodnja plastike, boja, pesticida i drugih hemikalija dovela je do nagomilavanja opasnog hemijskog otpada u koji spadaju fenolna jedinjenja. Fenolna jedinjenja su prisutna i lako se mogu detektovati u otpadnim vodama različitih industrija: koksa (28–3900 mg L<sup>-1</sup>), sirovog uglja (9–6800 mg L<sup>-1</sup>), petrohemijskoj (2.8–1220 mg L<sup>-1</sup>) kao i različitim rafinerijama (6–500 mg L<sup>-1</sup>), (Contrerasa i sar. 2003; Busca i sar. 2008). Pored navedenog, izvori otpadnih voda kontaminiranih fenolom uključuju farmaceutsku industriju, proizvođače plastike, drvenih proizvoda, boja i lakova, i papirne industrije. Koncentracija fenola u otpadnim vodama papirne industrije kreće se od 0.1 do 1600 mg L<sup>-1</sup> (Contrerasa i sar. 2003; Busca i sar. 2008). Ispuštanje otpadne vode, koja sadrži fenol, u

slobodne rečne tokove, bez prethodnog tretmana, zabranjeno je zakonom zbog toksičnosti fenola i njegovih derivata (Li i sar. 2000; Yapar i sar. 2009, Ackay 2004). Zbog toksične prirode fenola, i njegovog negativnog uticaja na životnu sredinu, Environmental Protection Agency (EPA) propisala je maksimalno dozvoljenu koncentraciju fenola u vodi za piće od  $1\mu\text{g L}^{-1}$  (United States Environmental Protection Agency, EPA, <http://nepis.epa.gov/Adobe/PDF//2000LNAI.PDF> (accessed April, 2011)).

Mnogi opasni polutanti, u koje spadaju fenol i supstutuisana fenolna jedinjenja, uključujući nekoliko pesticida, mogu biti nošeni vodom i vazduhom po nekoliko stotina kilometara ugrožavajući živi svet i čovekovu okolinu (Hakulinen i sar. 1985). Ovi polutanti se veoma teško razgrađuju, a poznato je da imaju kancerogeno, mutageno, teratogeno ili hronično toksično dejstvo (Lončar i sar. 2011). Toksično dejstvo fenola kod ljudi manifestuje se već na koncentracijama od 10 do 24  $\text{mg L}^{-1}$ , dok se letalnom koncentracijom u krvi smatra koncentracija od 150 mg na 100 ml krvi (Kilkurani i Kaware 2013).

Konvencionalne metode za uklanjanje fenola i njegovih derivata iz vodene sredine mogu se podeliti u tri kategorije: fizičke (ekstrakcija vodenom parom, adsorbpcija i ekstrakcija), hemijske (oksidacija i katalizovani fazni transfer) i biološke (Hao i sar. 2000).

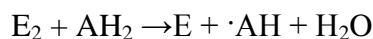
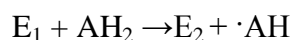
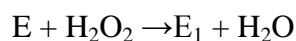
Od gore pomenutih metoda za uklanjanje fenola, fizička metoda adsorpcije fenola na jeftinim materijalima veoma je popularna i intenzivno se izučava. Najveći problemi ove metode su regeneracija vezanog fenola i odlaganje kontaminiranog upotrebljenog adsorbensa (Kilkurani i Kaware 2013). Aktivni ugalj ima visok adsorbcioni potencijal za vezivanje fenola (Vázquez i sar. 2007), ali je njegova regeneracija, koja se najčešće izvodi toplotom, veoma skup i dugotrajan proces. Progresivna regeneracija, koja uključuje zagrevanje i hlađenje kompleksa, dovodi do oštećenja aktivnog uglja, kroz gubitak ugljenika (Busca i sar. 2008).

Od hemijskih metoda za uklanjanje kontaminanata iz vode, upotreba enzima koji uklanjaju загаđivače zasniva se na precipitaciji ili transformaciji (Choing i sar. 2014). Enzimi mogu promeniti karakteristike otpada ili ga transformisati u neke visokovredne proizvode (Karam i Nicell 1997). Enzimi su visoko specifični i efikasni za uklanjanje ciljanih supstanci, a



način njihove upotrebe i čuvanje ne predstavljaju veliki problem (Wilberg i sar. 2002). Enzimi mogu uklanjati fenol i iz nerazblaženih rastvora u kratkom vremenskom periodu (Choing i sar. 2014). Od svih izučavanih enzima, peroksidaze su se pokazale kao najbolji kandidati za uklanjanje fenolnih jedinjenja iz otpadnih voda (Melo i sar 2005).

Najčešće primenjivana peroksidaza iz rena katalizuje oksidaciju fenola uz pomoć vodonik peroksida na sledeći način:



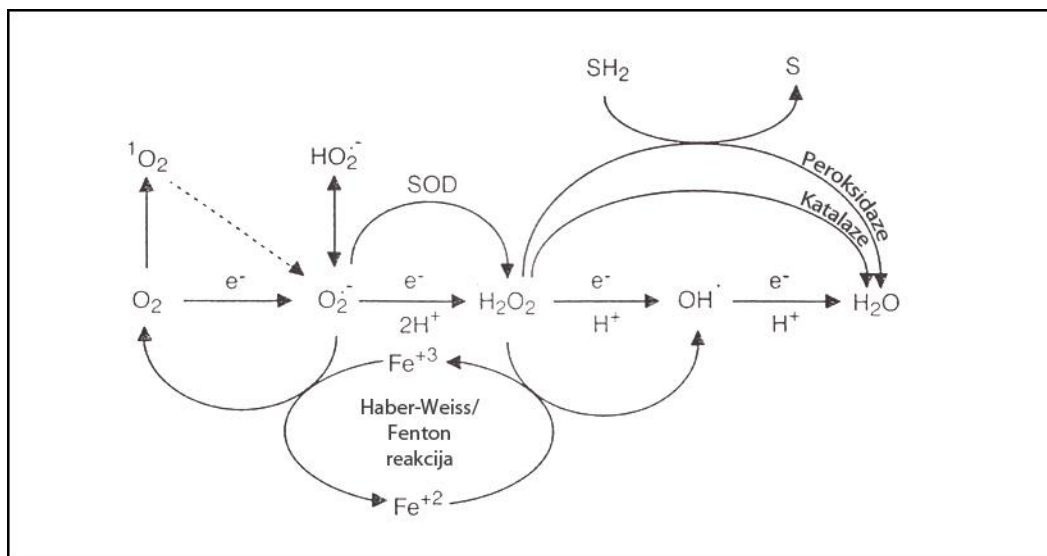
Enzim (E) reaguje sa peroksidom i formira se oksidovana forma ( $E_1$ ) koja oksiduje aromatični prsten fenola. Aromatični prsten sada predstavlja slobodni radikal, oslobođen sa aktivnog mesta enzima, dok enzim prelazi u stanje  $E_2$ , koje oksiduje sledeći aromatični prsten, praveći još jedan slobodni radikal, a enzim se vraća u prvobitno konformaciono stanje i ciklus može da se ponovi (Wright i Nicell 1999). Slobodni radikali nastali u ovoj enzimskoj reakciji polimerizuju fenol i dovode do nagomilavanja velike količine polimerizovanih jedinjenja koja su manje rastvorljiva od polaznih kontaminirajućih supstanci i precipitiraju u rastvoru. Iako je proces eliminacije fenola i drugih aromatičnih zagađujućih supstanci veoma efikasan, neekonomičnost procesa proizvodnje i upotrebe vodi ka iznalaženju alternativnih metoda za prečišćavanje otpadnih voda (Choing i sar. 2014).

Zbog navedenih nedostataka fizičkih i hemijskih metoda, pažnja je usmerena ka biološkim metodama, koje su jeftinije i često efikasnije u procesu uklanjanja fenola iz vode (Gio i sar. 2004). Jedna od bioloških metoda za uklanjanje fenola iz vode uključuje korišćenje aerobnih bakterija koje razgrađuju aromatična jedinjenja koristeći ih kao izvor ugljenika i energije (Choing i sar. 2014). Istraživanja su pokazala da je ovom metodom, u malim zapreminama, moguće prečistiti čak do  $1\text{gL}^{-1}$  fenola (Marrot i sar. 2006). Problemi koji se javljaju u ovakvim sistemima vezani su za dugotrajan proces aklimatizacije

mikroorganizama na prisustvo fenola (Firozjaee i sar. 2012), smanjenu brzinu uklanjanja fenola usled njegove toksičnosti (Steiert and Crawford 1985) i inhibiciju mikrobnog rasta do kojeg dolazi zbog povišene koncentracije fenola (Gernjak i sar. 2003). Jedan od sve popularnijih bioloških metoda uklanjanja fenola iz otpadnih voda odnosi se na *hairy roots* kulture (kontinualne culture korenova) koje u velikom procentu mogu eliminisati fenol i spontano se regenerisati za sledeći ciklus. Ova biološka metoda detaljnije je opisana u poglavlju Proizvodnja *hairy roots* zelene salate i njihova potencijalna primena u procesu fitoremedijacije.

#### **1.4. Oksidativni stres biljaka**

Faktori koji utiču na rastenje i razviće biljaka, a pri tome im smanjuju produktivnost na nivo niži od njihovog genetičkog potencijala predstavljaju stres (Bowler i sar. 1994). Biljke su neprestano izložene nekoj vrsti stresa jer nemaju mogućnost kretanja pomoću koga bi mogle smanjiti njegov intenzitet. Stres kome su biljke izložene može se podeliti na: abiotički i biotički stres. Abiotički stres je višak ili manjak nekog činioca u fizičkom ili hemijskom okruženju biljke (visoka i niska temperatura, suša, visoka koncentracija soli, osmotski stres, jonizujuće zračenje, mehanički stres, manjak nutrijenata, zagađivači, herbicidi). Biotički stres izazivaju druge vrste svojim delovanjem i tu spadaju: korovi, razne vrste štetočina (insekti, ptice, glodari, nematode) i patogeni (bakterije, gljive, virusi). Stres, u bilo kom obliku, dovodi do stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS, reactive oxygen species), a one svojim nagomilavanjem dovode do oksidativnog stresa (Inze i Montagu 2002). Biljke, kao i svi aerobni organizmi, koriste kiseonik za proizvodnju energije i disanje. Tokom redukcije kiseonika do vode nastaju ROS u koje spadaju: superoksidni anjon radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksil radikal ( $OH^{\cdot}$ ), peroksil radikal ( $RO_2^{\cdot}$ ), vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ), singlet kiseonik ( $^1O_2$ ) (Slika 5).



Slika 5. Nastanak ROS redukcijom kiseonika (modifikovano prema Vranova i sar. 2002).  
SOD-superoksid dismutaza

Superoksid anjon radikal je umereno reaktivan i ne može proći kroz biološke membrane. Dovodi do formiranja  $\text{H}_2\text{O}_2$  i  $\text{O}_2$  u spontanoj reakciji, a može i uticati na aktivnost metaloenzima sa aktivnim kompleksom  $\text{Fe}^{3+}$  i  $\text{Cu}^{2+}$ . Ipak, najveća oštećenja ćelija izazivaju ROS koji se formiraju kasnije, a to su  $\text{H}_2\text{O}_2$  i hidroksil radikal (Halliwell i Gutteridge 1989). Najreaktivniji od svih ROS je hidroksil radikal koji može reagovati sa svim biološkim molekulima, a ćelije nemaju efikasan mehanizam za njegovu eliminaciju (Vranova i sar. 2002). Njegovo delovanje dovodi do lipidne peroksidacije, denaturacije proteina i mutacija DNK molekula, što su oštećenja koja dovode do smrti ćelije. Proteini vezani za plazma membranu ćelije takođe mogu biti denaturisani delovanjem ROS, što vodi gubitku njihove enzimske aktivnosti i permeabilnosti membrane (Kukavica i sar. 2007).

Same ćelijske organele mogu biti izvor ROS. U normalnim, optimalnim, uslovima za rastenje i razviće biljaka, ROS se normalno proizvode i njihova koncentracije je veoma niska. Kada dođe do uticaja određene vrste stresa njihova koncentracija se drastično povećava. Veliki proizvođač ROS su hloroplasti koji svojim pigmentima u fotosistemu I i II apsorbuju svetlosnu energiju i transportuju je pomoću elektron transportnog lanca. Krajnji akceptor elektrona u procesu fotosinteze je  $\text{CO}_2$ . Većina biljaka nema dovoljno

visoku stopu fiksacije CO<sub>2</sub> i koriste ne više od 50% apsorbirane svetlosne energije (Baker 1991) pa se kao krajnji akceptori elektrona koriste druga jedinjenja i kiseonik. Kiseonik, kao krajnji akceptor elektrona, dovodi do formiranja velike količine ROS. Pored hloroplasta u ove organele spadaju još i peroksizomi, mitohondrije, citohromi i endoplazmatični retikulum (Mittler 2002). Kada su biljke izložene stresu, elektron transportni lanac u mitohondrijama generiše O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Purvis i Shewfelt 1993). Reakcije detoksifikacije u citohromima su takođe izvor ROS, naročito u citohromu P<sub>450</sub> u citoplazmi i endoplazmatičnom retikulumu, kao i plazma membrana u kojoj se nalazi NADPH zavisna oksidaza koja proizvodi veliku količinu ROS kada je biljka napadnuta patogenima (Vranova i sar. 2002).

Pored negativne uloge koju imaju, ROS mogu imati i ulogu signalnog molekula koji se aktivira kada je u pitanju odbrana od patogena, rastenje, morfogeneza ili ćelijska smrt. Dokazano je i da je veliki broj gena pod uticajem ROS (Apel i Hirt 2004) tj. da oni dovode do aktivacije pojedinih gena. Kod bakterija i kvasaca ROS utiču na ekspresiju najmanje 115 proteina (Dempsey 1991), a oni su regulisani na transkripcionom nivou. Visoke koncentracije ROS dovode do neželjenih i nepovratnih povreda biljaka, dok niske koncentracije mogu biti signal o stresu na koji se biljka može aklimatizovati u kratkom vremenskom roku (Foyer i sar. 1997). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je dokazano služio kao signalni molekul koji dovodi do ekspimiranja gena za odbranu biljke (GST i GPx geni) (Levine i sar. 1994), toleranciju ka niskim (Prasad i sar. 1994) i visokim temperaturama (Lopez-Delgado i sar. 1998). U stresnim uslovima biljke usporavaju svoj rast, redukuju ćelijske deobe i na taj način čuvaju energiju kojom se brane od stresnih uslova, a sa druge strane smanjuju rizik od daljih oštećenja (May i sar. 1998). Pomenute promene su u tesnoj vezi sa biljnim hormonima, a oni su pod direktnim uticajem oksidativnog stresa (Ziv 1991; George 1996).

Kako su biljke sesilni organizmi, i ne mogu se aktivnim putem skloniti od stresa, one su tokom evolucije razvile veoma efikasan sistem antioksidativne zaštite koji im omogućava uklanjanje ROS, zaštitu od oštećenja izazvanih oksidativnim stresom, a samim tim i veću mogućnost za preživljavanjem (Halliwell i Gutteridge 1989). Od ovog štetnog delovanja slobodnih kiseoničnih radikala, biljke se brane antioksidativnim sistemom koji može biti

enzimski i neenzimski. U enzimski sistem spadaju enzimi: peroksidaze, katalaze, superoksid dismutaza, askorbat peroksidaza, glutation reduktaza, monodehidroaskorbat reduktaza itd. U neenzimski sistem spadaju:  $\beta$ -karoten, askorbinska kiselina, vitamin E, glutation, zeaksantin, polifenolna jedinjenja, prolin i dr. (Apel i Hirt 2002). Količina ROS u biljnim tkivima meri se posredno preko aktivnosti antioksidativnih enzima ili procesa koji se zove lipidna peroksidacija (Dat i sar. 2000). ROS, sa izuzetkom  $H_2O_2$ , ne mogu prolaziti kroz biološke membrane, tako da je antioksidativna zaštita na lokalnom nivou (delovi ćelije, organele) način na koji funkcioniše ovaj sistem kod biljaka (Blokhina i sar. 2003). Veoma je važno za biljku da sistem antioksidativne zaštite brzo funkcioniše i da različiti sistemi, bilo enzimski ili neenzimski, rade u kooperaciji. Primer veoma dobre saradnje različitih mehanizama antioksidativne zaštite je askorbat-glutation put u hloroplastima koji pruža zaštitu od štetnog delovanja svetlosti (Noctor i Foyer 1998). Askorbat takođe učestvuje u regeneraciji  $\alpha$ -tokoferola (Thomas i sar. 1992), dok tokoferol direktno reaguje sa redukovanim glutationom (Fryer 1992) i redukovanim koenzimom Q (Buttner 1993). Vodonik peroksid može biti redukovan peroksidazama u vakuoli, gde kao elektron donori služe fenolna jedinjenja (Takahama i Oniki 1997).

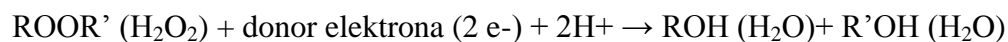
Biljkama se može pojačati sistem antioksidativne zaštite izdvajanjem posebnih genotipova, hibridizacijom protoplasta, genetičkim transformacijama, menjanjem sastava hranljive podloge, dodavanjem mineralnih đubriva u zemljište i različitim načinima regeneracije u kulturi tkiva (Cassels i Curry 2001)

#### **1.4.1. Antioksidativni enzimi kod biljaka**

Primarni odgovor na povećanu koncentraciju ROS je aktivacija antioksidativnih enzima u koje spadaju POX, CAT, SOD, heat shock proteini koji štite enzime od ROS (Burdon, 1993) i proteaze koje eliminišu oštećene proteine (Stadtman 1992). ROS mogu inhibirati enzime za metilovanje DNK što dovodi do hipometilovanja (Wacksman 1997) i nemogućnosti popravljanja oštećenja na DNK molekulu. U daljem tekstu biće opisani sledeći antioksidativni enzimi: POX, CAT, SOD jer su oni izučavani u ovoj doktorskoj disertaciji.

#### 1.4.1.1. Peroksidaze (POX, 1.11.1.x)

Peroksidaze su grupa monomernih jedinjenja sa veoma širokim spektrom supstratne specifičnosti (Huystee i Cairns 1982). POX učestvuju u reakciji oksidacije supstrata u prisustvu peroksida, pri čemu nastaju voda i kiseonik:

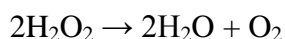


Peroksidaze se nalaze u citoplazmi, vakuolama, peroksizomima i ćelijskom zidu (Gaspar i sar. 1982). Učestvuju u velikom broju reakcija u ćeliji kao što su oksidacija fenolnih jedinjenja, lignifikacija i umrežavanje polisaharida ćelijskog zida (Passardi i sar. 2004). Mogu učestvovati i u metabolizmu nekih biljnih hormona kao što su auksini (Passardi i sar. 2004). Lavid i sar. (2001a; Lavid i sar. 2001b) potvrdili su učešće POX u akumulaciji teških metala. Postoje tri grupe peroksidaza, ali u biljne peroksidaze spadaju one iz klase III. Biljne peroksidaze predstavljaju solubilne, jonske i kovalentno vezane forme za ćelijski zid. Ove peroksidaze pojavile su se verovatno u vreme izlaska prvih kopnenih biljaka i od tada se njihov broj konstantno uvećavao, a na taj način se uvećavao i broj reakcija u kojima učestvuju (Pennell i sar. 1992; Hiraga i sar. 2001). Biljne peroksidaze učestvuju u klijanju semena (Scialabba i sar. 2002), popravljanju "štete" kod mehaničkih povreda tkiva (Raymond i sar. 2000), senescenciji (Jimenez i sar. 1998) ili u rastenju i sazrevanju plodova (Alexander i Grierson 2002). Klasa III, biljnih peroksidaza, katalizuju redukciju  $\text{H}_2\text{O}_2$  uzimajući elektrone od različitih donora kao što su fenolna jedinjenja, prekursori lignina, auksin ili sekundarni metaboliti (Hiraga i sar. 2001). Geni koji kodiraju različiti izoforme POX počinju ekspresiju od samog početka klijanja semena (Morohashi 2002), preko rastenja, razvića i na kraju smrti biljke (Passardi i sar. 2005). Tokom klijanja, POX učestvuju u procesu pucanja semenjače, trošenja endosperma i zaštite klijanca od patogena. Tokom daljeg rasta klijanca ovi enzimi regulišu direktno ili indirektno rast i arhitekturu ćelijskog zida (Cosgrove 2001). Peroksidaze na taj način mogu uticati na zaustavljanje rasta ćelijskog zida, a sa druge strane mogu dovesti do elongacije i njegovog rasta. Prilikom rasta ćelijskog zida i uspostavljanja njegove organizacije, POX sa lakazama učestvuju u polimerizaciji lignina (Keifer-Meyer i sar. 1996), sintezi ekstenzina (Schnabelrauch i sar.

2001) i pektina (Qi i sar. 1995). Pri delovanju nekog abiotičkog stresa, POX učestvuju u odbrani biljke pasivno (izgradnjom jačeg ćelijskog zida) ili aktivno (eliminacijom ROS). Ukoliko je stres dovoljno jak, da probije sve te barijere i dospe u biljku, peroksidaze učestvuju u izolaciji i eliminaciji stranog tela (Passardi i sar. 2005). Pored uloge POX u akumulaciji teških metala Lavid i sar. (2001) pokazali su da ovi enzimi učestvuju u brzom odgovoru biljke na napad patogena. Uloga POX u slučaju povrede biljnog tkiva, bilo da je ona uzrokovana fizičkim, hemijskim ili biološkim agensima, je u brzom popravljanju štete nastale na taj način, što posredno dovodi i do sprečavanja ulaska “stranih tela“ (Park i sar. 2003). Povećana koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i aktivnosti POX je konstatovana kod zelene salate koja je bila napadnuta bakterijama (Bestwick i sar. 1998).

#### **1.4.1.2. Katalaze (CAT, 1.11.1.6)**

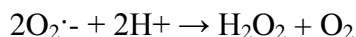
Katalaze su metaloenzimi, sa hem prostetičnom grupom, koje uklanjaju vodonik peroksid razlažući ga do vode i kiseonika:



Katalaze učestvuju u metabolizmu i biljaka i životinja (Abassi i Kushad 1998; Bailly i sar. 2004) i najvećim delom se nalaze u peroksizomima (Dat i sar. 2000). Katalaze učestvuju u odbrani biljaka od štetnog dejstva vodonik peroksida i kada je fotosinteza pojačana, katalaze daju značajan doprinos u eliminaciji ovog štetnog molekula (Auh i Scandalios 1997), a neki autori smatraju da su ovi enzimi glavni u eliminaciji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> iz biljnih ćelija (Mizuno i sar. 1998). Postoji više tipova katalaza (Dat i sar. 2000) odnosno izoformi, a karakterizacija je urađena na osnovu njihove lokalizacije u ćeliji. Prilikom reakcije u kojoj katalaze razlažu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, formira se intermedijerno jedinjenje koje reaguje sa molekulom vodonik peroksida prilikom čega nastaje snažan oksidant-hidroksil radikal (OH·) (Eltner 1987). Gorantla i sar. (2007) identifikovali su gene kod pirinča koji kodiraju CAT izoforme koje su veoma zastupljene u vodnom stresu. Postoji negativna korelacija između aktivnosti CAT i koncentracije glutaciona u ćeliji (Marok i sar 2013).

### 1.4.1.3. Superoksid dismutaze (SOD, 1.15.1.1)

Superoksid dismutaze su metaloenzimi koji katalizuju dismutaciju superoksid anjon radikala do kiseonika i vodonik peroksida:



Enzim su prvi put opisali McCord i Fridovich 1969. Koncentracija superoksidanjon radikala i  $\text{H}_2\text{O}_2$ , dve komponente Haber-Weissove reakcije na kraju koje nastaje hidroksil radikal, određuje aktivnost superoksid dismutaze (Bowler i sar. 1992). Superoksid anjon radikal nastaje u raznim delovima ćelije, na mestima gde postoji elektron transportni lanac, tako da se različite izoforme ovog enzima nalaze u mnogim ćelijskim organelama (Alscher i sar. 2002). Dismutacija superoksidnog anjona do vodonik peroksida je 10 000 puta brža kada je katalizovana sa SOD, nego kada se dešava spontano (Bowler i sar. 1992). Sa obzirom na to da  $\text{O}_2^{\cdot-}$  molekul ne može proći biološke membrane (Takahashi i Asada 1983) veoma je važno da SOD bude prisutna u svim delovima ćelije gde se on akumulira. U zavisnosti od metalnog kofaktora, enzim može sadržati: Fe-SOD, Mn-SOD, Cu/Zn-SOD, Ni-SOD (Bannister i sar. 1987). Cu/Zn-SOD izoforme su veoma konzervativne i slične kod biljaka, gljiva, ptica i sisara (Asada i sar. 1980; Michalski 1996), a nalaze se u hloroplastima, citosolu i ekstracelularnom prostoru (Alscher i sar. 2002). Mn-SOD se nalazi u mitohondrijama i peroksizomima i kod eukariota je uvek u obliku tetramera (Michalski 1996). Fe-SOD nije pronađena u životinjskim tkivima (Michalski 1996). Ova izoforma je osim kod prokariota konstatovana i kod nekih evolutivno starih biljaka (Salin i Bridges 1981) kod kojih je locirana u hloroplastima, a veoma je slična Mn-SOD izoformi i ima dve subjedinice (Asada i sar. 1980; Michalski 1996). Mn- i Fe-SOD su evolutivno najstarije izoforme ovog enzima, dok se Cu/Zn-SOD razlikuje po aminokiselinskom sastavu i najverovatnije je zasebno nastala kod eukariota (Kanematsu i Asada 1990). Ni-SOD je pronađen samo kod nekih prokariota (Radojčić 2006).



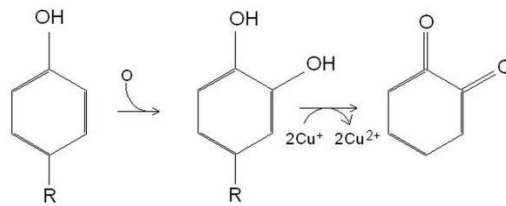
#### **1.4.2. Neenzimska komponenta antioksidativnog sistema biljaka**

Veoma snažna antioksidantna svojstva imaju sekundarni metaboliti-fenolna jedinjenja u koje spadaju flavonoidi, tanini, hidrocina matni estri i lignin (Grace i Logan 2000). Pored fenolnih jedinjenja, u neenzimske komponente antioksidativne zaštite spadaju i  $\beta$ -karoten, askorbinska kiselina, vitamin E, glutation, zeaksantin, prolin i dr. (Apel i Hirt 2002). Fenolna jedinjenja poseduju veoma dobru hemijsku strukturu za eliminaciju slobodnih radikala i pokazano je da su snažniji antioksidanti *in vitro* nego što je tokoferol ili askorbinska kiselina (Blokhina i sar. 2003). Polifenolna jedinjenja poseduju visok stepen reaktivnosti kao donori elektrona i imaju mogućnost da stabilizuju i delokalizuju nesparene elektrone (Rice-Evans i sar. 1997). Takahama i Oniki (1997) pokazali su da fenolna jedinjenja mogu eliminisati vodonik peroksid u biljnim ćelijama, a nije zanemarljiva njihova uloga prilikom abiotičkog stresa izazvanog nedostatkom kiseonika (Blokhina i sar. (2003).

Prolin, kao važan deo neenzimskog sistema antioksidativne zaštite, najčešće je povezivan sa abiotskim stresom, a naročito vodnim deficitom (Demiralay i sar. 2013). Pretpostavlja se da prolin deluje kao signalni molekul, a može uticati i na gensku eksperesiju pojedinih gena uključenih u sintezu proteina za odbranu od stresa (Moustakas i sar. 2011). Prolin deluje kao osmoprotektan, a učestvuje i u eliminaciji ROS i to najčešće u interakciji sa šećerima (Wingler i Roitsch 2008). Poznato je da sami šećeri kod biljaka deluju kao signalni molekuli (Smeekens i sar. 2010) i da imaju veoma važnu ulogu u adaptivnim mehanizmima na stresne uslove sredine (Ramel i sar. 2009).

#### **1.5. Polifenol oksidaze (PPO, 1.10.3.1)**

Polifenol oksidaze (PPO) su najčešće dimerni enzimi sa dva atoma bakra i oksiduju orto-difenole do orto-dihinona korišćenjem molekularnog kiseonika (Tran i sar.2012). Neke PPO mogu konvertovati i monofenole do orto-difenola (Constabel i Barbehenn, 2008). Biljne PPO se obično sastoje od tri domena: N-terminalnog peptida, centra od dva atoma bakra i C-terminalnog regiona (van Gelder i sar. 1997).



PPO se smatraju enzimima koji učestvuju u odbrani biljaka od herbivora, patogena ili reparaciji tkiva nakon povrede (Constabel i Rayan, 1998). Većina izoformi PPO je lokalizovana u hloroplastima, dok se njihovi fenolni supstrati nalaze u vakuolama (Constabel i sar. 1996). Veliki broj PPO učestvuju u razviću biljke i njenom rastu, tako da su različite izoforme aktivne u različito vreme (Tran i Constabel, 2011). Jedna od karakteristika PPO enzima je i njihova sposobnost da se nalaze u neaktivnom ili latentnom stanju (Mayer i Harel 1979). Enzim se može aktivirati iz latentnog stanja različitim metodama koje uključuju kiselu i baznu sredinu (Chazarra i sar. 1996).

Geni za PPO su nađeni kod zelenih biljaka, ali i kod životinja i gljiva, gde su obično uključene u proces pigmentacije kao tirozinaze (Tran i sar. 2012). Orto-hinoni koji nastaju delovanjem PPO odgovorni su za pojavu braon boje voća i povrća koje duže stoji ili je isečeno za upotrebu. Sprečavanje pojave različitih nijansi braon boje pomenutih namirnica je od velikog značaja u industriji hrane, tako da je i izučavanje ovih enzima u poslednje vreme veoma intenzivno. Istraživanja su pokazala da biljke sadrže veliki broj introna u genima za PPO (Zhou i sar. 2003), a inače se veoma malo zna o genima koji kodiraju PPO kod neekonomskih biljaka. Tran i sar. (2012) potvrdili su da je familija PPO evolutivno veoma kompleksna i raznolika i kao takva reflektuje se na veliki broj funkcija koje ovi enzimi imaju, što je suprotno prethodno utemeljenom mišljenju da su ovi enzimi konzervativne i plastične prirode. Biljne peroksidaze i lakaze, koje imaju slične funkcije kao PPO, su veoma brojne kod viših biljaka (Passardi i sar. 2004), tako da je veoma moguće da su oksidativni enzimi uključujući i PPO postali važni za biljke kada su one kolonizovale kopno. Monokotile sadrže dva do osam PPO gena, dok dikotile imaju do jedanaest gena, a kod nekih nisu ni konstatovani (Tran i sar. 2012). Tako varijabilan broj PPO gena kod različitih familija, čak i vrsta biljaka, je veoma interesantan i govori o ekspanziji familije PPO koja je uzrokovana ogromnim brojem različitih ekoloških i

metaboličkih pritisaka i uticaja. Istraživanja vezana za PPO enzime su veoma brojna, ali su i metode kojima se ovaj enzim proučava mnogobrojne jer različiti enzimi, njihove izoforme i aktivnost, zavise od biljnog organa, starosti biljke, pola, godišnjeg doba, doba dana pa čak i različitih sorti (Shafran i sar. 2007). Polifenol oksidaze imaju veliki broj supstrata za koje su specifične. Ova supstratna specifičnost zavisi od vrste enzima, biljne vrste i hemijske strukture supstrata. Najčešće korišćeni supstrati za identifikaciju PPO su: katehol, 4-metil katehol, 4-tetrabutil katehol, L-DOPA, hlorogena kiselina itd. (Aniszewski i sar. 2008). Pored već pomenute karakteristike da PPO učestvuju u brojnim fiziološkim procesima, potvrđena je i njihova uloga u odbrani biljaka od patogena i to polimerizacijom fenolnih jedinjenja od kojih nastaju lepljivi polimeri (Constabel i Barbehenn 2008).

#### **1.6. Genetičke transformacije biljaka pomoću *A. rhizogenes***

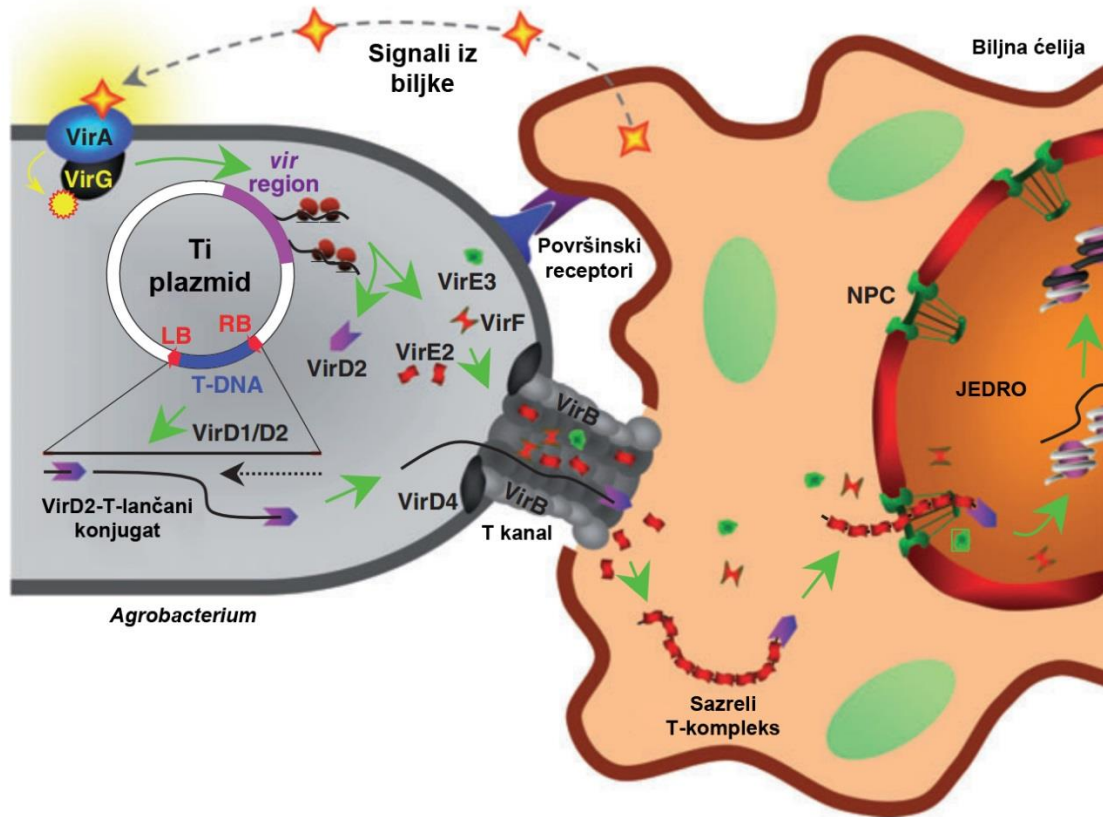
Transformacija biljaka predstavlja stabilnu inkorporaciju stranih gena u biljni genom (Slater i sar. 2004). Metod biljne transformacije zavisi od prirode DNK molekula koji će biti ugrađen u biljni genom i od prirode domaćina. Strani genetički materijal se može uneti u biljnu ćeliju na dva načina: tehnikama direktnog transfera gena (mikrobombardovanje, elektroporacija, mikroinjektiranje, fuzija protoplasta) i transferom gena putem bioloških vektora (virusi i bakterije). Najčešće upotrebljavan metod transformacije biljaka je uz pomoć vektora u koje spadaju bakterije iz roda *Agrobacterium*. Uvođenjem različitih gena od interesa može se uticati na rezistentnost biljaka na herbicide, što predstavlja i najveći deo do sada urađenih transformacija, rezistentnost biljaka na insekte, modifikaciju građe biljaka i otpornost na različite vrste stresova (Chandler i Lu 2005; Tanaka i sar. 2005; Hammond 2006; Simonović 2010).

Još početkom XX veka uočeno je formiranje adventivnih korenova kod biljaka koje su inficirane bakterijom *A. rhizogenes*, a ova pojava označena je kao *hairy roots* (Riker i sar. 1930). Za transformaciju biljaka bakterijama iz roda *Agrobacterium* potrebno je imati odabrane koncentracije, prekulture eksplantata, izvršiti kontrolisane povrede biljnog tkiva, napraviti podlogu za kokultivaciju, podesiti temperaturu i selekcionu režim (Chandler i Lu 2005).

Bakterije roda *Agrobacterium* imaju velike plazmide, ekstrahromozomalne molekule DNK koji se razmnožavaju u bakterijskim ćelijama, a prilikom transformacije se koriste kao vektori (200-250 kb) (Van Larebeke i sar. 1975). Kod ovih bakterija postoje dva osnovna tipa plazmida, a za *A. rhizogenes* je karakterističan Ri-plazmid. Plazmidi sadrže dva genetička regiona koja su neophodna za transformaciju: deo plazmidne DNK koji čini T-DNK (transferred DNK) koji omogućava bakteriji da eksprimira svoje gene u biljci (Baron i Zambryski 1995) i deo koji učestvuje u procesu infekcije, a naziva se *vir* region (virulence region). *Vir* geni kodiraju sintezu *vir* proteina koji su odgovorni za proces prepoznavanja specifičnih jedinjenja koje sintetiše biljna ćelija nakon povrede i transfer T-DNK u biljnu ćeliju.

Ekspresija Ri T-DNK u biljnoj ćeliji dovodi do formiranja adventivnih korenova *hairy roots*. Kada se *hairy roots* gaje na hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja, odlikuju se bočnim grananjem, brzim rastom i plagiotropizmom (Venna i Taylor 2007). Ri plazmid sastoji se od dve T-DNK: T<sub>L</sub>-DNK i T<sub>R</sub>-DNK. Nakon inkorporacije T<sub>R</sub>-DNK u biljni genom regenerišu se korenovi koji se ne razlikuju od netransformisanih korenova, dok se posle inkorporacije sa T<sub>L</sub>-DNK dobijaju tipični *hairy roots* (Vilaine i Casse-Delbart 1987). Na T<sub>R</sub>-DNK se nalaze *aux1* i *aux2* geni koji verovatno olakšavaju proces transformacije. U T<sub>L</sub>-DNK nalazi se 18 ORF sekvenci od kojih četiri učestvuju u indukciji korenova, a poznati su kao *rolA*, *rolB*, *rolC* i *rolD* geni. Ovi genski lokusi (*root oncogenic loci*) indukuju transformaciju (Christey 2001).

Agrobakterije prodiru unutar biljke preko korenovog sistema i kreću se kroz provodne elemente, ali do infekcije dolazi samo posle povrede biljne ćelije. Kada dođe do povrede, oslobađaju se eksudati (fenolna jedinjenja, amino kiseline, šećeri i organska jedinjenja) koji privlače bakterije i dolazi do indukcije bakterijskih gena odgovornih za virulenciju. Na Slici 6 dat je shematski prikaz procesa genetičke transformacije pomoću bakterija roda *Agrobacterium*.



Slika 6. Shematski prikaz procesa genetičke transformacije pomoću bakterija iz roda *Agrobacterium*. Modifikovano prema Citovsky (2007)

Svaki binarni plazmid sadrži T-DNK graničnike između kojih se ubacuju geni od interesa i marker geni. Marker geni mogu biti selektabilni i reporter geni (Reynaerts i sar. 1988). Selektabilni markeri se koriste za negativnu selekciju i nose gene za uspostavljenju rezistentnosti na antibiotike (kanamicin, higromicin i dr.) i herbicide. Selekcija transformisanih biljnih klonova najčešće se obavlja uvođenjem selektabilnog markera za negativnu selekciju, kao npr. *nptIII* gena koji kodira enzim neomicin-fosfotransferazu II (NPT II), koji inaktivira aminoglikozidne antibiotike (kanamicin, neomicin i G-418) fosforilacijom. Na taj način samo transformisane ćelije mogu da prežive letalne doze antibiotika, čime se dobija željena selekcija.

Reporter geni se unose u biljnu ćeliju da bi se preko njih pratila transformacija (rast transformisanih ćelija, efikasnost regeneracije, rast transgenih ćelija). Jefferson i sar. (1987) kao reporter gen koriste *uidA* gen iz *E. coli*, koji boji biljno transformisano tkivo u plavu boju i kodira  $\beta$ -glukuronidazu odnosno GUS enzim, tako da ne zahteva veštačke supstance za detekciju i njegova ekspresija se veoma lako detektuje u tkivu bez uništavanja posmatranog tkiva.

### **1.7. Fitoremedijacija**

Zagađenje životne sredine je globalni problem koji pogađa i razvijene i zemlje u razvoju (Suresh i Ravishankar 2004). Kontaminirajuće supstance, koje su izvor zagađenja, mogu biti organskog i neorganskog porekla. U organske zagađivače spadaju najčešće supstance nastale aktivnošću čoveka kao što su: otpadna ulja, eksplozivna jedinjenja, poljoprivredna đubriva, razne vrste goriva, otpadne supstance nastale preradom drveta (Suza i sar. 2008). Sva ova jedinjenja dovode do potencijalnog zagađenja i vode i zemljišta (Xingmao i Burken 2003; Pilon-Smits 2005). Neorganski polutanti potiču od prirodnih procesa ili aktivnošću čoveka, agrikulture ili rudarstva (Pilon-Smits 2005). I zagađivači nastali prirodnim putem i oni nastali aktivnošću čoveka mogu dovesti do akumulacije i oslobađanja velike količine teških metala (mangana, cinka, bakra, molibdena, žive i nikla) u zemlju i vodu i na taj način ugroziti ekosistem, a posredno i zdravlje ljudske populacije (Nedelokoska i Doran 2000). Negativan uticaj na životnu sredinu koji zagađivači imaju, kao i visoka cena njihovog uklanjanja, doveli su do velikog broja ispitivanja iz oblasti korišćenja biljaka u procesu fitoremedijacije (Kuiper i sar. 2004). Tehnologija procesa fitoremedijacije je intenzivno proučavana od strane Suresh i Ravishankar (2004), Pilon-Smits (2005) i Doty (2008). Sposobnost biljaka da apsorbuju i/ili akumuliraju teške metale ili konvertuju toksične supstance u bezopasne forme pomoću svojih enzima predstavlja fitoremedijaciju (Suresh i Ravishankar 2004). Koren biljke je prvi “na udaru“ zagađivača koji se nalaze u zemljištu ili vodi. Korenov sistem apsorbuje toksično jedinjenje i transportuje ga kroz vaskularni sistem. Taj proces naziva se fitoekstrakcija (Doty 2008). Koren u interakciji sa mikrobima u zemljištu može dovesti do uspešnije biodegradacije u procesu koji se zove fitostimulacija (Pilon-Smits 2005). Posle ulaska u biljna tkiva,

kontaminirajuća supstanca postaje meta za degradaciju od strane biljnih enzima u procesu fitodegradacije (Boominathan i sar. 2004).

Biljke poseduju veoma efikasan metabolički aparat za biotransformaciju velikog broja toksičnih supstanci. Reakcije detoksifikacije organskih jedinjenja u biljkama se odigravaju kroz tri faze (Van Eerd i sar. 2003). Tokom prve faze jedinjenja se transformišu hemijskom oksidacijom, redukcijom ili hidrolizom korišćenjem enzima monooksigenaza, peroksidaza, reduktaza, dehidrogenaza i esteraza. Produkti ove faze obično imaju nizak nivo toksičnosti (Schmidt i sar. 2006). U drugoj fazi, toksične supstance potupno gube toksične efekte i metaboliti se transferazama prevode u šećere, glutation ili amino kiseline koji su stabilni i rastvorljivi u vodi (Brazier-Hicks i sar. 2007). U trećoj fazi dolazi do izbacivanja metabolisanih jedinjenja iz citosola uz pomoć ATP ili proton zavisnih transportera ili imobilizacijom u vakuolama ili apoplastu. Dalja enzimska aktivnost koja prevodi metabolisana jedinjenja u lignin, hemicelulozu ili pektin dešava se takođe u ovoj fazi (Shroder i sar. 2007).

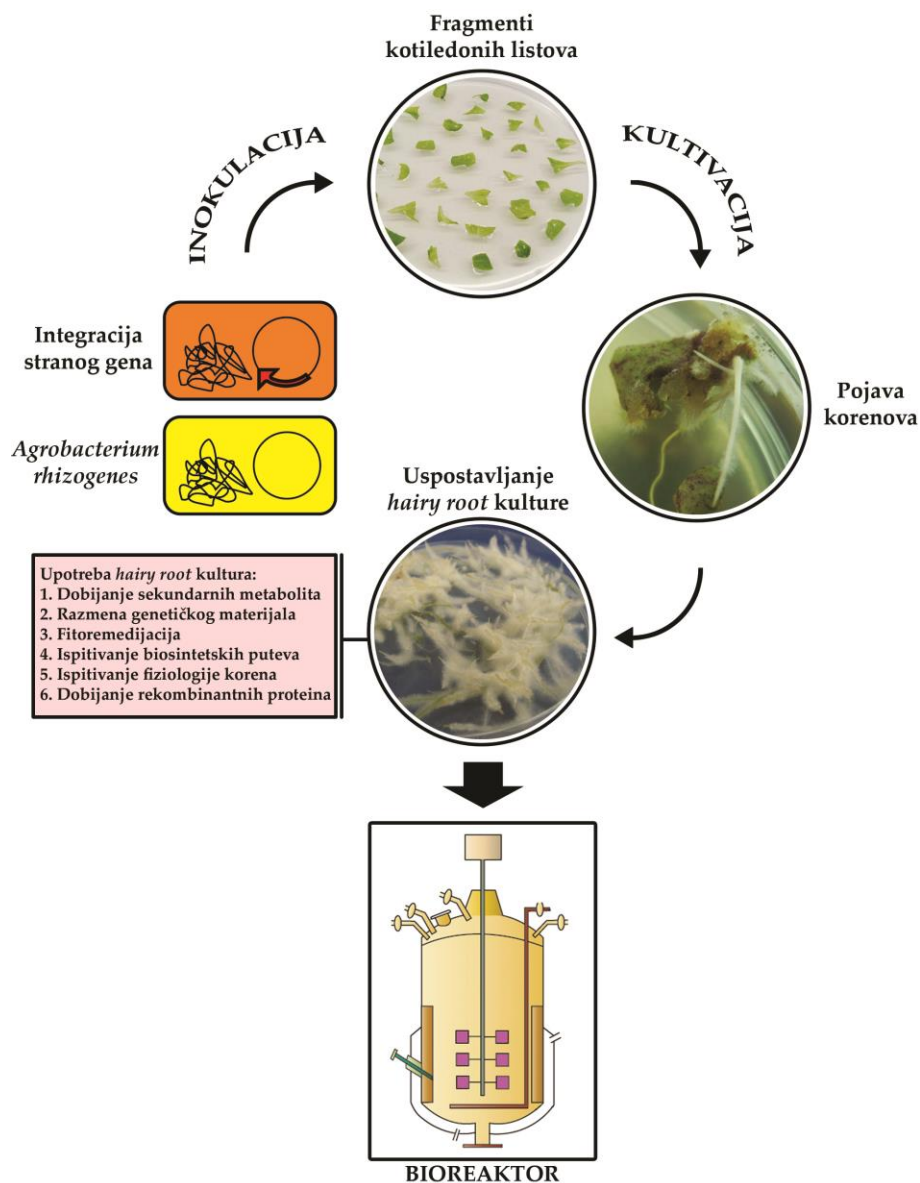
Iako je brzina detoksifikacije organskih jedinjenja od strane biljaka mala, korišćenje ostalih metoda (fizičkih i hemijskih) koje bi bile brže, je veoma skupo, tako da je fitoremedijacija od strane biljaka postala atraktivnija i pristupačnija (Van Aken 2008).

### **1.8. Proizvodnja *hairy roots* zelene salate i njihova potencijalna primena u procesu fitoremedijacije**

Genetička transformacija zelene salate je veoma koristan metod za poboljšanje njenih osobina i načina gajenja (Veena i Taylor, 2007). Pillegi i sar. (2001), Ahmed i sar. (2007), Matvieiva i sar. (2009) i Lim i sar. (2011) uradili su transformaciju zelene salate sa *A. tumefaciens*. Po prvi put je 2014. godine urađena transformacija sa *A. rhizogenes* od strane Tadić i sar. (2014) i tada su dobijeni *hairy roots* (Slika 3). Fenotipske odlike *hairy roots* su brz rast na hranljivoj polozi bez hormona, odsustvo geotropizma, lateralno grananje i genetička stabilnost (Guillon i sar. 2006). Zbog njihove stabilnosti i visoke produktivnosti, godinama su izučavani i ispitivana je njihova mogućnost za proizvodnju sekundarnih metabolita koji se inače proizvode u *wildtype* korenovima (Flores i sar. 1999; Shanks i

Morgan 1999; Girl i sar. 2001; Sevon i Oksman-Caldentey 2002). Mnogi sekundarni metaboliti medicinski važnih biljaka, akumuliraju se u korenovima, ali je povređivanje korenova letalno za biljke i dovodi do njihove smrti, te je proizvodnja ovih jedinjenja od strane *hairy roots* veoma značajna. Zbog toga je interesovanje za *hairy roots* još i veće poslednjih godina i njihova proizvodnja se obavlja u malih laboratorijama, ali i u velikim industrijskim postrojenjima (Guillon i sar. 2006). *Hairy roots* su u početku korišćeni za istraživanja vezana za fiziologiju korena i molekularne interakcije korena sa rizosferom (Ono i Tian 2011). Poslednjih godina pažnja istraživača usmerena je ka izučavanju *hairy roots* u procesu fitoremedijacije (Boominathan i Doran 2003a; Boominathan i Doran 2003b; Boominathan i sar. 2004; Eapen i sar. 2003) zbog njihove sposobnosti da apsorbuju teške metale ili da konvertuju toksične organske molekule u bezopasne forme (Suresh i Ravishankar 2004). Takođe, *hairy roots* imaju veliku kontaktnu površinu tkiva i zagađivača (Gujarathi i sar. 2005) pa mogu konvertovati mnogo više toksičnih supstanci od korenova netransformisanih biljaka. Velike količine različitih metabolita i enzima, koje proizvode *hairy roots*, mogu biti translocirane u spoljašnju sredinu od strane transformisanih korenova (Gujarathi i sar. 2005), a oni mogu detoksikovati opasna jedinjenja. Ovi metaboliti mogu se proizvoditi u velikim količinama u bioreaktorima i zatim koristiti u procesu fitoremedijacije (Slika 7).





Slika 7. Dobijanje i različita uloga hairy roots kulture

Arujo i sar. (2002) testirali su hairy roots na prisustvo fenola u vodi i zaključili da oni mogu da uklone određenu količinu ove supstance. Hairy roots šargarepe koriste peroksidaze za uklanjanje fenola i hlorofenola iz vode, dok transformisani korenovi *Brassica napus* mogu detoksikovati velike količine 2,4-dihlorofenola iz vode (Agostini i sar. 2003). Jedan od osnovnih pristupa koji se koriste za prečišćavanje fenola iz voda je primena enzima kao što su peroksidaze i to najčešće peroksidaza iz rena (Gomez i sar.

2008), ali su visoki troškovi njene proizvodnje doveli do pokušaja upotrebe *hairy roots* u fitoremedijaciji.

*Hairy roots* biljaka koji su poznati hiperakumulatori mogu usvajati kadmijum, nikl ili uranijum u velikim količinama (Nedelkoska i Doran 2000), bez obzira na odsustvo nadzemnih delova biljke. Boominathan i Doran (2003 a) pokazali su da se nikl akumulira, i to u velikim koncentracijama, u ćelijskom zidu transgenih korenova, u obliku kompleksa sa organskim kiselinama. Isti autori (2003 b) dokazali su hiperakumulaciju kadmijuma u korenovima *Thsalpi caerulescens*.

Rezultati dobijeni istraživanjima na *hairy roots* mogu objasniti koji su metabolički kapaciteti samog korena i razdvojiti ih od onih koji potiču od mikroorganizama u zemljištu (Chaudhry i sar. 2005). Uslovi u kojima se korenovi gaje, mogu se strogo kontrolisati u pogledu sastava hranljive podloge i fizičkih parametara, za razliku od uslova u prirodi. Zbog smanjenog sadržaja hlorofila, šećera i drugih pigmenata u biljkama gajenim *in vitro*, olakšano je izolovanje njihovih produkata i povećana njihova čistoća (Schmidt 2001). Korišćenjem *in vitro* dobijenih biljaka, regenerisanih od jedne biljke, mogu se izbeći varijacije nastale usled korišćenja različitog biljnog materijala, a može se favorizovati onaj željeni genotip koji poseduje karakteristike od interesa (Pollard i Baker 1996).

Istraživanja procesa fitoremedijacije uz pomoć *hairy roots* su veoma popularna, ali njihova primena u prirodi, bez prethodne provere, možda neće dati očekivane rezultate (Doran 2009) jer su i zemljište i voda na kojima bi se gajili *hairy roots*, prepuni različitih mikroorganizama koji mogu manje ili više uticati na njihovu praktičnu primenu. Zbog navedenih razloga, *hairy roots* se najčešće koriste za proveru eventualne mogućnosti biljke za fitoremedijaciju i za proučavanje mehanizama i metaboličkih puteva koji su uključeni u proces.

## 2. CILJEVI RADA

Cilj ove doktorske disertacije bio je:

1. Ispitivanje uticaja fenola na klijavost i razvoj klijanaca različitih sorti zelene salate
2. Uspostavljanje i optimizacija hidroponskog sistema za gajenje odabranih sorti zelene salate.
3. Ispitivanje mogućnosti uklanjanja različitih koncentracija fenola iz rastvoru korišćenjem morfološki zrele zelene salate.
4. Transformacija odabrane sorte zelene salate sa *Agrobacterium rhizogenes* u cilju dobijanja *hairy roots*, koji bi bili korišćeni u procesu fitoremedijacije

### **3. MATERIJAL I METODE**

#### **3.1. Biljni materijal**

Za uspostavljanje *in vitro* kultura i hidroponično gajenje, kao polazni materijal korišćena su semena zelene salate (*Lactuca sativa* L.). Semena različitih sorti zelene salate dobijena su od različitih dobavljača i to redom:

Iceberg, Red Yugoslavian Butterhead, Mascara, Little Gem, Ruby red i Red fire: Trade Winds Fruit (Santa Rosa, CA, USA),

Ljubljanska ledenka i Nansen: ‘‘Semenarna’’ (Ljubljana, Slovenija),

Vera i Viola: Institut za povrtarstvo (Smederevska Palanka, Srbija),

Majska kraljica: ‘‘Agro Market’’ (Beograd, Srbija).

#### **3.2. Priprema biljnog materijala za eksperimente *in vitro***

Semena zelene salate su ispirana 60 minuta tekućom vodom u koju je dodato nekoliko kapi deterdženta. Posle toga, tretirana su 30% rastvorom komercijalnog preparata NaOCl (varikina), 2 puta u trajanju od po 10 minuta. Semena su na kraju ispirana u sterilnoj destilovanoj vodi (3 x 10 minuta) i postavljana na sterilnu hranljivu podlogu koja je prethodno pripremljena (Poglavlje 3.2.1.).

*In vitro* kulture gajene su u klimatizovanoj prostoriji, na temperaturi od 24 °C i pri fotoperiodu od 16 h svetlosti i 8 h mraka. Kao izvor svetlosti korišćene su fluorescentne lampe jačine 65 W i intenziteta svetlosti od 47  $\mu\text{mols}^{-1}\text{m}^{-2}$ .

### 3.2.1. Hranljiva podloga za gajenje biljaka *in vitro*

Po završenoj sterilizaciji, semena zelene salate su stavljana na MS (Murashige i Skoog, 1962) hranljivu podlogu sa rastvorom soli i vitamina upola manje koncentracije od standardne (Tabela 1).

Tabela 1. Sastav MS rastvora soli i vitamina.

<b>MS makro elementi</b>	<b>Koncentracija (mgL<sup>-1</sup>)</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
KNO <sub>3</sub>	1900
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
<b>MS mikro elementi</b>	
MnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	22,3
ZnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O	8,6
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
KJ	0,83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,25
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,025
CaCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,025
<b>Kompleks gvožđa</b>	
Na <sub>2</sub> EDTA	37,2
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	27,8
<b>Vitaminski kompleks</b>	
vitamin B <sub>1</sub>	0,1
vitamin B <sub>6</sub>	0,5
nikotinska kiselina	0,5
glicin	0,5

Osnovna hranljiva podloga sadržala je, pored navedenih komponenata iz Tabele 1, 3 % saharoze, 0,7 % agara (Torlak, Beograd) i  $100 \text{ mgL}^{-1}$  mioinozitola (Sigma). pH podloge je podešavan na 5,8 pre autoklaviranja.

### 3.2.2. Hranljiva podloga za gajenje kultura *A. rhizogenes* A4M70GUS

Za gajenje kultura *A. rhizogenes* A4M70GUS korišćena je YEB (Yeast Extract Broth) podloga (Tabela 2), u koju je dodat antibiotik neomicin u koncentraciji od  $100 \text{ mgL}^{-1}$ .

Tabela 2. Sastav YEB podloge

<b>Komponenta</b>	<b>Koncentracija (<math>\text{gL}^{-1}</math>)</b>
Bakto-mesni ekstrakt	5
Bakto-ekstrakt kvasca	1
Bakto-pepton	5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,495
Saharoza	5
Agar (Torlak)	15

### 3.3. Ispitivanje uticaja fenola na klijanje zelene salate

U cilju određivanja uticaja fenola na klijanje zelene salate, semena su stavljana u Petri kutije i postavljana na sterilan filter papir koji je natapan rastvorom fenola koncentracija: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 i  $400 \text{ mgL}^{-1}$ . Inhibitorna koncentracija fenola (IK50) određivana je za svaku sortu i označena kao ona koncentracija fenola na kojoj 50% semena klija. Procenat iskljalih semena beležen je posle 8 dana gajenja na različitim koncentracijama fenola. Semena zelene salate koja su klijala na inhibitornoj koncentraciji fenola, specifičnoj za svaku sortu, korišćena su kao startni material za analizu aktivnosti antioksidativnih enzima. Od semena 11 sorti zelene salate, izabrana su ona semena koja kličaju na najvišim i najnižim koncentracijama fenola označenim kao inhibitornim i sakupljana su posle 4, 5, 6, 7 i 8 dana gajenja. Određivana je aktivnost peroksidaza,

katalaza i polifenol oksidaze da bi se odredio mogući uticaj fenola na antioksidativni kapacitet zelene salate. Inhibitorna koncentracija fenola naknadno je određena za sortu zelene salate Majjska kraljica, jer se na osnovu zadatih koncentracija fenola nije moglo zaključiti koja koncentracija dovodi do klijanja 50% semena ove sorte (Poglavlje Rezultati). Gajenjem ove sorte zelene salate na koncentracijama fenola između 50 i 150 mgL<sup>-1</sup>, utvrđena je da inhibitorna koncentracija fenola za sortu zelene salate Majjska kraljica. Dalji eksperimenti podrazumevali su gajenje ove sorte na toj koncentraciji fenola.

Isključale biljke gajene su još 30 dana na istim koncentracijama fenola, sa ciljem daljeg praćenja uticaja fenola na rast klijanaca i morfološke karakteristike zelene salate.

### **3.4. Gajenje u hidroponičnim uslovima**

Komora za hidroponično gajenje (100×100×180 cm) je Hidroponika, Srbija (Slika 8 a). Komora je naknadno klimatizovana na 15±2 °C i režim svetlo : mrak u odnosu od 16 h : 8 h. Korišćeni su grejači-folije jačine 160 W/m<sup>2</sup> koji su bili ugrađeni u dno komore. Kao izvor svetlosti korišćene su fluorescentne lampe jačine 6400 W i intenziteta svetlosti od 47 μmols<sup>-1</sup>m<sup>-2</sup>. Komora je sadržala dva kanistera za hidroponično gajenje biljaka zapremine 50 L (Slika 8 d). Kanisteri su sadržali filtere za prečišćavanje i aeraciju vode. U svaki kanister dodavano je po 30 L dejonizovane vode sa rastvorom HESI Hydro Growth mineralnog đubriva (Hidroponika, Srbija) koje se koristi za hidroponično gajenje biljaka ([www.HESI.NL](http://www.HESI.NL)). Mineralno đubrivo dodavano je u koncentraciji od 50 mL na 10 L vode. Dejonizovana voda dodavana je u kanistere proporcionalno stopi isparavanja i iskorišćavanja od strane biljaka. Posle 20 dana kompletan rastvor u kanisterima je zamenjivan novim. Nakon završenog ciklusa rasta zelene salate (40 dana) kanisteri i nosači su dezinfikovani deterdžentom i tekućom vodom.

Biljke su sadene na stiroporne nosače, dimenzija 60×40 cm, koji su plutali po površini vode u kanisterima (Slika 8 b, c). Na svakom nosaču moglo je biti zasađeno po najmanje 40 biljaka koje su rasle u posebnim poljima na nosačima prečnika 6 cm i dubine 5 cm. U svako polje na nosačima dodavane su specijalne glinene kuglice (Hidroponika, Srbija) koje su predstavljale pH neutralan, neorganski supstrat granulacije 8-16 mm (Slika 8 b). Glinene

kuglice su dezinfikovane pre upotrebe rastvorom 3% hidrogena i vode u odnosu 30:70 tokom 12 h, posle čega su ispirane tekućom vodom.



Slika 8. Gajenje zelene salate u komori za hidroponično gajenje biljaka. a) izgled komore; b) nosači sa glinenim kuglicama na kojima se vide klijanci zelene salate stari 7 dana; c) zelena salata gajena u hidroponičnim uslovima tokom 25 dana; d) kanisteri sa dejonizovanom vodom i mineralnim rastvorom u kojima je zelena salata stara 25 dana.

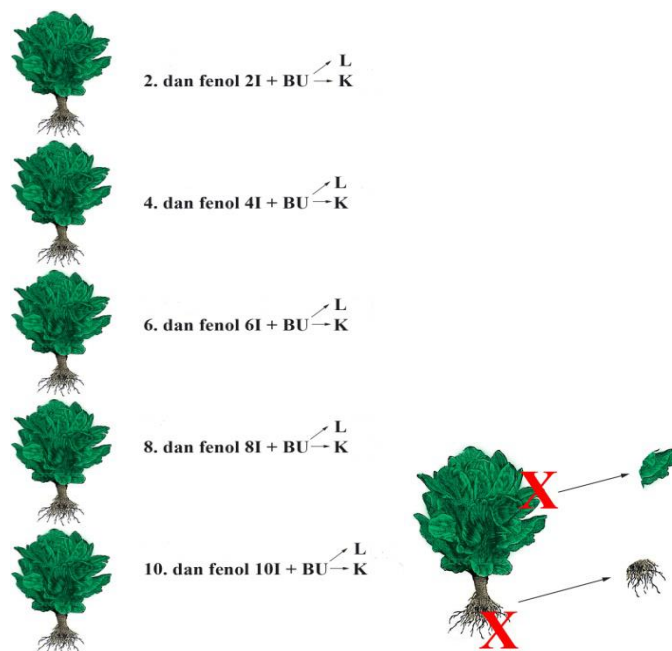


### 3.5. Ispitivanje uticaja fenola rastvorenog u vodi na rastenje zelene salate

Rastvor fenola koncentracije  $200 \text{ mgL}^{-1}$  dodavan je u kanistere za hidroponično gajenje biljaka. Voda je pored pomenutog rastvora fenola sadržala i mineralni rastvor (HESI Hydro Growth). Koncentracija fenola koja će biti korišćena u eksperimentu određena je iz prethodnog eksperimenta u kome je ispitan uticaj fenola na klijanje zelene salate (Poglavlje 3.4.). Izabrane su dve sorte (Ljubljanska ledenka i Nansen) koje su klijaile na najvišim koncentracijama i koje su dalje, tokom 30 dana, rasle na istim koncentracijama fenola bez vidljivih morfoloških promena. Koncentracija fenola koja je odabrana za dalja ispitivanja ( $200 \text{ mgL}^{-1}$ ) bila je najviša koncentracija ispod inhibitorne, na kojoj klija 100% semena zelene salate, a zatim 100% klijanaca nastavlja sa rastom tokom 30 dana gajenja.

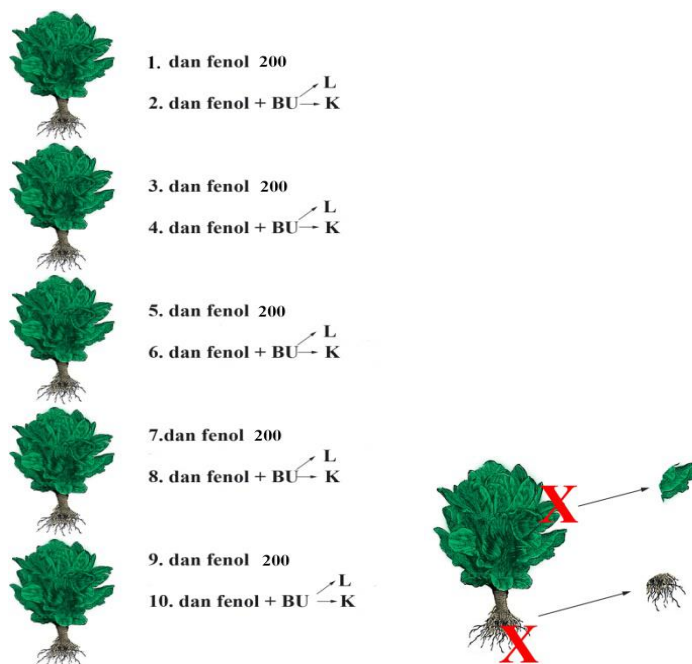
Semena pomenute dve sorte zelene salate, postavljana su u polja na nosačima koja su bila ispunjena glinenim kuglicama sa ciljem zadržavanja semena na površini, obezbeđivanja potrebne vlažnosti, sprovođenja korena do mineralnog rastvora i nesmetanog uzorkovanja korena tokom trajanja eksperimenta (glinene kuglice se veoma lako odstrane sa korenovog sistema bez oštećenja korena).

U prvoj fazi eksperimenta, zelena salata gajena je na koncentraciji fenola od  $200 \text{ mgL}^{-1}$  tokom 10 dana (Slika 9) i ta koncentracija je označena kao početna koncentracija fenola u daljem tekstu. Uzorci korena i listova sakupljani svaka dva dana tokom 10 dana rastenja u cilju određivanja aktivnosti enzima. Uzorci rastvora u kome je zelena salata gajena sakupljani su na svaka dva dana tokom 10 dana gajenja u cilju određivanja koncentracije fenola rastvorenog u vodi.



Slika 9. Zelena salata gajena na koncentraciji fenola od  $200 \text{ mgL}^{-1}$  tokom deset dana. Uzorci fenola iz vode kao i biološki uzorci (BU), list (L) i koren (K), sakupljani su svaka dva dana

U drugoj fazi eksperimenta, rastvor u kome je gajena zelena salata sadržao je konstantnu koncentraciju fenola od  $200 \text{ mgL}^{-1}$ . Rastvor u kanisterima za hidroponično gajenje menjan je svaka dva dana da bi se održala pomenuta koncentracija fenola (Slika 10) i ta koncentracija se označava kao konstantna koncentracija fenola u daljem tekstu. Uzorci korena i listova sakupljani su svaka dva dana tokom 10 dana rastenja u cilju određivanja aktivnosti enzima, a uzorci rastvora sa fenolom takođe su sakupljani na svaka dva dana tokom 10 dana u cilju određivanja koncentracije fenola u rastvoru.



Slika 10. Zelena salata gajena na konstantnoj koncentraciji fenola od  $200 \text{ mgL}^{-1}$  tokom deset dana. Rastvor vode u kome se nalazi fenol koncentracije  $200 \text{ mgL}^{-1}$  menjan je svakog dana. Uzorci fenola iz vode kao i biološki uzorci (BU), list (L) i koren (K), sakupljani su svaka dva dana. Oznaka fenol 200 predstavlja rastvor fenola u vodi koncentracije  $200 \text{ mgL}^{-1}$ .

Kako bi se ispitala mogućnost uklanjanja fenola isključivo efektom adsorpcije fenola na koren zelene salate, ispitivana je koncentracija fenola u vodi nakon ispiranja korenova uzimanih sa biljaka gajenih na početnoj koncentraciji fenola tokom deset dana. Uzorci su sakupljani svaka dva dana tokom gajenja biljaka.

Kontrolne biljke gajene su u hidroponičnim uslovima u rastvoru koji je sadržao samo mineralni rastvor. Uzorci korena i listova, kao i rastvora iz kanistera takođe su sakupljani tokom istih vremenskih intervala.

Transformisani i netransformisani korenovi u tečnoj kulturi gajeni na MS hranljivoj podlozi pri koncentracijama fenola od  $25$  do  $75 \text{ mgL}^{-1}$  i gajeni u erlenmajerima. Analiza potencijalnog uklanjanja fenola iz rastvora je rađena na transformisanim i netransformisanim korenovima u cilju ispitivanja njihovog potencijala za uklanjanje fenola iz rastvora.

Transformisani korenovi su gajeni na početnoj i konstantnoj koncentraciji fenola u rastvoru. Koncentracija koja je primenjivana u ovom slučaju bila je od 25 do 125 mgL<sup>-1</sup> u cilju utvrđivanja maksimalne koncentracije fenola koju transformisani korenovi mogu ukloniti.

### **3.6. Anatomska istraživanja korena**

Odsecci delova korena koji su gajeni na početnoj koncentraciji fenola u hidroponičnim uslovima tokom 5 dana, kao i novoformirani korenovi regenerisani posle 10 dana gajenja u rastvoru fenola od 200 mgL<sup>-1</sup>, sakupljani su u cilju ispitivanja njihovih anatomskih karakteristika. Korenovi su fiksirani 24 h na 4 °C u FAA fiksativu koji sadrži 5 mL 40% formalina, 5 mL glacijalne sirćetne kiseline i 90 mL 70% etanola (Jensen, 1962). Fiksirani materijal je ispiran, dehidriran i ukalupljen u parafin. Poprečni preseći debljine 5-7 µm, sečeni su na rotacionom mikrotomu i obojeni rastvorom hematoksilina. Preparati su fotografisani na Litz DMRB svetlosnom mikroskopu (Lieca, Wetzlar, Germany).

### **3.7. Određivanje sadržaja hlorofila i ukupnih pigmenata u listovima zelene salate**

Za izolovanje hlorofila i karotenoida korišćeno je 20 mg biljnog materijala. Uzorci biljnog materijala (listovi) sakupljani su 3 dana posle tretiranja zelene salate rastvorom fenola početne koncentracije (200 mgL<sup>-1</sup>), odnosno 3 dana nakon pomenutog tretmana koji je trajao 10 dana (Poglavlje 3.6., prva faza). Sredstvo za ekstrakciju bio je 96% etanol (2 mL). Epruvete sa biljnim tkivom i etanolom zagrevane su u vodenom kupatilu na 70 °C u trajanju od 10 minuta. Sadržaj hlorofila i karotenoida određivan je spektrofotometrijski na tri talasne dužine (470 nm, 648 nm i 664 nm) i beležena je vrednost absorbance (A) prema Lichtenhaler (1987). Ukupan sadržaj hlorofila i karotenoida izračunavan je prema formuli i izražavan u mg/g sveže mase:

$$C(a+b) = 5,24A664 + 22,24A648$$

$$\text{Sadržaj hlorofila a: } Ca = 13,36A664 - 5,19A648$$

$$\text{Sadržaj hlorofila b: } Cb = 27,43A648 - 8,12A664$$

$$\text{Sadržaj karotenoida: } C = (1000A470 - 2,13Ca - 97,64Cb) / 209$$

$$\text{Sadržaj ukupnih pigmenata } P = Ca + Cb + C$$

Odnos hlorofila a i b izračunavan je prema formuli:  $Ca / Cb$

Sve ekstrakcije ponovljene su po tri puta.

### **3.8. Analiza enzima**

Određivanje aktivnosti enzima: SOD, CAT, POX i PPO određena je spektrofotometrijski. Aktivnost enzima određivana je u korenu i listovima zelene salate koja je tretirana rastvorom fenola početne koncentracije  $200 \text{ mgL}^{-1}$ , kao i rastvorom konstantne koncentracije fenola od  $200 \text{ mgL}^{-1}$  tokom 10 dana (Poglavlje 3.6.)

Razdvajanje izoformi peroksidaza i polifenol oksidaze rađeno je zimogramskom detekcijom. Gelovi su fotografisani na transiluminatoru (UltraLum Inc, Gel Explorer-u, Exton, PA). Svi uzorci su analizirani tri puta. Analiza gelova grafički je obrađena primenom paketa TotalLab 120.

#### **3.8.1. Izolovanje i određivanje ukupnih proteina**

Ukupni rastvorljivi proteini izolovani su iz korena, listova i semena prosečne mase 300 (koren i seme) odnosno 500 mg (listovi), koji su homogenizovani u avanu uz dodatak tečnog azota. U svaki uzorak dodato je po 1 mL pufera za ekstrakciju proteina tj. 0,1 M kalijum fosfanog pufera (K-P pufer), pH 7, polivinilpirolidon (PVPP) 1,5%, 10 mM ditriotreitol (DTT) i 1 mM fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF). Posle homogenizacije, uzorci su centrifugirani na 12000 g u trajanju od 5 min na  $4^\circ\text{C}$ . Izolati su čuvani na  $-80^\circ\text{C}$  i dalje korišćeni za kvantifikaciju ukupnih proteina i enzimske testove. Koncentracije proteina određena je primenom Bradford metode (Bradford, 1976). Za ovu analizu pripremljena je smeša od 10  $\mu\text{L}$  uzorka i 200  $\mu\text{L}$  Bradfordovog reagensa.

Bradfordov reagens:

1. Koncentrovana boja Comassie brilliant blue G-250 (CBB G-250)

komazi plavo (CBB) G-250	100 mg
95% etanol	50 mL
85% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	100 mL
Voda	do 200 mL

2. Bradfordov reagens

CBB G-250	100 mL
Voda	do 500 mL

Na osnovu standardne krive napravljene uz korišćenje bovine serum albumin (BSA) rastvora, koncentracije od 0, 0,1, 0,2, 0,4, 0,5, 0,7, 0,9 i 1 mgL<sup>-1</sup>, izračunata je koncentracija ukupnih proteina.

Koncentracija ukupnih proteina u uzorku izražena je u odnosu na mg tkiva. Merenje je rađeno spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 595 nm.

Uzorci proteina poznate (izmerene) koncentracije razblaženi su sa „Loading buffer“-om (za 10 ml pufera: 3 ml glicerola, 0,25% bromfenol plavo, 2,4 ml 1 M Tris Cl pH 6,8, 10 µl 1 M DTT i 4,59 ml vode) u odnosu 2:1 i nanošeni na poliakrilamidni gel.

### 3.8.2. Određivanje aktivnosti superoksid dismutase

Aktivnost superoksid dismutase (EC 1.15.1.1) određivana je po modifikovanoj metodi Beyer i Fridovich-a (1987). Reakciona smeša (1 mL) sadržala je 100 mM K-P pufer (pH 7,8), 2 mM EDTA, 260 mM metionin, 1,5 mM nitroblu tetrazolium hlorid (NBT) i 0,04 mM riboflavina. Za svaki uzorak pripremljeno je šest razblaženja koja su naneta na

mikrotitar ploču. Razblaženja su sadržala rastuće zapremine uzorka: 0, 5, 10, 15, 20 i 25  $\mu\text{L}$  i opadajuće zapremine pufera: 800, 795, 790, 785, 780 i 775  $\mu\text{L}$ . Zapremine ostalih komponenti su bile konstantne i to: 2 mM EDTA (50  $\mu\text{L}$ ), 260 mM metionin (50  $\mu\text{L}$ ), 1,5 NBT (50  $\mu\text{L}$ ) i 0,04 mM riboflavin (50  $\mu\text{L}$ ).

Reakciona smeša u mikrotitar ploči osvetljavana je 30 min – 1 h na temperaturi od 25 °C. Spektrofotometrijsko merenje vršeno je na 540 nm. Aktivnost SOD određivana je kao količina uzorka potrebna za redukciju 50% supstrata (NBT) i izražava se kao  $\mu\text{molmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$  odnosno U/mg sveže mase. Sva merenja ponovljena su po tri puta.

### 3.8.3. Određivanje aktivnosti ukupnih katalaza

Aktivnost katalaza (EC 1.11.1.6) određivana je spektrofotometrijskim praćenjem kinetike nestajanja  $\text{H}_2\text{O}_2$ , prema metodi Aebi (1984). Za praćenje aktivnosti korišćeni su 50 mM K-Na-P puffer, pH 7,0 i 30% vodonik peroksid sa apsorbancom od  $0,85 \pm 0,02$ . Aktivnost CAT merena je 3 min, na temperaturi od 20 °C, na svakih 20 s. Jedinica (U) aktivnosti katalaza se definiše kao količina enzima koja razgradi 1  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  za 1 min. Aktivnost CAT izražena je u  $\mu\text{molmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$  (U/mg sveže mase).

Aktivnost enzima izračunavana je prema formuli:

$$V_{\max} = (\Delta A - \Delta A_0) * V_k / 0.0436 * V_e$$

$\Delta A$  – promena apsorbance u minutu

$\Delta A_0$  – promena apsorbance kontrolnog rastvora u minutu

$V_k$  – zapremina reakcione smeše u kivetu (ml),

$V_e$  – zapremina uzorka u kivetu (ml)

0,0436 – milimolarni ekstinkcioni koeficijent  $\text{H}_2\text{O}_2$  na 240 nm izražen u  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Sva merenja ponovljena su po tri puta.

### 3.8.4. Određivanje aktivnosti ukupnih peroksidaza

Aktivnost ukupnih peroksidaza (EC 1.11.1.7) u semenima zelene salate koja su bila izložena dejstvu fenola rađena je po proceduri Furumo and Furutani (2008). Reakciona smeša sadržala je 2,7 mL K-P pufera, 0,1 mL 3% vodonik peroksida i 0,15 mL 4% gvajakola, pH 6,5. Finalna koncentracija vodonik peroksida i gvajakola bila je 0,1% i 0,2% u totalnoj zapremini od 3 mL. Smeša za esej je inkubirana 3 min na sobnoj temperaturi. Posle inkubacije, 50  $\mu$ L rastvorenog ekstrakta je odvojeno i aktivnost POX je merena na 470 nm tokom 2 min na sobnoj temperaturi. Enzimska aktivnost izražena je u  $\mu\text{molmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$  (U/g sveže mase).

Aktivnost ukupnih peroksidaza u biljnim tkivima praćena je spektrofotometrijski merenjem promene apsorbance na 430 nm. Reakciona smeša je sadržala 2,9 ml 0,05 M K-P pufera, pH 6,5, 60  $\mu$ L 1 M pirogalola (Sigma) kao supstrata za enzim i 10  $\mu$ L uzorka, uz dodatak 30  $\mu$ L 1 M  $\text{H}_2\text{O}_2$  posle prvih 20 s reakcije. Aktivnost peroksidaza je merena 3 min, na svakih 20 s, a izražavana je u  $\mu\text{molmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$  odnosno U/mg sveže mase. Tokom reakcije dolazi do oksidacije pirogalola do purpurogalina koji je žućkasto-smeđe boje. Purpurogalin ima maksimum apsorpcije na 430 nm. Aktivnost enzima izračunavana je prema formuli (Kukavica i Veljović, 2004):

$$V_{\max} = (\Delta A - \Delta A_0) * V_k / 2.47 * V_e$$

$\Delta A$  – promena apsorbance u minutu,

$\Delta A_0$  – promena apsorbance blank rastvora u minutu,

$V_k$  – zapremina reakcione smeše u kivetu (ml),

$V_e$  – zapremina uzorka u kivetu (ml),

2,47 – milimolarni ekstinkcioni koeficijent pirogalola na 430 nm izražen u  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

Sva merenja ponovljena su po tri puta.



#### **3.8.4.1. Zimogramska detekcija peroksidaza**

Za razdvajanje izoformi peroksidaza na gelu korišćen je poliakrilamidni gel koji je sadržao 3,75 ml akrilamida, 0,75 ml amfolita pH opsega 3-10, 4 ml glicerola, 6,5 ml vode, 12  $\mu$ L TEMED-a, 75  $\mu$ L APS. Izoforme peroksidaza su određene inkubiranjem gela 30 min u 50 mM M K-P puferu (pH 5,8) koji je sadržao gvajakol (10  $\mu$ L gvajakola je resuspendovano u 10 ml 20 mM Tris pH 7,0) i 10  $\mu$ L  $H_2O_2$  (Siegel i Galston, 1967). Izoelektrično fokusiranje vršeno je na 10 °C na poliakrilamidnom gelu na koji je naneto 15  $\mu$ L uzorka i 10  $\mu$ L pI markera. Izoelektrično fokusiranje trajalo je tri sata na 1200 V. Analiza gelova rađena je primenom grafičkog paketa TotalLab TL 120.

#### **3.8.5. Određivanje aktivnosti polifenol oksidaze**

Određivanje aktivnosti polifenol oksidaze ispitivano je upotrebom dva supstrata: 4-metil katehol (4-MC) i 2,3-dihidroksi-L-fenilalanin (L-DOPA).

Reakciona smeša za prvi esej (esej I) sadržala je sledeće komponente: 1,45 mL 100 mM K-P pufera, pH 6,8, 0,5 mL 100 mM 4-MC, sveže pripremanog rastvaranjem 124,1 mg 4-MC u 10 mL pufera. Finalna koncentracija 4-MC u zapremini od 200 mL pufera bila je 25 mM. Reakciona smeša inkubirana je 3 min na sobnoj temperaturi. Homogenizovani uzorak (50  $\mu$ L) dodavan je u kivetu sa već pripremljenom smešom za esej. Reakcija je praćena na 412 nm tokom 2 min na sobnoj temperaturi. Enzimska aktivnost izražena je u  $\mu\text{molmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$  (U/mg sveže mase) i pretstavljena kao količina enzima potrebna da proizvede 1  $\mu\text{mol}$  produkta reakcije po minutu (Waite 1976).

Reakciona smeša za drugi esej (esej II) sadržala je sledeće komponente: 50  $\mu$ L homogenizovanog uzorka dodato je u 2,95 mL smeše za esej koja se nalazi u kiveti, a sadržala je 5 mM L-DOPA rastvorenog u 50 mM morfolinopropansulfonatnom puferu (MOPS), pH 6,5. ApSORBANCA je merena na 475 nm, na kojoj dopahrom, koji nastaje razlaganjem L-DOPA, ima koeficijent molarne apSORBcije od  $3700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Linerani rast apSORBANCE tokom prvih 60 do 90 s reakcije proporcionalan je količini enzima (Behbahani i sar. 1993).

Aktivnost enzima je izračunavana prema formuli:

Za esej I:

$$V_{\max} = (\Delta A - \Delta A_0) * V_k / 3.7 * V_e$$

3,7 – milimolarni ekstinkcioni koeficijent dopahrom na 475 nm izražen u  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

Za esej II:

$$V_{\max} = (\Delta A - \Delta A_0) * V_k / 1.01 * V_e$$

1.01 – milimolarni ekstinkcioni koeficijent za 4-MC na 412 nm izražen u  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

$\Delta A$  – promena apsorbance u min,

$\Delta A_0$  – promena apsorbance blank rastvora u min,

$V_k$  – zapremina reakcione smeše u kivetu (mL),

$V_e$  – zapremina uzorka u kivetu (mL),

Sva merenja ponovljena su po tri puta.

### **3.8.5.1. Zimogramska detekcija polifenol oksidaze**

Za razdvajanje izoformi polifenol oksidaze na gelu korišćen je poliakrilamidni gel koji je sadržao 3,75 ml akrilamida, 0,75 ml amfolita pH opsega 3-10 (Sigma), 4 ml glicerola, 6,5 ml vode, 12  $\mu\text{L}$  TEMED-a, 75  $\mu\text{L}$  APS. Izoforme PPO su određene inkubiranjem gela 3-5 min u 20 ml 0,1 M Na-acetatnom puferu (pH 6) koji je sadržao 3-Methyl-2-benzothiazolinone hidrazone hydrochloride hydrate (MBTH) i 10 mM fenol kao supstrat na 25 °C. Izoelektrično fokusiranje vršeno je na 10 °C na poliakrilamidnom gelu na koji je naneto 15  $\mu\text{L}$  uzorka i 10  $\mu\text{L}$  pI markera. Izoelektrično fokusiranje trajalo je tri sata na 1200 V, a korišćeni pH opseg bio je od 3-10. Analiza gelova rađena je primenom grafičkog paketa TotalLab TL 120.

### 3.9. Određivanje koncentracije prolina

Koncentracija prolina u korenovima i listovima zelene salate određivana je prema modifikovanoj metodi Bates i sar. (1973). Tkivo mase 0,25 g homogenizovano je u metanolu zapremine 0,5 mL (HPLC grade). Homogenat je centrifugiran na 14000 g tokom 2 min. U supernatant je dodato 0,5 mL hloroforma i 0,75 mL vode (HPLC grade). Smeša je izmešana na vortex aparatu i čuvana na 4 °C. Gornja, bistra faza supernatanta je razdvojena i koncentrovana na koncentratoru (Eppendorf Concentrator 5301) na sobnoj temperature u trajanju od 3 h.

Koncentrovani uzorci su resuspendovani u vodi, a zatim je u resuspendovane uzorke dodat ninhidrin u odnosu uzorak: ninhidrin = 1:2,5. Smeša sa ninhidrinom je inkubirana u vodenom kupatilu na 90 °C tokom 4 min. Nakon kuvanja, smeša je prebacivana na led i dodavano je 930 µL etanola. Spektrofotometrijsko merenje rađeno je na talasnoj dužini od 350 nm koristeći smešu bez ninhidrina kao slepu probu. Koncentracija prolina je određivana poređenjem sa standardnom krivom. Sledeća formula korišćena je za izračunavanje koncentracije prolina u uzorku:

$$\text{Prolin } (\mu\text{M g}^{-1} \text{ sveže mase}) = ((A_{350} \text{ sa ninhidrinom} - A_{350} \text{ bez ninhidrina}) / a) \times (\text{zapremina uzorka} / \text{zapremina smeše}) \times (1 / \text{sveža masa uzorka})$$

A<sub>350</sub>: apsorbanca na talasnoj tužini od 350 nm

Zapremina uzorka: 20 µL

Zapremina smeše: 1 mL

a = regresioni koeficijent, dobijen na osnovu standardne krive prolina

### 3.10. Određivanje koncentracije fenola rastvorenog u vodi

Određivanje koncentracije fenola u vodi rađeno je spektrofotometrijski uz upotrebu 4-aminoantipirina (4-AAP). Pre započinjanja eksperimentalne procedure merenja, uzorak je potrebno predestilovati. Neposredno pre prebacivanja uzorka u aparat za destilaciju, potrebno je sniziti pH vrednost uzorka na 4 upotrebom fosforne kiseline.

Smeša pripremljena za merenje koncentracije fenola u vodi sadržala je destilovani uzorak, pufer (16,9 g amonijum hlorida rastvorenog u 143 mL amonijum hidroksida, pH 10), 2 mL 4-AAP rastvora (2 g 4-AAP rastvorenog u 100 mL destilovane vode) i 2 mL kalijum fericijanid rastvora (8 g  $K_3Fe(CN)_6$  rastvorenog u 10 mL destilovane vode). Reakciona smeša je izmešana i posle 15 min rađeno je očitavanje na talasnoj dužini od 460 nm, na kojoj je maksimalna apsorbcija intenzivno crvenog jedinjenja koje nastaje u reakciji 4-AAP i fenola. Standardi su očitavani na istoj talasnoj dužini, a razblaženja fenola su pravljena u koncentracijama od 0 do 1000  $\mu\text{gL}^{-1}$ .

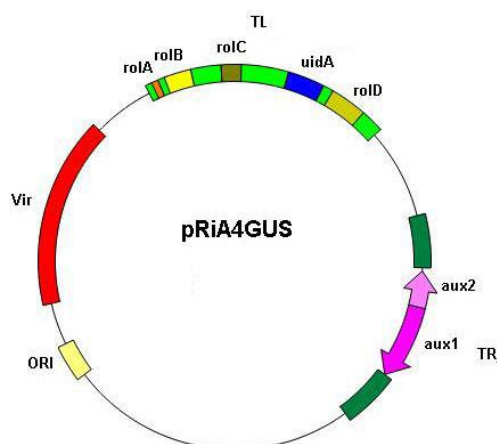
Sva merenja rađena su prema pravilniku Instituta za standardizaciju Srbije, šifra SRPS ISO 6439 B: 1997, o kvalitetu vode-određivanje fenolnog indeksa (Institut MOL, Stara Pazova).

### **3.11. Transformacija zelene salate pomoću *Agrobacterium rhizogenes* A4M70GUS**

Kotiledonarni listovi klijanaca zelene salate dve sorte (Ljubljanska ledenka i Nansen) stari 7 dana korišćeni su za transformaciju.

#### **3.11.1. Priprema *A. rhizogenes* i indukcija hairy roots**

*A. rhizogenes* A4M70GUS nosi plazmid pRiA4 koji sadrži dve T-DNK:  $T_L$  i  $T_R$ , a one su razdvojene intergenskim regionom od 15 kb (Slika 11).  $T_R$ -DNK nosi dva gena koji kodiraju agropin sintetazu i manopin sintetazu (*aux1* i *aux2*).



Slika 11. Shematski prikaz plazmida pRiA4GUS. Delovi T-DNK su obeleženi zelenim, a geni koji se eksprimiraju u bakteriji crvenim nijansama (*vir* region). Veličina gena na slici nije u korelaciji sa veličinom plazmida.

T<sub>L</sub>-DNK sadrži četiri lokusa (*rolA*, *rolB*, *rolC* i *rolD*) koji su neophodni za regeneraciju *hairy root*. T<sub>L</sub>-DNK takođe sadrži *uidA* sekvencu, između *rolC* i *rolD* sekvence, pod kontrolom 35S CaMV promotora mozaičnog virusa karfiola. *uidA* gen je reporterski gen za enzim β-glukuronidazu. Pozitivna reakcija sa jedinjenjem X-gluc, kao enzimskim supstratom, je bio pokazatelj uspešnosti transformacije. *vir* region u T-DNK plazmidu obezbeđuje funkcije *in trans* za transfer T-DNK. ORI (*origin of replication*) je mesto početka replikacije.

*Agrobacterium rhizogenes* A4M70GUS gajen je na YEB hranljivoj podlozi (Poglavlje 3.2.2.). Za zaražavanje biljnog materijala korišćene su bakterijske suspenzije, pravljene prenošenjem jedne bakterijske kolonije sa jedne Petri kutije čuvane na 4 °C u odgovarajuće tečne podloge, koje su inkubirane preko noći, na šejkeru na temperaturi od 24 °C u uslovima mraka. Tečne YEB podloge imale su isti sastav kao i čvrste, osim agara.

### 3.11.2. Određivanje selektivne koncentracije kanamicina

Za određivanje koncentracije antibiotika koji će se koristiti pri selekciji transformisanog tkiva, urađen je eksperiment osetljivosti biljaka prema kanamicinu. U MS hranljivu podlogu, dodat je kanamicin, u koncentracijama od 10 do 100 mgL<sup>-1</sup>, posle sterilizacije

podloge u sterilnim uslovima. Biljke su na ovim hranljivim podlogama gajene četiri nedelje i na osnovu dobijenih rezultata određena je osetljivost na kanamicin prema kojoj su bile pravljene hranljive podloge sa definisanim koncentracijama.

### **3.11.3. Transformacija biljaka pomoću *A. rhizogenes* A4M70GUS**

Inokulacija je izvršena povređivanjem epidermisa biljke iglom koja je prethodno potopljena u bakterijsku suspenziju. Na mestu povrede pojavili su se adventivni korenovi koji su odsecani i prenošeni na MS čvrstu hranljivu podlogu u koju je dadat cefotaksim (Tolycar, Jugoremedia, Srbija) u koncentraciji  $200 \text{ mgL}^{-1}$  u cilju eliminacije bakterija. Korenovi su posle 35 dana prenošeni na svežu hranljivu podlogu bez antibiotika. Za merenje prirasta biomase korenova, stavljeno je po 1 g transformisanih korenova u 30 ml MS/2 na šejker tokom 35 dana.

### **3.11.4. Histoheмиjski GUS test**

Ekspresija GUS gena transgenih korenova određivana je histoheмиjski na osnovu enzimske aktivnosti  $\beta$ -glukurinozidaze (Jefferson i sar. 1987). Vršni delovi korenova (10-15 mm) potapani su u 100  $\mu\text{L}$  pufera, koji je sadržao 2 mM 5-bromo-4-hloro-3-indolil- $\beta$ -D-glukuronska cikloheksilamoniumova so, AMPRESCO, OH, SAD) (X-gluc), 0,5 mM  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , 0,5 mM  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ , 10 mM  $\text{NA}_2\text{EDTA}$ , 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , u bunariće mikrotitar ploče i inkubirani 24 h na  $37^\circ\text{C}$ . X-gluc je neposredno pred rad rastvoren u N,N-dimetilformamidu u koncentraciji od  $20 \text{ mgL}^{-1}$ . Bojenje uzoraka posmatrano je na svetlosnom mikroskopu.

### **3.11.5. PCR analiza**

Za PCR analizu korišćeni su korenovi sorti zelene salate koji su imali pozitivnu GUS reakciju. Da bi se potvrdila transformacija, DNK je izolovana prema Zhou i sar. (1994) tako što je 200 g biljnog materijala homogenizovano u tečnom azotu. U svaki uzorak je dodato 600  $\mu\text{L}$  ekstrakcionog pufera, koji se sastojao od 2% CTAB, 20 mM NaEDTA, 100 mM TRIS-HCl pH8, 1,4 M NaCl, sa 0,5%  $\beta$ -merkaptioetanol. Uzorci su inkubirani u vodenom kupatilu na  $56^\circ\text{C}$  20 min. Posle hlađenja u svaki uzorak dodato je po 600  $\mu\text{L}$

smeše hloroform:izoamilalkohol (24:1). Posle centrifugiranja na 20 000 rpm na sobnoj temperaturi tokom 10 min odvajan je supernatant. Postupak je ponavljan još jednom i u tako razdvojen supernatant dodavano je po 250  $\mu\text{L}$  4M NaCl i 750  $\mu\text{L}$  hladnog izopropanola. Uzorci su ostavljani na temperaturi od 4°C tokom 30 min, posle čega su centrifugirani na 8000 rpm na sobnoj temperaturi tokom 30 min i odvojen je supernatant, dok je talog opran dodavanjem 1 mL hladnog 70% etanola. Uzorci su ponovo centrifugirani pod istim uslovima. Supernatant je odliven, a talog resuspendovan dodavanjem 200  $\mu\text{L}$  TE pufera koji je sadržao 20  $\mu\text{L}$  0,5 M EDTA, 100  $\mu\text{L}$  1 M TRIS i 9,88 mL vode na 10 mL pufera. Uzorci su ostavljani tokom noći radi resuspendovanja taloga. Posle rastvaranja taloga dodato je po 200  $\mu\text{L}$  smeše hloroform:izoamil alkohol (24:1) i sadržaj je centrifugiran na 13000 rpm na sobnoj temperaturi tokom 10 min, posle čega je odvojeno po 140  $\mu\text{L}$  supernatanta i u njega dodato po 75  $\mu\text{L}$  (10  $\text{mgmL}^{-1}$ ) RNK-aze. Sadržaj je inkubiran u vodenom kupatilu na 37 °C tokom 45 min. Opet je dodata smeša hloroform:izoamil alkohol (140  $\mu\text{L}$ ) pa je uzorak centrifugiran. Posle centrifugiranja uzimano je 100  $\mu\text{L}$  gornje faze.

Određivanje koncentracije DNK rađeno je na spektrofotometru na talasnim dužinama 260 i 280 nm, a izračunavanje po formuli:

Ukupna DNK:  $50 \mu\text{gmL}^{-1} * A_{260} * \text{razblaženje}$

Prajmer korišćeni za PCR analizu bili su *uidA*, *rolA*, *rolB* i *rolC* (Tabela 3)

Tabela 3. Lista prajmera korišćenih za PCR analizu

Gen	Sekvenca prajmera 5' -3'	Veličina amplifikovanog fragmenta (bp)
<i>uidA</i>	CCC GGC AAT AAC ATA CGG CGT G CCT GTA GAA ACC CCA ACC CGT G	366
<i>virD1</i>	ATG TCG CAA GGC AGT AAG CAA GGA GTC TTT CAG CAT G	441
<i>rolA</i>	GTT AGG CGT GCA AAG GCC AAG TGC GTA TTA ATC CCG TAG GTC	203
<i>rolB</i>	AAA GTC TGC TAT CAT CCT CCT ATG AAA GAA CGT GCA AGC TAC CTC TCT	348
<i>rolC</i>	TAC GTA GAC TGC CCG ACG ATG ATG AAA CTT GCA CTC GCC ATG CCT CAC	342

PCR reakcija vršena je u reakcionoj smeši zapremine 25  $\mu$ L: 16  $\mu$ L vode, 2,5  $\mu$ L 10 $\times$ PCR pufera, 1,5  $\mu$ L 10 mM dNTP, 1,25  $\mu$ L 5  $\mu$ M prajmeri P1 i P2, 0,5  $\mu$ L 5 U $\mu$ L<sup>-1</sup> Taq DNK polimeraze i 2 $\mu$ L uzorka DNK.

Početna denaturacija nukleinskih kiselina odvijala se na 95 °C tokom 5 min, posle čega su sledila 35 ciklusa: denaturacije (na 95 °C tokom 1 min), vezivanje prajmera (kod *uidA* na 62 °C tokom 2 min, kod *rolA/rolB/* 53 °C tokom 1 min, kod *rolC* 55 °C tokom 1 min) i ekstenzije na 72 °C tokom 2 min, osim za *rolA/rolB* 1 min. Finalna ekstenzija rađena je na 72 °C tokom 10 min.

### 3.11.6. Elektroforeza DNK

Elektroforeza je rađena u 1,5% agaroznim gelovima (60 mL) sa 3  $\mu$ L etidijum-bromida (10 mgmL<sup>-1</sup>) u 1 $\times$ TBE puferu sa 0,5  $\mu$ gmL<sup>-1</sup> etidijum bromida pri konstantnoj voltaži od 74 V. Posle završene elektroforeze, gelovi su fotografisani na transiluminatoru (UltraLum Inc, Gel Explorer, Exton, PA).



### **3.11.7. Ispitivanje uticaja fenola na rast trangenih korenova zelene salate**

Korenovi su dalje gajeni u tečnoj MS hranljivoj podlozi u koju je dodat fenol u koncentracijama: 0, 25, 50, 75 i 100 mgL<sup>-1</sup>, na šejkeru, u uslovima mraka, tokom 25 dana. Vrhovi korenova različitih sorti zelene salate dužine oko 15 mm od svake sorte prebacivano je u 30 mL tečne MS hranljive podloge, sa dodatkom pomenutih koncentracija fenola, u cilju praćenja njihovih morfoloških karakteristika. Dužina i masa korenova merene su na svakih pet dana i na osnovu toga je određivan prirast mase. Uzorci tečne hranljive podloge sakupljani su takođe na svakih pet dana sa ciljem određivanja koncentracije fenola tokom vremena.

### **3.12. Statistička obrada podataka**

Numerički podaci su obrađeni primenom računarskog programa Statgraphics verzija 4.2 (STSC Inc. and Statistical Graphics Corporation, 1985-1989, USA). Za određivanje statistički značajnih razlika između srednjih vrednosti korišćena je analiza varijanse (ANOVA), kao i LSD („least significant difference“) test za utvrđivanje statistički značajnih razlika na nivou  $p \leq 0,05$ . Grafičko predstavljanje rezultata urađeno je pomoću računarskog programa Microsoft Office Excel kao i vektorskog programa Corel Draw.

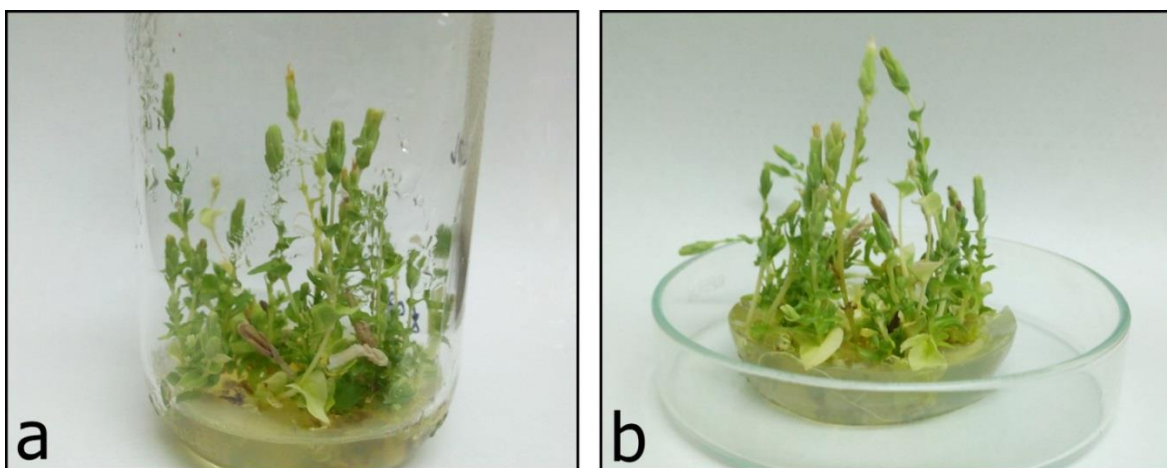
### **3.13. Grafička obrada podataka**

Pojedine slike i grafici obrađeni su primenom programa za vektorsku grafiku Corel Draw, kao i primenom programa za rastersku grafiku Adobe Photoshop.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Zelena salata gajena *in vitro*

Semena 11 sorti zelene salate gajena su na hranljivoj podlozi sa upola manjim sadržajem mineralnih soli koja je korišćena za isključivanje. Posle 30 dana gajenja, dobijene biljke u kulturi nisu bile morfološki zadovoljavajuće. Stablo im je bilo izduženo, listovi sitni i etiolorani, a struktura rozete, koju poseduju sve vrste salate nije bila prisutna (Slika 12 a i b). Korenovi su bili veoma dobro razvijeni. Eksperiment, ponovljen više puta, dovodio je do istih rezultata, te iz tog razloga dalja ispitivanja uticaja fenola na klijanje i rast zelene salate nisu rađena *in vitro*, već u hidroponičnim uslovima.



Slika 12. Izgled dve sorte zelene salate regenerisane iz semena posle 30 dana gajenja u kulturi. a) sorta Iceberg; b) sorta Vera

### 4.2. Klijanje semena različitih sorti zelene salate na rastućim koncentracijama fenola

Semena jedanaest odabranih sorti zelene salate gajena su na rastućim koncentracijama fenola u rasponu od 0 do 400 mgL<sup>-1</sup> tokom 20 dana (Tabela 4). Određivana je inhibitorna koncentracija fenola (IK50), odnosno ona koncentracija fenola na kojoj isključava 50% semena.

Dve sorte (Ljubljanska ledenka i Red Yugoslavian Butterhead) zelene salate postižu klijavost od 100% tokom gajenja na dve najniže koncentracije fenola (50 i 100 mgL<sup>-1</sup>).

Semena Ljubljanske ledenke kličaju na koncentraciji fenola do  $200 \text{ mgL}^{-1}$ . Pomenuta sorta (LJL) kliča i na koncentraciji od  $350 \text{ mgL}^{-1}$  fenola gde ne kliča nijedna druga ispitivana sorta. Kod tri varijeteta (Iceberg, Vera i Ruby red) primećen je drastičan pad klijavosti (0%) na koncentraciji od  $250 \text{ mgL}^{-1}$  nakon relativno visoke klijavosti na  $200 \text{ mgL}^{-1}$ . Sorte Little gem i Majska kraljica, pokazuju nagli pad klijavosti na koncentraciji fenola od  $100 \text{ mgL}^{-1}$ , što je skoro dva puta manje nego na prvoj ispitivanoj koncentraciji ispod ( $50 \text{ mgL}^{-1}$ ). Četiri sorte zelene salate izabrane su za dalju analizu: Ljubljanska ledenka i Nansen, zbog visokog procenta klijavosti na najvišim koncentracijama fenola ( $300$  i  $250 \text{ mgL}^{-1}$ ) i Little gem i Majska kraljica zbog izraženog pada klijavosti koji se primećuje prelazom sa koncentracije fenola od  $50$  na koncentraciju fenola od  $100 \text{ mgL}^{-1}$ . IK50 koncentracija fenola iznosi redom: LJL ( $300 \text{ mgL}^{-1}$ ), N ( $250 \text{ mgL}^{-1}$ ), LG ( $100 \text{ mgL}^{-1}$ ) i MK ( $75 \text{ mgL}^{-1}$ ). Inhibitorna koncentracija fenola za sortu MK određena je u posebnom eksperimentu koji nije prikazan.

Tabela 4. Uticaj rastuće koncentracije fenola na klijanje različitih sorti zelene salate

Varijetet	Koncentracija fenola (mgL <sup>-1</sup> )								
	0	50	100	150	200	250	300	350	400
<b>Iceberg</b>	100	98.3±1.7	96.7±3.3	98.3±1.7	85.0±2.8	0	0	0	0
<b>Ljubljanska ledenka</b>	100	100	100	100	100	90.0±1.7	<b>50.0±5.1</b>	38.3±1.7	0
<b>Red Yugoslavian Butterhead</b>	100	100	100	18.3±1.7	8.3±1.7	0	0	0	0
<b>Mascara</b>	91.7±1.7	81.7±1.7	73.3±1.7	46.7±1.7	8.3±1.7	0	0	0	0
<b>Viola</b>	86.7±1.7	73.3±1.7	68.3±3.3	35.0±1.7	28.3±1.7	0	0	0	0
<b>Little Gem</b>	100	91.7±1.7	<b>50.0±2.8</b>	16.7±1.7	18.3±1.7	0	0	0	0
<b>Regina di Maggio*** (Majska kraljica)</b>	91.7±1.7	78.3±1.7	38.3±3.3	11.7±1.7	8.3±1.7	0	0	0	0
<b>Vera</b>	98.3±1.7	86.7±1.7	73.3±1.7	53.3±3.3	61.7±1.7	0	0	0	0
<b>Ruby red</b>	100	100	96.7±1.7	78.3±3.3	96.7±1.7	0	0	0	0
<b>Nansen</b>	100	100	98.3±1.7	100	100	<b>51.7±1.7</b>	11.7±1.7	0	0
<b>Red fire</b>	96.7±3.3	81.7±1.7	53.3±1.7	23.3±3.3	16.7±1.7	0	0	0	0

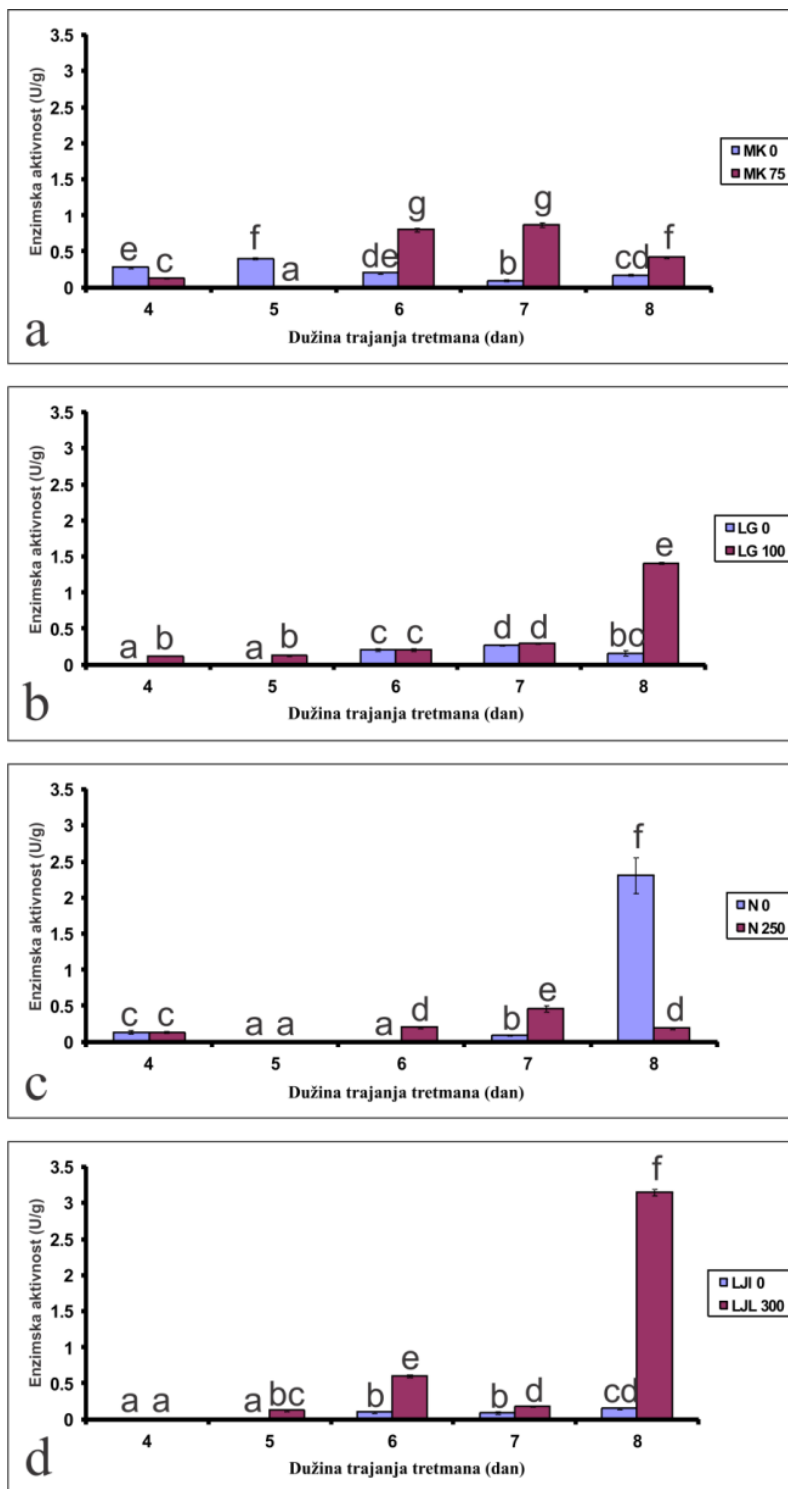
\* Zatamnjеним бројевима означиене су ИК50 фенола, односно концентрација фенола на којој клија 50% семена зелене салате одређене сорте

### **4.3. Određivanje aktivnosti enzima kod klijanaca različitih sorti zelene salate gajenih na inhibitornim koncentracijama fenola**

Kod sorti zelene salate koje su pokazale najveću tolerantnost na prisustvo rastućih koncentracija fenola, tokom ispitivanja klijavosti, određivani su enzimi antioksidativnog stresa (POX, PPO, CAT). Klijaneci zelene salate koji su gajeni na IK50 fenola, specifičnoj za svaku sortu, sakupljani su posle 4, 5, 6, 7 i 8 dana sa ciljem određivanja aktivnosti pomenutih enzima (Slika 13, 14 i 15). Odabrane su četiri sorte zelene salate. Ljubljanska ledenka i Nansen izabrane su zbog najvećeg procenta klijavosti na najvišim koncentracijama fenola (300 i 250 mgL<sup>-1</sup>), dok su Little Gem i Majska kraljica imale najveći pad klijavosti već posle druge primenjene koncentracije fenola (100 mgL<sup>-1</sup>).

#### **4.3.1. Analiza aktivnosti peroksidaza kod klijanaca različitih sorti zelene salate gajenih na inhibitornim koncentracijama fenola**

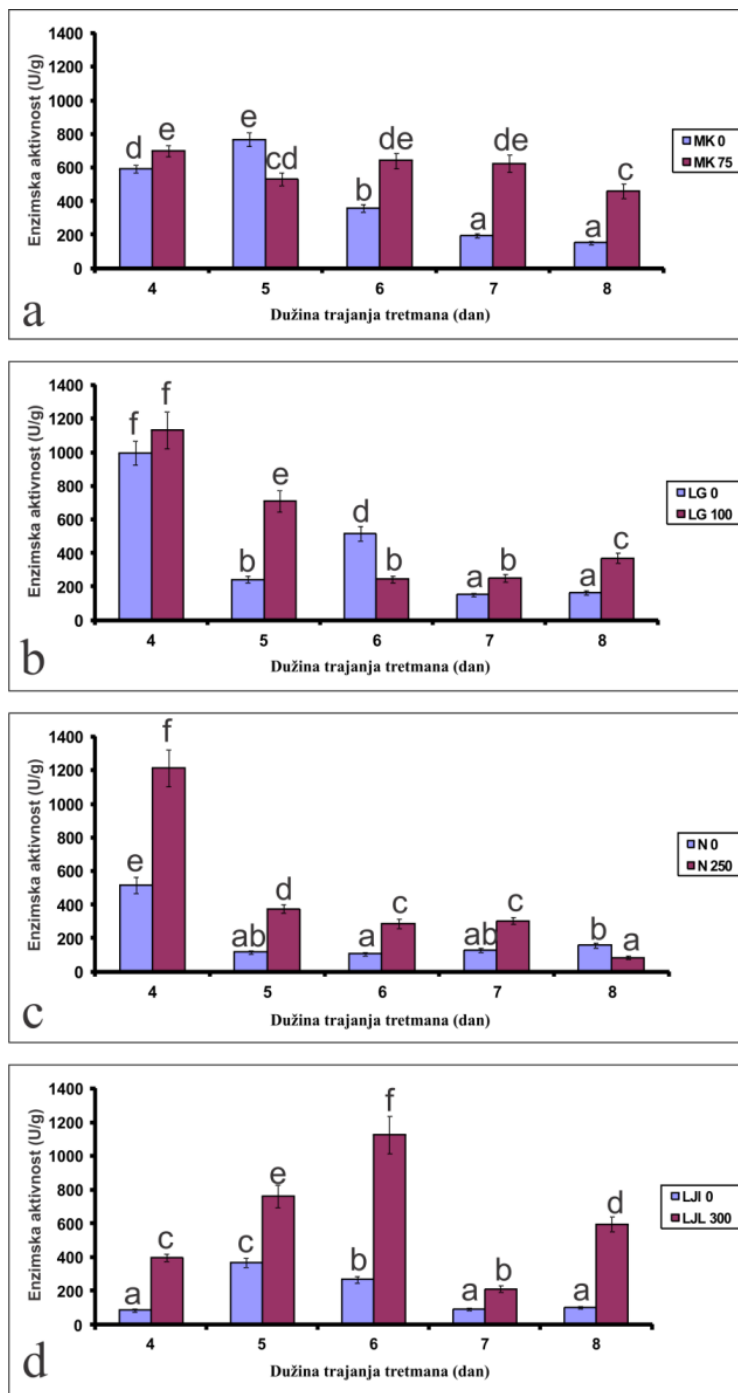
Primećen je trend porasta peroksidazne aktivnosti kod klijanaca gajenih na IK fenola u odnosu na kontrolna semena (Slika 13). Kod sorte Majska kraljica, dolazi do povećanja peroksidazne aktivnosti posle šestog dana gajenja klijanaca na IK50 fenola (Slika 13 a). Sorta Little Gem pokazuje povećanje aktivnosti POX tek posle 8 dana gajenja (Slika 13 b). Kod sorte Nansen nije primećen porast u aktivnosti POX prilikom gajenja klijanaca na fenolu, ali je zato znatan porast aktivnosti enzima primećen kod kontrolnih semena posle 8 dana gajenja u odsustvu fenola (Slika 13 c). Najveći porast aktivnosti POX pokazuje i najotpornija sorta zelene salate, Ljubljanska ledenka, kod koje je primećen blagi porast aktivnosti posle šest dana, a veoma veliki skok peroksidazne aktivnosti zabeležen je posle osam dana gajenja na IK50 fenola koja u ovom slučaju iznosi 300 mgL<sup>-1</sup> (Slika 13 d).



Slika 13. Aktivnost peroksidaza tokom osam dana gajenja na inhibitornoj koncentraciji fenola kod različitih sorti zelene salate: a) MK, Majska kraljica; b) LG, Little Gem; c) N, Nansen; d) LJL, Ljubljanska ledenka

#### **4.3.2. Analiza aktivnosti katalaza kod klijanaca različitih sorti zelene salate gajenih na inhibitornim koncentracijama fenola**

Aktivnost CAT raste kod semena gajenih na IK50 fenola u odnosu na kontrolne klijanice. Aktivnost CAT kod sorte MK značajno je veća nego kod kontrolnih klijanaca tek posle šestog dana gajenja (Slika 14 a). Sorte Little gem i Nansen pokazuju naglo povećanje aktivnosti posle četiri dana (sam početak klijanja) da bi katalazna aktivnost opala već petog dana i ostala do kraja osmog dana na vrednosti ispod početne (Slika 14 b i c). Kod Ljubljanske ledenke katalazna aktivnost raste do šestog dana gajenja i tu dostiže najveću vrednost posle čega naglo opada (Slika 14 d).

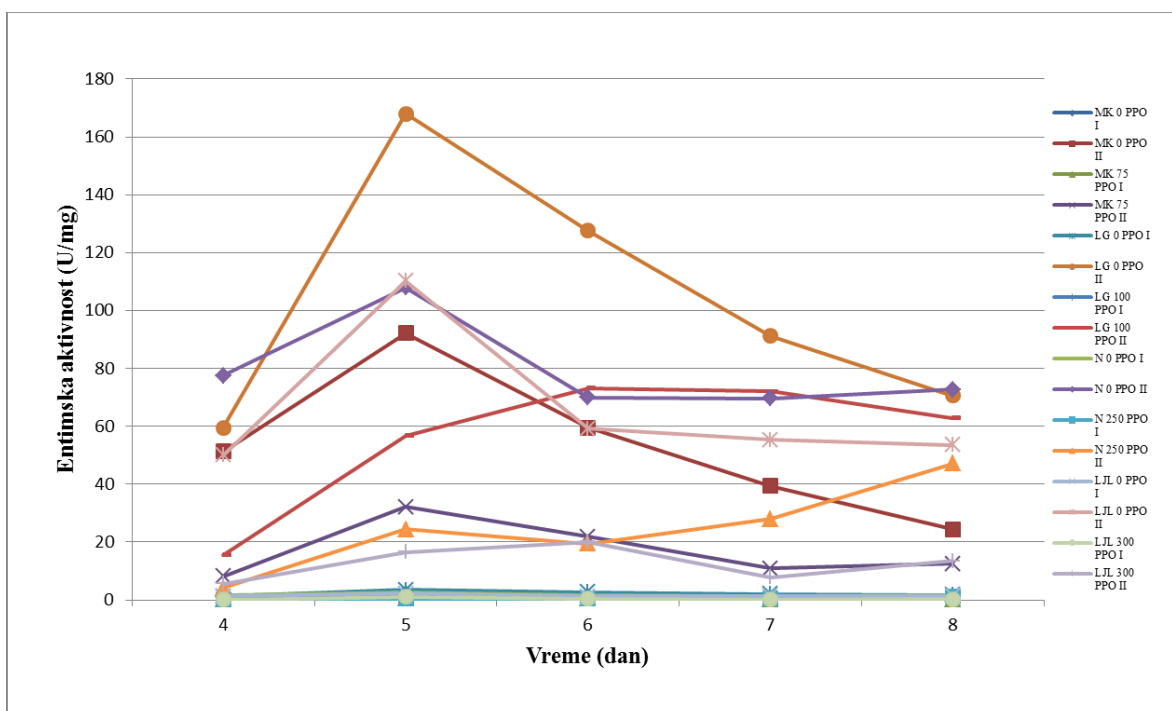


Slika 14. Aktivnost katalaza tokom osam dana gajenja na inhibitornoj koncentraciji fenola kod različitih sorti zelene salate: a) MK, Majska kraljica; b) LG, Little Gem; c) N, Nansen; d) LjL, Ljubljanska ledenka



### 4.3.3. Aktivnost PPO kod različitih sorti zelene salate određena različitim supstratima

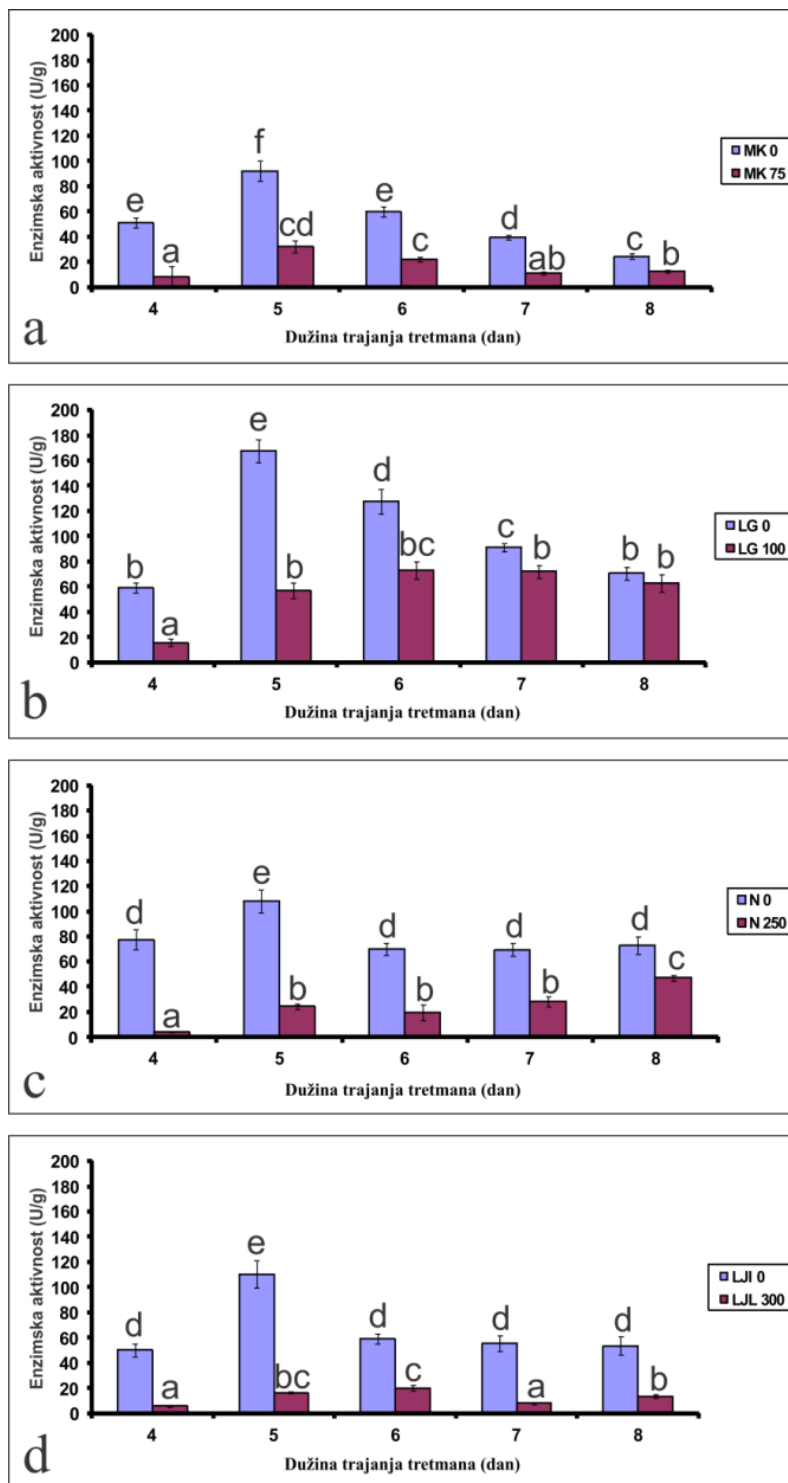
Za detekciju aktivnosti PPO kod četiri sorte zelene salate korišćena su dva supstrata: 4-MC i L-DOPA. Pokazalo se da izbor 4-MC, kao supstrata, dovodi do relativno većih aktivnosti PPO u odnosu na L-DOPA (Slika 15). Dalje određivanje aktivnosti PPO biće rađeno sa 4-MC kao supstratom jer se on pokazao kao adekvatniji za ovaj enzim.



Slika 15. Efekat izbora supstrata na aktivnost PPO kod različitih sorti zelene salate. PPO I - enzimski esej sa 4-MC kao supstratom; PPO II – enzimski esej sa L-DOPA kao supstratom. Sorte zelene salate: MK-Majska kraljica; LG-Little gem; N-Nansen; LjL- Ljubljanska ledenka. Oznaka 0 pored skraćenice sorte označava kontrolu. Oznake redom: 75, 100, 250 i 300 predstavljaju IK50 fenola date sorte.

#### **4.3.4. Analiza aktivnosti polifenol oksidaza kod klijanaca različitim sorti zelene salate gajenih na inhibitornim koncentracijama fenola**

Uočen je porast aktivnosti polifenol oksidaza kod kontrolnih semena sa vremenom (Slika 16). Primećeno je da aktivnost PPO kod kontrolnih semena raste do petog dana gajenja. Kod sorte MK i LG aktivnost PPO statistički značajno opada posle petog dana do kraja osmog dana kod kontrolnih klijanaca (Slika 16 a i b), dok se kod sorti N i LJL posle opadanja aktivnosti nakon petog dana zadržava na istom nivou do kraja gajenja (Slika 16 c i d). Ljubljanska ledenka koja pokazuje najveću tolerantnost na prisustvo fenola i najvišu IK50 fenola, ima najnižu aktivnost PPO u odnosu na druge sorte tokom svih osam dana.

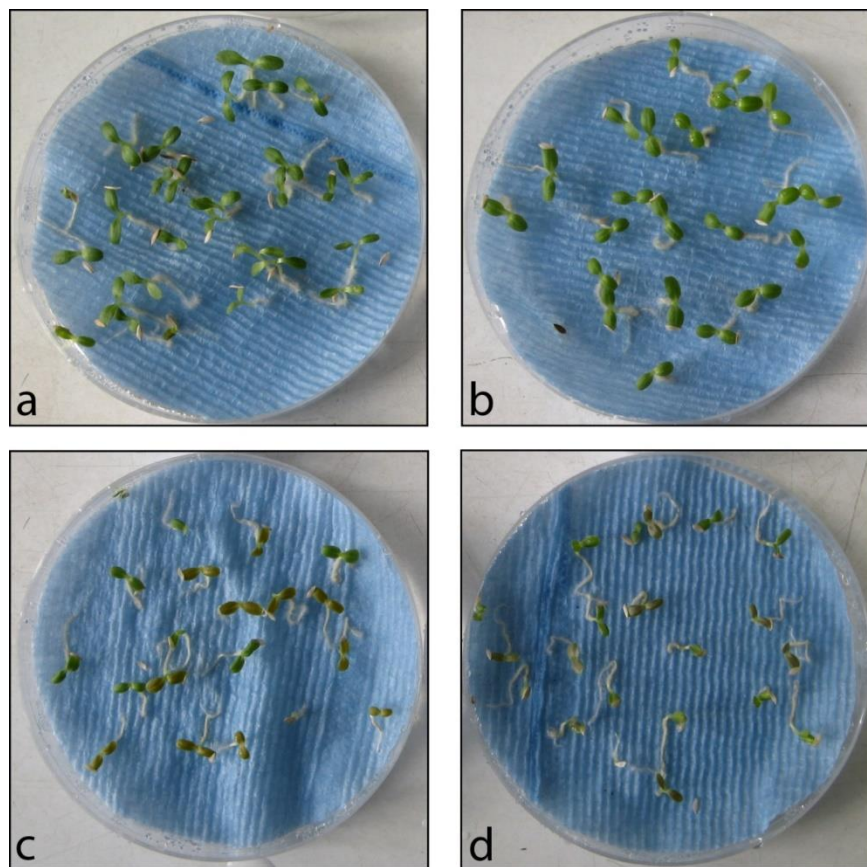


Slika 16. Aktivnost polifenol oksidaze tokom osam dana gajenja na inhibitornoj koncentraciji fenola kod različitih sorti zelene salate: a) MK, Majska kraljica; b) LG, Little Gem; c) N, Nansen; d) LJI, Ljubljanska ledenka

#### **4.4. Morfoloske karakteristike klijanaca različitih sorti zelene salate tokom klijanja na fenolu**

Na Slici 17 prikazane su četiri sorte zelene salate posle osam dana gajenja na IK50 fenola. Sorte Ljubljanska ledenka i Nansen su najtolerantnije na prisustvo fenola (Poglavlje 4.2) i kličaju na najvišim ispitivanim koncentracijama fenola. Klijanci ove dve sorte imaju dobro razvijene listove, tamno zelene boje i lisna ploča im je otvorena i postavljena normalno u odnosu na stabaoce (Slika 17 a i b). Morfološke karakteristike ove dve sorte ne razlikuju se od kontrolnih klijanaca koji nisu gajeni na fenolu (rezultat nije prikazan). Svaka sorta pokazuje uniformnost po pitanju rastenja i razvića klijanaca tokom vremena.

Sorte Majska kraljica i Little Gem pokazuju manju klijavost u prisustvu fenola. Njihove IK50 fenola su niže u odnosu na prve dve opisane sorte. Klijanci sorti MK i LG su slabije razvijeni (Slika 17 c i d). Listovi su im svetlo zelene do žute boje i veoma često uvijeni ka unutrašnjoj strani. Lisna ploča je često postavljena pod uglom prema stablu. Može se videti da se stepen rastenja i razvića razlikuje od biljke do biljke posle istog vremena gajenja.



Slika 17. Morfološke karakteristike klijanaca različitih sorti zelene salate posle osam dana klijanja na IK50 fenola. a) LjL; b) N; c) MK; d) LG

#### **4.5. Gajenje različitih sorti zelene salate na odabranoj koncentraciji fenola u hidroponičnim uslovima**

Za ispitivanje uticaja fenola na rastenje i razviće zelene salate odabrane su dve sorte (Ljubljanska ledenka i Nansen) koje su pokazale najveću otpornost na fenol (Poglavlje 4.2), odnosno najveći procenat klijanja na visokim koncentracijama fenola. Klijanci koji su gajeni na IK50 fenola u prethodnom eksperimentu, ostavljeni su na istoj koncentraciji fenola još 30 dana da bi se video uticaj pomenute koncentracije fenola da dalje rastenje i razviće ove dve sorte. Sa obzirom na to da nije došlo do promena u rastenju i razviću ni kod jedne sorte tokom vremena, prilikom gajenja biljaka na IK50 fenola (50% iskljalih semena zelene salate je raslo na ovoj koncentraciji fenola tokom 30 dana bez vidljivih morfoloških

promena), odabrana je ona koncentracija fenola ispod IK50 na kojoj klija 100% semena. Ta koncentracija fenola je u slučaju obe sorte iznosila  $200 \text{ mgL}^{-1}$ .

U hidroponični rastvor je, posle mesec dana gajenja obe sorte zelene salate, dodavana odabrana koncentracija fenola od  $200 \text{ mgL}^{-1}$ . Tokom narednih deset dana praćena je promena morfologije biljaka, trend eventualnog uklanjanja fenola iz rastvora i aktivnost enzima. Rastvor fenola ( $200 \text{ mgL}^{-1}$ ) je u jednom eksperimentu dodavan na početku i nije menjan tokom deset dana (početna koncentracija fenola, Poglavlje Materijal i Metode, 3.6.), dok je u drugom eksperimentu ovaj rastvor dodavan posle svaka dva dana gajenja (konstantna koncentracija fenola).

#### **4.5.1. Morfoloske karakteristike različitih sorti zelene salate tokom gajenja na početnoj i konstantnoj koncentraciji fenola**

Zelena salata (sorte Ljubljanska ledenka i Nansen), gajena hidroponično, stara trideset dana, koja je narednih deset dana gajena na početnoj ili konstantnoj koncentraciji fenola od  $200 \text{ mgL}^{-1}$ , pokazuje slične morfološke promene (Slika 18). Već posle četiri dana gajenja na koncentraciji fenola od  $200 \text{ mgL}^{-1}$ , dolazi do narušavanja strukture rozete obe sorte (Slika 18, sredina). Listovi gube mehaničke karakteristike i počinju da padaju. Neretko se primećuje i nekroziranje listova i korenova. Sve pomenute morfološke promene izraženije su kod biljaka koje su gajene na konstantnoj koncentraciji fenola (Slika 18, desno). Najmlađi listovi, koji se nalaze unutar rozete, dugo ostaju nepromenjeni, naročito kod biljaka gajenih na početnoj koncentraciji fenola (Slika 18, levo). Kod biljaka, gajenih na konstantnoj koncentraciji fenola, ovi unutrašnji listovi takođe ostaju nepromenjeni, međutim posle trećeg menjanja rastvora fenola (rastvor fenola se menja svaka dva dana i dodaje se ponovo koncentracija od  $200 \text{ mgL}^{-1}$ ) i kod ovih najmlađih listova dolazi do pojave žute boje i gubljenja čvrstine. Ukoliko se biljke posle gajenja u rastvoru fenola koncentracije  $200 \text{ mgL}^{-1}$  dalje gaje na nižoj koncentraciji fenola ( $50 \text{ mgL}^{-1}$ ) dolazi do potpune regeneracije cele biljke i pojave novih listova. Koren biljaka se takođe menja prilikom gajenja zelene salate na pomenutoj koncentraciji fenola. Rezultati morfoloških promena korena prikazani su u Poglavlju 4.5.6.1.

Tokom gajenja zelene salate obe sorte u rastvoru fenola koncentracije  $200 \text{ mgL}^{-1}$  dolazi i do promene boje rastvora fenola iz bezbojne, koja je na početku, do različitih nijansi braon boje koje se javljaju tokom vremena i zavise od dužine gajenja biljaka u rastvoru kao i od sorte zelene salate (Slika 18).



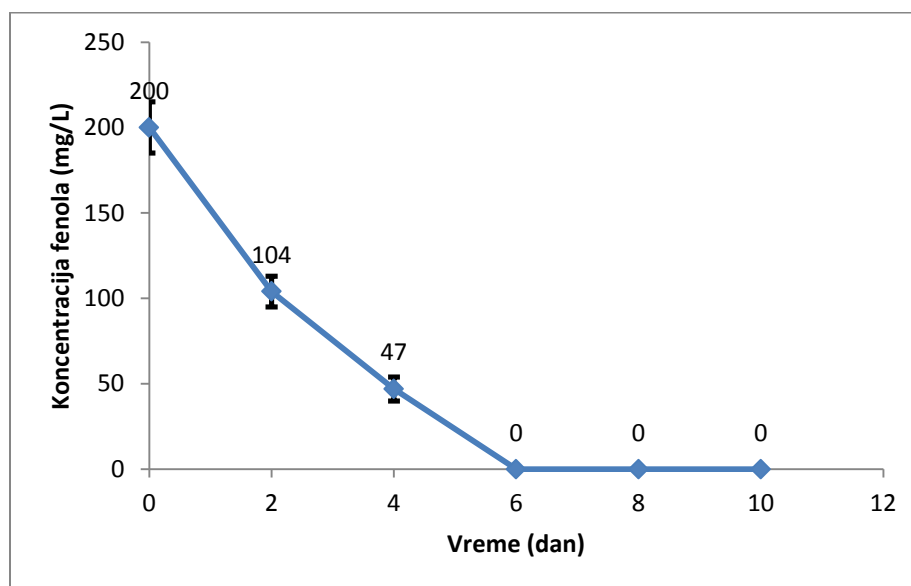
Slika 18. Morfološke karakteristike dve sorte zelene salate tokom gajenja na fenolu koncentracije  $200 \text{ mgL}^{-1}$ . Sorta Ljubljanska ledenka gajena 10 dana na početnoj koncentraciji fenola (levo); Sorta Nansen gajena četiri dana na početnoj koncentraciji fenola (sredina); Sorta Ljubljanska ledenka gajena 10 dana na konstantnoj koncentraciji fenola. Slikano dan posle menjanja rastvora fenola (desno). Slike su napravljene u teglama radi lakšeg uočavanja morfoloških karakteristika korena i lista, a biljke su prethodno gajene u hidroponičnom sistemu.

#### **4.5.2. Promena koncentracije fenola u hidroponičnom rastvoru tokom gajenja različitih sorti zelene salate**

Merena je brzina uklanjanja fenola iz hidroponičnog rastvora u kome su biljke gajene tokom deset dana. Uzorci rastvora uzimani su svaka dva dana tokom trajanja eksperimenta

iz rastvora u kome su gajene obe sorte zelene salate, kao i iz rastvora sa početnom i konstantom koncentracijom fenola.

Sorta LjL gajena na početnoj koncentraciji fenola od  $200 \text{ mgL}^{-1}$  uklanja fenol ispod granica detekcije ( $0.03 \text{ mgL}^{-1}$ ) za korišćenu metodu, posle šest dana. Posle samo dva dana gajenja, koncentracija fenola je upola manja, a posle četiri dana četiri puta manja od početne koncentracije fenola u rastvoru. Trend uklanjanja fenola je linearno zavistan od vremena izloženosti početnoj koncentraciji fenola (Slika 19).

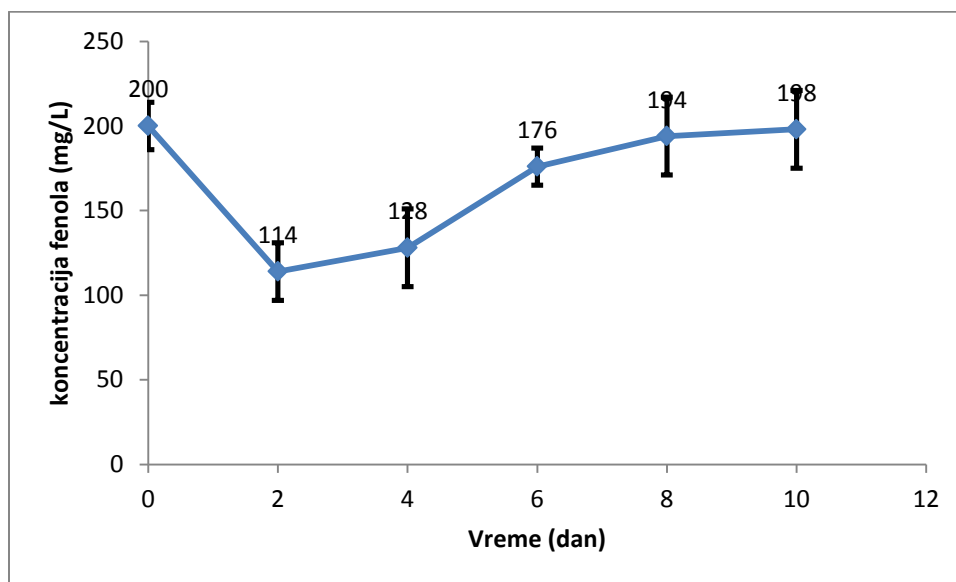


Slika 19. Promena koncentracije fenola tokom vremena u hidroponičnom rastvoru početne koncentracije fenola ( $200 \text{ mgL}^{-1}$ ) u kome je gajena sorta Ljubljanska ledenka

Kod biljaka gajenih na konstantnoj koncentraciji fenola primećen je isti efekat uklanjanja fenola, tokom prva dva dana gajenja na koncentraciji fenola od  $200 \text{ mgL}^{-1}$ , kao i kod biljaka gajenih na početnoj koncentraciji fenola (Slika 20). Posle drugog dana gajenja efekat uklanjanja fenola je manje izražen i opada sa  $86 \text{ mgL}^{-1}$  (2. dana) na  $72 \text{ mgL}^{-1}$  (4. dana) za dva dana. Međutim, već prilikom treće zamene rastvora fenola (6. dana) uklanjanje fenola iz rastvora se svodi na svega  $24 \text{ mgL}^{-1}$  za dva dana gajenja. Tokom 10

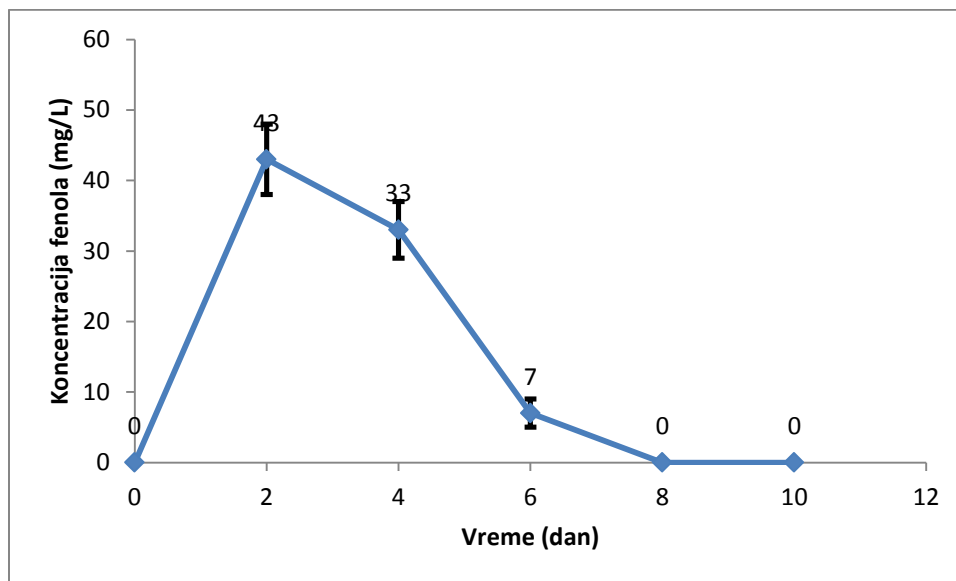


dana gajenja, odnosno pet zamena rastvora fenola, dolazi do nemogućnosti uklanjanja fenola iz rastvora.



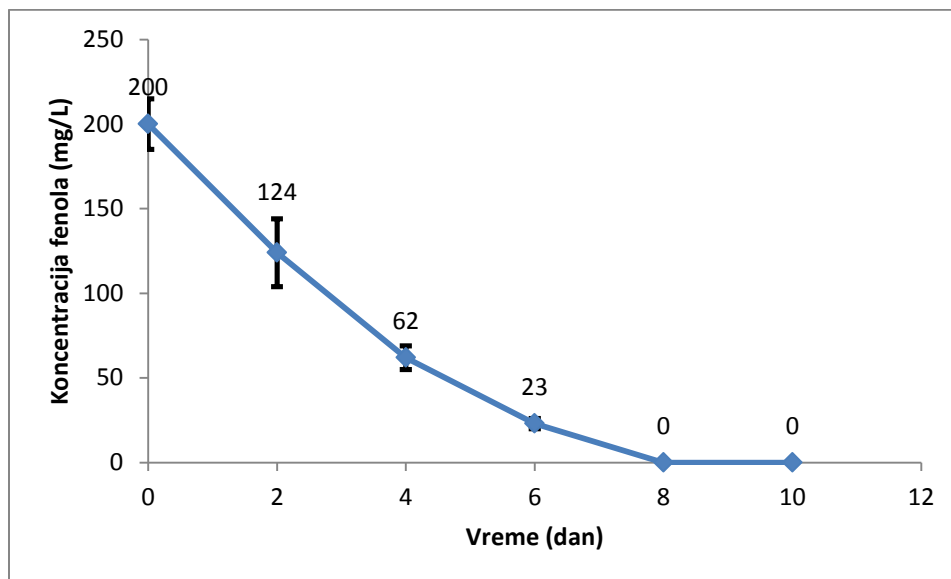
Slika 20. Promena koncentracije fenola tokom vremena u hidroponičnom rastvoru konstantne koncentracije fenola ( $200 \text{ mgL}^{-1}$ ) u kome je gajena sorta Ljubljanska ledenka

Kako bi se ispitala mogućnost uklanjanja fenola isključivo efektom adsorpcije fenola na koren zelene salate, ispitivana je koncentracija fenola u vodi nakon ispiranja korenova uzimanih sa biljaka gajenih na početnoj koncentraciji fenola tokom deset dana (Slika 21). Može se videti da postoji izvesna količina fenola koja je adsorbovana na koren biljke, ali ona opada tokom vremena, da bi posle osam dana gajenja bila ispod granice detekcije.



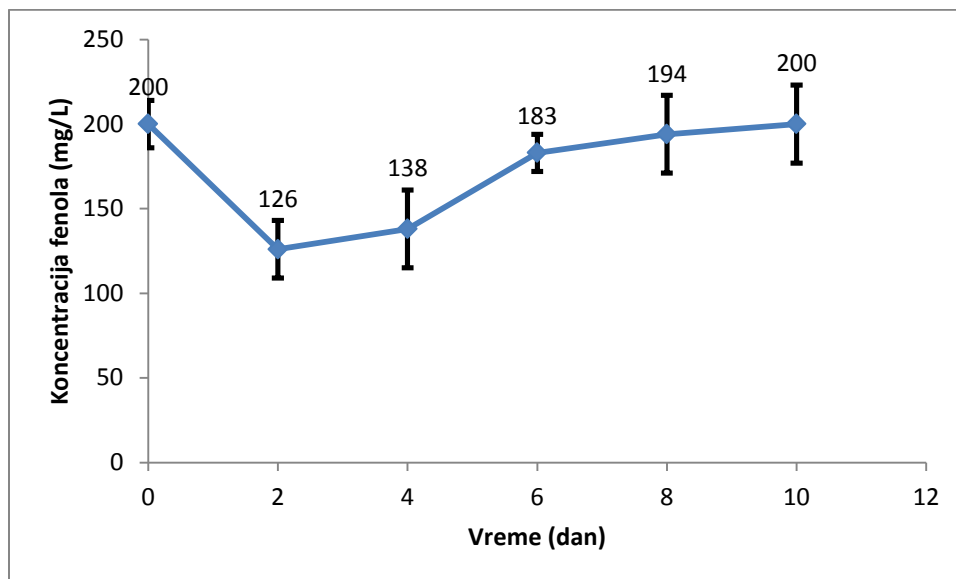
Slika 21. Promena koncentracije fenola u rastvoru tokom vremena posle ispiranja korenova sorte Ljubljanska ledenka gajene u hidroponičnom rastvoru početne koncentracije fenola ( $200 \text{ mgL}^{-1}$ )

Sorta Nansen koja je gajena na početnoj koncentraciji fenola od  $200 \text{ mgL}^{-1}$  uklanja fenol ispod granica detekcije ( $0.03 \text{ mgL}^{-1}$ ) za korišćenu metodu, posle šest dana gajenja. Posle dva dana gajenja, koncentracija fenola je oko 40% manja, a posle četiri dana koncentracija fenola je oko 3,2 puta manja od početne koncentracije fenola u rastvoru. Trend uklanjanja fenola je linearno zavistan od vremena izloženosti početnoj koncentraciji fenola, ali je tempo uklanjanja fenola iz rastvora sporiji nego kod sorte Ljubljanska ledenka (Slika 22).



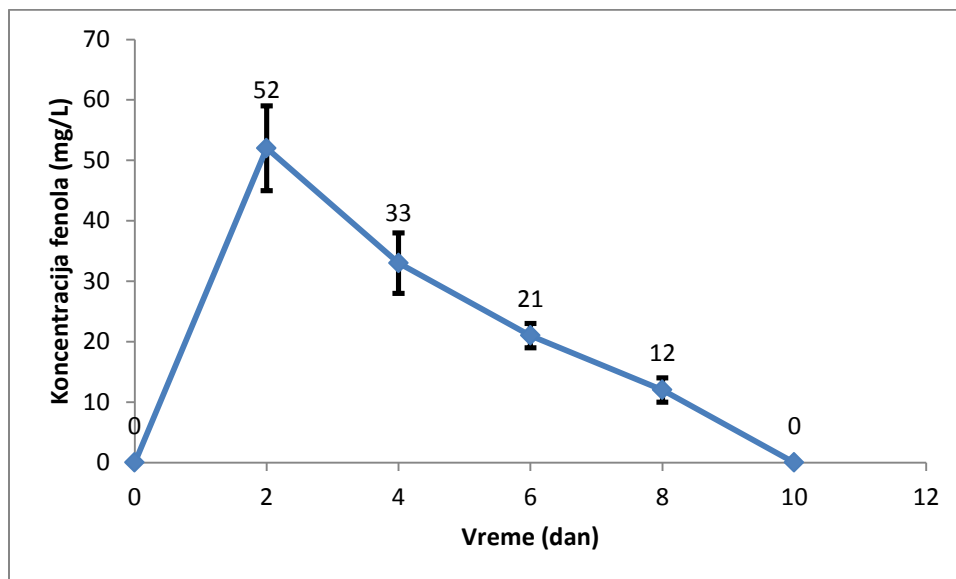
Slika 22. Promena koncentracije fenola tokom vremena u hidroponičnom rastvoru početne koncentracije fenola ( $200 \text{ mgL}^{-1}$ ) u kome je gajena sorta Nansen

Kod biljaka sorte Nansen gajenih na konstantnoj koncentraciji fenola primećen je isti efekat uklanjanja fenola, tokom prva dva dana gajenja na koncentraciji fenola od  $200 \text{ mgL}^{-1}$ , kao i kod biljaka gajenih na početnoj koncentraciji fenola (Slika 23). Sličan model primećen je i kod sorte Ljubljanska ledenka. Posle drugog dana gajenja efekat uklanjanja fenola je manje izražen. Tempo uklanjanja fenola posle drugog dana gajenja je sporiji nego kod prethodno ispitivane sorte, ali se kapacitet ove sorte salate za uklanjanje fenola iz vode gubi osmog dana kao i u prethodnom slučaju. Tokom 10 dana gajenja, odnosno pet zamena rastvora fenola, kao i kod sorte Ljubljanska ledenka, dolazi do nemogućnosti uklanjanja fenola iz rastvora.



Slika 23. Promena koncentracije fenola tokom vremena u hidroponičnom rastvoru konstantne koncentracije fenola ( $200 \text{ mgL}^{-1}$ ) u kome je gajena sorta Nansen

Prilikom ispiranja korenova sorte Nansen, vidi se da je adsorpcija fenola malo veća nego kod sorte Ljubljanska ledenka (Slika 24). Adsorpcija fenola opada sa vremenom, ali ne tako brzo kao kod prethodne sorte i dostiže nivo ispod granica detekcije tek 10. dana gajenja.



Slika 24. Promena koncentracije fenola u rastvoru tokom vremena posle ispiranja korenova sorte Ljubljanska ledenka gajene u hidroponičnom rastvoru početne koncentracije fenola ( $200 \text{ mgL}^{-1}$ )

#### 4.5.3. Određivanje aktivnosti enzima kod različitih sorti zelene salate gajenih na početnoj i konstantnoj koncentraciji fenola

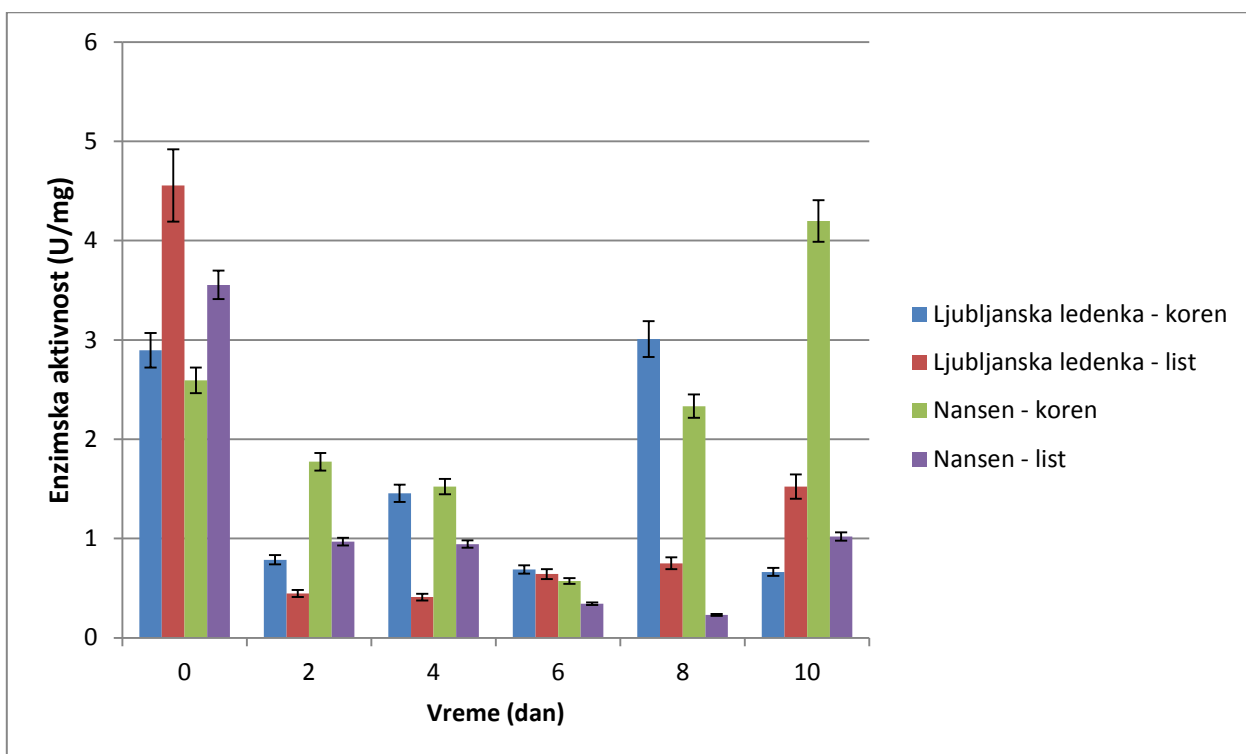
Uzorci korena i lista dve sorte zelene salate (Ljubljanska ledenka i Nansen) uzimani su svaka dva dana tokom gajenja biljaka na početnoj ili konstantnoj koncentraciji fenola od  $200 \text{ mgL}^{-1}$  u hidroponičnom rastvoru sa ciljem ispitivanja aktivnosti enzima tokom gajenja biljaka na fenolu (10 dana). Rađena je analiza aktivnosti POX, CAT, PPO i SOD.

Posle 10 dana gajenja na fenolu, biljke gajene na početnoj koncentraciji fenola vraćene su u hidroponični rastvor bez fenola i gajene još 3 dana. I kod ovih biljaka određivana je aktivnost svih enzima u listu i korenu da bi se ustanovilo da li se aktivnost enzima vraća na početnu vrednost i kojim tempom.

##### 4.5.3.1. Analiza aktivnosti peroksidaza kod različitih sorti zelene salate gajenih na početnoj i konstantnoj koncentraciji fenola

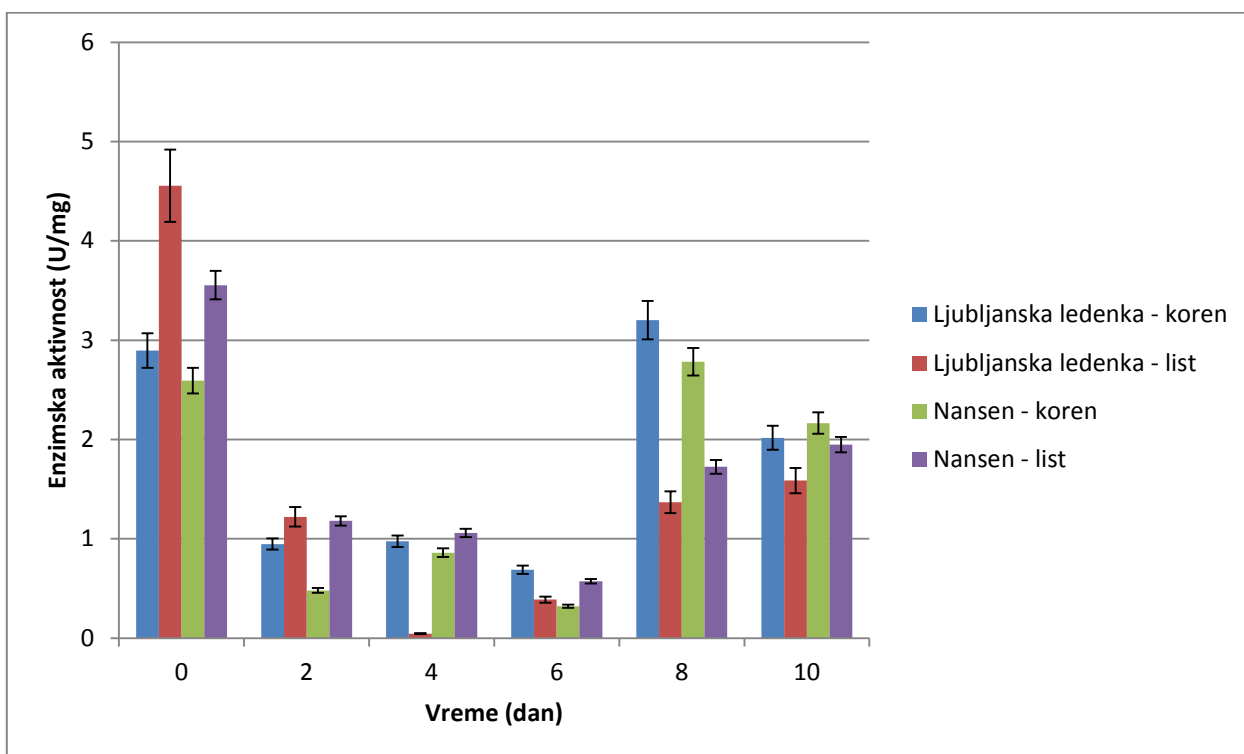
Kod sorte Ljubljanska ledenka gajene na početnoj koncentraciji fenola, aktivnost POX u korenu dostiže najveću vrednost posle osam dana gajenja na fenolu, što je i aktivnost na

samom početku (Slika 25). U korenu sorte Nansen dolazi do naglog porasta aktivnosti POX posle 8. dana (2,33 U/mg), da bi dostigla najveću vrednost posle 10 dana gajenja. Aktivnost POX lista Lubljanske ledenke pokazuje nagli pad već nakon drugog dana tretmana, sa tendencijom blagog porasta aktivnosti sa vremenom. Aktivnost peroksidaza u listu sorte Nansen takođe pokazuje pad aktivnosti već posle drugog dana, ali je on manje izražen nego kod varijeteta Ljubljanska ledenka, i pokazuje najmanju vrednost aktivnosti 8. dana gajenja, za razliku od sorte LJL koja minimalnu aktivnost POX u listu ima 4. dana gajenja. Najviša vrednost aktivnosti POX zabeležena je 10. dana u korenu sorte Nansen ukoliko je biljka gajena na početnoj koncentraciji fenola i iznosila je 4,19 U/mg što je za 38% veća vrednost u odnosu na kontrolne korenove iste sorte.



Slika 25. Aktivnost POX kod različitih sorti zelene salate gajenih na početnoj koncentraciji fenola tokom deset dana

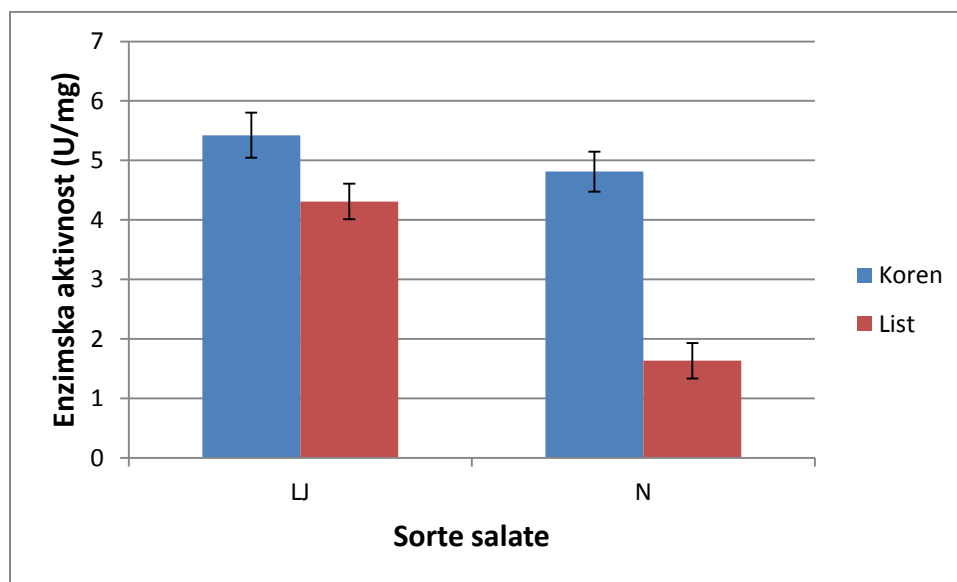
Kod biljaka gajenih na konstantnoj koncentraciji fenola, kod obe sorte, i u korenu i u listu dolazi do opadanja enzimske aktivnosti tokom 2. ,4. i 6. dana gajenja, odnosno tokom 3 ciklusa izmene rastvora fenola (Slika 26). Nagli skok aktivnosti primećuje se u korenovima obe sorte tokom 8. dana trajanja eksperimenta (3,20 i 2,78 U/mg, LJJ i N redom). Posle 10 dana enzimska aktivnost u listovima se ne menja u odnosu na 8. dan, dok aktivnost POX u korenovima opada.



Slika 26. Aktivnost POX kod različitih sorti zelene salate gajenih na konstantnoj koncentraciji fenola tokom deset dana

Biljke su dalje gajene tri dana u rastvoru bez fenola nakon čega je u korenu i listovima obe sorte merena aktivnost POX. Ove biljke su prethodno gajene na početnoj koncentraciji fenola ( $200 \text{ mgL}^{-1}$ ). Korenovi obe sorte zelene salate koje su gajene tri dana u rastvoru bez fenola imaju više vrednosti aktivnosti POX u odnosu na one zabeležene kod biljaka gajenih na početnoj koncentraciji fenola i u korenu i u listovima (Slika 27). Aktivnost POX je veća u korenu nego u listovima kod obe sorte (20 i 295 % za LJJ i N, redom). Enzimska

aktivnost u listu sorte LJL pokazuje nešto nižu vrednost u odnosu na listove kontrolnih biljaka iz prethodnog eksperimenta. Kod sorte Nansen ova vrednost je upola manja.

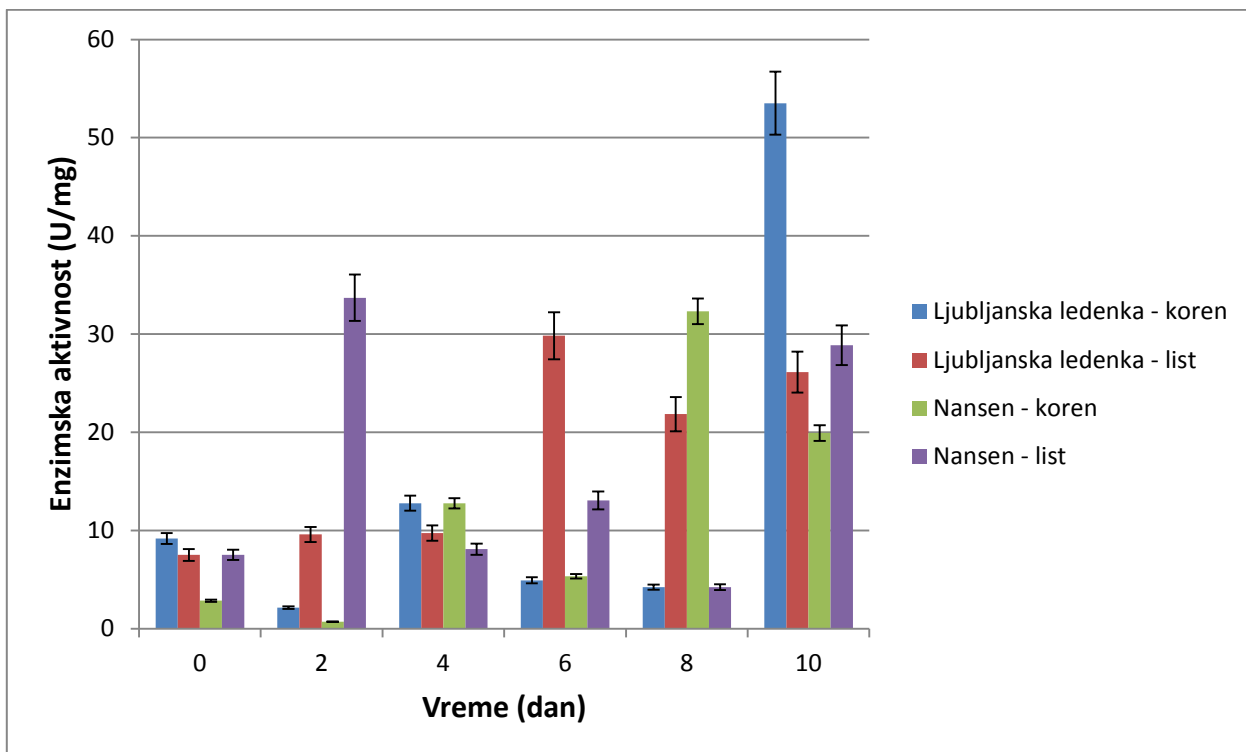


Slika 27. Aktivnost POX kod različitih sorti zelene salate gajenih tri dana u rastvoru bez fenola posle deset dana gajenja na početnoj koncentraciji fenola (10+3)

#### 4.5.3.2. Analiza aktivnosti katalaza kod različitih sorti zelene salate gajenih na početnoj i konstantnoj koncentraciji fenola

Aktivnost CAT u korenu sorte LJL pokazuje blagi pad već drugog dana eksperimenta, da bi već 4. dana pokazala veliki skok vrednosti, a najveću aktivnost dostigla 10. dana u korenu kada je biljka gajena na početnoj koncentraciji fenola (najveća vrednost zabeležena je u korenu sorte LJL i iznosila je 53,51 U/mg, što je porast od 5,8 puta u odnosu na kontrolne biljke). U korenu sorte Nansen pokazana je aktivnost CAT koja se naizmenično menja, sa maksimalnom vrednošću 8. dana gajenja i blagim padom na kraju tretmana. U listu sorte Ljubljanska ledenka, nakon relativno niske aktivnosti 2. i 4. dana, najvišu vrednost pokazuje 6. i 10. dana eksperimenta, sa blagim padom 8. dana. Aktivnost CAT lista sorte Nansen, slično kao kod korena, pokazuje naizmenične skokove i padove katalazne aktivnosti sa maksimumom aktivnosti 2. dana gajenja kada iznosi 33,7 U/mg (Slika 28).



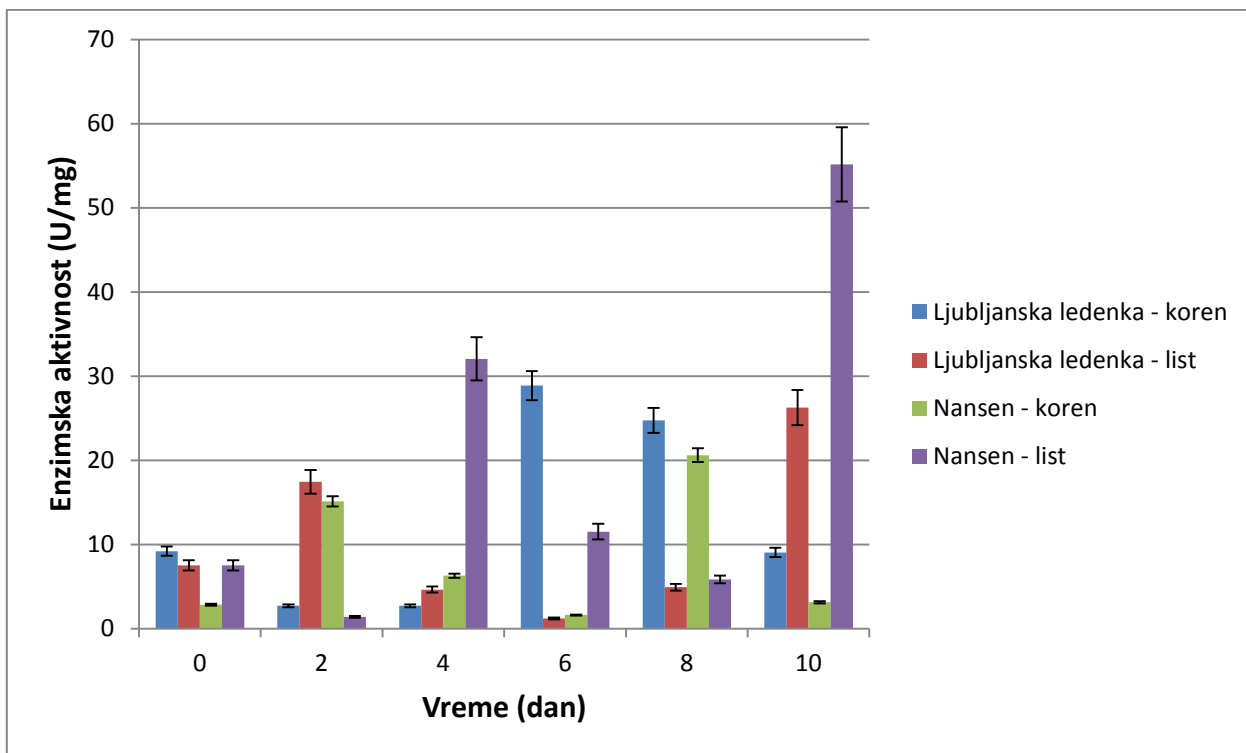


Slika 28. Aktivnost CAT kod različnih sorti zelene salate gajenih na početnoj koncentraciji fenola tokom deset dana

Aktivnost CAT u korenu sorte Ljubljanska ledenka pokazuje pad 2. dana gajenja, da bi naglo skočila 6. dana što je i njena najviša vrednost tokom gajenja biljaka na konstantnoj koncentraciji fenola (Slika 29). Aktivnost CAT u listu Ljubljanske ledenke pokazuje skok 2. dana gajenja, sa minimalnom zabeleženom vrednošću 6. dana (6,15 puta manja vrednost u odnosu na kontrolu). Maksimalna vrednost ativnosti katalaza zabeležena je 10 dana. Aktivnost CAT u listu sorte LJL opet raste 10. dana gajenja.

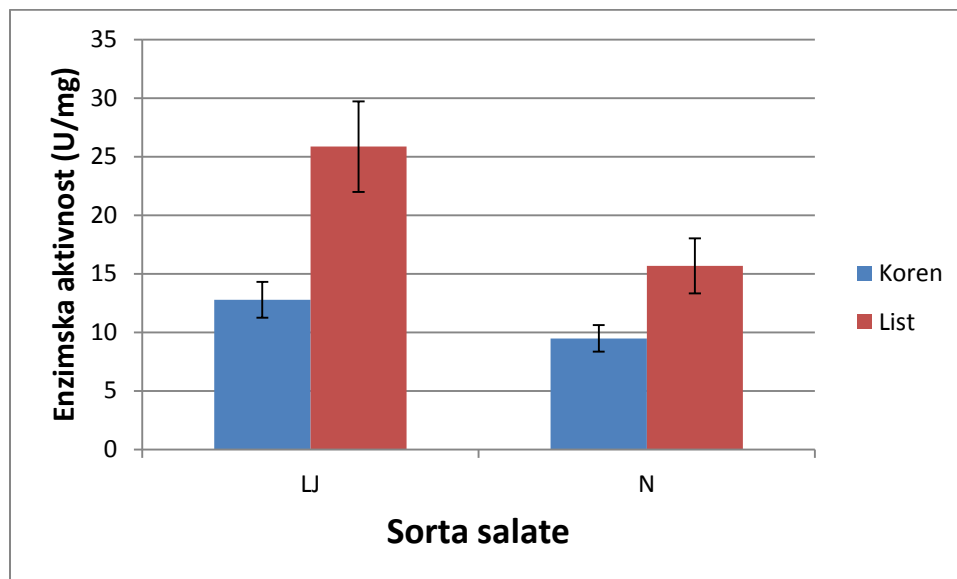
Najviša vrednost aktivnosti CAT zabeležena je u listu sorte Nansen i to 10. dana gajenja, što je i najviša zabeležena vrednost katalazne aktivnosti tokom celokupnog trajanja eksperimenta kod salata gajenih na konstantnoj koncentraciji fenola (55,16 U/mg, što je 7,33 puta više nego što je zabeleženo u kontrolnim biljkama) (Slika 29). U korenu sorte

Nansen primetan je porast u katalaznoj aktivnosti 2. i 8. dana, dok je aktivnost tokom ostalih dana slična početnoj kod kontrolnih biljaka.



Slika 29. Aktivnost CAT kod različitih sorti zelene salate gajenih na konstantnoj koncentraciji fenola tokom deset dana

U korenovima i listovima obe sorte pokazana je nešto viša vrednost aktivnosti CAT u odnosu na one zabeležene kod kontrolnih biljaka u prethodnom eksperimentu gajenih na početnoj koncentraciji fenola. Aktivnost CAT u listovima veća je nego u korenovima kod obe sorte i to 2,02 puta za LJL i 1,65 puta za sortu N (Slika 30), a razlika u aktivnosti CAT u listovima među sortama je veća nego razlika u aktivnosti enzima među korenovima.



Slika 30. Aktivnost CAT kod različitim sorti zelene salate gajenih tri dana u rastvoru bez fenola posle deset dana gajenja na početnoj koncentraciji fenola (10+3)

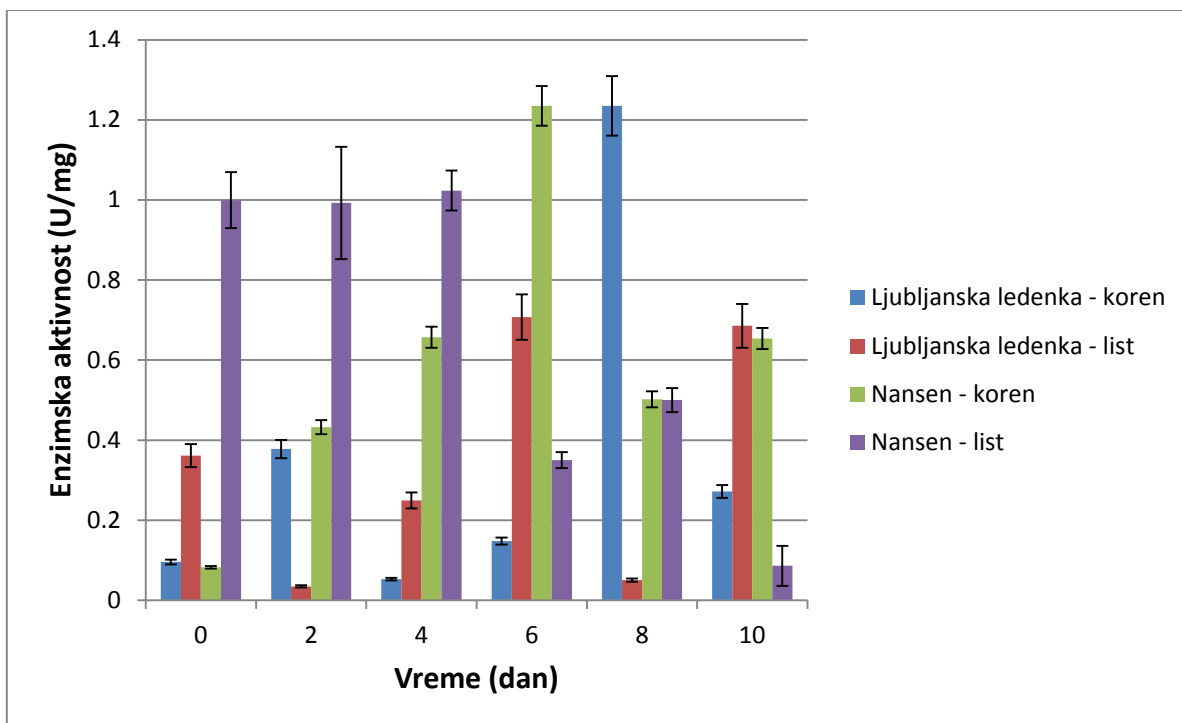
#### 4.5.3.3. Analiza aktivnosti PPO kod različitim sorti zelene salate gajenih na početnoj i konstantnoj koncentraciji fenola

Aktivnost PPO određivana je uz pomoć dva supstrata: L-DOPA i 4-MC. Biće prikazani rezultati dobijeni na oba načina.

##### 4.5.3.3.1. Analiza aktivnosti PPO kod različitim sorti zelene salate gajenih na početnoj i konstantnoj koncentraciji fenola određivane uz pomoć L-DOPA kao supstrata

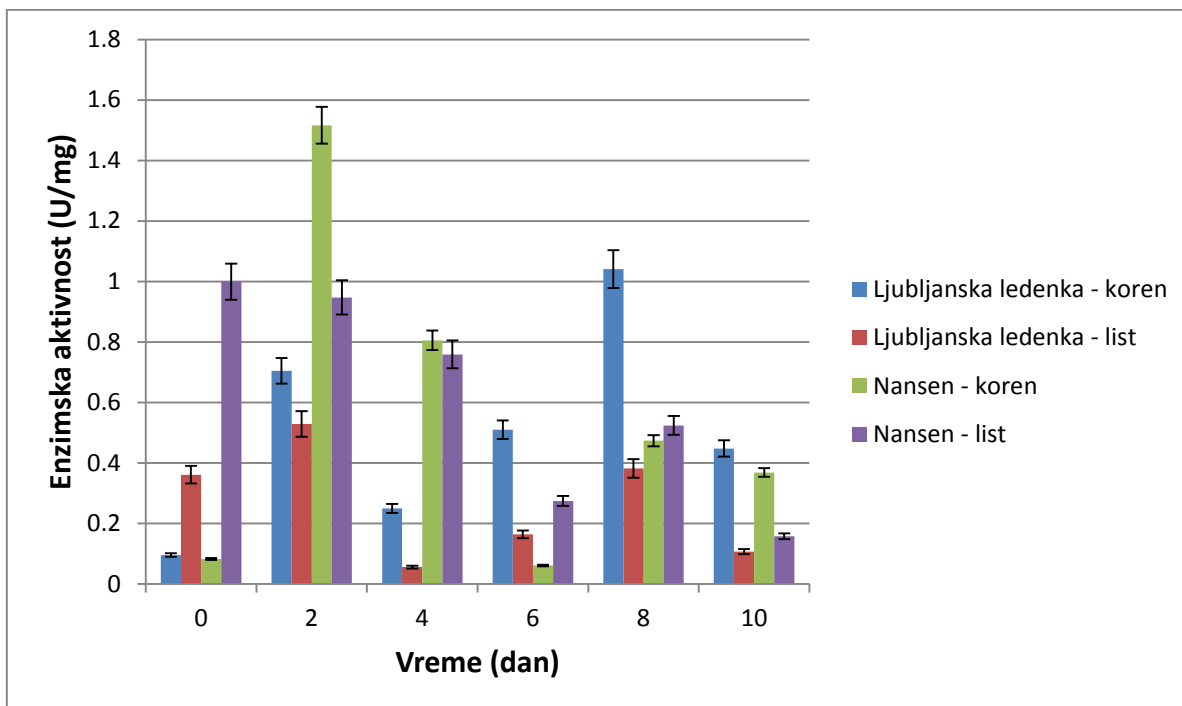
Aktivnost PPO u korenu sorte Ljubljanska ledenka pokazuje porast 2. dana gajenja na početnoj koncentraciji fenola, da bi maksimalna aktivnost enzima bila zabeležena 8. dana gajenja (1,23 U/mg). Za razliku od korena, u listu sorte L JL aktivnost PPO pokazuje nižu vrednost već drugog dana koju prati trend rasta aktivnosti do 6. dana eksperimenta, zatim opet pad 8. i porast 10. dana. U korenu sorte Nansen zabeležen je pravilan rast aktivnosti enzimske aktivnosti tokom do 6. dana kada je i najveća aktivnost PPO (1,23 U/mg) koja je 14,55 puta veća nego kod kontrolnih biljaka. Aktivnost PPO u listu sorte Nansen ne

pokazuje veliku promenu do 6. dana gajenja posle koga pada. Najviše aktivnosti PPO zabeležene su u korenu sorte Nansen 6. dana i u korenu sorte Ljubljanska ledenka 8. dana trajanja eksperimenta (Slika 31).



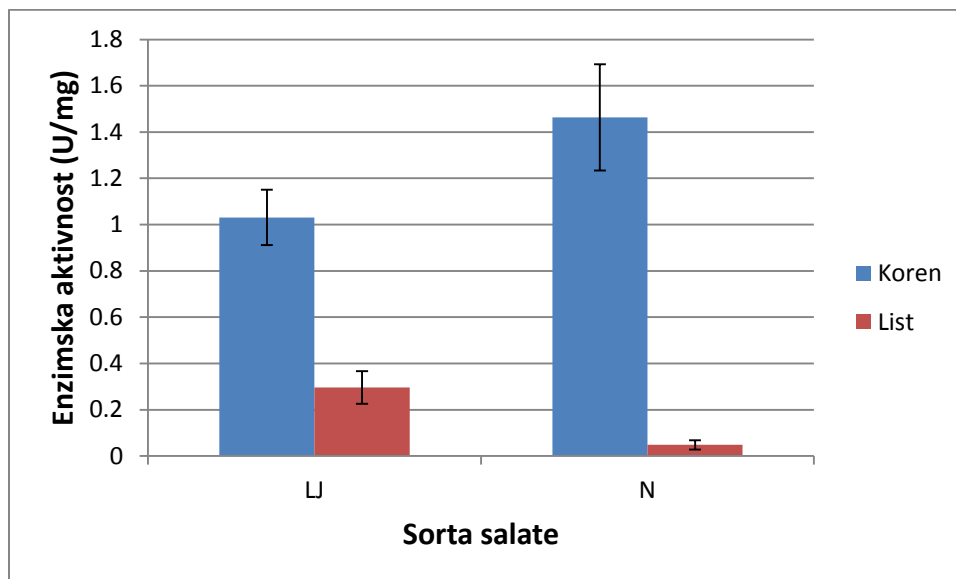
Slika 31. Aktivnost PPO kod različitih sorti zelene salate gajenih na početnoj koncentraciji fenola tokom deset dana. Aktivnost enzima određivana sa L-DOPA

Aktivnost PPO u korenu sorte Ljubljanska ledenka, gajenih na konstantnoj koncentraciji fenola, pokazuje najveću aktivnost 8. dana gajenja (1,04 U/mg), da bi na kraju tretmana 10. dana opala (Slika 32). U listu sorte Ljubljanska ledenka dolazi do skoka enzimske aktivnosti 2. i 8. dana, dok su aktivnosti PPO tokom ostalih dana manje nego kod kontrole. U korenu sorte Nansen dolazi do skoka enzimske aktivnosti već drugog dana što je i najveća aktivnost PPO u korenu ove sorte (1,51 U/mg). Posle ove maksimalne aktivnosti PPO u korenu sorte Nansen opada do kraja eksperimenta. Aktivnost PPO u listu sorte Nansen opada od početka eksperimenta do kraja izuzev blagog porasta 8. dana gajenja.



Slika 32. Aktivnost PPO kod različitih sorti zelene salate gajenih na konstantnoj koncentraciji fenola tokom deset dana. Aktivnost enzima određivana sa L-DOPA

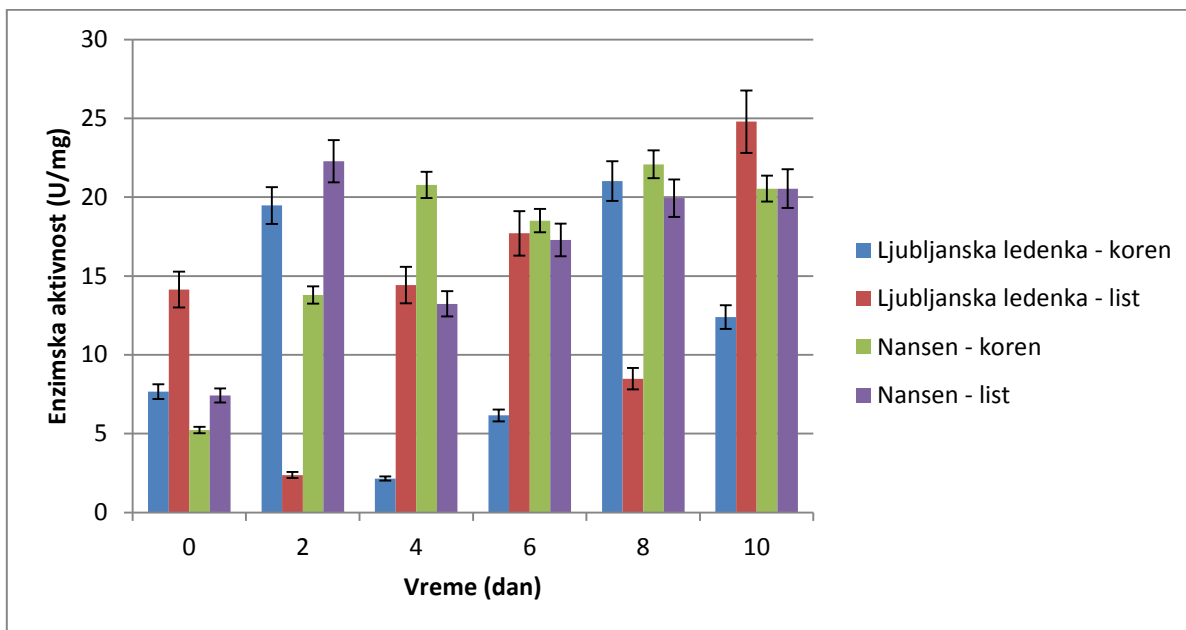
Nakon 10 dana gajenja na fenolu, biljke gajene na početnoj koncentraciji fenola prebačene su u rastvor bez fenola u trajanju od tri dana i analizirana je aktivnost PPO u korenu i listu obe sorte (Slika 33). U korenu obe sorte zabeležena je nešto viša vrednost aktivnosti PPO u odnosu na kontrolne biljke iz prethodnog eksperimenta, dok aktivnost enzima u listu ima nižu vrednost u odnosu na istu kontrolu. Primećena je i razlika u aktivnosti enzima u korenu i listu, koja je čak 30 puta veća u korenu sorte Nansen nego u njenim listovima.



Slika 33. Aktivnost PPO kod različiti sorti zelene salate gajenih tri dana u rastvoru bez fenola posle deset dana gajenja na početnoj koncentraciji fenola ( $10+3$ ). Aktivnost enzima određivana sa L-DOPA

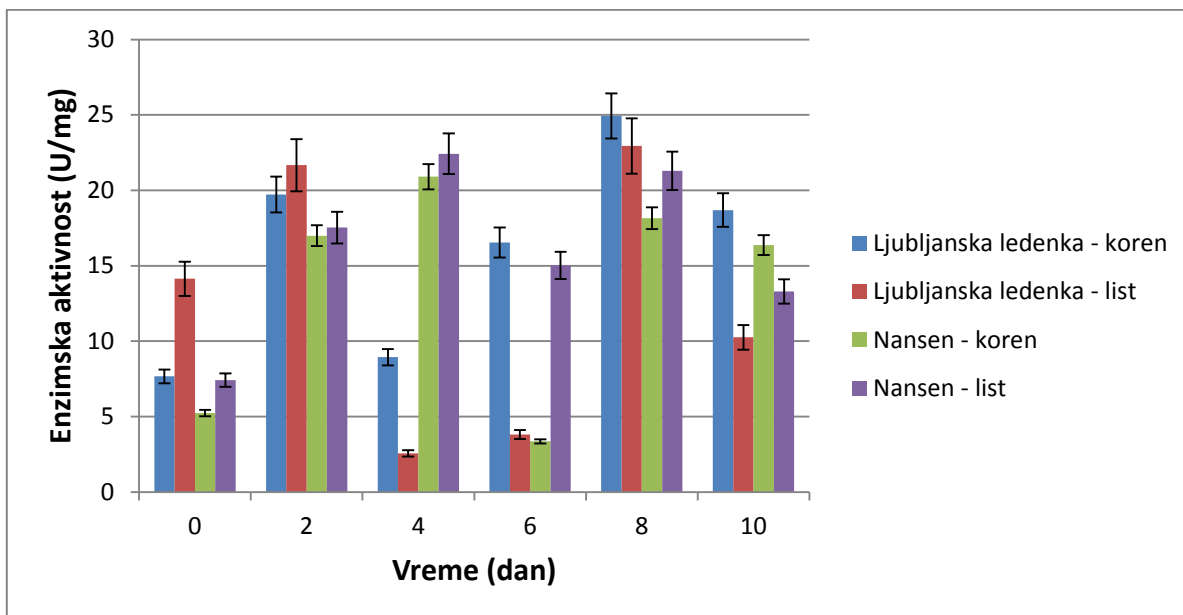
#### 4.5.3.3.2. Analiza aktivnosti PPO kod različiti sorti zelene salate gajenih na početnoj i konstantnoj koncentraciji fenola određivane pomoću supstrata 4-MC

Kod obe sorte, u korenu i listu, tokom celokupnog trajanja eksperimenta prisutan je talasasti trend promene aktivnosti PPO (Slika 34). U korenu sorte Ljubljanska ledenka maksimalna aktivnost PPO primećena je 2. i 8. dana gajenja. Za razliku od korena, u listu sorte Ljubljanska ledenka aktivnost PPO prati suprotan trend u odnosu na koren tj. tamo gde je aktivnost u korenu veća, u listu je manja i obratno. U listu sorte LJL zabeležena je najveća aktivnost PPO 10. dana gajenja, što je i najveća aktivnost ovog enzima tokom eksperimenta (24,79 U/mg). PPO aktivnost korena sorte Nansen raste u odnosu na kontrolu tokom gajenja biljaka na fenolu. U listu sorte Nansen, zabeležen je linearni porast aktivnosti PPO od 4. do 6. dana gajenja iako je maksimalna aktivnost enzima zabeležena baš 2. dana eksperimenta i iznosila je 19,47 U/mg.



Slika 34. Aktivnost PPO kod različitih sorti zelene salate gajenih na početnoj koncentraciji fenola tokom deset dana. Aktivnost enzima određivana sa 4-MC

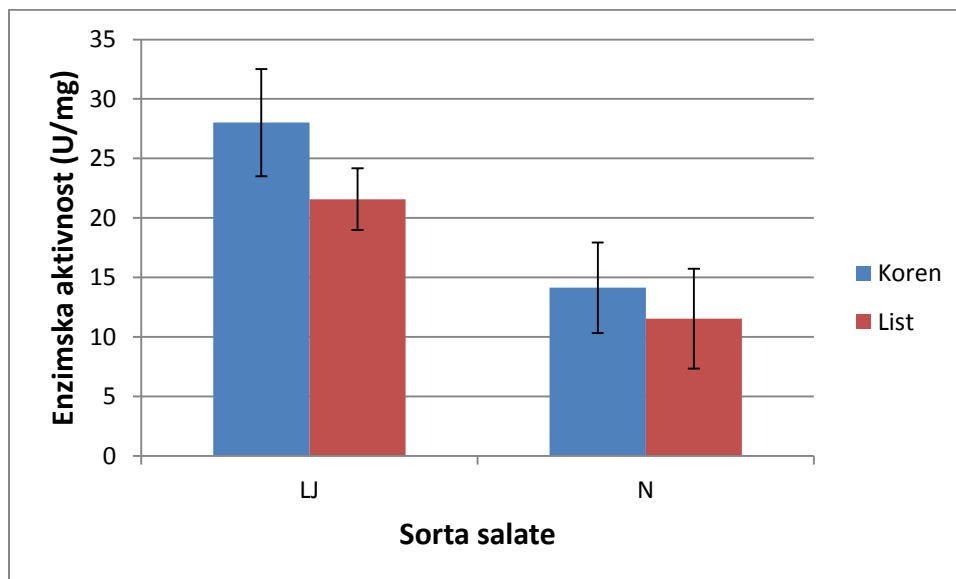
U korenu sorte Ljubljanska ledenka, gajene na konstantnoj koncentraciji fenola, uočen je skok aktivnosti PPO 2. dana eksperimenta posle koga sledi pad aktivnosti 4. dana pa opet porast do maksimalne aktivnosti 8. dana (24,93 U/mg) (Slika 35). Isti trend aktivnosti PPO ove sorte je zabeležen u listu. Aktivnost PPO korena sorte Nansen pokazuje porast tokom svih dana osim 6. dana gajenja kada je primećen pad aktivnosti enzima od 1,5 puta u odnosu na kontrolne biljke. Isti trend aktivnosti PPO u korenu primećen je u listu sorte Nansen, s tim što su relativne vrednosti aktivnosti enzima veće.



Slika 35. Aktivnost PPO kod različitih sorti zelene salate gajenih na konstantnoj koncentraciji fenola tokom deset dana. Aktivnost enzima određivana sa 4-MC

Kod biljaka koje su posle gajenja na početnoj koncentraciji fenola, gajene tri dana u rastvoru bez fenola, zabeležen je porast aktivnosti PPO (Slika 36) u korenu i listu obe sorte u odnosu na kontrolne biljke iz prethodnog eksperimenta.





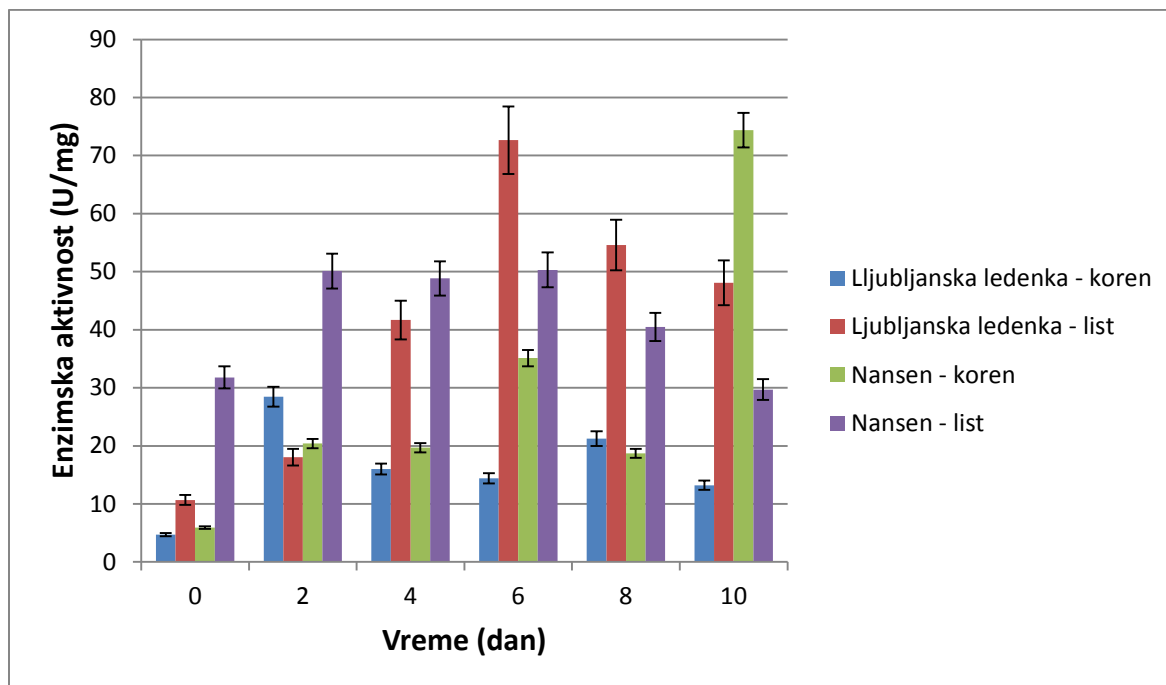
Slika 36. Aktivnost PPO kod različitih sorti zelene salate gajenih tri dana u rastvoru bez fenola posle deset dana gajenja (10+3) na početnoj koncentraciji fenola. Aktivnost enzima određivana sa 4-MC

Primećena je velika razlika u aktivnosti PPO u zavisnosti da li je njena detekcija rađena sa L-DOPA ili 4-MC. Vrednosti aktivnosti PPO izmerene uz pomoć 4-MC bile su do 20 puta veće u odnosu na one izmerene sa L-DOPA kao supstratom, što ukazuje da je 4-MC adekvatniji supstrat za PPO.

#### 4.5.3.4. Analiza aktivnosti superoksid dismutaze kod različitih sorti zelene salate gajenih na početnoj i konstantnoj koncentraciji fenola

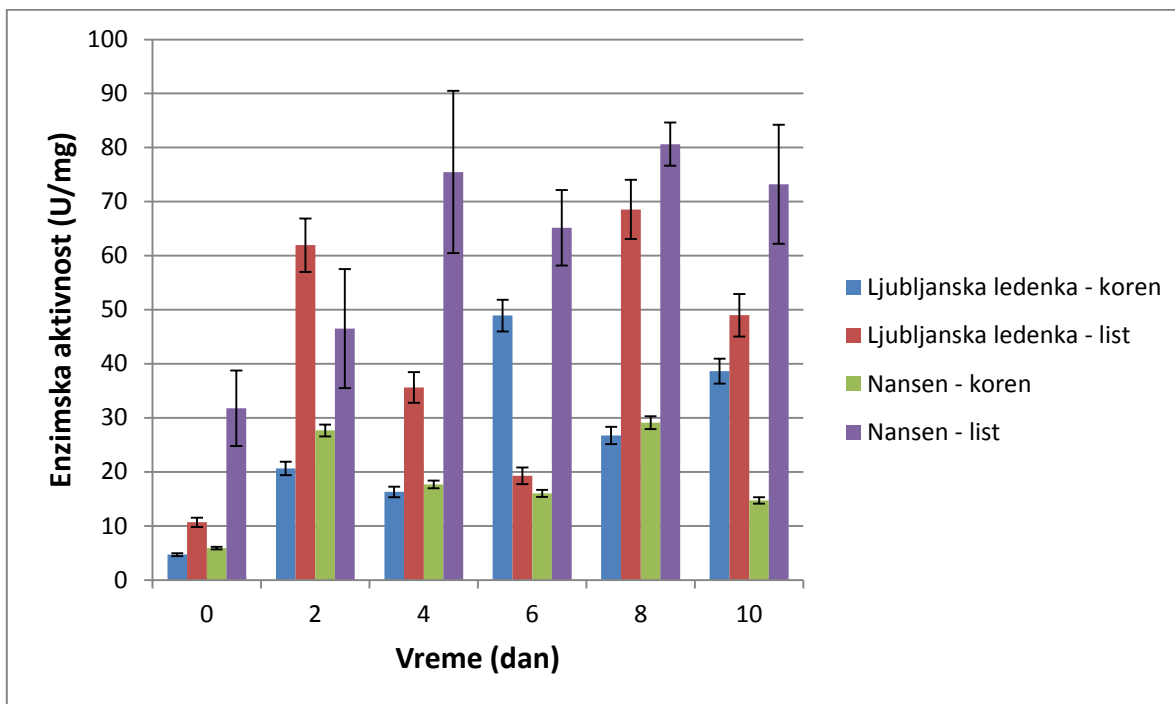
U korenu sorte Ljubljanska ledenka izmerena aktivnost superoksid dismutaza pokazuje skok posle 2 dana gajenja na početnoj koncentraciji fenola, ali ga zatim prati pad aktivnosti SOD koji ostaje na nižoj aktivnosti sve do kraja (Slika 37). U listu iste sorte aktivnost SOD pokazuje paraboličan oblik tokom vremena, sa maksimalnom izmerenom vrednošću 6. dana tretmana (72,65 U/mg što je 6,8 puta veća vrednost u odnosu na kontrolu). Aktivnost SOD u korenu sorte Nansen raste u odnosu na kontrolu do 12,5 puta i dostiže najveću vrednost 10. dana gajenja. Aktivnost SOD u listu sorte Nansen, slicno kao kod sorte Ljubljanska

ledenka, pokazuje paraboličnu zavisnost izmerene aktivnosti u vremenu, ali sa manje izraženim lukom.



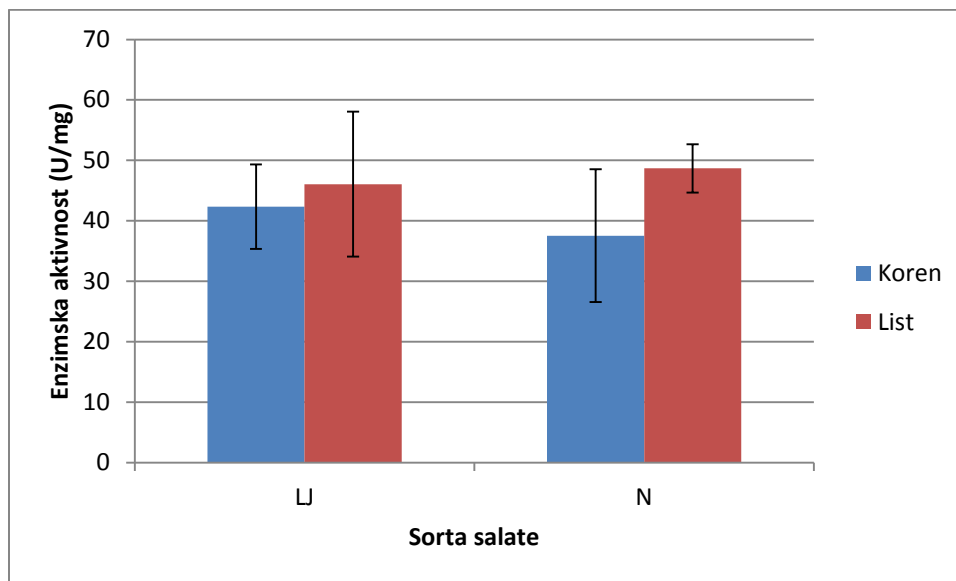
Slika 37. Aktivnost SOD kod različitih sorti zelene salate gajenih na početnoj koncentraciji fenola tokom deset dana

Aktivnost SOD u korenu sorte Ljubljanska ledenka naizmenično raste i pada počevši od drugog dana gajenja na konstantnoj koncentraciji fenola (Slika 38) i dostiže najveću vrednost 6. dana gajenja (48,91 U/mg). U listu iste sorte primećen je porast aktivnosti 2. i 8. dana gajenja, dok su aktivnosti na ostalim danima niže. Aktivnost SOD u korenu sorte Nansen je niža od aktivnosti enzima u listu iste sorte. Aktivnost enzima u listu sorte Nansen raste od samog početka i ostaje na istom nivou do kraja tretmana.



Slika 38. Aktivnost SOD kod različitih sorti zelene salate gajenih na konstantnoj koncentraciji fenola tokom deset dana

Kod biljaka koje su posle gajenja na početnoj koncentraciji fenola, gajene tri dana u rastvoru bez fenola, zabeležen je porast aktivnosti SOD (Slika 39) u korenu i listu obe sorte u odnosu na kontrolne biljke iz prethodnog eksperimenta. Aktivnost SOD u korenu i listu obe sorte ne pokazuje razliku u vrednostima kao što je slučaj sa aktivnostima već opisanih enzima (POX, CAT i PPO) na istom tretmanu.



Slika 39. Aktivnost SOD kod različitih sorti zelene salate gajenih tri dana u rastvoru bez fenola posle deset dana gajenja na početnoj koncentraciji fenola (10+3).

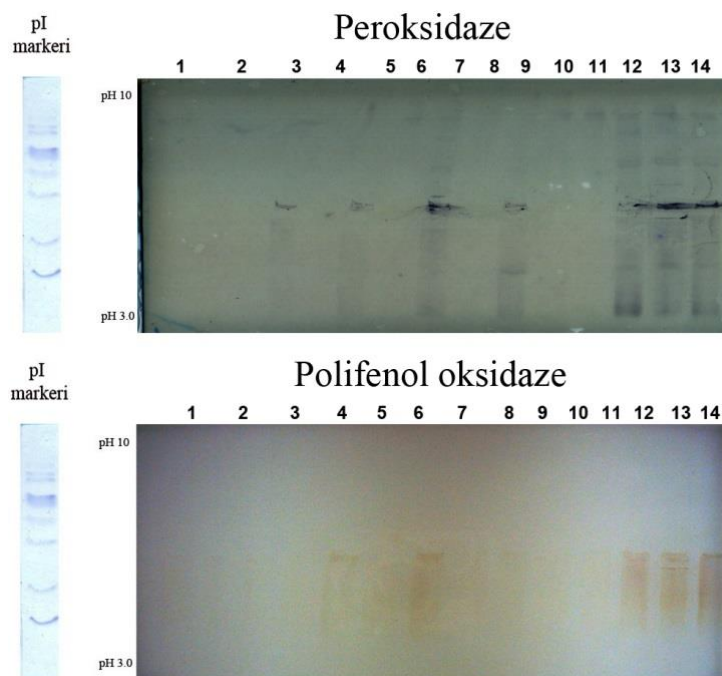
#### 4.5.4 Zimogramska detekcija peroksidaza i polifenol oksidaze kod različitih sorti zelene salate gajenih na početnoj i konstantnoj koncentraciji fenola

Određivanje izoformi POX i PPO rađeno je za određeni odabrani broj uzoraka koji su pokazivali visoku aktivnost merenu na spektrofotometru i upoređivani sa kontrolnim uzorcima koji nisu gajeni na fenolu.

Sa prikazanih gelova zimogramske detekcije POX i PPO može se primetiti da se većina izoformi i jednog i drugog enzima nalazi u kiselom delu (Slika 40). Ovaj podatak naročito važi za PPO izoforme kod kojih je razlika među izoformama kiselog i baznog dela mnogo izraženija. Kod biljaka, 3 dana posle gajenja na početnoj koncentraciji fenola, jasno se vide dobro izražene izoforme POX u baznom delu. Izoforme kod kontrolnih uzoraka su slabo vidljive.

Može se razlikovati 6 izoformi POX i najmanje 3 izoforme PPO. Najjače su izražene izoforme u uzorcima 3 dana posle gajenja na početnoj koncentraciji fenola u slučaju oba ispitivana enzima. Izoforme PPO su izraženije kod biljaka koje su gajene na fenolu nego

kod kontrolnih biljaka, naročito u korenu sorte Nansen i na početnom i na konstantnom fenolu.



Slika 40. Zimogramska detekcija peroksidaza i polifenol oksidaza zelene salate gajene na fenolu. pI vrednosti redom su: 3,5; 4,2; 4,5; 5,15/5,3; 6; 6,9/7,35; 7,75/8/8,3; 9,45; 10,65.

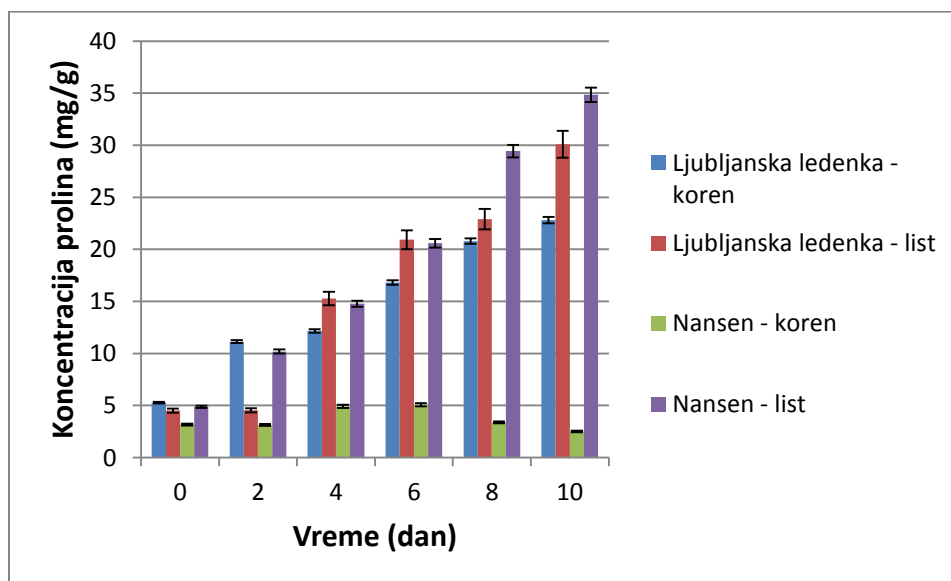
Peroksidaze: 1- K N L; 2 - K LjL L; 3 - K N K; 4 – K LjL Ko; 5 – N L PF 6. dan; 6 – LjL L PF 6. dan; 7 – N Ko PF 10. dan; 8 – N Ko KF 8. dan; 9 – LjL L PF 8. dan; 10 – LjL Ko KF 8. dan; 11 – N L 3 dana posle tretmana PF; 12 – Lj L 3 dana posle tretmana PF; 13 – N Ko 3 dana posle tretmana PF; 14 – LjL Ko 3 dana posle tretmana PF

Polifenol oksidaze: 1- K N L; 2 - K LjL L; 3 - K N Ko; 4 – K LjL Ko; 5 – N Ko PF 8. dan; 6 – LjL Ko PF 8. dan; 7 – N Ko KF 4. dan; 8 – LjL Ko KF 8. dan; 9 – N L PF 10. dan; 10 – LjL L PF 10. dan; 11 – N L 3 dana posle tretmana PF; 12 – LjL L 3 dana posle tretmana PF; 13 – N Ko 3 dana posle tretmana PF; 14 – LjL Ko 3 dana posle tretmana PF.

K – kontrola; N – Nansen; LjL – Ljubljanska ledenka; PF – početna koncentracija fenola; KF – konstantna koncentracija fenola; Ko – koren; L - list

#### 4.5.5. Sadržaj prolina kod različitih sorti zelene salate gajenih na početnoj i konstantnoj koncentraciji fenola

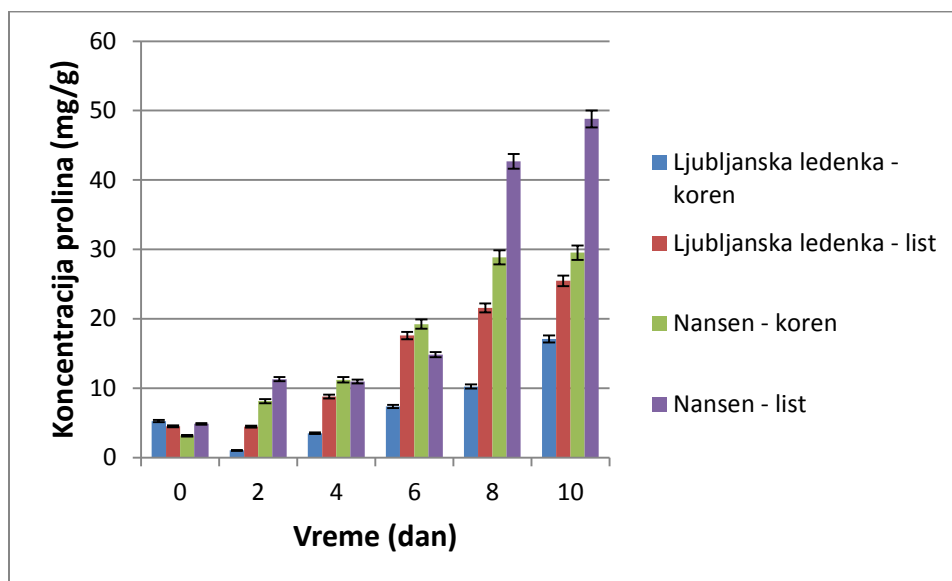
Koncentracija prolina u korenu i listu sorte Ljubljanska ledenka linearno raste tokom deset dana gajenja biljaka na početnoj koncentraciji fenola (Slika 41) i 10. dana gajenja dostiže najveću vrednost. U korenu sorte Nansen koncentracija prolina tokom vremena se menja veoma malo u odnosu na početnu koncentraciju, da bi posle 6. dana gajenja počela da pada i dostigla nivo sa početka tretmana 8. dana gajenja. Za razliku od korena, koncentracija prolina u listu sorte Nansen, linerano raste sa vremenom slično kao kod sorte Ljubljanska ledenka.



Slika 41. Koncentracija prolina kod različitih sorti zelene salate gajenih na početnoj koncentraciji fenola tokom deset dana

Prilikom gajenja biljaka na konstantnoj koncentraciji fenola, koncentracija prolina raste u korenu sorte Ljubljanska ledenka, počevši od 2. dana gajenja da bi dostigla maksimum 10.

dana gajenja (Slika 42). U listu iste sorte koncentracija prolina linearno raste do 10. dana gajenja. Koncentracija prolina u korenu sorte Nansen linerano raste, prvo blago, a onda od 8. dana naglo da bi dostigla maksimum 10. dana gajenja, dok je koncentracija u listu iste sorte posle blagog rasta do 6. dana, porasla naglo od 8. dana i dostigla maksimalnu vrednost na kraju tretmana.



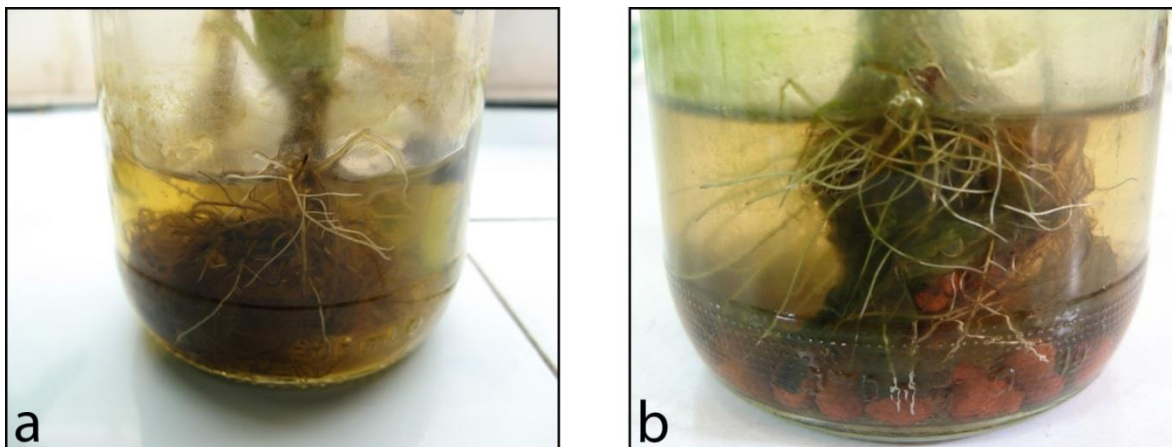
Slika 42. Koncentracija prolina kod različitih sorti zelene salate gajenih na konstantnoj koncentraciji fenola tokom deset dana

#### 4.5.6. Morfološke promene zelene salate gajene na početnoj koncentraciji fenola

##### 4.5.6.1. Koren različitih sorti zelene salate gajenih na početnoj koncentraciji fenola

Tokom gajenja zelene salate na početnoj koncentraciji fenola od  $200 \text{ mgL}^{-1}$ , dolazi do promena na korenovom sistemu kod obe ispitivane sorte (Slika 43, 44 i 45). Prosečan broj starih korenova kod sorte Ljubljanska ledenka iznosio je  $35,8 \pm 5,1$ , dok je kod sorte Nansen bio  $28,1 \pm 4,8$ . Prosečna dužina najdužeg korena bila je  $10,1 \pm 0,9 \text{ cm}$  za sortu Ljubljanska ledenka i  $8,7 \pm 1,0 \text{ cm}$  za sortu Nansen. Već posle dva dana gajenja u rastvoru fenola dolazi do početka nekroze korenova, što se manifestuje pojavom različitih nijansi

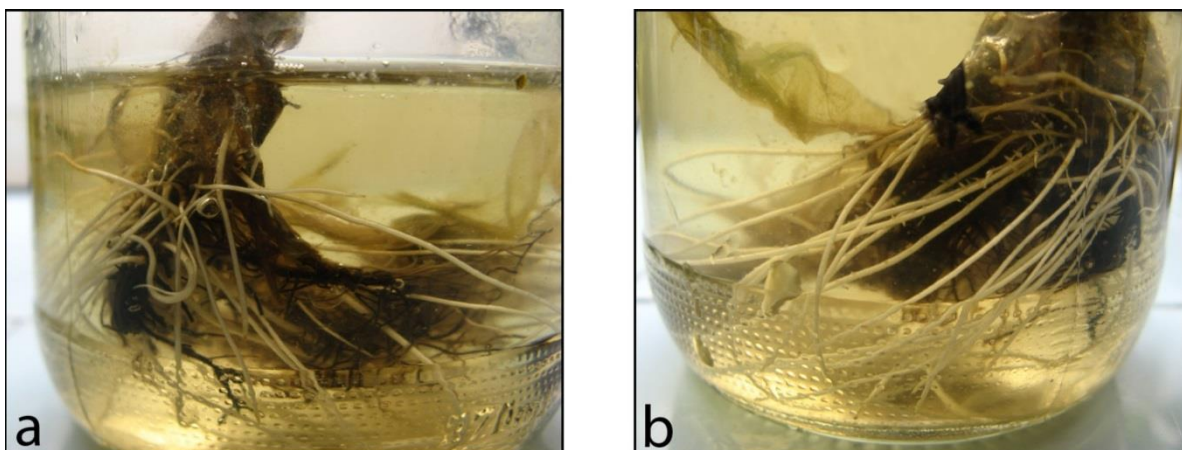
braon boje na velikom broju korenova (Slika 43). Novonastali korenovi su deblji, svetliji i nemaju bočne korenove.



Slika 43. Koren zelene salate na početnoj koncentraciji fenola posle tri dana gajenja. a) Sorta Nansen; b) Sorta Ljubljanska ledenka

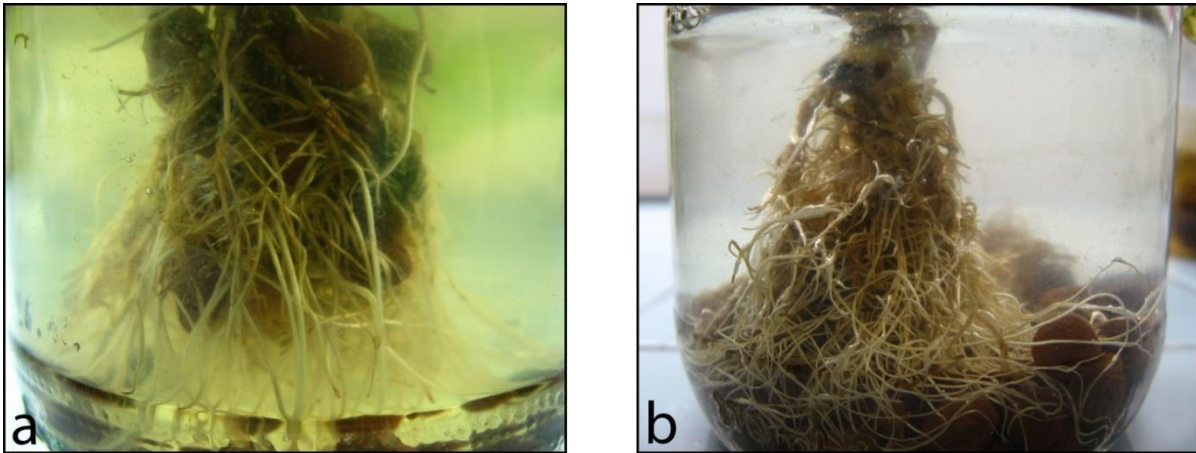
Daljim gajenjem biljaka na istoj koncentraciji fenola, dolazi do regeneracije novih korenova koji se morfološki razlikuju od prvobitnih (Slika 44). Posle tri dana gajenja na početnoj koncentraciji fenola izmeren je broj novih korenova koji su se regenerisali od početka i taj broj je kod sorte Ljubljanska ledenka bio  $17,8 \pm 3,1$ , kod sorte Nansen  $11,1 \pm 2,7$ .





Slika 44. Koren zelene salate sorte Ljubljanska ledenka na početnoj koncentraciji fenola posle 6 (a) i posle 7 (b) dana gajenja na početnoj koncentraciji fenola

Na samom kraju tretmana (posle deset dana) potpuno su regenerisani novi korenovi koji su duži od starih i ne pokazuju nikakave znake nekroze tokom vremena (Slika 45). Novonastali broj korenova kod sorte Ljubljanska ledenka na kraju eksperimenta bio je  $28,4 \pm 1,3$ , a kod sorte Nansen  $15,8 \pm 2,2$  što čini skoro 80% od broja korenova na samom početku kod sorte Ljubljanska ledenka i 57% kod sorte Nansen. Prosečna dužina najdužeg novonastalog korena posle deset dana gajenja na početnoj koncentraciji fenola iznosio je  $12,2 \pm 1,2$  cm za sortu Ljubljanska ledenka i  $9,8 \pm 0,8$  cm za sortu Nansen što je duže od prosečne dužine najdužeg korena na početku.

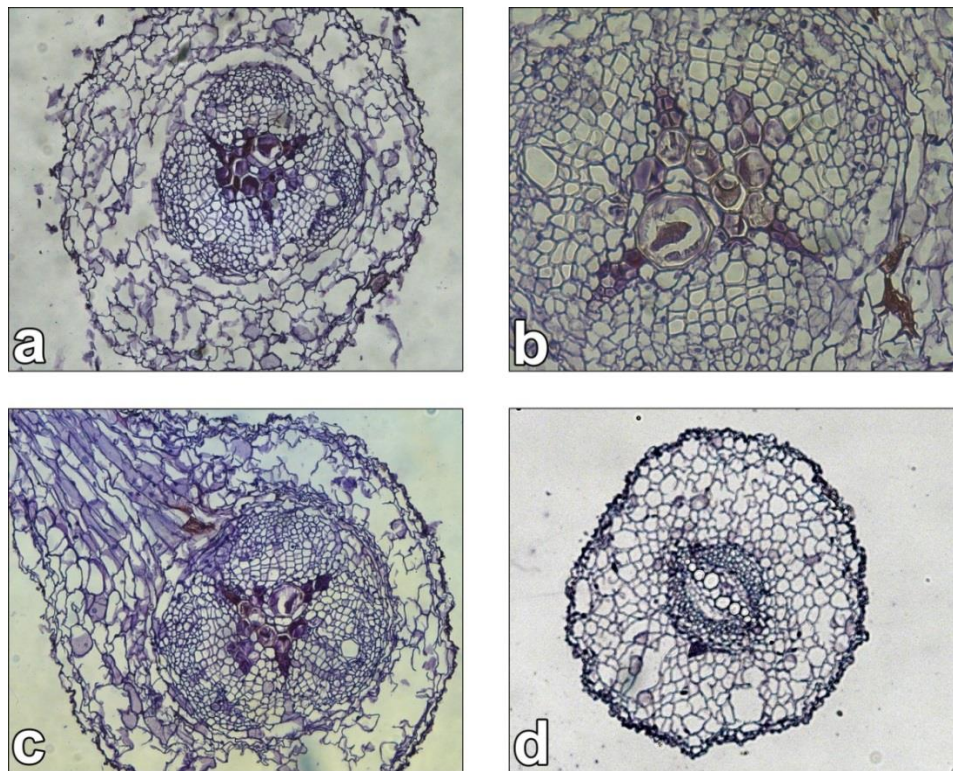


Slika 45. Koren zelene salate na početnoj koncentraciji fenola posle deset dana gajenja. a) Sorta Nansen; b) Sorta Ljubljanska ledenka

#### **4.5.6.2. Anatomska istraživanja korena različitih sorti zelene salate gajenih na početnoj koncentraciji fenola**

Rađena je citološka studija starih i novih korenova obe sorte zelene salate koje su rasle na početnoj koncentraciji fenola. Stari korenovi sakupljeni su posle pet, a novoformirani korenovi posle deset dana gajenja u rastvoru fenola.

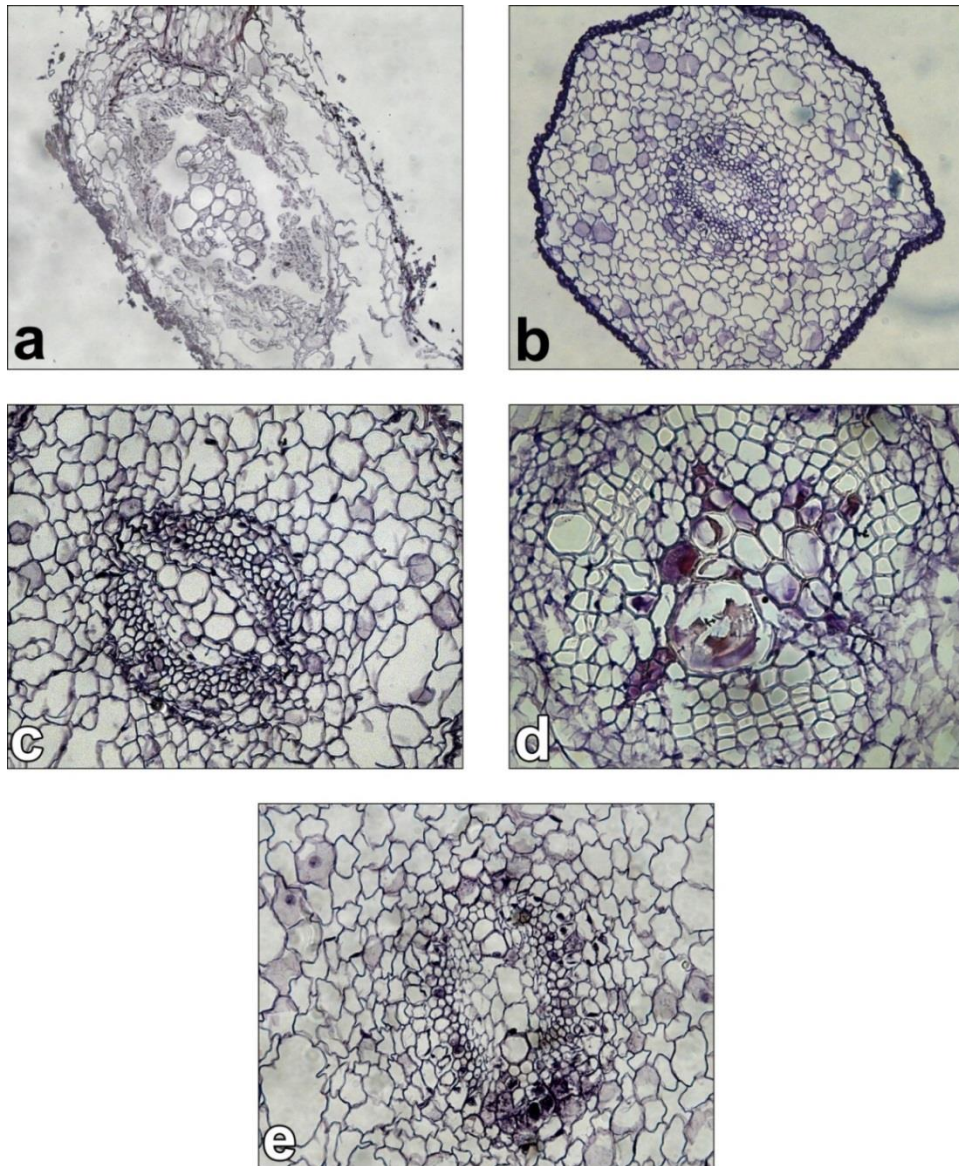
Kod sorte Ljubljanska ledenka, koja je pokazala veću toleranciju na fenol, može se primetiti da su parenhimske ćelije korena narušene strukture, kao i ćelje epidermisa korena (Slika 46 a). Primećuju se veliki međućelijski prostori među ćelijama korteksa korena, kao i povećan prostor između ćelija endodermisa i korteksa. Ksilemski i floemski elementi su ostali nenarušene strukture (Slika 46 b). Na Slici 46 c vidi se regeneracija novog korena sorte Ljubljanska ledenka. Ćelije novog korena polaze iz meristema formiranih u endodermisu, bez obzira na okolno tkivo koje je evidentno narušeno pod uticajem fenola. Dalji tok rasta korena i praćenje njegovog razvoja nije opisano. Novi korenovi regenerisani u rastvoru početne koncentracije fenola, posle deset dana imaju uobičajenu strukturu korena (Slika 46 d). Ćelije korteksa su čvrsto povezane jedna sa drugom, dok je epidermis korena netaknut. Elementi provodnog tkiva korena su u početnim stadijumima razvoja.



Slika 46. Poprečni presek korena sorte Ljubljanska ledenka gajene na početnoj koncentraciji fenola. a) Stari koren posle pet dana gajenja; b) Stari koren posle pet dana gajenja, provodno tkivo; c) Regeneracija novog korena; d) Novoformirani koren posle deset dana gajenja

Kod sorte Nansen, koja je i pokazala slabiju toleranciju na fenol, došlo je do mnogo većeg oštećenja primarnog korena (Slika 47 a). Epidermalni sloj korena je potpuno uništen, kao i tkivo korteksa. Primarna struktura provodnog tkiva je takođe narušena i može se videti da su elementi ksilema i floema nestali ili su potpuno izgubili prvobitan oblik. Za razliku od primarnog korena, novi korenovi imaju potpuno drugačiju morfologiju (Slika 47 b). Epidermis novog korena nije narušen i čak sadrži ćelije koje su čvrsto povezane. Ćelije korteksa su netaknute i povezane u celinu. Provodna tkiva su u početnim stadijumima razvoja (Slika 47 c). Oko njih se mogu videti ćelije korteksa koje imaju svoj prepoznatljiv oblik. Pojedini delovi ksilemskih elemenata novoformiranih korenova su uvećani i jače obojeni (Slika 47 d). Dalji razvoj novog korena podrazumeva formiranje i sazrevanje ćelija endodermisa (Slika 47 e) koje čine čvrsto zbijene ćelije. Ksilemski elementi su uvećani.





Slika 47. Poprečni presek korena sorte Nansen gajene na početnoj koncentraciji fenola. a) Stari koren posle pet dana gajenja; b) Novi koren posle deset dana gajenja; c) Novi koren posle deset dana gajenja, provodno tkivo; d) Novi koren posle deset dana gajenja, provodno tkivo, ksilemski elementi; e) Novi koren posle deset dana gajenja, razvoj provodnog tkiva

#### **4.5.6.3. Izgled rozete različitih sorti zelene salate gajenih na početnoj koncentraciji fenola**

Posle gajenja od deset dana na početnoj koncentraciji fenola ( $200 \text{ mgL}^{-1}$ ), zelena salata je gajena u rastvoru fenola od  $50 \text{ mgL}^{-1}$  na kojoj dolazi do kompletne regeneracije listova i daljeg rasta novonastalih korenova (Slike nisu prikazane). Ukoliko se biljke posle pomenutog tretmana gajenja na početnoj koncentraciji fenola dalje gaje u rastvoru bez fenola, dolazi takođe do regeneracije novih listova i formiranja rozete, ali je 17% biljaka imalo drugačiji izgled listova u rozeti u odnosu na biljke koje nikada nisu gajene u rastvoru sa početnom koncentracijom fenola (Slika 48). Ovi listovi imali su primetno svetliju nijansu zelene boje i odlikovali su se sporijim rastom. Regeneracija novih listova dešava se u periodu od 3 do 20 dana od početka gajenja biljaka u rastvoru bez fenola.

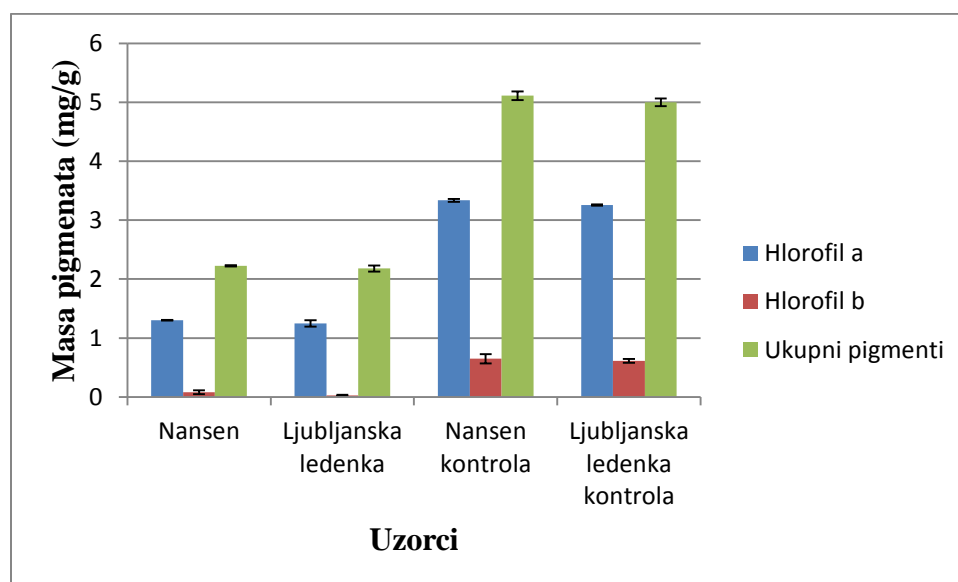


Slika 48. Različite sorte zelene salate koje su gajene u rastvoru bez fenola posle desetodnevnog gajenja u rastvoru fenola početne koncentracije od  $200 \text{ mgL}^{-1}$ . a) Sorta Nansen stara 10 dana (desna biljka) u odnosu na sortu Ljubljanska ledenka (leva biljka) koja je gajena u rastvoru bez fenola; b) Sorta Ljubljanska ledenka stara 10 dana (leva biljka) u odnosu na sortu Ljubljanska ledenka (desna biljka) koja je gajena u rastvoru bez fenola; c) Sorte Ljubljanska ledenka (dole levo) i Nansen (dole desno) stare 15 dana u odnosu na sortu Ljubljanska ledenka (gore) koja je gajena u rastvoru bez fenola. Ljubljanska ledenka koja je u ovom slučaju služila kao kontrola i gajena je u rastvoru bez fenola, bila je stara 20 dana.

#### **4.5.6.3.1. Odredjivanje sadržaja hlorofila a i b i ukupnih pigmenata kod biljaka gajenih na početnoj koncentraciji fenola**

Opisane biljke, smanjene pigmentacije listova, koje su posle gajenja na početnoj koncentraciji fenola, gajene u rastvoru bez fenola podvrgnute su analizi hlorofila i ukupnih pigmenata. Analiza ovih parametara određena je posle 20 dana, kada se i završava regeneracija novih listova.

Primećen je veliki pad u količini hlorofila i ukupnih pigmenata kod obe sorte u odnosu na kontrolne biljke koje nisu gajene u rastvoru fenola (Slika 49). Sadržaj hlorofila a kao i ukupnih pigmenata je 2,3 puta niži nego kod kontrolnih biljaka kod obe sorte. Količina hlorofila a i b i ukupnih pigmenata je slična kod obe sorte posle tretmana kao kod obe kontrolne sorte. Sadržaj hlorofola b je najniži kod sorte Ljubljanska ledenka posle tretmana, dok je kod kontrolnih biljaka ova koncentracija i do 30 puta veća. Ukupni pigmenti imaju 2,3 puta veću koncentraciju kod kontrolnih biljaka u odnosu na biljke posle tretmana.

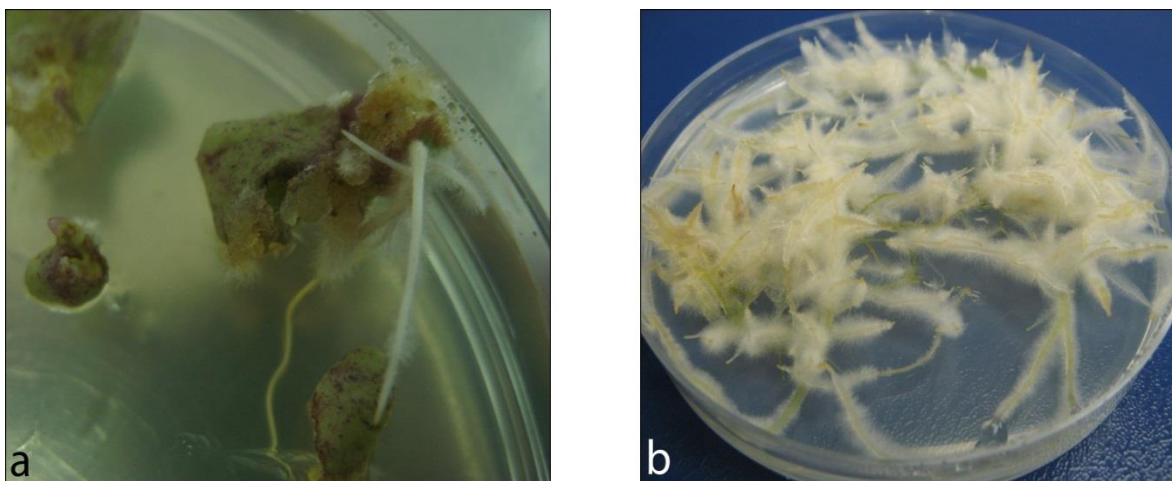


Slika 49. Količina hlorofila a i b i ukupnih pigmenata kod različitih sorti zelene salate gajenih u rastvoru bez fenola posle tretmana gajenja na početnoj koncentraciji fenola

#### 4.6. Transformacija različitih sorti zelene salate uz pomoć *A. rhizogenes*

Kao eksplantati za transformaciju obe sorte zelene salate korišćeni su fragmenti kotiledonih listova klijanaca starih sedam dana. Korenovi na fragmentima oba varijeteta salate, pojavili su se na nakon 10 dana od inokulacije sa *A. rhizogenes* A4M70GUS (Slika 50 a). Svaki pojedinačni adventivni koren smatran je posebnom linijom. Nakon 30 dana, procenat eksplantata koji su formirali koren bio je veoma visok (96.7 % za sortu Nansen i 91.2 % za sortu Ljubljanska ledenka).

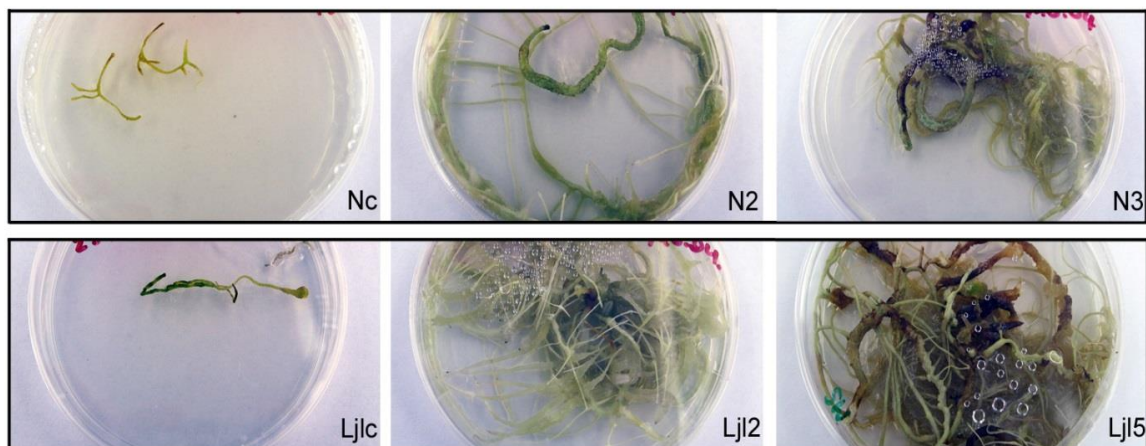
Za uspostavljanje kulture korenova odsecani su adventivni korenovi 30 dana nakon inokulacije i preneti na čvrstu MS podlogu bez regulatora rastenja. Samo fragmenti dužine nekoliko centimetara su uspešno doveli do uspostavljanja kulture korenova. Korenovi su pokazivali karakteristične osobine: plagiotropičnan rast, veliki broj korenovih dlačica i obilno bočno grananje (Slika 50 b).



Slika 50. Regeneracija korenova na fragmentima kotiledonih listova klijanaca zelene salate. a) Korenovi nakon inokulacije sa *A. rhizogenes* A4M70GUS posle deset dana; b) Kultura transformisanih korenova

Uspostavljene linije korenova pokazuju značajne fenotipske varijacije, naročito po pitanju morfologije korena (Slika 51). N2 liniju karakteriše cirkularni rast korenova u Petri kutijama, u svim subkulturama. Neki korenovi su tanki, sa uobičajenim karakterističnim bočnim grananjem i dosta korenovih dlačica (npr. Ljubljanska ledenka 2, LJL 2). Netransformisani korenovi, oba varijeteta, pokazuju nizak tempo rasta, odnosno stepen prinosa biomase sa vremenom.





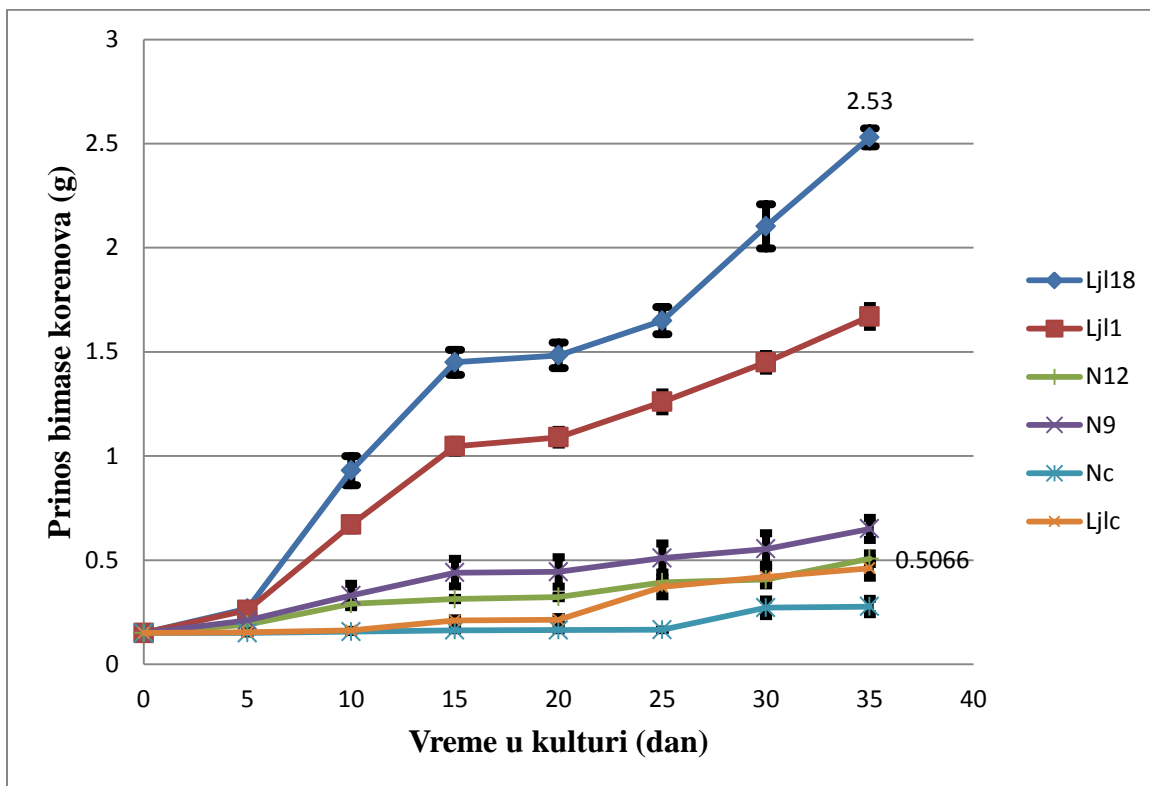
Slika 51. Rast četiri nedelje starih kultura korenova zelene salate (NC-Nansen kontrola, N2-linija, N3-linija, LjLc – Ljubljanska ledenka kontrola, LjL2-linija, LjL5-linija)

Primećene su značajne razlike u prinosu biomase korenova nakon gajenja u dužini trajanja od 35 dana (Slika 52). Indeks prinosa biomase varira značajno, od 0,5 g za N 2 do 2.53 g za LjL 18 mereno na 40 mL u MS/2 hranljivoj podlozi. LjL 18 je pokazala najveći tempo prinosa biomase, 5,5 puta veći u odnosu na kontrolu.

LjL 18 ne samo da raste brže od ostalih linija, nego se i češće grana. Nasuprot ovoj liniji, N 12 se pokazao kao linija koja najsporije raste.

Raspon prinosa sveže biomase, u odnosu na početnu, kretao se od 3,33 do 16,87. Netransformisani korenovi rastu sporo i imaju manji prinos. Kontrola sorte Nansen ima prinos od 1,85 g, a kontrola sorte Ljubljanska ledenka 3,07 g.

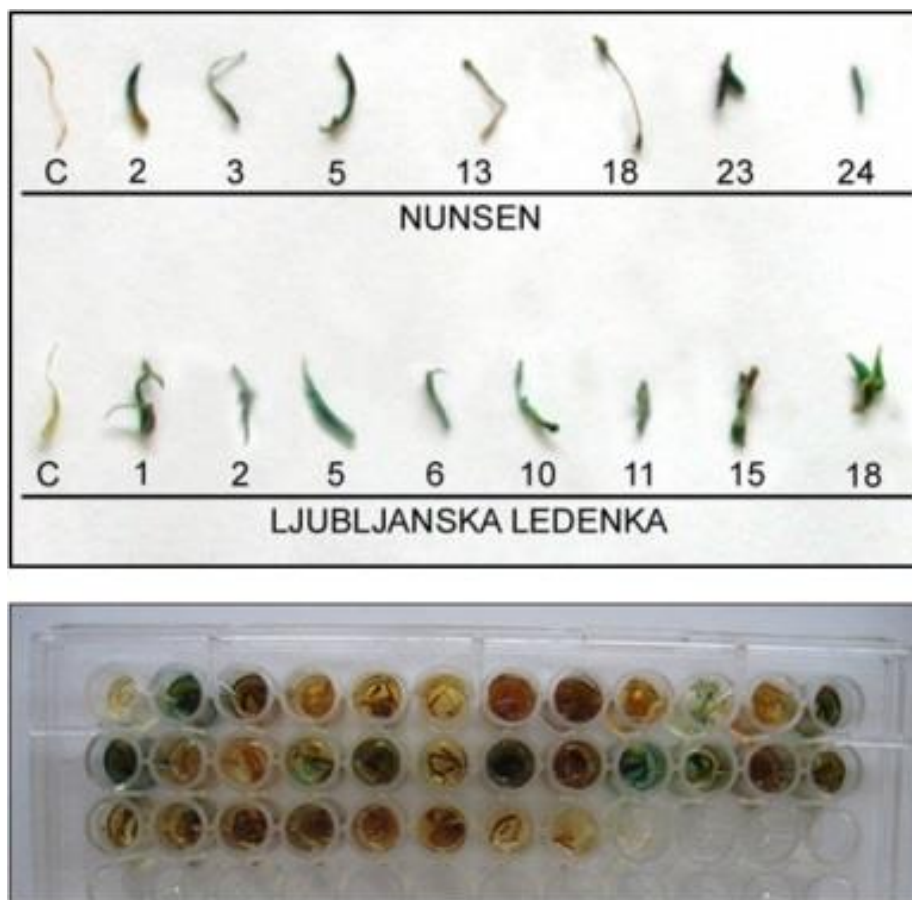
Iako je sorta Nansen pokazala veći procenat regeneracije korenova iz kotiledonih listova klijanaca, korenovi sorte Ljubljanska ledenka bolje rastu u tečnom medijumu.



Slika 52. Prinos sveže mase različitih linija korenova dve sorte zelene salate. Svaka tačka prikazuje srednju vrednost tri ponavljanja  $\pm$  standardna greška. LjL-sorta ljubljanska ledenka; N-sorta Nansen. LjLc-Ljubljanska ledenka kontrola; Nc-Nansen kontrola. Brojevi pored svake sorte označavaju liniju transformanata

#### 4.6.1. Histoheмиjski GUS test

GUS test je korišćen za procenu faktora koji utiču na efikasnost transformacije. Sve linije koje su inokulisane sa *A. rhizogenes* A4M70GUS bile su objekat GUS histoheмиjskog testiranja kako bi se odredile one linije koje daju pozitivnu reakciju na GUS. Pozitivna bojena reakcija je primećena kod svih linija, mada je intenzitet bojenja varirao od linije do linije. GUS reakcija je bila negativna kod kontrolnih korenova (Slika 53).

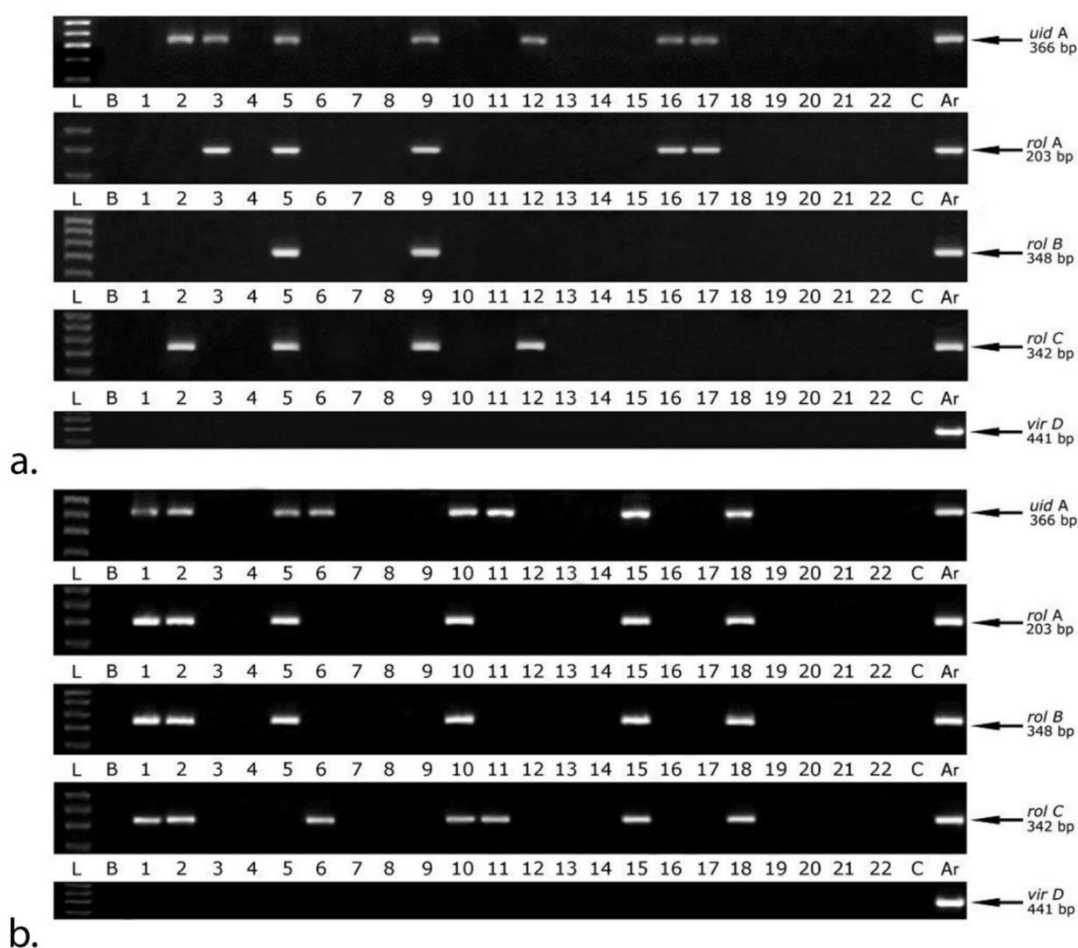


Slika 53. GUS hitohemijski test kulture korenova zelene salate. Plava boja primećena je u 15 linija, dok GUS ekspresija izostaje u kontrolnim korenovima

#### 4.6.2. PCR analiza

Kako pozitivna GUS reakcija nije pouzdan pokazatelj aktivnosti  $\beta$ -glukuronidaze i može poslužiti samo kao pokazatelj uspešne transformacije, PCR analizom smo potvrdili eventualnu transformaciju. Sve linije koje su dale negativnu reakciju na GUS bile su subjekt dalje analize PCR tehnikom. Svih 15 linija, sedam linija sorte Nansen (Slika 54 a) i osam linija sorte Ljubljanska ledenka (54 b) su dale pozitivnu PCR reakciju na *uidA* fragment od 366 bp, čime je potvrđen rezultat GUS hitohemijskog eseja. Prisustvo *rolA* gena potvrđeno je kod pet linija Nansen i šest linija Ljubljanske ledenke.

Kontrolni korenovi nisu pokazali pozitivan signal za 348 bp fragment *rolB* gena, dok su dve linije sorte Nansen i šest linija sorte Ljubljanska ledenka bili pozitivni potvrđujući integrisanje ovog gena u ćelijski genom. Amplikon od 342 bp koji odgovara *rolC* genu primećen je kod DNK poreklom od četiri linije sorte Nansen i sedam linija sorte Ljubljanska ledenka. Prisustvo rezidualnih kontaminirajućih bakterija provereno je PCR analizom korišćenjem *virD1* specifične prajmerske sekvence. Ni u jednoj liniji nije primećena pozitivna reakcija, osim naravno u pozitivnoj kontroli gde se jasno uočava 441 bp *virD1* amplifikon.



Slika 54. PCR analiza genomske DNK izolovane iz kulture korenova zelene salate sorte Nansen (a) i sorte Ljubljanska ledenka (b). Trake: L-leder, B – blank, 1-22 – linije korenova, C – netransformisani korenovi, Ar – pozitivna kontrola (pRi A4M70GUS)

#### 4.6.3. Formiranje tečne kulture transformisanih korenova i ispitivanje uklanjanja fenola iz rastvora

Za formiranje tečne kulture transformisanih korenova odabrana je linija sorte Ljubljanska ledenka, koja je pokazala najviši prinos biomase korenova u vremenu. Ta linija označena je brojem 18 - LJL 18. Ova linija gajena je na čvrstoj MS hranljivoj podlozi pre nego što će biti prebačena u uslove tečne kulture (Slika 55). Može se videti da LJL 18 ima razvijene korenove koji imaju veoma dobro razvijene bočne korenove.



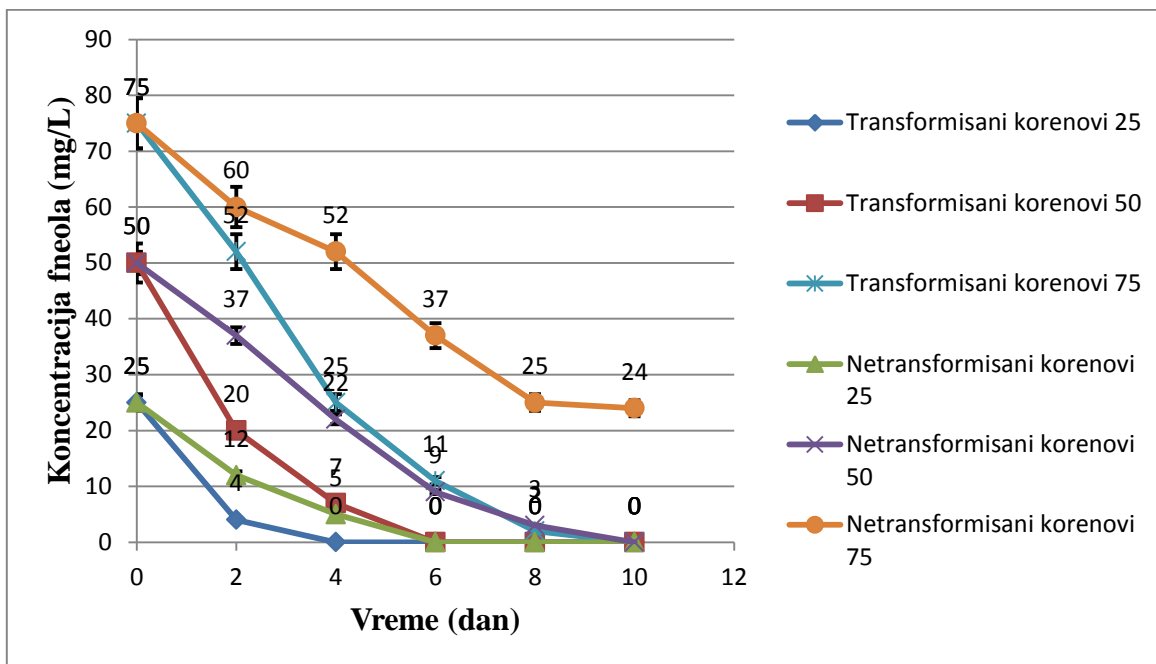
Slika 55. Kultura transformisanih korenova zelene salate gajenih na čvrstoj podlozi

Tečna kultura transformisanih korenova LJL 18 formirana je tako što je 5 g korenova postavljeno u 60 mL tečne MS hranljive podloge (Slika 56). Kulture korenova su držane na šejkeru i posle deset dana vidi se značajno umnožavanje.



Slika 56. Tečna kultura transformisanih korenova linije LJL 18 stara 10 dana

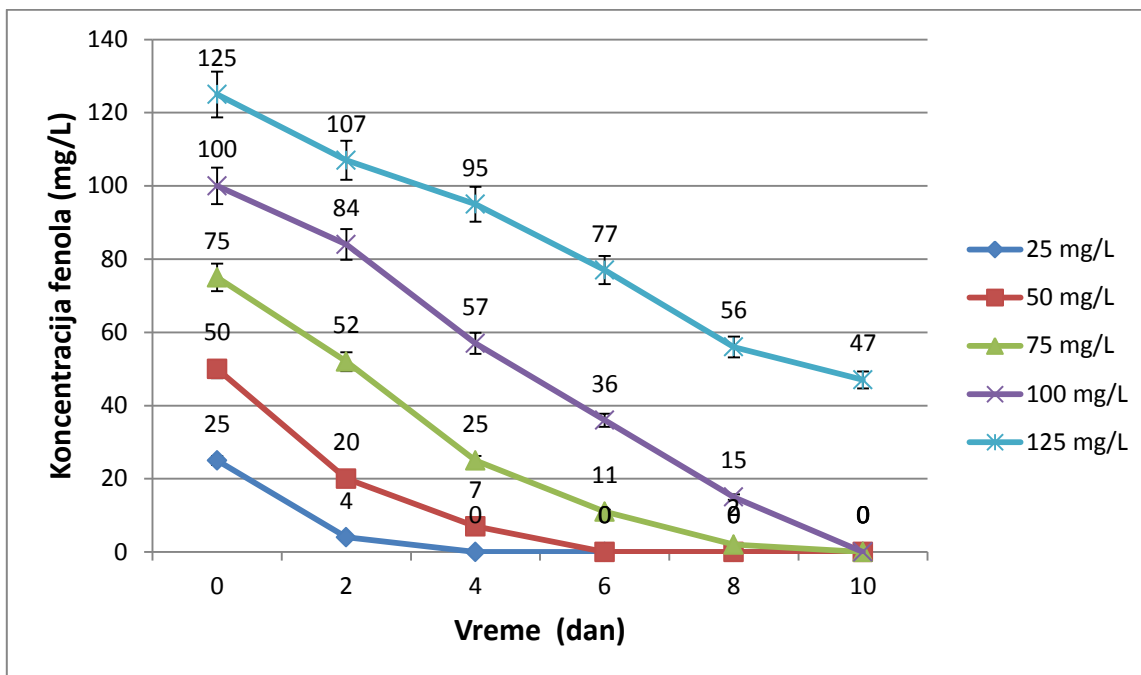
Analizom uklanjanja fenola korenovima zelene salate, sorte Ljubljanska ledenka u tečnoj kulturi došlo se do zaključka da transformisani korenovi, LJL 18, na svim koncentracijama efikasnije uklanjaju fenol iz tečne hranljive podloge od netransformisanih korenova (Slika 57). Na koncentracijama fenola od 25 i 50 mgL<sup>-1</sup> netransformisani korenovi mogu ukloniti fenol iz vode u periodu od 10 dana, dok na koncentraciji fenola od 75 mgL<sup>-1</sup> efekat uklanjanja izostaje kod netransformisanih korenova i u rastvoru se zadržava oko 24 mg/L fenola što iznosi 30% od početne koncentracije.



Slika 57. Uklanjanje različitih koncentracija fenola transformisanim i netransformisanim korenovima sorte Ljubljanska ledenka. Broj pored teksta u legendi označava koncentraciju fenola u  $\text{mgL}^{-1}$

Transformisani korenovi, sorte Ljubljanska ledenka, gajeni su dalje u tečnoj hranljivoj podlozi na početnoj i konstantnoj koncentraciji fenola. Koncentracije fenola koje su u oba slučaja ispitivane kretale su: 25, 50, 75, 100 i 125  $\text{mgL}^{-1}$ .

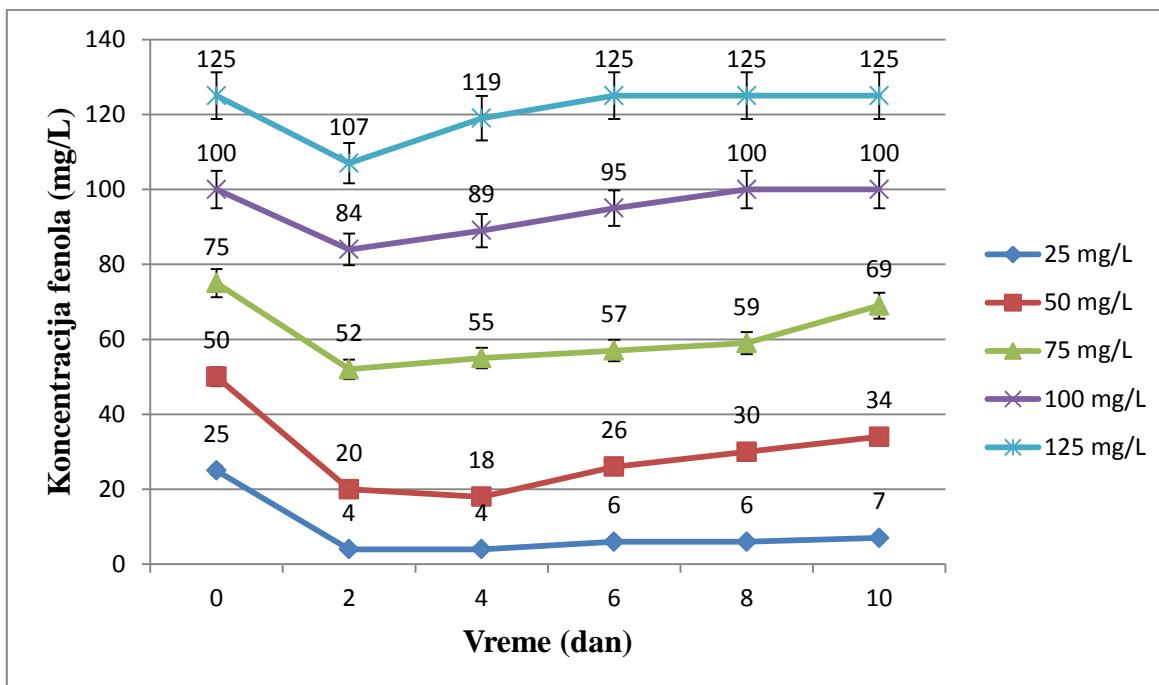
Kod transformisanih korenova na početnoj koncentraciji fenola dolazi do potpunog uklanjanja fenola na prve tri ispitivane koncentracije (Slika 58). Poslednja koncentracija na kojoj dolazi do uklanjanja fenola iz rastvora je 100  $\text{mgL}^{-1}$ . Na 125  $\text{mgL}^{-1}$  mogućnost uklanjanja fenola kulturom transformisanih korenova izostaje i ostaje 37,6 % fenola u rastvoru u odnosu na početnu koncentraciju.



Slika 58. Uklanjanje fenola iz rastvora pomoću transformisanih korenova zelene salate sorte Ljubljanska ledenka gajene na početnoj koncentraciji fenola tokom vremena.

Prilikom gajenja transformisanih korenova na konstantnoj koncentraciji fenola dolazi do identičnog tempa uklanjanja fenola iz rastvora tokom prva dva dana kao i kod onih gajenih na početnoj koncentraciji fenola (Slika 59). Kod transformisanih korenova na konstantnoj koncentraciji fenola, korenovi izlagani koncentraciji fenola od  $25 \text{ mgL}^{-1}$  pokazali su isti trend uklanjanja tokom prva dva ciklusa, odnosno 4 dana, kao i korenovi na početnoj koncentraciji fenola, da bi posle ovog perioda koncentracija fenola ostajala na istom nivou kao i posle 4 dana gajenja. Korenovi gajeni na koncentraciji fenola od 50 i  $75 \text{ mgL}^{-1}$  pokazuju slabije uklanjanje fenola od onih na početnoj koncentraciji i mogućnost uklanjanja fenola se smanjuje sa svakom promenom rastvora fenola. Korenovi gajeni na koncentracijama od 100 i  $125 \text{ mgL}^{-1}$  uklanjaju fenol do 6. odnosno 4. dana gajenja da bi posle toga mogućnost uklanjanja fenola potpuno izostala.





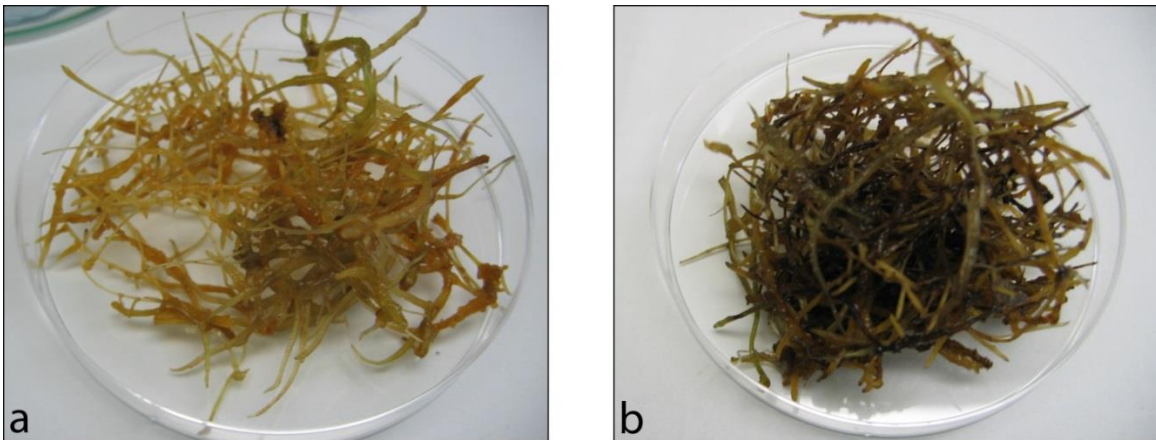
Slika 59. Ukljanjanje fenola iz rastvora pomoću transformisanih korenova zelene salate sorte Ljubljanska ledenka gajene na konstantnoj koncentraciji fenola tokom vremena

U zavisnosti od samog tretmana, izlaganja transformisanih korenova početnoj ili konstantnoj koncentraciji fenola, koncentracije fenola i dužine vremena gajenja, boja tečne hranljive podloge se menjala sa vremenom od žute (hranljiva podloga bez fenola), do različitih nijansi braon boje (Slika 60).



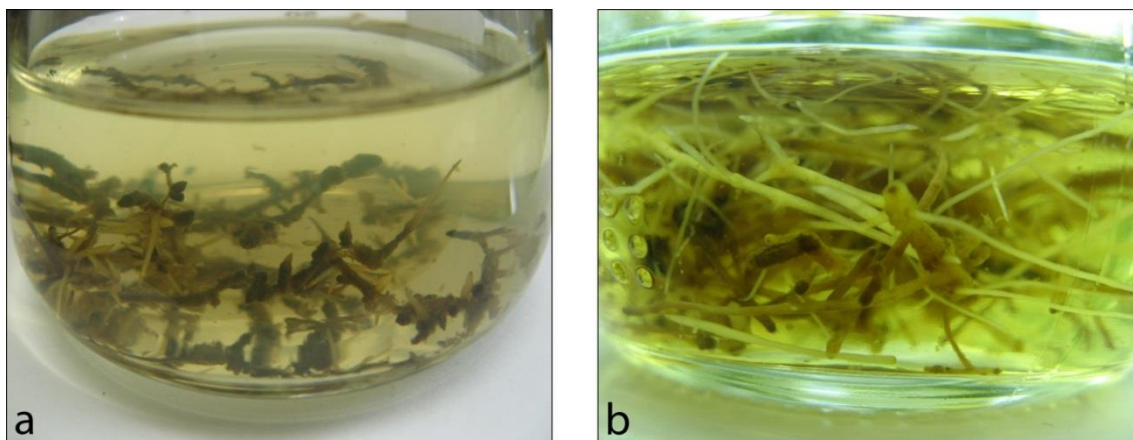
Slika 60. Transformisani korenovi zelene salate sorte Ljubljanska ledenka gajeni u tečnoj hranljivoj podlozi: bez fenola (levo); sa početnom koncentracijom fenola od  $75 \text{ mgL}^{-1}$  tokom 6 dana (sredina); sa konstantnom koncentracijom fenola od  $75 \text{ mgL}^{-1}$  posle 6 dana, odnosno treće promene rastvora sa fenolom (desno).

Primećena je promena boje transformisanih korenova zelene salate u odnosu na kontrolne korenove koji su gajeni u tečnoj hranljivoj podlozi bez fenola (Slika 61). Transformisani korenovi koji su gajeni u tečnoj hranljivoj podlozi sa fenolom imali su različite nijanse braon boje u zavisnosti od dužine izlaganja fenolu i njegove koncentracije u tečnoj hranljivoj podlozi. Kontrolni korenovi imali su žućkasto-belu boju.



Slika 61. Izgled transformisanih korenova zelene salate sorte Ljubljanska ledenka gajenih tokom 10 dana u tečnoj hranljivoj podlozi a) bez fenola; b) sa rastvorom fenola početne koncentracije  $75 \text{ mgL}^{-1}$ .

Transformisani korenovi zelene salate koji su gajeni na početnoj koncentraciji fenola od  $100 \text{ mgL}^{-1}$  tokom deset dana, dalje su gajeni u tečnoj hranljivoj podlozi bez fenola. Već posle dva dana dolazi do regeneracije transformisanih korenova (Slika 62 a). Posle deset dana dolazi do potpune regeneracije transformisanih korenova u hranljivoj podlozi bez fenola (Slika 62 b). Transformisani korenovi, koji su prethodno gajeni na konstantnoj koncentraciji fenola iste koncentracije, nisu uspeli da se regenerišu u hranljivoj podlozi bez fenola.



Slika 62. Transformisani korenovi zelene salate sorte Ljubljanska ledenka gajenih 10 dana na početnoj koncentraciji fenola od  $100 \text{ mgL}^{-1}$ , a zatim na hranljivoj podlozi bez fenola tokom: a) 2 dana; b) 10 dana

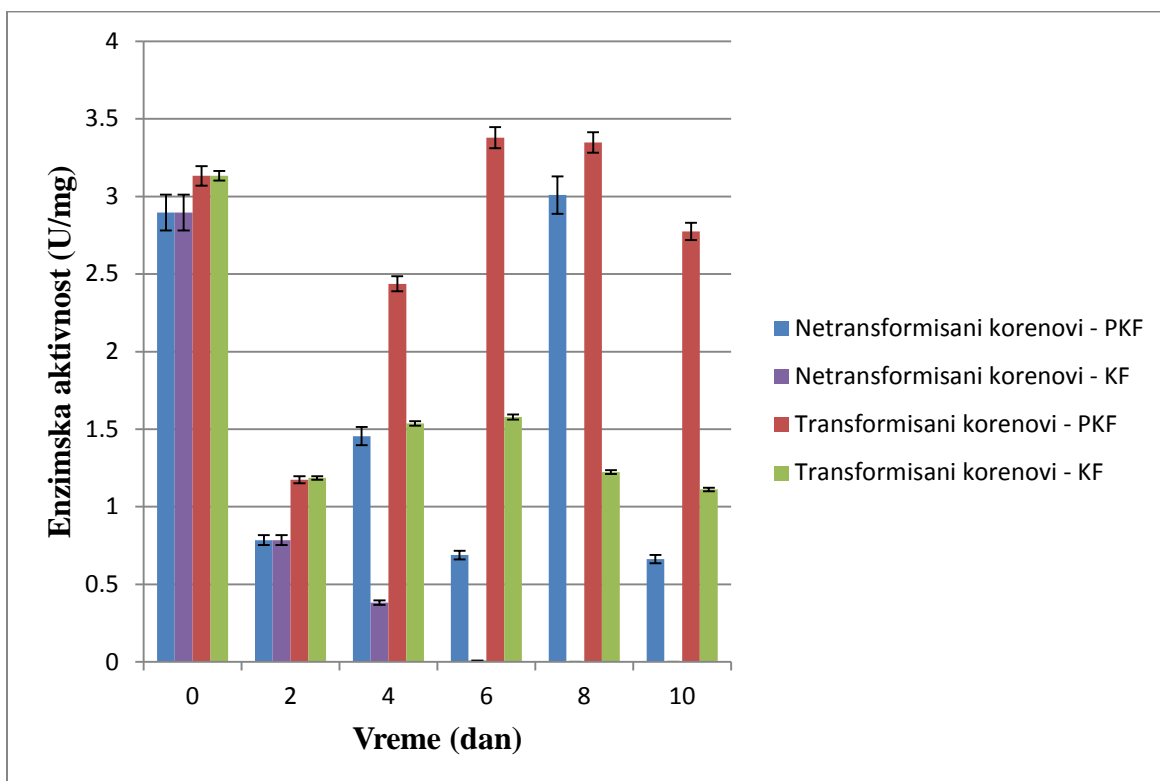
#### **4.6.4. Aktivnost enzima kod transformisanih korenova zelene salate sorte Ljubljanska ledenka tokom gajenja na početnoj i konstantnoj koncentraciji fenola**

Aktivnost POX, CAT, PPO i SOD određivana je u transformisanim korenovima sorte Ljubljanska ledenka koji su gajeni na početnoj i konstantnoj koncentraciji fenola od  $50 \text{ mgL}^{-1}$ . Ova koncentracija fenola na kojoj su korenovi gajeni odabrana je jer je to poslednja ispitivana koncentracija fenola koju i transformisani i netransformisani korenovi mogu u potpunosti ukolniti iz rastvora.

##### **4.6.4.1. Aktivnost peroksidaza kod transformisanih korenova zelene salate sorte Ljubljanska ledenka tokom gajenja na početnoj i konstantnoj koncentraciji fenola**

Transformisani korenovi sorte Ljubljanska ledenka pokazuju nešto veću aktivnost POX od kontrolnih (netransformisanih) korenova gajenim i na početnoj i na konstantnoj koncentraciji fenola (Slika 63). Kod transformisanih korenova gajenih na početnoj koncentraciji fenola dolazi do pada aktivnosti enzima tokom prva dva dana gajenja koja se zatim povećava i dostiže maksimalnu vrednost posle 6. ( $3,37 \text{ U/mg}$ ) i 8. ( $3,34 \text{ U/mg}$ ) dana. Isti trend primećen je i kod netransformisanih korenova gajenih na početnoj koncentraciji fenola, s tim što je najveća aktivnost uočena 8. dana ( $3,01 \text{ U/mg}$ ) i opada posle desetog

dana gajenja. Kod transformisanih korenova na konstatnoj koncentraciji fenola primećene su manje vrednosti aktivnosti POX u odnosu na one gajene na početnoj koncentraciji fenola i to već posle 2. dana gajenja. Kod netransformisanih korenova gajenih na konstantnoj koncentraciji fenola aktivnost enzima opada brzo već posle 2 dana, da bi posle 4. dana gajenja pala ispod granica detekcije.

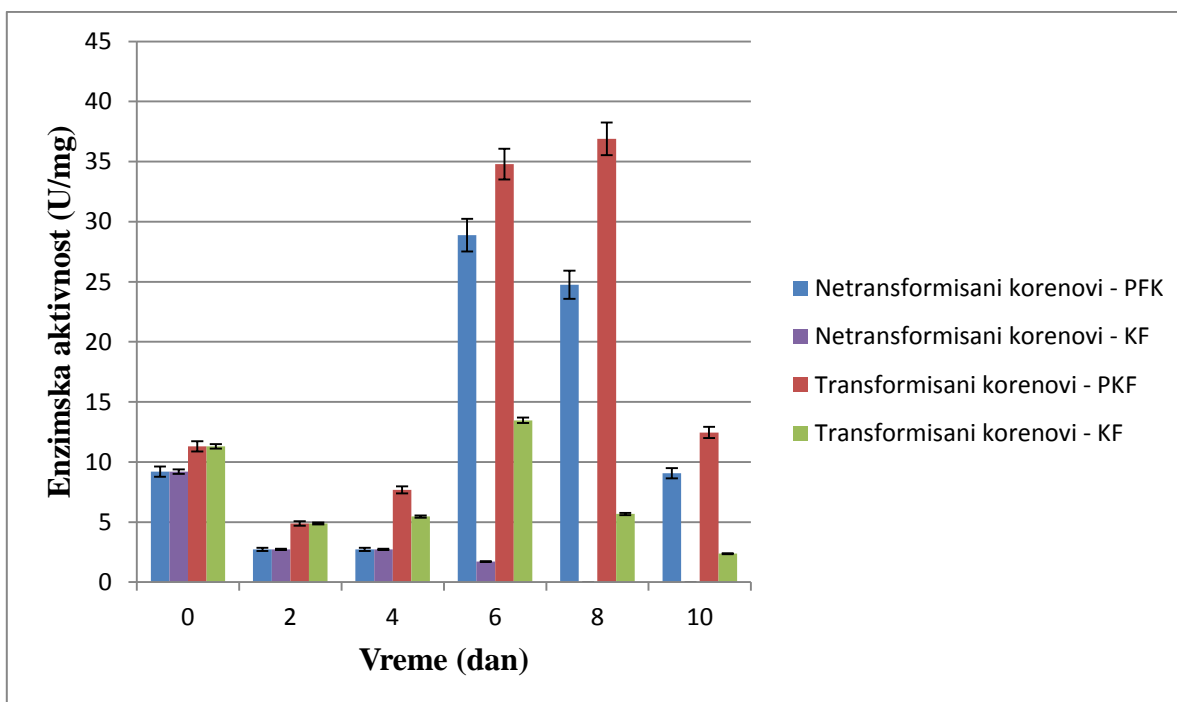


Slika 63. Aktivnost peroksidaza kod transformisanih korenova zelene salate sorte Ljubljanska ledenka tokom gajenja na početnoj i konstantnoj koncentraciji fenola od  $50 \text{ mgL}^{-1}$ . PKF-početna koncentracija fenola; KF-konstantna koncentracija fenola

#### 4.6.4.2. Aktivnost katalaza kod transformisanih korenova zelene salate sorte Ljubljanska ledenka tokom gajenja na početnoj i konstantnoj koncentraciji fenola

Aktivnost CAT ima opada kod svih analiziranih uzoraka posle 2 dana gajenja (Slika 64) da bi porasla kod netransformisanih ( $28,88 \text{ U/mg}$ ) i transformisanih korenova ( $34,79 \text{ U/mg}$ ) na početnoj koncentraciji fenola posle 6 dana. Posle 6 dana gajenja aktivnost enzima raste i

kod transformisanih korenova na konstantnoj koncentraciji fenola. Na kraju tretmana aktivnost CAT opada kod svih ispitivanih uzoraka, da bi potpuno izostala kod netransformisanih korenova gajenih na konstantnoj koncentraciji fenola.

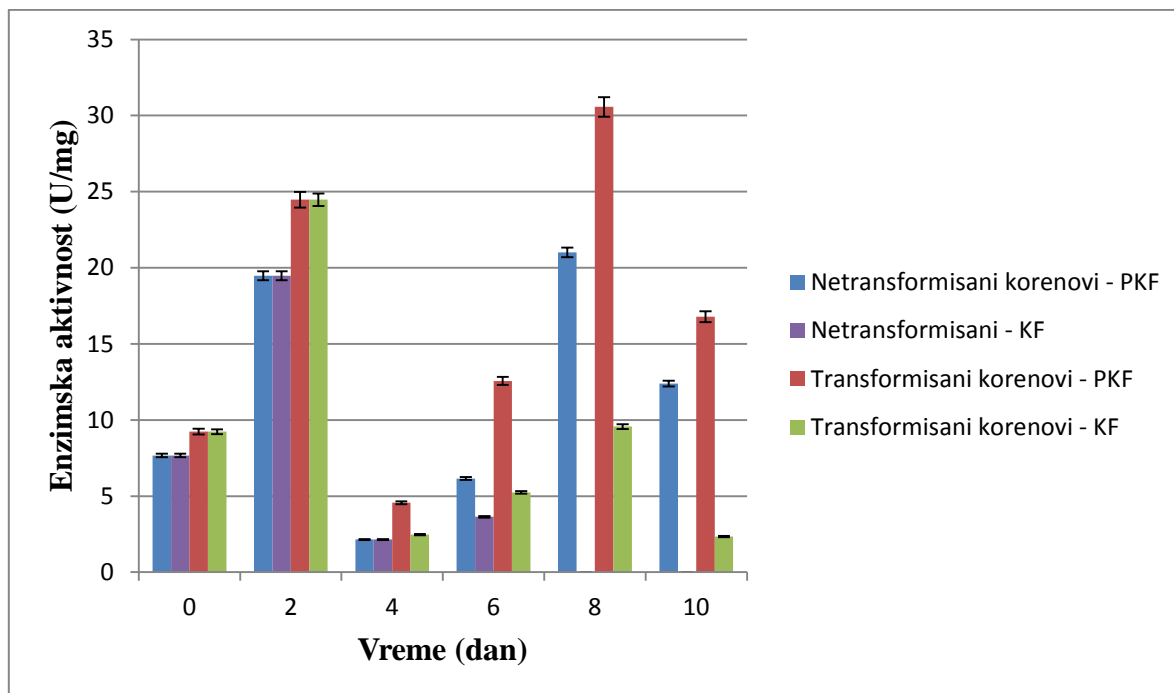


Slika 64. Aktivnost katalaza kod transformisanih korenova zelene salate sorte Ljubljanska ledenka tokom gajenja na početnoj i konstantnoj koncentraciji fenola od  $50 \text{ mgL}^{-1}$ . PKF-početna koncentracija fenola; KF-konstantna koncentracija fenola

#### 4.6.4.3. Aktivnost polifenoloksidaza kod transformisanih korenova zelene salate sorte Ljubljanska ledenka tokom gajenja na početnoj i konstantnoj koncentraciji fenola

Aktivnost PPO pokazuje veliki skok u porastu aktivnosti posle 2 dana gajenja korenova (transformisanih i netransformisanih) i na početnoj i na konstantnoj koncentraciji fenola (Slika 65). Najveća vrednost PPO zabeležena je 8. dana gajenja ( $30,56 \text{ U/mg}$ ) i to kod transformisanih korenova gajenih na početnoj koncentraciji fenola, što je 3,31 puta veća

aktivnost od početne. Nije zabeležena aktivnost PPO kod netransformisanih korenova posle 6. dana gajenja.

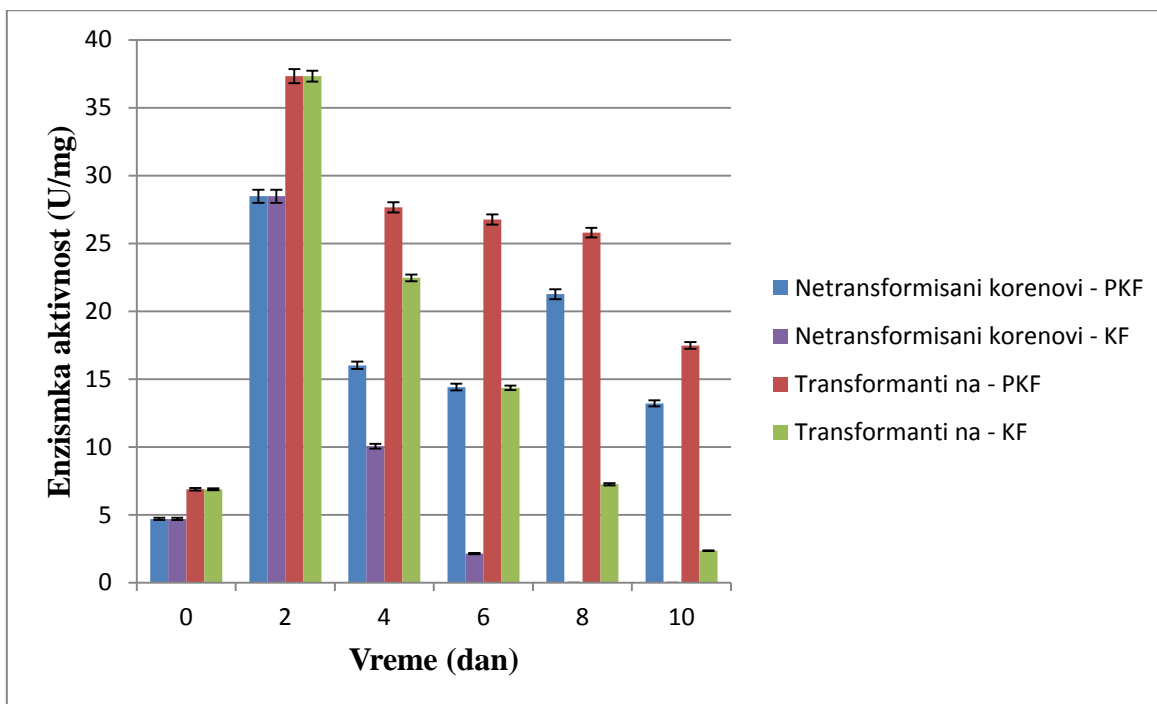


Slika 65. Aktivnost polifenoloksidaze kod transformisanih korenova zelene salate sorte Ljubljanska ledenka tokom gajenja na početnoj i konstantnoj koncentraciji fenola od  $50 \text{ mgL}^{-1}$ . PKF-početna koncentracija fenola; KF-konstantna koncentracija fenola. Za aktivnost PPO korišćen je 4-MC.

#### 4.6.4.4. Aktivnost superoksid dismutaze kod transformisanih korenova zelene salate sorte Ljubljanska ledenka tokom gajenja na početnoj i konstantnoj koncentraciji fenola

Posle dva dana gajenja zabeležen je nagli porast aktivnosti SOD kod svih korenova na oba tretmana (Slika 66) i dostiže 5,4 puta veću vrednost u odnosu na početnu za transformisane korenove gajene i na početnoj i na konstantnoj koncentraciji fenola. Ova vrednost dostiže 6,7 puta ukoliko se radi o netransformisanim korenovima. Najveća aktivnost SOD primećena je kod transformisanih korenova gajenih na početnoj i konstantnoj koncentraciji fenola. Kod netransformisanih korenova gajenih na konstantnoj koncentraciji fenola dolazi do pada

enzimske aktivnosti posle dva dana gajenja i opada do 6. dana posle koga se više ne može detektovati. Aktivnost SOD opada posle najveće zabeležene vrednosti (2. dana) kod transformisanih korenova gajenih na konstantnoj koncentraciji fenola i do kraja 10 dana dostiže najnižu vrednost.



Slika 66. Aktivnost superoksidismutaze kod transformisanih korenova zelene salate sorte Ljubljanska ledenka tokom gajenja na početnoj i konstantnoj koncentraciji fenola od 50 mgL<sup>-1</sup>. PKF-početna koncentracija fenola; KF-konstantna koncentracija fenola



## 5. DISKUSIJA

### 5.1. Zelena salata *in vitro*

Sterilisana semena 11 sorti zelene salate gajena su na MS hranljivoj podlozi, sa ciljem uspostavljanja kulture *in vitro*. Ovakav sistem gajenja zelene salate koja bi u sterilnim uslovima bila izložena dejstvu fenola, bio bi veoma dobar način za praćenje uklanjanja fenola iz hranljive podloge. Međutim, umnožavanje zelene salate *in vitro*, kao ni samo gajenje biljke u kulturi, nije dalo zadovoljavajuće rezultate. Semena i klijanci zelene salate su gajeni na MS hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja. Pokazano je da eksplantati zelene salate (kotiledoni) zahtevaju prisustvo indol-3-sirćetne kiseline (IAA) i kinetina (KIN), pojedinačno ili zajedno dodatih u hranljivu poldogu (Webb i sar. 1984) ili kombinaciju benzil amino purina (BAP) i naftil sirćetne kiseline (NAA) nižih koncentracija (Hunter i Buritt 2002). KIN i IAA u kombinaciji dovode do regeneracije pupoljaka, dok IAA samostalno stimuliše rast korenova. Korenovi su bili dobro razvijeni i kod zelene salate gajene samo na MS hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja, tako da dodavanje IAA ne bi mnogo poboljšalo rezultat. U pomenutom radu nije došlo do regeneracije pupoljaka u hranljivoj podlozi bez dodatka regulatora rastenja. Honari i sar. (2008) gajili su kotiledone zelene salate na hranljivim poldogama sa IAA i BAP. Najbolji rezultati dobijeni su na hranljivoj podlozi sa  $0,05 \text{ mgL}^{-1}$  NAA i  $0,2 \text{ mgL}^{-1}$  BAP gde je formiran kalus, a za direktnu organogenezu korišćena je hranljiva podloga sa  $0,05 \text{ mgL}^{-1}$  NAA i  $0,4 \text{ mgL}^{-1}$  BAP. Dalja istraživanja rađena su u hidroponičnim uslovima koji su simulirali eventualne otpadne vode u kojima bi se koristila zelena salata za fitoremedijaciju. Ovakav način gajenja salate svakako će pokazati da li zelena salata uklanja fenol iz vode i, ukoliko uklanja, da li je postupak isplativ. Dalja istraživanja baviće se optimizacijom protokola za gajenje zelene salate *in vitro*, ali je za potrebe ove doktorske disertacije taj deo istraživanja zanemaren kao nedovoljno potreban i skup. Takođe, rezultati koji se dobiju prilikom ispitivanja mogućnosti za fitoremedijaciju *in vitro*, ne mogu se sa sigurnošću primeniti na celu biljku koja je gajena u prirodi (Doran 2009), tako da su neophodna dalja istraživanja koja su u ovoj disertaciji obavljena u hidroponici.

## **5.2. Klijanje semena različitih sorti zelene salate na rastućim koncentracijama fenola sa praćenjem aktivnosti antioksidativnih enzima i PPO**

Zelena salata ima veoma razvijen sistem antioksidativne zaštite (Zdravković i sar. 2014). Veliki broj istraživanja na ovu temu ticao se ispitivanja zelene salate kao veoma dobrog kandidata za dijetalnu ishranu kao i za ishranu ljudi koji su oboleli ili se oporavljaju od određenih bolesti (Serafini i sar. 2002; Nicolle i sar. 2004; Llorach i sar. 2008; Kanthal i sar. 2014; Urzula i sar. 2014). Iz tog razloga je veći deo rezultata baziran na određivanju različitih neenzimskih komponenti antioksidativne zaštite (vitamin C, vitamin E, fenoli, antocijanini itd.) koje se visoko kotiraju kada je u pitanju tzv. "zdrava ishrana". Iz do sada objavljenih radova mogu se sakupiti informacije o vrsti, količini i zastupljenosti pomenutih jedinjenja kod određenih sorti zelene salate, ali su podaci o enzimskom sastavu, a pogotovo o delovanju enzima antioksidativne zaštite i PPO veoma oskudni.

Različite vrste stresa kod biljaka dovode do pojačane proizvodnje ROS koje mogu dovesti do oksidativnih oštećenja (Inze i Montagu, 2002). Oksidativna oštećenja dovode do pojačane sinteze i aktivnosti antioksidativnih enzima koji deluju kao odbrambeni sistem biljaka. ROS mogu dovesti i do smrti ćelije ukoliko je njihova koncentracija veća od one koju biljka može efikasno eliminisati. Kod biljaka se u uslovima stresa može aktivirati, a obično i jeste tako, više antioksidativnih enzima i na taj način se povećava njihova mogućnost za preživljavanje (Allen, 1995). U ovoj disertaciji, praćena je aktivnost: peroksidaza, katalaza, polifenol oksidaze i superoksid dizmutaze u cilju utvrđivanja njihove moguće uloge koju mogu imati u borbi zelene salate sa štetnim uticajem fenola u vodi. Antioksidativni enzimi su najčešći markeri oksidativnog stresa, ali se često ne može uočiti jasna korelacija njihove aktivnosti sa određenom vrstom stresa kojoj su biljke izložene (Walker i McKersie, 1993; Seppänen i Fagerstedt, 2000).

Tokom istraživanja, kao polazna osnova, korišćena su semena 11 različitih sorti zelene salate. Odabrana su dva varijeteta koja su odgovarala po kriterijumu otpornosti na fenol. Među polaznim sortama, koje su odbačene kao neadekvatne, bilo je i varijeteta koji su imali manje ili više crvene listove (usled visoke koncentracije antocijanina) kao što su Vera,

Ruby Red i Red Fire što je u suprotnosti sa uvreženim mišljenjem da crvene sorte zelene salate imaju viši sadržaj fenolnih jedinjenja i povećan antioksidativni kapacitet (Liu i sar. 2007). Antocijanini su dokazani kao primarna fenolna jedinjenja u crvenolisnim varijetetima zelene salate (Dupont i sar. 2000; Caldwell 2003). Sa obzirom na to da rezultati ove teze pokazuju da zeleni varijeteti bolje podnose fenol od crvenih, može se pretpostaviti da visok sadržaj antocijanina u crvenolisnim varijetetima nije dovoljan preduslov za borbu sa štetnim uticajem visokih koncentracija fenola ( $200 \text{ mgL}^{-1}$ ). Liu i sar. (2007) su takođe pokazali da antioksidativni kapacitet zelene salate direktno zavisi od doba godine tokom kojeg je salata gajena i to bez obzira da li ima ili nema visok sadržaj antocijanina. Ovakav rezultat dovodi do zaključka da postoje aktivne komponente neenzimske prirode, koje poboljšavaju antioksidativni kapacitet zelene salate, a ne radi se strogo o fenolnim jedinjenjima. Može se konstatovati da antioksidativni kapacitet zelene salate zavisi od mnogo faktora: sorte, boje, temperature spoljašnje sredine, doba dana i godine itd, tako da bi traženje jednog generalizovanog odgovora bilo veoma teško.

Fenol je primarno polimerizovan od strane PPO, ali takođe može biti ukolonjen iz biljnih tkiva aktivnošću POX (Thyapong i sar. 1996). Veliki broj podataka o polifenol oksidazi sumiran je u revijskom radu Mayer (2006) u kome se navodi da su istraživanja na ovom enzimu dala, za sada, nedovoljan broj podataka o njegovom načinu funkcionisanja. Prilikom gajenja semena na različitim inhibitornim koncentracijama fenola može se primetiti da dve sorte (Ljubljanska ledenka i Nansen) imaju najveću klijavost i klijaju na koncentraciji fenola od čak  $300 \text{ mgL}^{-1}$ . Kod svih ispitivanih varijeteta zelene salate, aktivnost peroksidaza raste ukoliko su semena gajena i klijala u rastvoru fenola, dok aktivnost PPO opada na istom tretmanu. Najveći porast aktivnosti POX, i to pred sam kraj tretmana, primećen je kod najotpornije sorte, Ljubljanska ledenka. Iako je aktivnost POX u semenima bila povećana, njena relativna (do 3 U/mg) vrednost je izuzetno niska. Tako niska vrednost aktivnosti POX u semenima zelene salate, izloženim dejstvu fenola, može se objasniti eventualnom inhibicijom enzimske sinteze, aktivnosti ili relokalizacijom enzima u spoljašnju sredinu, što se može dogoditi prilikom ekstrakcije uzoraka (Bestwick i sar. 1998; Tadić i sar. 2014). Hu i sar. (2012) su pokazali da POX imaju širok optimum pH vrednosti

u kojima pokazuju aktivnost, zahvaljujući velikom broju izoformi koje se javljaju u biljnim tkivima, a koje mogu biti delimično ili potpuno prečišćene prilikom ekstrakcije. U ovoj disertaciji korišćen je protokol za ekstrakciju POX iz semena zelene salate po Furumo i Furutani (2008) koji podrazumeva ekstrakciju uzoraka na pH 6,5. Moguće je da POX, koje su aktivne tokom klijanja semena, ne pokazuju maksimalnu aktivnost na ovoj pH vrednosti pufera ili da su određene izoforme neaktivne. Tokom klijanja semena, aktiviraju se različite izoforme POX. Ove brojne izoforme karakteristične su samo za proces klijanja i kasnije tokom rasta biljke one se najčešće gube (Passardi i sar. 2005). Moguće je da određene izoforme koje se javljaju samo tokom klijanja zelene salate nisu detektovane i da se one u kasnijim stadijumima razvija gase. Ove izoforme POX ne moraju biti uključene u polimerizaciju fenola. POX koje se javljaju tokom klijanja semena zaslužne su za pucanje semenjače, trošenje endosperma i zaštitu od patogena koji bi mogli napasti seme koje klija (Morohashi 2002).

Sorta Ljubljanska ledenka, koja pokazuje najveću aktivnost POX tokom klijanja na inhibitornim koncentracijama fenola, i Nansen sa najvećom aktivnošću katalaza, imaju takođe i najveću otpornost na štetno dejstvo fenola, što se vidi po njihovoj nepromenjenoj morfologiji. CAT, kao i POX, smatraju se prvom odbrambenom linijom biljaka od stresa (Vamos-Vigyazo 1981; Apel and Hirt 2004). Povećanje aktivnosti CAT na početku tretmana može biti objašnjeno povećanom koncentracijom vodonik peroksida uzrokovanom toksičnim delovanjem fenola. Katalaze imaju nizak afinitet za vodonik peroksid (Mizuno i sar. 1998) tj. koncentracija vodonik peroksida mora dostići određeni nivo da bi bio dovoljan za aktivaciju katalaza, a u ovom slučaju fenol može dovesti do formiranja velike količine slobodnih radikala. Veoma velika aktivnost katalaza primećena je i kod sorti zelene salate koja je rasla na povećanoj koncentraciji NaCl i to na početku tretmana (Mahmoudi i sar. 2012). Povećana aktivnost CAT zabeležena je i kod klijanaca zelene salate gajene na 100 mM koncentraciji NaCl i to za 41% u odnosu na kontrolu (Hela i sar. 2011). U pomenutom radu, klijanci zelene salate su kasnili sa klijanjem u odnosu na kontrolne biljke, što u slučaju klijanja salate na fenolu nije slučaj. Klijanci koji su gajeni na povećanoj koncentraciji NaCl bili su izloženi povećanom osmotskom stresu i kašnjenje u

klijanju se može tumačiti kao priprema za klijanje pod takvim uslovima. Kod klijanaca koji su klijali na fenolu, aktivirani su mehanizmi odbrane na samom početku bez odlaganja klijanja.

Kod klijanaca bele breze je zabeležena veoma niska aktivnost PPO, ali se ona povećava sa porastom temperature (Tegelberg i sar. 2008). Povećana aktivnost PPO kod klijanaca zelene salate koji nisu rasli u rastvoru fenola, može biti pripisana povećanju do kojeg dolazi usled povećane temperature na kojoj su semena gajena (24 °C) u sobi za kulturu tkiva (optimalna temperatura za klijanje korišćenih sorti zelene salate je između 18 i 20 °C). Kao i u slučaju smanjene aktivnosti POX, moguće je da je PPO oslobođena u spoljašnju sredinu sekrecijom ili lizom ćelijskog zida (Sinsabaugh 2010). Povredama listova topole od strane herbivora dolazi do snažnog povećanja aktivnosti PPO (Constabel i Ryan 1998) što dovodi do kovalentnih modifikacija slobodnih amino kiselina i sulfhidrilnih grupa i na taj način menjanja konformacije proteina i njihove nutritivne vrednosti. Smanjena aktivnost PPO u klijancima zelene salate može takođe biti objašnjena kao sprečavanje akumulacije štetnih fenolnih polimera (suprotno reakcijama koje se dešavaju u listovima topole) u biljnom tkivu ili korišćenjem neadekvatnog protokola za ekstrakciju. Determinacija PPO i fenolnih jedinjenja u biljnim tkivima može se razlikovati u velikom broju slučajeva, a sve zavisi od procedure koja je korišćena za analizu (Dinçer i sar. 2013). Isti autori navode da se rezultati mogu razlikovati u zavisnosti od geografskog lokaliteta biljke, ekoloških uslova ili klime. Tokom klijanja, dolazi do aktivacije različitih izoformi PPO koje se mogu veoma razlikovati od onih kod odrasle biljke i strogo su regulisane tokom razvića (Tran i sar. 2012). PPO sa monofenolaznom aktivnošću, izolovana iz zelene salate "iceberg", pokazuje snažnu inhibiciju izazvanu visokom koncentracijom supstrata (Chazarra i sar. 1999) što može biti povezano sa našim eksperimentom u kome je korišćena inhibitorna koncentracija fenola karakteristična za svaku ispitivanu sortu. Postoji i hipoteza da PPO služi kao signalni molekul koji biljci nagoveštava prisustvo fenola (Bais i sar. 2004). U tom slučaju, PPO ne zahteva visoke koncentracije fenola za svoju aktivaciju. Možda bi aktivnost PPO u korenu klijanaca zelene salate bila veća i na taj način bi PPO delovala kao signalni molekul koji se prvi aktivira ukoliko biljka dođe u kontakt sa fenolom u podlozi. Eksperimenti koji su

kasnije rađeni na zreloj zelenoj salati pokazali su da se aktivnost PPO u korenu hidroponično gajene salate povećava kada je ona izložena fenolu. Aktivnost PPO u klijancima zelene salate rađena je na celom klijancu, tako da nije moguće tačno reći koji deo biljke je odgovoran za veću ili manju proizvodnju PPO. Mnogi autori navode da PPO imaju bitnu ulogu u klijanju biljaka (Taneja i Sachar, 1974; Maki i Morohashi, 2006; Dicko i sar. 2006) i da se različite izoforme mogu javljati tokom klijanja u odnosu na odraslu biljku. Istraživanja započeta u ovoj tezi mogu se dopuniti praćenjem izoformi tokom klijanja zelene salate na fenolu, da bi se videlo da li se iste izoforme javljaju kod klijanaca i kod zrele biljke tokom gajenja na fenolu i da li aktivnost PPO tokom klijanja salate na fenolu možda potiče od izoforme PPO koja se aktivira samo tokom klijanja. Holzapfel i sar. (2010) veruju da se veliki deo PPO proizvodi u korenu klijanaca *Bromus* spp. Isti autori navode da L-DOPA nije prirodni supstrat za PPO korena, ali su pokazali da i katehol korišćen kao supstrat daje loše rezultate. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima u ovoj studiji gde je L-DOPA bio lošiji supstrat za PPO od 4-MC. Takođe, rezultati su i u saglasnosti sa rezultatima Gawlick-Dziki i sar. (2008) koji su pokazali da se najbolji rezultati za aktivnost PPO zelene salate postižu korišćenjem katehola i 4-MC kao supstrata. U svakom slučaju, ukoliko pretpostavimo da PPO ima funkciju jednog od signalnih molekula koji klijanac zelene salate informiše o štetnim uticajima u spoljašnjoj sredini, logično je da ima široku supstratnu specifičnost.

### **5.3. Gajenje zelene salate na odabranoj koncentraciji fenola sa praćenjem aktivnosti antioksidativnih enzima i PPO**

Poslednjih godina velika pažnja se posvećuje fitoremedijaciji voda uz pomoć različitih antioksidativnih enzima, naročito peroksidaza, koji bi uklonili fenol iz vode (Gómez i sar. 2008). Peroksidaza iz rena je jedan od najviše proučavanih enzima koji se koriste u procesu prečišćavanja otpadnih industrijskih voda (Diao i sar. 2010), ali su troškovi proizvodnje i upotrebe ovih enzima veoma veliki i neisplativi, pa je korišćenje biljaka i njihovih enzima jedan od načina na koji bi se uštedelo, a možda i poboljšalo prečišćavanje otpadnih voda. Peroksidaza iz rena katalizuje veoma dobro oksidaciju različitih supstrata uključujući i fenole (Eikhorn, 1978). Prečišćavanje ovog enzima je veoma skup i često nedovoljno

razrađen proces. Davidenko i sar. (2004) probali su da upotrebe parcijalno prečišćenu repinu POX za uklanjanje fenola iz vode i pokazali da je, uz prisustvo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ovakav način prečišćavanja vode moguć i veoma uspešan, mada bi troškovi prečišćavanja, pa i parcijalnog, bili ipak veći nego kod potencijalne primene nekog biološkog sistema.

Hidroponični uslovi gajenja zelene salate koji su korišćeni u ovoj studiji mogu dovesti do određenih poremećaja u funkcionisanju enzima u odnosu na salatu koja bi bila gajena u polju ili u sistemu u koji se slivaju otpadne vode. Međutim, cilj istraživanja u ovoj tezi bio je ispitivanje mogućnosti uklanjanja fenola iz otpadnih voda, te je hidroponični sistem bio adekvatno rešenje. Hidroponični sistemi, koji su razvijeni i prilagođeni gajenju zelene salate za potrebe ove doktorske disertacije, bili su mali kontrolisani sistemi u čiji vodeni rastvor za gajenje je dodavana početna, odnosno konstantna koncentracija fenola. Početna koncentracija fenola u rastvoru bi dala odgovor na pitanje da li se ova biljka može koristiti za fitoremedijaciju otpadnih voda zagađenih fenolom, dok bi konstantna koncentracija fenola simulirala uslove u kojima nova količina otpadne vode, a samim tim i nova koncentracija fenola dolazi u kontakt sa biljkama. Na taj način se može proveriti otpornost zelene salate na ovu vrstu otpadne vode koja može biti zatvoren sistem (početna koncentracija fenola) ili otvoren sistem sa konstantnom cirkulacijom (konstantna koncentracija fenola). Takođe, Zdravković i sar. (2014) pokazali su da nema statistički značajne razlike u antioksidativnom kapacitetu tri različita varijeteta zelene salate (Emerald, Vera i Neva) koje su bile gajene u uslovima plastenika ili staklene bašte. Može se posredno postaviti hipoteza da i u slučaju hidroponičnog gajenja salate nema velike razlike u načinu na koji se aktiviraju enzimi antioksidativnog stresa kada je biljka izložena fenolu u odnosu na eventualno gajenje zelene salate u vodenom sistemu u prirodi. Lin i sar. (2013) su gajili zelenu salatu u hidroponičnom sistemu i dokazali da posle 35 dana gajenja nema značajne razlike u proteinskom sastavu između biljaka koje su različito osvetljavane. Nasuprot tome, primećena je velika razlika u enzimskom sastavu i enzimskoj aktivnosti antioksidativnih enzima kada je ispitivano pet različitih sorti zelene salate, dok ni u ovom slučaju nije primećena razlika u odnosu na mesto gajenja (Llorach i sar. 2008).

Kod obe sorte (LJL i N) zelene salate dolazi do naglog pada aktivnosti POX tokom 2., 4., i 6. dana gajenja na početnoj ili konstantnoj koncentraciji fenola. Aktivnost POX u korenu se povećava i kod jedne i kod druge sorte pred kraj tretmana ukoliko su biljke gajene na početnoj koncentraciji fenola, dok se prilikom gajenja na konstantnoj koncentraciji fenola povećanje aktivnosti dešava posle 8. dana gajenja da bi opet došlo do smanjenja pred kraj tretmana. Aktivnost POX je veća u korenu nego u listovima i na početnoj i na konstantnoj koncentraciji fenola, ali je to donekle i logično jer se najveći deo biljnih peroksidaza eksprimira baš u korenu u poređenju sa drugim biljnim organima, jer korenov sistem predstavlja prvo mesto na kome se biljka susreće sa nizom abiotičkih faktora na koje treba odgovoriti sistemom antioksidativne zaštite (Tamás i sar. 2007). Aktivnost POX je veoma niska kod zelene salate, i to kod obe sorte, koja je rasla bilo na početnoj, bilo na konstantnoj koncentraciji fenola. Protokoli koji su korišćeni u ovoj disertaciji podrazumevali su upotrebu gvajakola i pirogalola. Moguće je da su supstrati neodgovarajući, ali je to manje verovatno sa obzirom na to da su Hu i sar. (2012) pokazali da su pomenuta dva supstrata veoma pogodna za ekstrakciju POX iz tkiva zelene salate. Pad u aktivnosti enzima može nastupiti kao posledica inhibicije enzimske aktivnosti ili enzimske relokalizacije npr. u ćelijski zid koji može biti rekalcihrantan na pufersku ekstrakciju (Bestwick i sar. 1998). Najmanja aktivnost POX kod zelene salate sorte Junjuck primećena je na temperaturama između 13 i 20 °C, a povećana aktivnost na temperaturama između 20 i 25 °C, dok je aktivnost PPO veća na nižim temperaturama (Boo i sar. 2011). Salate koje su izučavane u ovoj tezi gajene su na temperaturama nižim od 20 °C, pa je aktivnost POX možda niža iz tog razloga. Tokom tumačenja rezultata, biće praćen trend aktivnosti POX, bez obzira na apsolutne vrednosti. Najveća aktivnost POX uočena je kod kontrolnih biljaka tj. onda kada biljke nisu bile izložene dejstvu fenola. U tom periodu bi se očekivala i veoma mala koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jer biljke nisu izložene stresu. Pad u aktivnosti POX odmah posle izlaganja zelene salate fenolu, može se tumačiti na više načina: visoka koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ne dovodi do povećanja aktivnosti POX; dolazi do aktivacije CAT koje se i aktiviraju pri većim koncentracijama ovog molekula, što i jeste slučaj u ovoj tezi; PPO preuzima ulogu enzima koji polimeriše fenolna jedinjenja, a njena aktivnost se zaista i povećava kada biljke dođu u kontakt sa fenolom; neki drugi antioksidativni enzimi koji nisu istraživani u ovoj



tezi dovode do eliminacije ROS. POX i CAT su u kompeticiji za isti supstrat:  $H_2O_2$ , pa je i logično što nisu aktivne u isto vreme. Ako se uzme u obzir da je aktivnost POX generalno manja u odnosu na CAT i PPO, može se pretpostaviti da poslednja dva enzima imaju veću ulogu u borbi zelene salate protiv štetnog dejstva fenola od POX. Poznato je da biljne POX imaju pojačanu aktivnost na samom početku delovanja nekog abiotičkog stresa, a da njihova aktivnost polako opada sa vremenom (Klumpp i sar. 2000). Isti autori navode da je primetno pojačana aktivnost POX samo kod jakog hemijskog stresa. Ovakvo ponašanje POX nije uobičajeno kod mnogih biljnih vrsta i obično se bazični nivo aktivnosti POX zadržava uvek i enzimi u tom slučaju imaju tzv. "housekeeping" funkciju, kao što je rastenje, razviće i lignifikacija (Passardi i sar. 2005). Ovaj bazični nivo aktivnosti POX primećen je i kod zelene salate u kontrolnim biljkama, da bi se tokom gajenja aktivnost povećavala i to naročito u korenu.

Zhan i sar. (2014) pokazali su da konstantno osvetljenje dovodi do smanjenja pojave braon boje cvasti karfiola, koja potiče od pojačane aktivnosti POX i PPO. Istraživanja su rađena sa ciljem produžavanja vremena tokom koga se karfiol može prodavati u supermarketima, a da ne bude oštećen braon bojom cvetova. Možda bi konstantan mrak tokom hidroponičnog, i eventualnog gajenja zelene salate u prirodi, moglo poboljšati uklanjanje fenola iz vode, dovodeći do pojačane aktivnosti ova dva enzima koja i učestvuju u eliminaciji fenola.

Kod zelene salate koja je rasla na početnoj koncentraciji fenola primećen je primetan rast u aktivnosti CAT u korenu sorte Ljubljanska ledenka i to pred kraj tretmana. Generalno, aktivnost CAT je bila veća tokom vremena ukoliko su biljke gajene na početnoj koncentraciji fenola bilo da se radi o korenu ili listovima, u odnosu na kontrolne biljke koje su rasle bez uticaja fenola. Međutim, ukoliko su biljke gajene na konstantnoj koncentraciji fenola, dolazi do znatnog porasta u aktivnosti CAT samo u listovima sorte Nansen i to na kraju tretmana. U ostalim slučajevima se na kraju tretmana aktivnost CAT smanjuje. Mahmoudi i sar. (2012) pretpostavljaju da su CAT odgovorne za uklanjanje  $H_2O_2$  iz tkiva salate koja je izložena dejstvu NaCl. Njihova aktivnost se drastično smanjuje kada je zelena salata izložena visokim koncentracijama NaCl, slično kao i u slučaju dugotrajnog izlaganja visokoj koncentraciji fenola. Aktivnost POX se povećava pred kraj tretmana prilikom koga

su salate izložene dejstvu fenola, što je obrnuto aktivnosti CAT. Može se pretpostaviti da POX u tom slučaju preuzimaju ulogu u uklanjanju visoke koncentracije ROS koja sigurno nastaje tokom rasta biljke na ovako toksičnim koncentracijama fenola. Njihov porast tokom gajenja salate na početnoj koncentraciji fenola može takođe govoriti u prilog tome. Smanjena aktivnost CAT tokom gajenja salate na konstantnoj koncentraciji fenola na samom kraju tretmana može se objasniti eventualnom inaktivacijom enzimske aktivnosti visokom koncentracijom vodonik peroksida ili samim odumiranjem tkiva na tako visokoj i konstantnoj koncentraciji fenola. Aktivnost CAT počinje da se vraća na početnu vrednost posle tri dana od izlaganja zelene salate fenolu, što se može objasniti padom koncentracije  $H_2O_2$ , koji je verovatno tokom tretmana fenolom bio prisutan u visokoj koncentraciji da bi se njegova koncentracija smanjila posle uklanjanja fenola. Pojačana produkcija  $H_2O_2$  može se pripisati i povećanoj aktivnosti SOD koja dovodi do njegovog nagomilavanja. Ako je aktivnost SOD pojačana, biće pojačana i aktivnost CAT koje su odgovorne za uklanjanje  $H_2O_2$ . U slučaju zelene salate gajene na fenolu, ovakav trend se može ustanoviti.  $H_2O_2$  je veoma dobar kandidat za sekundarnog glasnika, jer lako može prolaziti kroz ćelijske membrane (Rojas-Beltran i sar. 2000). Njegova povećana koncentracija može dovesti do aktivacije određenih gena za enzime koji u ovoj tezi nisu analizirani. Kovtun i sar. (2000) su dokazali da  $H_2O_2$  aktivira specifičnu protein kinazu *Arabidopsis* koja pokreće fosforilaciju MAPK (mitogen-activated protein kinase) i na taj način se aktiviraju geni koji su uključeni u odbrambeni mehanizam biljke.

Aktivnost PPO se generalno smanjuje na kraju tretmana u korenu i listu obe sorte (LJL i N) ukoliko se salata gaji na konstantnoj koncentraciji fenola, dok u slučaju gajenja na početnoj koncentraciji fenola smanjenje aktivnosti je primećeno tek 10. dana gajenja ukoliko se kao supstrat koristi L-DOPA. Kada se posmatraju rezultati dobijeni sa supstratom 4-MC, koji je inače dao mnogo bolje rezultate, vidi se da se aktivnost PPO smanjuje posle 10. dana na konstantnoj koncentraciji fenola, a dostiže maksimum aktivnosti posle 8 dana gajenja. Generalno, primećen je porast u aktivnosti ovog enzima, u odnosu na kontrolu, kod obe sorte i u korenu i u listu ukoliko se biljke gaje na početnoj koncentraciji fenola, dok su u slučaju gajenja na konstantnoj koncentraciji fenola primećene mnogo veće oscilacije. U

slučaju gajenja na početnoj koncentraciji fenola, pad aktivnosti na kraju tretmana nije primećen. Sa obzirom na to da je PPO lokalizovana u plastidima biljaka, a supstrati koje enzim koristi uglavnom se nalaze u vakuolama, glavni faktor koji dovodi do aktivacije i pojačane aktivnosti enzima je degradacija velikog broja subćelijskih komponenti (Rigal i sar. 2000) tako da bi se povećanje aktivnosti na konstantnoj koncentraciji fenola posle 8 dana moglo objasniti lizom ćelijskog zida usled dejstva fenola, a pad aktivnosti posle 10 dana odumiranjem ćelija. Na početnoj koncentraciji fenola ne dolazi do takve destrukcije tkiva jer je fenol vremenom uklonjen, pa samim tim i ne dolazi do uništavanja ćelija u tako velikom broju. Biljake koje nisu tretirane abiotičkim stresom, koji je u ovom slučaju fenol, pokazuju niže vrednosti aktivnosti PPO u ranijem stadijumu rastenja i razvića (Jiang i sar. 2004). Ovi autori smatraju da se snižena aktivnost enzima kod mladih jedinki može pripisati jačim ćelijskim membranama koje još uvek zadržavaju funkciju i oblik, za razliku od starijih ćelija kod kojih veoma često dolazi do povećane propustljivosti i pucanja ćelijske membrane pa samim tim i ispuštanja veće količine PPO u citoplazmu ćelije. Povećana PPO aktivnost primećena je i kod salata starih 73 dana u odnosu na biljke stare između 28 i 42 dana (Chutichudet i sar. 2011) i to prvenstveno u listovima. Manja aktivnost enzima primećena je u korenu i stablu. Isti autori navode da je sadržaj ukupnih fenola i askorbinske kiseline takođe povećan posle dužeg gajenja zelene salate. U pomenutoj studiji ispitivani su različiti parametri koji dovode do pojačane pojave tipične braon boje listova zelene salate posle dužeg stajanja ili gajenja sa ciljem poboljšanja izgleda salate koja bi na taj način bila prijemčivija za potrošače. Izmerena pH vrednost u istom eksperimentu bila je najveća posle 28 dana gajenja, da bi počela blago da opada na vrednost od 6,81 posle 73 dana gajenja. Maksimum aktivnosti PPO zabeležena je na pH vrednosti od 7.0 kada je u pitanju zelena salata (Gawlick-Dziki, 2008). Zelena salata opisana u ovoj doktorskoj disertaciji bila je stara 60 dana kada je podvrgnuta eksperimentu u kome je bila izlagana visokoj koncentraciji fenola u rastvoru što se poklapa sa starošću opisane zelene salate u kojoj je zabeležena optimalna pH vrednost za PPO. Može se zaključiti da je na samom početku ovog eksperimenta, zelena salata stara 60 dana, imala pogodnu pH vrednost koja bi bila optimalna za uspešnu aktivaciju PPO. Generalno, aktivnost PPO je kod zelene salate bila veća u korenu nego u listovima, mada su vrednosti u oba slučaja bile iznad prosečnih

vrednosti za kontrolu. Yingsanga i sar. (2008) su pokazali da je aktivnost PPO u listovima *Nepheium lappaceum* veća nego u korenu i stablu. Ovakav rezultat objašnjavaju činjenicom da je protok kiseonika u listovima i njihovim tkivima mnogo veći nego u drugim delovima biljke najviše zbog toga što imaju najveću površinu, što je slučaj i sa zelenom salatnom, kao i povećan broj stoma po jedinici površine (Yingsanga i sar. 2006). Collier i Huntington (1983) sa druge strane smatraju da se povećana aktivnost PPO i sklonost listova da poprimaju braon boju može pripisati njihovoj većoj površini u odnosu na druge delove biljke, većoj stopi rasta po jedinici vremena i povećanom sadržaju vode koja se može zadržavati u njima. U eksperimentu urađenom u okviru ove doktorske disertacije pokazano je da je aktivnost PPO u korenu zelene salate veća nego u listovima posle tri dana gajenja salate na koncentraciji fenola od  $200 \text{ mgL}^{-1}$ , dok se u slučaju konstantnog fenola primećuje da je aktivnost PPO u korenu daleko veća nego u listovima na samom početku gajenja. Koren je u ovom slučaju bio izložen veoma visokoj koncentraciji fenola u vodenom rastvoru pa je bio prvi deo biljke koji je došao u kontakt sa toksičnom koncentracijom fenola. U slučaju gajenja salate na konstantnoj koncentraciji fenola došlo je do pojačane aktivnosti PPO u korenu posle tri dana gajenja i ta aktivnost je održavana do kraja eksperimenta u kome je uklanjana fenol iz vode. Salata u ovom slučaju sintetizuje povećanu količinu PPO da bi se borila protiv toksičnog dejstva fenola. U drugom slučaju, gde je fenol održavan na konstantnoj koncentraciji fenola od  $200 \text{ mgL}^{-1}$ , aktivnost PPO opada posle trećeg dana bez obzira na prisutni fenol u vodi. Ovakav rezultat može se tumačiti kao nemogućnost zelene salate za daljom proizvodnjom enzima, što može biti rezultat odumiranja korena ili možda uključivanje nekih drugih mehanizama antioksidativne zaštite. Mogući, neposredan dokaz aktivnosti PPO ili nekog drugog enzima koji polimeriše fenol, je i promena boje rastvora u kome su gajene biljke, a koji menja boju od bezbojne na početku, do različitih nijansi braon boje na kraju eksperimenta. Različita fenolna jedinjenja i PPO nalaze se veoma često u različitim delovima ćelije. Kada dođe do oštećenja ćelije i njenih organela i delova, fenolna jedinjenja mogu doći u neposredan kontakt sa PPO i na taj način mogu biti polimerizovana od strane enzima (Rigal i sar. 2000). Na taj način se takođe može objasniti povećana aktivnost PPO u korenu zelene salate koja je bila u kontaktu sa fenolom u vodi. Kao i kod klijanaca, i u slučaju odrasle

biljke bolji rezultati se postižu sa 4-MC kao supstratom, što može navesti na pretpostavku da se i kod klijanaca i kod odrasle biljke možda aktiviraju slične izoforme ili su te izoforme jednostavno specifične za sortu nevezano od stadijuma razvića.

Razlike u aktivnosti PPO u različitim delovima zelene salate primetili su i Mai i Glomb (2013). Ovi autori navode da je aktivnost PPO najveća u žućkastim unutrašnjim listovima, a najmanja u stablu salate. Aktivnost PPO korena u pomenutom radu nije ispitivana, a eksperimenti su rađeni na zelenoj salati koja je kupljena na pijaci. Aktivnost PPO kod zelene salate gajene hidroponično je takođe veća u listovima u odnosu na koren, ukoliko se uporede rezultati aktivnosti PPO kontrolnih biljaka različitih sorti. Zabeleženo je da je aktivnost i PPO i POX rasla kada su biljke slatkog krompira bile izložene biotičkom i abiotičkom stresu (Kwak i sar. 1996). Tri dana nakon uklanjanja zelene salate iz vodenog rastvora u koji je dodat fenol, pokazano je da je aktivnost PPO i dalje povećana u korenu u odnosu na listove. Pretpostavlja se da uticaj fenola kao abiotičkog faktora nije nestao onog trenutka kada je salata prebačena u čistu vodu te se stoga primećuje i dalje povećana aktivnost enzima. Moguće je da se u korenu zadržala određena količina fenola zbog koga je PPO i dalje aktivna, ali je mnogo prihvatljivije objašnjenje da je PPO aktivna i dalje, usled nastanka određenih povreda tkiva korena uzrokovanih fenolom. Posle završenog eksperimenta, kao i tokom samog eksperimenta, primećena je pojava braon boje korena kao i spontano regenerisanje novih korenova drugačije morfologije. Pojava braon boje korena dolazi od proizvodnje o-kinona koji nastaju od o-difenola, a oni se nakupljaju kao proizvod reakcije između PPO i fenola. O-kinoni su nestabilna jedinjenja koja spontano polimerizuju i formiraju braon, crvene i crne pigmente (Gawlik-Dziki i sar. 2007), a neposredni su dokaz aktivnosti PPO.

Može se razlikovati 6 izoformi POX i najmanje 3 izoforme PPO u analiziranim uzorcima zelene salate, gajene na početnoj i konstantnoj koncentraciji fenola. Izoforme koje su izolovane iz uzoraka korena i lista biljaka tri dana posle toksičnog delovanja fenola pokazale su jaču aktivnost i mnogo vidljivije trake. Ako se uzme u obzir rezultat iz prethodnog eksperimenta, u kome se vidi da POX imaju veoma slabu aktivnost, može se pretpostaviti da su i trake koje potiču od biljaka gajenih na fenolu slabije. Moguće je da su

određene izoforme enzima uključene u uklanjanje fenola iz vode, ali da su inaktivirane tokom njegovog toksičnog delovanja. Sosa-Alderete i sar. (2012) dokazali su prisustvo kiselih izoformi POX kod transformisanih korenova duvana gajenih na fenolu, koje se razlikuju od izoformi korenova koji nisu bili izloženi njegovom dejstvu. Međutim, određene bazne izoforme koje se mogu primetiti prilikom gajenja korenova duvana na fenolu, parcijalno su inaktivirane tokom vremena. Inaktivacija pojedinih izoformi POX može se dogoditi putem ireverzibilne reakcije između POX i fenil ili fenoksi radikala, adsorpcijom polimerizovanih produkata na POX što rezultuje nemogućnošću da supstrat priđe aktivnom mestu enzima (POX) (Nakamoto i Machida, 1992) ili inaktivacijom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-om (Sidrach i sar. 2006). Sosa-Alderete i sar. (2009) pokazali su da određene izoforme POX koje su uključene u polimerizaciju fenola, ne moraju uopšte biti eksprimirane u transformisanim korenovima duvana koji su izloženi fenolu. Međuspecijske varijacije su veoma česte u pogledu afiniteta POX ka fenolu i hlorofenolu (de Araujo i sar. 2004). Takođe, izoforme ovog enzima pokazuju velike razlike u brzini uklanjanja i metabolizmu fenola (Coniglio i sar. 2008), pa bi dalji eksperimenti vezani za uklanjanje fenola zelenom salatnom dali približnija objašnjenja u vezi njegovog polimerizovanja od strane POX. Veoma je moguće da su određene izoforme POX, koje nisu detektovane na gelu, uključene u polimerizaciju fenola. One se razlikuju od izoformi koje se nalaze u kontrolnim biljkama, a veoma se dobro vide na zimogramskoj detekciji.

Geni i genske familije koji kodiraju PPO su veoma različiti kod različitih vrsta. Njihov položaj, aktivacija i broj kopija se takođe veoma razlikuju čak i među različitim sortama iste vrste i to mnogo više od nekih drugih enzima koji su uključeni u sistem antioksidativne zaštite. Daleko manji broj istraživanja rađen je na dikotilama (Tran i sar. 2012) nego na monokotiledonim biljkama. Tokom evolucije, biljke su se prilagođavale različitim ekološkim faktorima i razvile najrazličitije familije gena za PPO, tako da bi svaka pretpostavka o načinu funkcionisanja PPO, njenoj aktivaciji, broju gena i postranslatornim modifikacijama kod zelene salate, bez adekvatne laboratorijske potvrde bila neozbiljna i suvišna, naročito ako se uzme u obzir činjenica da su se mnogo značajnije promene, duplikacije i modifikacije dešavale baš kod gena koji kodiraju enzime zaslužne za

mehanizme odbrane, suprotno enzimima uključenim u primarni metabolizam i ćelijske funkcije (Hanada i sar. 2008).

Identifikacija izoformi PPO može biti od velikog značaja jer nemaju sve izoforme ovog enzima hidrolitičku aktivnost. U ovoj doktorskoj disertaciji definisane su tri izoforme PPO kada je kao supstrat korišćen fenol jer je od značaja bilo odrediti koje izoforme PPO su uključene u njegovu eventualnu polimerizaciju. Međutim, Dicko i sar. (2002) pokazuju da se javlja veoma veliki broj različitih izoformi kada se koriste različiti supstrati. Ovi autori su razvili metod za zimografsku detekciju PPO koristeći 4-hidroksianizol i 3,4-dihidroksifenilpropioničnu kiselinu uz pomoć kojih su dobili veliki broj PPO izoformi sa većom senzitivnošću za o-difenolaznu nego za monofenolaznu aktivnost. Poznato je da PPO mogu postojati u latentnom odnosno neaktivnom stanju (Mayer i Harel 1979) i da mogu biti oslobođene i ponovo aktivirane određenim kiselim ili baznim sredinama. Chazarra i sar. (1996) pokazali su prisustvo nekativnih izoformi PPO kod zelene salate koje mogu biti aktivirane snižavanjem pH vrednosti ili sa SDS dok su Chazarra i sar. (1999) takođe kod zelene salate dokazali inhibiciju PPO enzima visokom koncentracijom supstrata.

Različite vrste stresa mogu uticati na broj i pojavu izoformi peroksidaza klase III tj. biljnih peroksiaza (Hiraga i sar. 2001). Određene izoforme peroksidaza mogu uticati na nivo endogenih auksina (Park i sar. 2007) tako što inhibiraju enzim IAA oksidazu (Potters i sar. 2009). Ako se najveći broj izoformi može uočiti kod biljaka koje više nisu pod dejstvom fenola, onda se može reći da POX u tom slučaju dovode do regeneracije novih korenova i deobe ćelija, jer je štetan uticaj fenola nestao.

Aktivnost SOD je generalno povećana na oba tertmana u odnosu na kontrolu. Primećen je trend blagog povećanja aktivnosti enzima kod korenova sorte Nansen na fenolu početne koncentracije  $200 \text{ mgL}^{-1}$ . Razlike u aktivnosti ovog enzima tokom vremena su slabije izražene nego kod drugih ispitivanih antioksidativnih enzima. Blago povećanje aktivnosti SOD primećeno je i kod sorti Verte i Romaine koje su bile izložene visokoj koncentraciji NaCl, za razliku od aktivnosti askorbat peroksidaze, katalaza i gvajakol peroksidaze koje su

takođe praćene u ovom eksperimentu (Mahmoudi i sar. 2012). Primećuju se velike razlike u aktivnosti SOD u listovima i korenu iste sorte tokom vremena što može sugerisati na različite kontrolne mehanizme koji kontrolišu enzim u listu odnosno korenu. Slično zapažanje kod zelene salate objavili su i Mahmoudi i sar. (2012). Pomenuti autori navode da u tkivu salate postoje dve detektovane izoforme SOD (Mn- i Fe-SOD), tako da je moguće da su različite izoforme aktivne u različitom tkivu (list i koren). U ovoj disertaciji nisu određivane izoforme ovog enzima, ali bi dalja eksperimentalna analiza mogla potvrditi ovu hipotezu. Lutatkin (2000) je pokazao da postoji snažna korelacija između aktivnosti SOD i proizvodnje superoksidnog anjona kod kukuruza i paradajza, mada je aktivnost različitih izoformi ovog enzima ograničena na organele u kojima se one nalaze (Kurepa i sar. 1997). Aktivnost SOD u listovima zelene salate se povećava sa vremenom u odnosu na koren. Moguće je da vremenom dolazi do aktivacije određenih izoformi SOD u listovima koji su takođe osetljivi na veću količinu slobodnih radikala poteklih od toksičnog dejstva fenola.

#### **5.4. Neenzimska komponenta antioksidativne zaštite kod zelene salate gajene na fenolu: prolin i fotosintetički pigmenti**

Poznato je da zelena salata ima veoma razvijen sistem antioksidativne zaštite, bilo da se radi o enzimskom ili neenzimskom sistemu (Saha i sar. 2008). Dokazano je prisustvo velike količine fenola i flavonoida u njenim tkivima kao i povećana aktivnost antioksidativnih enzima. Enzim fenil alanin amonijum liaza je jedan od mogućih enzima koji mogu imati povećanu aktivnost, a uključen je u polimerizaciju fenolnih jedinjenja (Yingsanga i sar. 2008). Naglo smanjenje aktivnosti PPO u korenovima i listovima zelene salate koja je bila izložena visokoj koncentraciji fenola u vodi može se stoga objasniti mogućim uključivanjem neenzimske komponente antioksidativne zaštite koja u ovoj doktorskoj disertaciji nije detaljno ispitivana. Neenzimska komponenta antioksidativne zaštite je veoma dobro razvijena kod različitih sorti zelene salate (Rice-Evans i sar. 1997). Pokazano je da sorte zelene salate koje imaju crvene listove imaju visok sadržaj antocijanina, dok salate koje imaju jako zelene, kao što je slučaj u ovoj disertaciji, i svetlo crvene listove imaju visok sadržaj vitamina C i fenola u svojim tkivima. Otpadne vode izazivaju nagli



osmotski stres kod biljaka (Ouzounidou i sar. 2008) pa bi se moglo očekivati da se pojačavaju aktivnosti određenih enzima ili koncentracije neenzimskih komponenti antioksidativne zaštite. Jedna od komponenti neenzimske zaštite koja je ispitivana u ovoj tezi je prolin. Sa obzirom na to da se njegova koncentracija povećava linearno u listovima tokom trajanja eksperimenta izloženosti zelene salate visokoj koncentraciji fenola, može se pretpostaviti da je uključen u odbrambeni mehanizam biljke. Koncentracija prolina u korenovima salate se povećava slabijim tempom i kod sorte Nansen čak dolazi i do smanjenja njegove koncentracije poslednjih dana. Već je objavljeno da je prolin usko povezan sa adaptacijama biljaka na povećan salinitet i sušu (Hare i Cress 1997; Okuma i sar. 2000; Khedr i sar. 2003). Ouzounidou i sar (2012) pokazali su da dodavanje 10 mM prolina u industrijsku otpadnu vodu (otpadna voda sakupljena na lokalitetu Kalamata, Peloponez, Grčka) dovodi do povećanja biomase salate (*L. sativa* var. *longifolia*) od 15 do 17%. Pomenute biljke su dodatkom prolina imale i povećanu akumulaciju ugljen dioksida po jedinici otpadne vode. Takav egzogeno dodat prolin služi kao osmoprotektivni faktor koji čuva vodni balans u ćelijama i dovodi do homeostaze poboljšavajući usvajanje vode iz podloge (u ovom slučaju iz hidroponičnog rastvora). Isti autori pokazali su da je aktivnost fotosistema II smanjena kada su biljke rasle u otpadnoj vodi, dok se njegova aktivnost može povećati dodavanjem prolina u vodu. Ouzounidou i sar. (2008) radili su istraživanja na paradajzu i primetili da kod ove biljke nema povećanog usvajanja vode niti transpiracije, što dovodi do zaključka da je prolin kod zelene salate više uključen u fiziološke procese izazvane stresom. Koncentracija prolina u korenovima salate se povećava slabijim tempom, i kod sorte Nansen čak dolazi i do smanjenja njegove koncentracije poslednjih dana gajenja na početnoj koncentraciji fenola, moguće zbog odumiranja korena ili naglog smanjenja njegove metaboličke funkcije usled toksičnosti fenola, ali mnogo verovatnije zbog toga što biljci više nije potrebna sinteza prolina jer fenola u rastvoru skoro da i nema. Eraslan i sar. (2007) pokazali su da se akumulacija askorbinske kiseline i prolina povećava kada je salata izložena abiotikom stresu uzrokovanom B i NaCl-om. Kada se sumiraju svi rezultati, može se pretpostaviti da bi eventualno dodavanje prolina u hidroponični rastvor, kao i u vodu zagađenu fenolom, dovelo do pojačanog efekta prečišćavanja. Sve pomenute komponente mogu biti kandidati za uspešnu odbranu biljke od razornog dejstva fenola rastvorenog u

vodi, ali bi dalja istraživanja u tom smeru dala odgovore i rezultate o kojima se može konkretnije diskutovati.

Smanjen je sadržaj hlorofila u zelenoj salati koja je bila izložena dejstvu fenola, čak do tri puta u odnosu na kontrolne biljke. Mai i Glomb (2013) su pokazali da je povećanje procenta u pojavi braon boje listova zelene salate u direktoj vezi sa smanjenjem sadržaja hlorofila. Njihova istraživanja se slažu sa radom Castaner i sar. (1999) koji dokazuju da fotosintetička tkiva onemogućavaju i smanjuju pojavu tamnjenja listova salate. Sadržaj hlorofila smanjuje se kada su biljke izložene različitim vrstama stresa, kao što je slučaj sa crvenim biberom (Kim i sar. 2004). Singh i sar. (2004) pokazali su da je sadržaj hlorofila i karotenoida ostao nepromenjen prilikom izlaganja *Sinapis alba* teškim metalima i otpadnim vodama, dok Ouzounidou i sar. (2008) pokazuju znatan pad u količini hlorofila i karotenoida paradajza čak i na veoma niskim koncentracijama otpadnih voda. Redukovan sadržaj hlorofila, kao što je slučaj u ovoj doktorskoj disertaciji, može biti razlog za smanjenje fotosintetičke efikasnosti (Ouzounidou i sar. 2006). Aktivnost fotosistema II u listovima drastično se smanjuje kada je zelena salata izložena dejstvu otpadnih voda, čak do 49% u odnosu na kontrolne biljke (Ouzounidou i sar. 2012). Prilikom izlaganja biljaka različitim vrstama stresa, fotosinteza se slabije odvija pa je verovatno i sadržaj pigmenata manji. Ovakvo zapažanje objavili su Kim i sar. (2002) na primeru krompira. Štetni uticaj fenola na fotosintezu ogleda se u blokadi Qb mesta na D1 proteinskoj subjedinici reakcionog centra fotosistema II što se objašnjava inhibicijom elektron transportnog lanca (Trebst i sar. 1993). Antioksidativni kapacitet zelene salate zavisi kako od genotipa tako i od uslova pod kojima se gaji, a takođe je zabeleženo da varijeteti koji imaju veliki sadržaj antocijanina, imaju i veći antioksidativni kapacitet (Liu i sar. 2007). Kada se uzme u obzir da se PPO kod biljaka predominantno nalazi u tilakoidima hloroplasta i to u latentnom stanju (Chazzara i sar. 1999), logično bi bilo pretpostaviti da bi određena vrsta stresa dovela do lize plastida i njegovog ćelijskog zida i zaustavljanja sinteze hlorofila.

## 5.5. Promena koncentracije fenola u rastvoru prilikom gajenja zelene salate

Prilikom gajenja zelene salate u rastvoru fenola koncentracije  $200 \text{ mgL}^{-1}$  primećeno je da ona uklanja fenol za 6 dana gajenja ukoliko se radi o početnoj koncentraciji fenola. Kada je gajena na konstantnoj koncentraciji fenola dolazi do slabljenja potencijala biljke za uklanjanje fenola već posle 4. dana, da bi posle 8 dana gajenja potpuno izgubila mogućnost uklanjanja ove štetne supstance. Zelena salata usvaja L-DOPA iz podloge velikom brzinom i njegovo usvajanje se povećava konstantno tokom pet dana praćenja (Hachinohe i sar. 2004). Prilikom kontakta korena salate sa L-DOPA, njegov rast se zaustavlja i to na koncentraciji od  $0,1 \text{ mM}$ . Praćenjem radioaktivnog izotopa  $^{14}\text{C}$ -L-DOPA utvrđeno je da  $48,5$  odnosno  $60,0\%$   $^{14}\text{C}$  bude translocirano u koren salate tokom 3 odnosno 5 dana eksperimenta. Isti autori navode da je metabolisanje L-DOPA u korenu salate veoma sporo. Ukoliko pretpostavimo da su u metabolisanje L-DOPA uključeni PPO i POX, može se pretpostaviti da je njihova aktivnost slaba. Takahama (1997) je pokazao da je oksidacija L-DOPA u dopakinon dosta sporija u odnosu na metabolisanje ostalih fenolnih jedinjenja. Sa tim u vezi može se pretpostaviti da se metabolisanje fenola u korenu zelene salate odvija brže, jer zelena salata ne prestaje da razvija koren na koncentraciji fenola od  $200 \text{ mgL}^{-1}$ , već dolazi i do regeneracije novih korenova. Ako se pretpostavi da je već opisana povećana aktivnost PPO u korenu salate zaslužna za metabolisanje usvojenog fenola, hipoteza o metabolisanju fenola uz pomoć PPO bi mogla biti prihvatljiva. Hipoteza o eventualnoj adsorbiciji fenola na koren zelene salate bi mogla biti odbačena jer je pokazano da je koncentracija adsorbovanog fenola na koren Ljubljanske ledenke zanemarljiva u odnosu na njegovu početnu koncentraciju. Kod sorte Nansen postoji nešto veća adsorbicija fenola na koren, ali se ne može celokupno uklanjanje fenola iz rastvora objasniti na ovaj način. U revijskom radu Sinsabaugh (2010) pominje se ekstracelularno izlučivanje PPO u spoljašnju sredinu lizom ćelijskog zida. Ovaj proces dešava se kod bakterija i gljiva sa svrhom degradacije lignina u spoljašnjoj sredini i pribavljanja različitih nutrijenata. Mnoge biljne vrste imaju sposobnost izlučivanja fenolnih jedinjenja u spoljašnju sredinu i ta jedinjenja utiču na razviće drugih biljnih vrsta u njihovoj okolini (alelopatija). Pored zrelih biljaka i semena imaju ovu osobinu npr. semena duvana mogu sprečiti klijanje sopstvenih semena

izlučivanjem fenolnih inhibitora (Kefeli i Kalevitch, 2002). Ako bi fenolna jedinjenja, kao u pomenutim slučajevima mogla izaći kroz koren biljke u spoljašnju sredinu, moglo bi se pretpostaviti da bi i fenol iz rastvora u obrnutom smeru mogao ući u biljku i u biljnim tkivima biti polimerizovan delovanjem PPO ili POX. Jedinjenje u koje bi mogao biti jednim delom polimerizovan je i lignin koji se deponuje u ćelijskom zidu (pogledati deo o citološkim preparatima). Velika količina PPO je detektovana u različitim zemljištima, pa bi se moglo pretpostaviti da ne mora nužno poticati samo od mikroorganizama, već i od viših biljaka koje su možda pretrpele neku povredu. Da bi se doneli precizniji zaključci svakako bi bilo potrebno pratiti radioaktivnost eventualno usvojenog fenola u korenu salate kao i metaboličkih produkata koji nastaju njegovom degradacijom. Ukoliko se dejstvo fenola na koren posmatra kao stres izazvan povredom biljnog tkiva, može se pretpostaviti da se u biljci sintetišu određena fenolna jedinjenja kao što su: kafeična kiselina, hlorogenična kiselina izohlorogenična kiselina itd. U tkivu salate puterice zabeleženo je povećanje od 87% u korist fenolnih komponenti nakon povrede (Tomas-Barberan i sar. 1997) pa se može pretpostaviti da bi i u tkivu Ljubljanske ledenke i Nansen sorte zelene salate moglo doći do sličnog povećanja određene grupe fenolnih jedinjenja što bi i rezultiralo u povećanju aktivnosti PPO i POX. Hidrofobni molekuli teže da se adsorbuju na ćelijske zidove i taj mehanizam je veoma često ireverzibilan (Doran 2009). Ovakve supstance se na taj način koncentrišu u korenu i veoma malo translociraju u listove. Ukoliko se pretpostavi da se fenol ponaša slično pentahlorofenolu koji je hidrofoban i slabo pokretljiv molekul kada dospe u korenov sistem (Ryan i sar. 1988), može se postaviti hipoteza da on ostaje većim delom adsorbovan unutar korena.

## **5.6. Analiza moguće primene zelene salate za uklanjanje fenola iz otpadnih voda**

Na osnovu rezultata može se primetiti da zelena salata sorte Ljubljanska ledenka uklanja fenol početne koncentracije  $200 \text{ mgL}^{-1}$  za šest dana, dok sorta Nansen istu koncentraciju fenola uklanja za osam dana (Slika 16 i 19). Kada se uzme u obzir da je zelena salata u eksperimentu gajena u hidroponičnim uslovima (20 L rastvora finalne koncentracije  $200 \text{ mgL}^{-1}$  fenola) i da je gustina sadnje bila 40 biljaka na  $\text{m}^2$ , može se izračunati da svaka biljka može da preradi 500 mL vode sa finalnom koncentracijom  $200 \text{ mgL}^{-1}$  fenola za šest

dana ukoliko se radi o sorti Ljubljanska ledenka, odnosno za osam dana ako se gaji sorta Nansen. To bi značilo da 50 biljaka/m<sup>2</sup>, što predstavlja optimalnu gustinu sadnje u hidroponskim uslovima, može da prečisti 25 L vode za šest, odnosno osam dana. Prostim preračunavanjem, može se zaključiti da je hektarom zasada zelene salate moguće ukloniti fenol iz 250 t vode zagađene fenolom koncentracije 200 mgL<sup>-1</sup> za šest, odnosno osam dana zavisno od sorte.

### **5.7. Anatomska istraživanja korena zelene salate gajene na početnoj koncentraciji fenola**

Ćelije korena su verovatno prve pogođene toksičnim uticajem fenola. Ouzounidou i sar. (2012) primetili su drastičan uticaj otpadnih voda na mehaničke karakteristike korenovog sistema zelene salate koje se prvenstveno ogledaju u promenama mehaničkog tipa koje pogađaju ćelijski zid. Takve mehaničke promene vidljive su u izduživanju korena i smatra se da imaju ulogu u inhibiciji rasta korena koja bi bila izazvana nekom vrstom stresa. Ukoliko se visoka koncentracija fenola u rastvoru, kojem je bila izložena zelena salata, posmatra kao toksična doza koja dovodi do povreda biljnog tkiva (prvenstveno ćelijskog zida i parenhima) može se pretpostaviti da se aktivnost još nekih enzima povećava usled novonastale povrede. Među te enzime spada fenil alanin amonijum liaza, PPO i POX. Vidljiva promena u strukturi biljnog tkiva izazvana povredom je sinteza povećane količine lignina, u kojoj između ostalog učestvuju POX (Tomas-Barberan i sar. 1997). Na citološkim preparatima zelene salate može se primetiti zadebljali zid centralnog cilindra korena i to na novonastalim korenovima obe ispitivane sorte. Takođe se primećuje zatamnjenje ćelija spoljašnjeg zida korena kod novih korenova regenerisanih gajenjem salate na fenolu. Ove morfološke promene mogu se tumačiti kao povećana akumulacija lignina u zidu korena koji je inače i glavni produkt polimerizacije fenolnih jedinjenja kod biljaka (Kefeli i sar. 2003). Pojačana aktivnost POX u korenu zelene salate, u odnosu na list, može se povezati sa ulogom POX u odbrani biljaka od abiotičkog stresa. Jedna od tih uloga je i izgradnja čvrstog ćelijskog zida, pored već dobro poznate uloge u eliminaciji ROS (Dorantes i Zúñiga 2012). Pored deponovanja fenolnih polimera u sekundarnom ćelijskom zidu, on se može skladištiti i u vakuoli biljnih ćelija i to u veoma velikim

količinama (Lewis i Yamamoto, 1990). Kefeli i sar. (2003) navode da se biljni fenoli sintetišu u plastidima biljaka i to pojačano pri jačem osvetljenju i da se zatim polimerišu jednim delom u lignin. Da li pojačana boja korena ćelijskog zida zelene salate potiče od lignina koji je nastao polimerizacijom usvojenog fenola, ne može se pozdano reći bez daljeg istraživanja, ali je svakako jedna hipoteza koju treba proveriti u budućnosti. Prilikom usvajanja toksičnih supstanci iz okruženja, one se mogu distribuirati u delove tkiva iz kojih se mogu izolovati („extractable“) i dalje translocirati u druge delove biljke, ili u delove biljke iz kojih se dalje ne mogu izolovati („nonextractable“) niti translocirati u gornje delove biljke (Sandermann 2004). U pomenutim delovima tkiva iz kojih se dalje ne mogu ekstrahovati, ovakve supstance se konvertuju u komponente ćelijskog zida kao što su: lignin, celuloza, hemiceluloza i pektin i tu ostaju kao sastavni deo biljke. Već pomenuta hipoteza o adsorbiciji fenola na koren biljke, donekle se može potvrditi kod sorte Nansen ukoliko se posmatraju poprečni preseki. Naime, na citološkim preparatima se može primetiti pojačana destrukcija parenhimskog tkiva i ćelijskog zida, što može poticati od veće adsorbicije fenola na koren ove sorte nego na koren Ljubljanske ledenke. Povreda biljnog tkiva takođe može dovesti do povećane aktivnosti IAA oksidaze koja utiče na usporen ili potpuno obustavljen rast korena. Sa druge strane H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimuliše pojavu novih gravitropnih korenova (Joo i sar. 2001), a može se pretpostaviti da se njegova količina povećava kada je biljka izložena fenolu. Na citološkim preparatima može se videti da je kod korenova koji su prvobitno stavljeni u fenol došlo do zaustavljanja rasta i promene morfologije tkiva, ali se takođe može videti i regeneracija novih korenova drugačije morfologije. Novi korenovi bi mogli nastati ukoliko je ponovo uspostavljena normalna aktivnost IAA oksidaze, što se verovatno i dešava posle aktiviranja antioksidativne zaštite i mehanizama kojima se uklanjaju štetne posledice povrede.

### **5.8. Transformacija korenova zelene salate uz pomoć *A. rhizogenes*, uklanjanje fenola uz pomoć *hairy roots* i analiza antioksidativnih enzima i PPO iz rastvora**

Kultura korenova je veoma pogodan sistem za fitoremedijaciju otpadnih voda, ali i za intenzivno proučavanje načina pomoću koga se ovaj proces odvija (Suza i sar. 2008), zbog velike produkcije biomase, proizvodnje enzima koji se izlučuju u spoljašnju sredinu (kao

što su peroksidaze) i mogućnosti da se neutrališu organski i neorganski zagađivači (Angelini i sar. 2011). Pomenute osobine kulture korenova bile su polazna osnova za transformaciju korenova zelene salate (Tadić i sar. 2014), a dobijeni hairy roots koji će biti podvrgnuti inhibitornim koncentracijama fenola u cilju određivanja njihovog potencijala za fitoremedijaciju voda.

Korenovi se pojavljuju na kotiledonim listovima 10 dana nakon inokulacije sa *A. rhizogenes* A4M70GUS i to na obe sorte zelene salate. Procenat eksplantata na kojima su regenerisani korenovi bio je veoma visok i to 96,7% za Nansen i 91,2% za Ljubljansku ledenku. Tako visok procenat regeneracije sa *A. rhizogenes* A4M70GUS opisan je ranije kod Sretenović-Raičić i sar. (2006) i Milošević i sar. (2009). Efekat regulatora rastenja na regeneraciju zelene salate još uvek nije u potpunosti ispitan, tako da i ne postoji opšti i efikasan protokol za transformaciju salate (Lim i sar. 2011). Efikasnost transformacije sa *A. rhizogenes* zavisi od tipa eksplantata (stablo, list, hipokotil, kotiledon, koren...) kao i od soja *A. rhizogenes* koji različito reaguje sa biljnim tkivima (Krolicka i sar. 2001; Azlan i sar. 2002). Pokazano je da kotiledoni listovi zelene salate, stari 7 dana, predstavljaju adekvatan izbor eksplantata. Morfološke razlike korenova primećene su među sortama salate, ali i između različitih linija iste sorte. Slična zapažanja zabeležena su kod *Gentiana lutea* (Sretenović-Raičić i sar. 2006) i *Impatiens hawkerii* (Milošević i sar. 2009).

Povrede biljnog tkiva su ključne za uspešnu transformaciju pomoću bakterija iz roda *Agrobacterium*, jer omogućavaju lakši ulaz bakterija u biljno tkivo (Gelvin, 2000), što je pokazano i na primeru kotiledonarnih listova zelene salate. Sa obzirom na to da je zelena salata veoma uspešno transformisana sa *A. rhizogenes*, postoji velika šansa da se nastavi dalja transformacija uvođenjem različitih gena koji bi doprineli poboljšanju fitoremedijacije.

Razlike u prirastu biomase između sedam linija transformisanih korenova primećene su posle 35 dana gajenja *in vitro*. Transformisani korenovi zelene salate gajeni su na hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja i postizali su veliko povećanje biomase. Najveći prirast mase zapažen je kod linije Ljubljanska ledenka 18 i bio je 5,5 puta veći od kontrolnih

korenova. Korenovi *Brassica napus* takođe imaju veliki prirast biomase u hranljivoj podlozi bez regulatora rasteња (Angelini i sar. 2011). Ova osobina, brzog rasteња u tečnim podlogama bez dodavanja stimulatornih jedinjenja, a sa velikom kontaktnom površinom između tkiva korena i kontaminirajuće supstance, čine ovaj sistem jeftinijim i pouzdanijim za fitoremedijaciju (Suza i sar. 2008). Zbog izuzetno velikog prirasta biomase linija Ljubljanska ledenka 18, je izdvojena za dalja proučavanja koja uključuju ispitivanja vezana za uklanjanje fenola iz vode. Za razliku od pomenute linije sa najvećim prirastom biomase i veoma intenzivnim grananjem, Nansen 12 ima najmanji prirast mase i smanjeno grananje. Fiziološke i morfološke razlike ove dve linije mogu poticati od *rol* gena, jer Nansen 12 sadrži samo jedan ovaj gen (*rolC*), dok Ljubljanska ledenka 18 ima tri *rol* gena (*rolA*, *rolB*, *rolC*). Bulgakov (2008) je naveo da indukcija korenova i njihov rast itekako zavise od sinergističkog delovanja *rol* gena. *Rol* geni takođe mogu uticati na biosintezu regulatora rasteња biljaka, a mogu povećati i osetljivost biljaka na njih (Binns and Constantino, 1998). Transformisani korenovi duvana mogu ukoniti fenol iz vode u koncentracijama od 100 do 800 mgL<sup>-1</sup> (Sosa-Alderete, 2012), dok korenovi *Brassica napus* uklanjaju fenol koncentracija preko 500 mgL<sup>-1</sup> u prisustvu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tokom 1 h i u opsegu pH od 4 do 9 (Coniglio i sar. 2008). Hairy roots pomenute *B. napus* razgrađuju toksični pesticid 2,4-dihlorofenol (2,4-DCP) prevodeći ga najverovatnije u polimerizovana neutralna jedinjenja radom POX (Agostini i sar. 2003).

Već je rečeno da transformisani korenovi zelene salate imaju veći prirast biomase od netransformisanih. Prirast mase transformisanih korenova linija Nansen i Ljubljanske ledenke se kretao od 3,33 do 16,87 puta više u odnosu na početnu svežu masu, dok je za netransformisane korenove, koji su rasli sporije, ovaj odnos iznosio između 1,85 i 3,07 puta. Tako ubrzan rast transformisanih korenova zabeležen je još kod Stojakowska i sar. (2012) i prirast mase iznosio je 15,8. Transformisani korenovi *I. hawkerii* imali su biomasu čak 26 puta veću od mase kontrolnih korenova u tečnoj MS hranljivoj podlozi (Milošević i sar. 2009), ali je daleko najveći prirast mase zabeležen kod *Scutellaria baicalensis* i iznosio je 37 puta (Tiwari i sar. 2008). Nije isključeno da bi optimizacija sastava hranljive podloge imala uticaj na dalje povećanje prirasta biomase transformisanih korenova. Poznato je da



regulatori rastenja (Ono i Tian 2011) kao i povećana koncentracija saharoze u hranljivoj podlozi (Wu i Shi 2008) mogu uticati na povećanje biomase transformisanih korenova.

Za svih 15 hairy roots linija, PCR reakcijom je potvrđeno prisustvo *uidA* fragmenta (sedam linija Nansen i osam linija Ljubljanske ledenke). Prisustvo *rolA* gena potvrđeno je kod pet linija Nansen i šest linija Ljubljanske ledenke, *rolB* je konstatovan kod dve linije Nansen i šest linija Ljubljanske ledenke i *rolC* je potvrđen kod četiri linije Nansen i sedam linija Ljubljanske ledenke. Ovako različiti rezultati i karakteristike linija mogu biti prisutne zbog varijacija u T-DNK inserciji odnosno u broju kopija i lokaciji Ri gena integrisanih u biljni genom (Doran, 2002) jer bi idealna transformacija podrazumevala jednu kopiju transgena koji bi bio integrisan, sa uniformnom ekspresijom iz generacije u generaciju. Različita ekspresija gena u kulturi korenova može biti rezultat balansa auksina i citokinina u biljci ili osetljivosti biljke na ove hormone koja je karakteristična za svaki genotip (Shen i sar. 1988). Da bi se iznosile ozbiljnije tvrdnje trebalo bi raditi istraživanja o broju kopija *rol* i *aux* gena kod zelene salate i njihovog uticaja na morfologiju dobijenih linija. Ekspresija ovih gena veoma verovatno ima veze sa balansom hormona, kao što je već rečeno, delom i zbog toga što je regeneracija biljaka iz kulture korenova moguća i na hranljivoj podlozi bez regulatora rastenja, dok kod zelene salate to nije slučaj. Tokom regeneracije izdanaka veoma veliku ulogu imaju regulatori rastenja dodati u hranljivu podlogu i sposobnost zelene salate za regeneraciju zavisi od njihovog odnosa i kombinacije, prvenstveno odnosa auksina i citokinina (Stojakowska i sar. 2012).

Pokazano je da transformisani korenovi sorte Ljubljanska ledenka mogu ukloniti fenol iz rastvora početne koncentracije  $75 \text{ mgL}^{-1}$ , dok netransformisani korenovi, u istom eksperimentu, mogu ukloniti fenol do koncentracije od  $50 \text{ mgL}^{-1}$ . Takođe, transformisani korenovi uklanjaju fenol iz rastvora početne koncentracije od  $100 \text{ mgL}^{-1}$  u roku od deset dana, a tek na koncentraciji od  $125 \text{ mgL}^{-1}$  dolazi do nemogućnosti ukaljanja. Kada se uzme u obzir da odrasla zelena salata u hidroponičnim uslovima, može da ukloni fenol koncentracije  $200 \text{ mgL}^{-1}$ , a transformisani korenovi  $100 \text{ mgL}^{-1}$ , može se pretpostaviti da listovi i celokupna masa biljke igraju važnu ulogu. Već je pokazano da je usvajanje teških metala preko kulture korenova redukovano u odnosu na usvajanje preko korena cele biljke

(Nedelkoska i Doran 2001), a takvo uvećano usvajanje teških metala u slučaju cele biljke dešava se zbog procesa transpiracije. Manje koncentracije fenola početne koncentracije ( $25 \text{ mgL}^{-1}$ ) korenovi zelene salate mogu ukloniti za četiri dana, dok više koncentracije ( $100 \text{ mgL}^{-1}$ ) uklanjaju za deset dana u potpunosti. Ovaj rezultat je dosta slabiji od rezultata dobijenog sa transformisanim korenovima duvana koji uklanjaju fenol koncentracije čak  $600 \text{ mgL}^{-1}$  za jedan dan (Sosa-Alderete 2012). Netransformisani korenovi slabije uklanjaju fenol iz rastvora verovatno samo zbog toga što imaju manji prinos biomase pa samim tim i proizvode manje količine enzima kojima bi fenol bio uklonjen ili usvojen. Takođe se zna da transformisani korenovi mogu sintetisati određene metabolite koji se ne mogu detektovati u kulturi netransformisanih korenova (Hu i Du 2006), pa je moguće da i potencijalna, još uvek ne determinisana jedinjenja, učestvuju u procesu neutralisanja fenola iz rastvora. Primećeno je da je koncentracija fenola u rastvoru brže i bolje uklonjena ako se kulture korenova gaje u teglama umesto u erlenmajerima (rezultati nisu prikazani) što se najverovatnije dešava zbog toga što je aeracija u teglama drugačija nego u erlenmajerima. Nedostatak kiseonika, je generalni problem koji se dešava u kulturi korenova (Hu i Du 2006). Sosa Alderete i sar. (2012) pokazali su da dodavanje  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $5 \text{ mM}$ ) u rastvor sa fenolom može pospešiti uklanjanje fenola od strane kulture korenova duvana. Uklanjanje fenola kod pomenutih korenova duvana bilo je smanjeno 50% na koncentraciji fenola od čak  $800 \text{ mgL}^{-1}$ .  $\text{H}_2\text{O}_2$  je kosupstrat za POX pa bi njegovo dodavanje u rastvor moglo pojačati aktivnost ovog enzima koji je svakako uključen u eliminaciju fenola. Koncentracija  $\text{H}_2\text{O}_2$  može biti optimizovana za svaki proučavani sistem za fitoremedijaciju da bi se dobilo što efikasnije uklanjanje fenola (Coniglio i sar. 2008). Aktivnost POX kod transformisanih korenova zelene salate raste sa vremenom na oba ispitivana tretmana i smanjuje se desetog dana, dok kod netransformisanih korenova dolazi do smanjenja enzimske aktivnosti. Ukoliko pretpostavimo da je koncentracija  $\text{H}_2\text{O}_2$  na početku tretmana niska, onda je povećana aktivnost POX i očekivana. Kako raste koncentracija  $\text{H}_2\text{O}_2$  sa vremenom, naročito prilikom gajenja na konstantnoj koncentraciji fenola, opada i aktivnost enzima. Smanjenje aktivnosti POX dodavanjem većih količina  $\text{H}_2\text{O}_2$  primećen je i kod Bodalo i sar. (2008) koji su posmatrali uklanjanje fenola peroksidazom rena i sojinom POX. Istraživanja u vezi inaktivacije POX većom koncentracijom supstrata često su rađena

na kulturama korenova i baš u ovim eksperimentima je pokazano da koncentracija  $H_2O_2$  utiče na aktivnost POX. Sa inhibitornom koncentracijom  $H_2O_2$  formira se katalitički neaktivna forma POX, verdohemoprotein (P-670) i nisko-reaktivno jedinjenje peroksi-anjon (III) porfirin radikal (Nazari i sar. 2007; Puiu i sar. 2008). Ova jedinjenja ne dovode do konačne aktivacije POX i one se mogu spontano vratiti u aktivno stanje, ali je uspostavljanje ponovne aktivacije veoma spor proces i neretko dovodi do smanjenja aktivnosti POX (Hong-Mei i Nicell 2008). U hidroponičnom rastvoru u kojima su gajeni korenovi zelene salate, moguće je da je došlo do ovakve inaktivacije enzima visokom koncentracijom  $H_2O_2$ , pa je aktivnost POX rezultirala u niskim vrednostima. U sistemima koji se koriste za uklanjanje štetnih supstanci iz vode, mora se voditi računa o koncentraciji vodonik-peroksida, da ona ne bi bila previsoka (Sosa-Alderete i sar. 2012). I pored moguće inaktivacije POX iz korenova supstratom ( $H_2O_2$  ili fenol), proces proizvodnje i prečišćavanja enzima je veoma skup i dovodi do još veće šanse za inaktivaciju tako dobijenog enzima (Gomez i sar. 2008). Stoga, korišćenje transformisanih korenova u cilju fitoremedijacije poseduje mnoge prednosti.

Do sada je pokazano da mnoge biljne vrste u hidroponičnim uslovima usvajaju velike količine teških metala i zadržavaju ih u stablima i listovima. Koncentracije određenih teških metala se kreću:  $10000 \mu\text{gg}^{-1}$  za Zn;  $1000 \mu\text{gg}^{-1}$  za Ni, Co, Cr, Cu ili Pb;  $100 \mu\text{gg}^{-1}$  za As i Cd (Prasad i sar. 2003; Turgut i sar. 2004). Boominathan i Doran (2003) pokazali su da je aktivnost CAT povećana prilikom hiperakumulacije Cd u transformisanim korenovima *Thlaspi caerulescens*. Ovaj rezultat je u skladu sa rezultatima u ovoj tezi, gde dolazi do velikog povećanja aktivnosti CAT i u transformisanim i u netransformisanim korenovima zelene salate izložene dejstvu fenola u vodi. Pored mehanizama uklanjanja fenola, koji su izučavani u ovoj disertaciji, pokazano je da ćelije *hairy roots* šargarepe, *Solanum aviculare* i slatkog krompira mogu da inkorporiraju fenolna jedinjenja uz pomoć polarnih ćelijskih komponenti, kao što su šećeri i proteini, podjednako dobro kao i uz pomoć ćelijskih zidova i membrana (de Araujo i sar. 2006). Pokazano je da transformisani korenovi zelene salate ne adsorbuju značajnu količinu fenola na površini korena (rezultati nisu prikazani), pa

ostaje još eventualna mogućnost usvajanja fenola uz pomoć transformisanih korenova zelene salate pomoću pomenutih šećera i proteina.

*Hairy roots*, tokom rastenja, mogu sintetisati i izlučivati različita fenolna jedinjenja u okolnu sredinu (Li i sar. 1998). U tečnoj hranljivoj podlozi sa fenolom u kojoj su gajeni korenovi zelene salate, primećuje se da posle deset dana dolazi do potpunog uklanjanja fenola koncentracije  $100 \text{ mgL}^{-1}$ , kao i nižih koncentracija fenola za kraće vreme, dakle, nije konstatovano prisustvo fenola u rastvoru. Korenovi zelene salate ne proizvode velike količine fenolnih jedinjenja dok se u okolnom rastvoru nalazi visoka koncentracija fenola. Ako bi se merila koncentracija fenola posle njegovog uklanjanja iz hranljive podloge, možda bi bila izmerena određena koncentracija novosintetisanih fenolnih jedinjenja iz *hairy roots*. Stojakowska i sar. (2012) izdvojili su fenolna jedinjenja 3,5-DCQA i hidrocinaamat iz kulture korenova zelene salate. Ova jedinjenja inhibiraju lipidnu peroksidaciju i hemolizu i veoma dobro uklanjaju slobodne radikale (Kim i Lee 2005; Park i sar. 2009), tako da predstavljaju neenzimsku komponentu antioksidativne zaštite, pored enzima koji učestvuju u polimerizaciji fenola. Istraživanja koja bi bila rađena na *hairy roots* zelene salate mogu dati veoma korisne informacije o eventualnoj akumulaciji ili biotransformaciji fenola iz otpadnih voda, jer je poznato da je kultura korenova pogodan sistem za izučavanje pomenutih događaja jer je potpuno isključena mogućnost translokacije u gornje delove biljke (Doran 2009). Sa druge strane, rezultati *in vitro* eksperimenata zavise i od sastava hranljive podloge i uslova pod kojima se biljke gaje, pa se rezultati dobijeni na ovaj način ne mogu uzimati kao potpuno relevantni i primenjivi na biljke koje se gaje u prirodi. Proces transpiracije, koji je konstantno zastupljen u celim biljkama, ne postoji u kulturi korenova, pa se njegov uticaj, ne može zanemariti kada se radi o translokaciji štetnih supstanci i njihovih polimera (Paterson i sar. 1990). Rezultati objavljeni u ovoj tezi, rađeni na celim biljkama u hidroponičnim uslovima, kao i u kulturi korenova, objedinjuju diskusiju o fitoremedijaciji zelenom salatam.

Transformisani korenovi zelene salate, linija Ljubljanske ledenke 18, mogu biti potencijalni sistem za fitoremedijaciju otpadnih voda koje su zagađene fenolom. Mnoge biljne vrste kod kojih je uspostavljena kultura korenova do sada su korišćene u te svrhe (Veena i Taylor,

2007; Guillon i sar. 2006). Ako se uzme u obzir da i korenovi zelene salate mogu da usvajaju ili polimerišu određenu toksičnu koncentraciju fenola, mogu biti iskorišćeni za proces fitoremedijacije voda. Dalja istraživanja bi pokazala da li se fenol u korenovima zelene salate akumulira ili polimeriše. Takođe, buduća istraživanja biće usmerena ka gajenju *hairy roots* u hidroponičnom sistemu i njihovoj mogućnosti za uklanjanje fenola iz takvog okruženja. Zajedno sa već dobijenim pozitivnim rezultatima i činjenicom da je metod hidroponičnog gajenja biljaka mnogo isplativiji od konvencionalnog načina fitoremedijacije, transformisani korenovi mogu biti odličan kandidat za proces prečišćavanja otpadnih voda.

### **5.9. Analiza moguće primene transformisanih korenova za uklanjanje fenola iz otpadnih voda**

Na osnovu rezultata, slično prethodnoj analizi primene zelene salate za uklanjanje fenola iz otpadnih voda, može se zaključiti da transformisani korenovi sorte Ljubljanska ledenka, linija LJL 18, uklanjaju fenol početne koncentracije  $100 \text{ mgL}^{-1}$  za deset dana (Slika 56). Ukoliko se ovi korenovi gaje na konstantnoj koncentraciji fenola iste koncentracije, mogu se gajiti deset dana na koncentraciji od  $25 \text{ mgL}^{-1}$  (Slika 57) i tada smanjuju koncentraciju fenola za  $21 - 18 \text{ mgL}^{-1}$  tokom svakog dana gajenja. Kada se u račun uvrsti činjenica da je 1 g transformisanih korenova gajeno na 30 mL tečne hranljive podloge i da je u tim uslovima fenol iz rastvora koncentracije  $100 \text{ mgL}^{-1}$  uklonjen za deset dana, može se izračunati da bi 33,3 kg transformisanih korenova LJL 18 bilo dovoljno za prečišćevanje 1 t zagađene vode.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Tokom gajenja semena različitih sorti zelene salate *in vitro*, nije došlo do formiranja morfološki zadovoljavajućih biljaka
2. Tokom klijanja semena zelene salate na različitim koncentracijama fenola, pokazano je da sorte Ljubljanska ledenka i Nansen kličaju na najvišim primenjenim koncentracijama od 350 odnosno 300 mgL<sup>-1</sup>. Inhibitorna koncentracija fenola za ove dve sorte na kojoj klija 50% semena iznosi za sortu Ljubljanska ledenka 300 mgL<sup>-1</sup>, a za sortu Nansen 250 mgL<sup>-1</sup>.
3. Zabeležena je povećana aktivnost CAT prilikom klijanja semena različitih sorti zelene salate (Ljubljanska ledenka, Nansen, Little Gem i Majska kraljica) na inhibitornim koncentracijama fenola, u odnosu na druge ispitivane enzime (POX i PPO).
4. Aktivnost POX je bila niska tokom klijanja četiri sorte zelene salate (Ljubljanska ledenka, Nansen, Little Gem i Majska kraljica) na inhibitornoj koncentraciji fenola, određenoj za svaku sortu pojedinačno, tokom osam dana klijanja.
5. Primećena je drastično veća aktivnost PPO ukoliko je kao supstrat za određivanje njene aktivnosti korišćen 4-metil-katehol, umesto L-DOPA.
6. Zelena salata sorte Ljubljanska ledenka uklanja fenol početne koncentracije 200 mgL<sup>-1</sup> iz rastvora posle šest dana gajenja. Prilikom gajenja ove sorte na konstantnoj koncentraciji fenola od 200 mgL<sup>-1</sup> dolazi do opadanja mogućnosti za uklanjanjem fenola posle šest dana gajenja.
7. Zelena salata sorte Nansen uklanja fenol početne koncentracije 200 mgL<sup>-1</sup> iz rastvora posle osam dana gajenja, a efekat uklanjanja fenola konstantne koncentracije je slabiji nego kod Ljubljanske ledenke.
8. Obe ispitivane sorte potpuno uklanjaju fenol početne koncentracije 200 mgL<sup>-1</sup> iz rastvora posle deset dana gajenja, dok konstantnu koncentraciju fenola od 200 mgL<sup>-1</sup> tokom istog vremena gajenja ne mogu eliminisati.
9. Aktivnost POX opada prilikom gajenja sorti zelene salate Ljubljanska ledenka i Nansen u rastvoru fenola i početne i konstantne koncentracije od 200 mgL<sup>-1</sup>, merene

i u korenu i u listovima, dok aktivnost CAT, PPO i SOD raste u odnosu na kontrolne biljke. Aktivnost CAT i SOD se povećava tokom vremena i dostiže maksimalnu vrednost pred kraj tretmana, dok aktivnost PPO pred sam kraj tretmana opada.

10. Koncentracija prolina konstantno raste kod obe ispitivane sorte zelene salate tokom gajenja na početnoj i konstantnoj koncentraciji fenola od  $200 \text{ mgL}^{-1}$ .
11. Primećena je morfološka razlika korenova zelene salate koji su regenerisani u rastvoru fenola početne koncentracije  $200 \text{ mgL}^{-1}$  u odnosu na stare korenove.
12. Zelena salata je uspešno transformisana sa *Agrobacterium rhizogenes* A4M70GUS i uspostavljena je kultura *hairy roots*. Najveći prinos biomase korenova primećen je kod linije LjL 18.
13. Transformisani korenovi sorte Ljubljanska ledenka uklanjaju u potpunosti fenol početne koncentracije  $100 \text{ mgL}^{-1}$  iz rastvora.
14. Primećen je porast aktivnosti svih analiziranih enzima (CAT, PPO i SOD) osim PPO prilikom gajenja transformisanih korenova zelene salate sorte Ljubljanska ledenka i na početnoj i na konstantnoj koncentraciji fenola od  $50 \text{ mgL}^{-1}$ .

## 7. LITERATURA

Aebi H (1984) Catalase *in vitro*. Methods in Enzymology 105, 121-126.

Abassi NA, Kushad MM (1998) Active oxygen-scavenging enzymes activities in developing apple flowers and fruits. Scientia Horticulturae 74, 183-194.

Akcay M (2004) Characterization and Determination of The Thermodynamic and Kinetic Properties of P-cp Adsorption onto Organophilic Bentonite from Aqueous Solution. Journal of Colloid and Interface Science 280, 299-304.

Agostini E, Coniglio MS, Milrad SR, Tigier HA, Guilietti AM (2003) Phytoremediation of 2,4-dichlorophenol by *Brassica napus* hairy roots cultures. Biotechnology and Applied Biochemistry 37, 139-144.

Ahmed BM, Akhter MS, Hossain M, Islam R, Choundhury TA, Hannan MM, Razvy MA, Ahmad I. An efficient *Agrobacterium*-mediated genetic transformation method of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with an aphidicidal gene, Pta (*Pinellia ternate Agglutinin*). Middle East Journal of Science Research 2, 155-160.

Alscher RG, Erturk N, Heath LS (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. Journal of Experimental Botany 53, 1331-1341.

Allen RD (1995) Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. Plant Physiology 107, 1049-1054.

Alexander L, Grierson D (2002) Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. Journal of Experimental Botany 53, 2039-2055.

Angelini VA, Orejas J, Medina MI, Agostini E (2011) Scale up of 2,4-dichlorophenol removal from aqueous solution using *Brassica napus* hairy roots. Journal of Hazardous Materials 85, 269-274.



Aniszewski T, Lieberei R, Gulewicz K (2008) Research on Catecholase, Laccase and Cresolase in Plants. recent progress and Future Needs. *Acta Biologica Cracoviensia* 50, 7-18.

Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55, 373-399.

Asada K, Kanematsu S, Okaka S, Hayakawa T (1980) Chemical and biochemical aspects of superoxide and superoxide dismutase. Bannister, J.V. and Hill, A.O. (eds.) Elsevier/North-Holland, New York, 136.

Atwell RJ, Thomson CJ, Greenway H, Ward G, Waters I (1985) A study of the impaired growth of roots of *Zea mays* seedlings at low oxygen concentrations. *Plant Cell and Environment* 8, 179-188.

Auh CK, Scandalios JG (1997) Spatial and temporal responses of the maize catalases to low temperature. *Physiologia Plantarum* 101, 149-156.

Azian GJ, Marziah M, Radzali M, Johari R (2002) Establishment of *Physalis minima* hairy roots culture for the production of physalins. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 69, 271-278.

Bailly C, Leymarie J, Lehner A, Rousseau S, Come D, Corbineau F (2004) Catalase activity and expression in developing sunflower seeds as related to drying. *Journal of Experimental Botany* 55, 475-483.

Bais HP, Prithiviraj B, Jha AK, Ausubel FM, Vivanco (2005) Allelopathy and exotic plant invasion: From molecules and genes to species interaction. *Science* 301, 1377-1380.

Baker NR (1991) A possible role for photosystem II in environmental perturbation of photosynthesis. *Physiologia Plantarum* 81, 563-570.

Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G (1987) Aspects of the structure, function and application of superoxide dismutase. *Critical Review of Biochemistry* 22, 111-118.

Baron C, Zambryski PC (1995) Notes from the underground: highlights from plant-microbe interactions. *Biotechnology*. Elsevier Sciences Ltd. 13, 356–362.

Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39, 205-207.

Behbahani I, Miller SA, O’Keeffe DH (1993) A comparison of mushroom tyrosinase dopaquinone and dopachrome assays using diode-array spectrophotometry: dopachrome formation vs ascorbate - linked dopaquinone reduction. *Microchemical Journal* 47, 251 – 260.

Benzarti S, Mohri S, Ono Y (2008) Plant Response to heavy metal toxicity: Comparative Study Between the Hyperaccumulator *Thalpi caerulescens* (Ecotype Ganges) and Nonaccumulator Plants: Lettuce, Radish, and Alfalfa. *Environmental Toxicology* 23, 607-615.

Bestwick CS, Brown IR, Mansfield JW (1998) Localized changes in peroxidase activity accompany hydrogen peroxide generation during the development of nonhost hypersensitive reaction in lettuce. *Plant Physiol* 118, 1067-1087.

Beyer WF, Fridowich I (1987) Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. *Annals of Biochemistry* 161, 559-556.

Binns AN, Constantino P (1998) *The Agrobacterium oncogenes*, Rhizobiaceae, Kluwer Press, Holland, Dodrecht, 251-266.

Blokhina O, Virolainen E, Fagersted KV (2003) Antioxidants, Oxidative damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Annals of Botany* 91, 179-194.

Boo Ho, Heo BG, Gorinstein S, Chon Su (2011) Positive effects of temperature and growth condition on enzymatic and antioxidant status in lettuce plants. *Plant Science* 181, 479-484.

Boominathan R, Doran PM (2003a) Organic complexation, heavy metal distribution and effect of ATPase inhibition in hairy roots of hyperaccumulation plant species. *Journal of Biotechnology* 101, 131-146.

Boominathan R, Doran PM (2003b) Cadmium tolerance and antioxidative defences in hairy roots on the cadmium hyperaccumulator, *Thalpi caeulescens*. *Biotechnology and Bioengineering* 83, 158-167.

Boominathan R, Saha-Chaudhury NM, Sahajwalla V, Doran PM (2004) Production of nickel bio-ore from hyperaccumulator plant biomass: application in phytomining. *Biotechnology and Bioengineering* 86, 243-250.

Bowler C, Van Montagu M, Inzé D (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Physiology and Plant Molecular Biology* 43, 83-116.

Bowler C, Van Camp W, Van Montagu M, Inzé D (1994) Superoxide dismutases in plants. *Critical Reviews in Plant Science* 13, 199-218.

Bradford MM (1976) A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins using the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

Brazier-Hicks M, Edwards LA, Edwards R (2007) Selection of plants for roles in phytoremediation: The importance of glycolisation. *Plant Biotechnology Journal* 5, 627-635.

Bremer K, Anderberg AA, Karis PO, Norden--Stam B, Lundberg J, Ryding O (1994) *Asteraceae: Cladistics and Classification*. Portland, Oregon, Timber Press.

Bulgakov VP (2008) Function of rol genes in plant secondary metabolism. *Biotechnology Advance* 26, 318-324.

Buettner GR (1993) The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation,  $\alpha$ -tocopherol, and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 300, 535-543.

Burdon RH (1993) Stress proteins in plants. *Botanical Journal of Scotland* 46, 463-475.

Busca G, Berardinelli S, Resini C, Arrighi L (2008) Technologies for the removal of phenol from fluid streams: A short review of recent developments. *Journal of Hazardous Material* 160, 265-288.

Caldwell CR (2003) Alkylperoxyl radical scavenging of red leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.) phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 4589-4595.

Castaner M, Gil MI, Ruiz M, Artes F (1999) Browning susceptibility of minimally processed baby and romaine lettuces. *European Food Research and Technology* 209, 52-56.

Cassels AC, Curry RF (2001) Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 64, 145-157.

Chandler S, Lu CY (2005): Biotechnology in ornamental horticulture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology, ProQuest Agriculture Journals* 41, 591-601.

Chaudhry Q, Blom-Zandstra M, Gupta S, Joner EJ (2005) Utilising the synergy between plants and rhizosphere microorganism to enhance breakdown of organic pollutants in the environment. *Environmental Science and Pollution Research* 12, 34-48.

Chazarra S, Cabanes J, Escribano J, Garcia-Carmona F (1996) Partial purification and characterization of latent polyphenol Oxidase in iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 984-988.

Chazarra S, Garcia-Carmona F, Cabanes J (1999) Characterization of monophenolase activity of polyphenol oxidase from iceberg lettuce. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 1422-1426.

Chiong T, Lau SY, Khor EH, Danquah MK (2014) Enzymatic approach to phenol removal from wastewater using peroxidases. *OA Biotechnology* 3, 9-14.

Christey MC (2001) Use of Ri-mediated transformation for production of transgenic plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 37, 687-700.

Chun C, Takakura T (1994) Rate of root respiration of lettuce under various dissolved oxygen concentrations in hydroponics. *Environmental Control in Biology* 32, 125-135.

Chutichudet B, Chutichudet P, Kaewsit S (2011) Influence of developmental stage on activities of polyphenol oxidase, internal characteristics and colour of lettuce cv. Grand Rapids. *American Journal of food Technology* 6, 215-225.

Citovsky V, Koylivsky SV, Lacroix B, Zaltsman A, Dafny-Yelin M, Vyas S, Tovkach A, Tzfira T (2007) Biological systems of the host cell involved in *Agrobacterium* infection. *Cellular Microbiology* 9, 9-20.

Collier GF, Huntigton VC (1983) The relationship between leaf growth, calcium accumulation and distribution and development in field-grown butterhead lettuce. *Scientia Horticulturae* 21, 123-128.

Coniglio M, Busto VD, Gonzales PS, Medina MI, Milrad S, Agostini E (2008) Application of *Brassica napus* hairy root cultures for phenol removal from aqueous solution. *Chemosphere* 72, 1035-1042.

Contrerasa S, Rodriguez M, Al Momania F, Sansa C, Esplugasa S (2003) *Water Research* 37, 3164-3171.

Constabel CP, Bergey DR, Rayan CA (1996) Polyphenol oxides as a component of the inducible defence response in tomato against herbivores. In: *In Phytochemical Diversity and Redundancy in Ecological Interaction*, (ed.) Romeo JT, Saunders JA, Barbosa P, New York, Plenum Press pp: 231-252.

Constabel CP, Ryan CA (1998) A survey of wound-and methyl jasmonate-induced leaf polyphenol oxidase in crop plant. *Phytochemistry* 47, 507-511.

Constabel CP, Barbehenn RV (2008) Defensive roles of polyphenol oxidase in plants. In: *In induced plant resistance to herbivory*, (ed.) Schaller A, New York, Springer, pp: 253-269.

Cosgrove DJ (2001) Wall structure and wall loosening. A look backward and forwards. *Plant Physiology* 125, 697-706.

Dat J, Vandenaabeele J, Vranova E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F (2000) Dual action of active oxygen species during plant stress responses. *CMLS, Cellular and Molecular Life Sciences* 57, 779-795.

Davidenko TI, Oseychuk OV, Sevastyanov OV, Romanovskaya II (2004) Peroxidase oxidation of phenols. *Applied Biochemistry and Microbiology* 40, 542-546.

Demiralay M, Saglam A, Kadioglu A (2013) Salicylic acid delays leaf rolling by inducing antioxidant enzymes and modulating osmoprotectant content in *Ctenanthe setosa* under osmotic stress. *Turkish Journal of Biology* 37, 49-59.

Demple B (1991) Regulation of bacterial oxidative stress genes. *Annual Review of Genetic* 25, 315-317.

de Araujo BS, Charlwood VB, Pletsh M (2002) Tolerance and metabolism of phenol and chloroderivatives by hairy roots cultures of *Daucus carota* L *Environmental Pollution* 117, 329-335.

de Araujo BS, de Oliveira JO, Machado SS, Pletsh M (2004) Comparative studies of peroxidases from hairy roots of *Daucus carota*, *Ipomea batatas* and *Solanum aviculare*. *Plant Science* 167, 1151-1157.

De Vries IM (1990) Crossing experiments of lettuce cultivars and species (*Lactuca* sect. *Lactuca*, *Compositae*). *Plant Systematics and Evolution* 171, 233-248.

De VriesIM, Van Raamsdonk WD (1994) Numerical morphological analysis of lettuce cultivars and species (*Lactuca* sect. *Lactuca*, *Asteraceae*). *Plant Systematics and Evolution* 193, 125-141.

De Vries IM (1997) Origin and domestication of *Lactuca sativa* L. *Genetic Resources and Crop Evolution* 44, 165-174.

Diao M, Ouédraogo N, Baba-Moussa L, Savadogo P, N'Guessan A, Bassole I, Dicko M (2010) Biodepollution of wastewater containing phenolic compounds from leather industry by plant peroxidases. *Biodegradation*

Dicko MH, Hilhorst R, Gruppen H, Laane C, Van Berkel WJH, Voragen AGJ (2002) Zymography of monophenolase and o-diphenolase activities of polyphenol oxidase. *Analytical Biochemistry* 306, 336-339.

Dicko MH, Gruppen H, Zouzouho Oc, Thaore AS, van Berkek WJ, Voragen AGJ (2006) Effect of germination on the activities of amylase and phenolic enzymes in sorghum varieties grouped according to food and-use properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86, 953-963.

Dinçer C, Tontul I, Çam IB, Özdemir KS, Topuz A, Nadeem HS, Tuğrulay S, Güotürk RS (2013) Phenolic composition and antioxidant activity of *Salvia tomentosa* Miller: effect of cultivation, harvesting year, and storage. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 37, 561-567.

Dity SL (2008) Enhancing phytoremediation through the use of transgenic and endophytes. *New Phytologist* 179, 318-333.

Doran PM (2002) Properties and application of hairy roots culture, and application of hairy roots culture, New York, Marcel Dekker, 143-162.

Doran PM (2009) Application of Plant Tissue Culture in Phytoremediation Research: Incentives and Limitations. *Biotechnology and Bioengineering* 103, 60-76.

Dorantes AR, Zúñiga AG (2012) Phelooxidases activity in root system and their importance in the phytoremediation of organic contaminants. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology* 4, 35-40.

Dupont MS, Mondin Z, Williamson G, Price KR (2000) Effect of cultivar, processing and storage on the flavonoid glycoside content and composition of lettuce and endive. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48, 3957-3964.

Eapen S, Suseelan KN, Tivarekar S, Kotwal SA, Mitra R (2003) Potential for rhizofiltration of uranium using hairy root cultures of *Brassica juncea* and *Chenopodium amaranticolor*. *Environmental Research* 91, 127-133.

Eikghorn G (1978) *Neorganicheskaya biokimia* (Inorganic Biochemistry), Moscow: Meditsina, 1978, vol. 2.

Elstner EF (1987) Metabolism of activated oxygen species. In: Davis DD (ed.), *Biochemistry of Plants*, Vol. 11, London: Academic Press, pp, 253-315.

Eraslan F, Inal A, Savasturk O, Gunes A. Changes in antioxidative system and membrane damage of lettuce in response to salinity and boron toxicity. *Scientia Horticulturae* 114, 5-10.

Ferakova V (1977) The genus *Lactuca* L. in Europe. Bratislava, Univerzita Komenskeho: 122.

Firoz AZ, Alam MS, Uddin MS, Khatun SA (2009) Effect of sowing time and spacing lettuce seed production in Hilly region. *Bangladesh Journal of Agricultural Research*.34, 531-536.

Firozjaee TT, Najafpour GD, Asgari A, Khavarpour M (2012) Biological treatment of phenolic wastewater in an anaerobic continuous stirred tank reactor. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly* 19, 173-179.

Flores HE, Vivanco JM, Loyola-Vargas VM (1999) Radicle biochemistry: the biology of root-specific metabolism. *Trends in Plant Science* 4, 220-226.

Funk VA, Bayer RJ, Keeley S, Chan R, Watson L, Gemeinholzer B, Schilling E, Panero JL, Baldwin BG, Garcia-Jakas N, Susanna A, Jansen RK (2005) Everywhere but Antarctica: Using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae. *Biologiske Skrifter*, 55, 343-374.

Furumo NC, Furutani S (2008) A simple method for assaying total protein, polyphenol oxidase and peroxidase activity from 'Kaimana' Litchi chinensis Sonn. *Journal of Hawaiian Pacific Agriculture* 15, 1-7.



Foyer CH, Lopez-Delgado H, Dat JF, Scott IM (1997) Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanism of acclamatory stress tolerance and signaling. *Physiologia Plantarum* 100, 241-254.

Fryer MJ (1992) The antioxidant effects of thylakoid vitamin E ( $\alpha$ -tocoferol). *Plant Cell and Environment* 15, 381-392.

Gelvin SB (2000) *Agrobacterium* and plants genes involved in T-DNA transfer and intergration. *Annual Review of Plant Phisiology* 51, 223-256.

Gaspar TH, Penel CL, Thorpe T, Grappin H (1982) Chemistry and biochemistry of peroxidases. In: Peroxidases, a survey of their biochemical and physiological roles in higher plants In: Gaspar TH, Penel CL, Thorpe T, Grappin H, (eds.), University of Geneva Press, pp. 10-60.

Gawlick-Dziki U, Szymanowska U, Baraniak B (2007) Characterization of polyphenol oxidase from broccoli (*Brassica oleracea* var. botrydis italiaca) florets. *Food Chemistry* 105, 1047-1053.

Gawlick-Dziki U, Zlotek U, Swieca M (2008) Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa* var. capitata L.). *Food Chemistry* 107, 129-135.

George EF (1996) *Plant Propagation by Tissue Culture: Part 2-In Practice*. Exegetics, Basingstoke

Gernjak W, Krutzler T, Glaser A, Malato S, Caceres J, Bauer R, Fernández-Alba AR (2003) Photo-Fenton treatment of water containing natural phenolic pollutants. *Chemosphere* 50, 71-78.

Gimenez-Abian M, De La Torre C, Lopez-Saez JF (1987) Growth and cell proliferation in *Allium* roots at different oxygen tensions. *Environmental and Experimental Botany* 27, 233-237.

Girl A, Dhingra V, Girl CC, Singh A, Ward OP, Narasu ML (2001) Biotransformation using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects. *Biotechnology Advanced* 19, 175-199.

Goi A, Trapido M, Tuhkanen T (2004) A study of toxicity, biodegradability, and some bio-products of ozinised nitrophenols. *Advances in Environmental Research* 8, 303-311.

Grace S, Logan BA (2000) Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Physiological Transaction of the Royal Society of London B* 355, 1499-1510.

Gómez JL, Bódalo A, Gómez E, Hidalgo AM, Gómez M, Murcia MD (2008) A transient design model of a continuous tank reactor for removing phenol with immobilized sozbean peroxidase and hydrogen peroxide. *Chemical Engineering Journal* 145, 142-148.

Gorantla M, Babu PR, Lachagari VB, Reddy AM, Wusirika R, Bennetzen JL (2007) Identification of stress-responsive genes in an indica rice (*Oryza sativa* L.) using ESTs generated from drought-stressed seedlings. *Journal of Experimental Botany* 58, 253-265.

Guillon S, Tremoulliaux-Guiller J, Pati PK, Rideau M, Gantet P (2006) Hairy root research: recent scenario and existing prospects. *Current Oppinion in plant Biology* 9, 341-346.

Gujarathi NP, Haney BJ, Park HJ, Wickramasinghe SR, Linden JC (2005) Hairy roots og *Helianthus Annus*: a model system to study phytoremediation of tetracycline and oxytetraciline. *Biotechnology Progress* 21, 775-780.

Hachinohe M, Sunohara Y, Matsumoto H (2004) Absorbtion, translocation and metabolism of L-DOPA in barnyardgrass and lettuce: their involvement in species-selective phytotoxic action. *Plant Growth Regulation* 43, 237-243.

Hakulinen R, Woods S, Ferguson J, Benjamin M (1985) *Water Science Technoogy* **17**, 289-301.

Halliwel B, Gutteridge JMC (1989) *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 936.

Hammond J (2006) Current status of genetically modified ornamentals. *Acta Horticulturae*, 722, ISHS Proc. XIstIS on Virus Diseases in Ornamentals. (ed.) C.A. Chang 117–128.

Hanada K, Zou C, Lehti-Shiu MD, Shinozaki K, Shiu SH (2008) Importance of lineage-specific expansion of plant tandem duplicates in the adaptive response to environmental stimuli. *Plant Physiology* 148, 993-1003.

Hao O J, Kim H, Chiang P C (2000) Decolorization of Wastewater, *Critical Review of Environmental Science and Technology* 30, 449- 505.

Hare PD, Cress WA (1997) Metabolic implication of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* 21, 79-102.

Hela M, Nawel N, Imen T, Hanen Z, Imen BS, Raouia BM, Olfa B, Rym K, Mouhiba BNA, Abdelali H, Lachaal M, Ouerghi Z (2011) Salt stress induced changes in germination, lipid peroxidation and antioxidant activities in lettuce (*Lactuca sativa* L.) seedlings. *African Journal of Biotechnology* 65, 14498-14506.

Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H (2001) A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiology* 42, 462-468.

Holzappel C, Shahrokhi P, Kafkewitz D (2010) Polyphenol oxidase activity in the roots of seedlings of *Bromus* (Poaceae) and other grass genera. *American Journal of Botany* 97, 1195-1199.

Honari H, Alizadeh H, Shahnejat Boushehri AA, Peighambari SA, Jalali Javaran M (2008) *In vitro* regeneration of Iranian varieties of lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivars. *Iranian Journal of Field Crop Science* 39, 173-180.

Yang HQ, Jie YL (2005) Uptake and transport of calcium in plants. *Journal of plant physiology and molecular biology* 31, 227-34.

Hong-Mei L, Nicell JA (2008) Biocatalytic oxidation of bisphenol A in a reverse micelle system using horseradish peroxidase. *Bioresource Technology* 99, 4428-4437.

Hu Y, Wu J, Luo P, Mo Y (2012) Purification and partial characterization of peroxidase from lettuce stems. *African Journal of Biotechnology* 11, 2752-2756.

Hu ZB, Du M (2006) Hairy roots and its application in plant genetic engineering. *Journal of Integrative Plant Biology* 48, 121-127.

Hunter DC, Buritt DJ (2002) Light quality influences adventitious shoot production from cotyledon explants of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 40, 215-220.

Huyste VRB, Carnis WL (1982) Progress and prospects in the use of peroxidase to study cell development. *Photochemistry* 21, 1843-1847

Inzé D, Van Montagu M (2002) *Oxidative Stress in Plants*. Taylor and Francis, New York.

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: B-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* 6, 3901-3907.

Jenni S (2005) Rib discoloration: A physiological disorder induced by heat stress in crisphead lettuce. *Horticultural Science* 40, 2031- 2035.

Jensen WA (1962): *Botanical histochemistry: principles and practices*. WH Freeman, and Company, San Francisco.

Jensen MH, Collins WL (1985) Hydroponic vegetable production. *Horticultural Review* 7, 483-558.

Jiménez A, Hernandez JA, Pastori G, del Rio LA, Sevilla F (1998) Role of ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisome in the senescence of pea leaves. *Plant Physiology* 118, 1327-1335.

Joo JH, Bae YS, Lee JS (2001) Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. *Plant Physiology* 126, 1055-1060.

Jordan W, van Barneveld H, Gerlich O, Kleine-Boymann M, Ullrich J (2002) Phenol, in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH Verlag.

Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF (1999) Plant Systematics: A Phylogenetic Approach. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Kanematsu S, Asada K (1990) Characteristic amino acid sequences of chloroplast and cytosol isozymes of CuZn superoxide dismutase in spinach, rice and horsetail. Plant Cell Physiology 31, 99-112.

Kanthal LK, Dey A, Satyavathi K, Bhojaraju P (2014) GC-MS analysis of bio-active compounds in methanolic extract of *Lactuca runcinata* DC. Pharmacognosy Research 6(1), 58-61.

Karam J, Nicell JA (1997) Potential Applications of Enzymes in Waste Treatment. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 69, 141-153.

Katz D, Weaver C, Katz D, Solomon H, Weaver, Williams Woys (2003). Encyclopedia of Food and Culture. Volume 2, pp: 376.

Khazei I , Salehi R , Kashi A, Mirjalili SM (2013) Improvement of lettuce growth and yield with spacing, mulching and organic fertilizer. International Journal of Agriculture and Crop Sciences, 6, 1137-1143.

Kefeli VI, Kelevitch MV, Borsari B (2003) Phenolic cycle in plants and environment. Journal of Cell and Molecular Biology 2, 13-18.

Keifer-Meyer MC, Gomord V, O Connell A, Halpin C, Faye L (1996) Cloning and sequence analysis of laccase-encoding cDNA clones from tobacco. Gene 178, 205-207.

Kesseli R, Ochoa O, Michelmore R (1991) Variation at RFLP loci in *Lactuca* spp. and origin of cultivated lettuce (*L. sativa*). Genome 34, 430-436.

Khedr AHA, Abbas MA, Wahid AAA, Quick WP, Abogadallah GM (2003) Prolin induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt stress. *Journal of Experimental Botany* 54, 2553-2562.

Kim HJ, Lee YS (2005) Identification of new dicaffeoylquinic acids from *Chrysanthemum morifolium* and their antioxidant activities. *Planta Medica* 71, 871-876.

Klumpp G, Furlan CM, Domingos M, Klumpp A (2000) Response of stress indicators and growth parameters of *Tibouchina pulchra* Cogn. exposed to air and soil pollution near the industrial complex of Cubatao. *Brazilian Science of Total Environment* 246, 79-91.

Kovtun Y, Chiu WL, Tena G, Sheen J (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 97, 2940-2945.

Kratky BA (2010) A Suspended Net-Pot, Non-Circulating Hydroponic Method for Commercial Production of Leafy, Romaine, and Semi-Head Lettuce," *Vegetable Crops*, VC-1, pp: 1-19.

Krolicka A, Stanisiewska I, Bielawski K, Malinski E, Szafranek J, Lokowska E (2001) Establishment of hairy root culture of *Ammi majus*. *Plant Science* 160, 259-264.

Kuiper I, Legendijk EL, Blomberg GV, Ligttenberg BJ (2004) Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe onteraction. *Molecular-Plant Microbe Interaction* 17, 6-15.

Kukavica B i Veljović-Jovanović S (2004) Scenscence-related changes in the antioxidant status of ginkgo and birch leaves during autumn yellowing. *Physiologia Plantarum* 122, 321-327.

Kukavica B, Quartacci MF, Veljović Jovanović S, Navari-Izzo F (2007) Lipid composition of pea (*Pisum sativum* L.) and maize (*Zea mays* L.) root plasma membrane and membrane-bound peroxidase and superoxide dismutase. *Archives of Biological Science* 59, 295-302.

Kulkarni SJ, Kaware JP (2013) Review on Research for Removal of Phenol from Wastewater. *International Journal of Scientific and Research Publications* 3, 1-5.

Kurepa J, Hérouart D, van Montagu M, Inzé D (1997) Differential expression of CuZn- and Fe-superoxide dismutase genes of tobacco during development, oxidative stress, and hormonal treatments. *Plant Cell Physiology* 38, 463-470.

Kwak SS, Kim SK, Park IH, Liu JR (1996) Enhancement of peroxidase activity by stressed-related chemicals in sweet potato. *Phytochemistry* 43, 565-568.

Lamb DT, Ming H, Meqharaj M, Naidu R (2010) Relative tolerance of a range of Australian native plant species and lettuce to copper, zinc, cadmium, and lead. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 59, 424-432.

Lavid N, Schwartz A, Lewinsohn E, Tel-Or E (2001a) Phenols and phenol oxidases are involved in cadmium accumulation in the water plants *Nymphaea peltata* (Menyanthaceae) and *Nymphaea* (Nymphaeaceae). *Planta* 214, 189-195.

Lavid N, Schwartz A, Yarden O, Tel-Or E (2001b) The involvement of polyphenols and peroxidases activities in heavy-metal accumulation by epidermal glands of the waterlily (*Nymphaeaceae*). *Planta* 212, 323-331.

Lebeda A (1998) Biodiversity of the interactions between germplasm of wild *Lactuca* spp. and related genera and lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*). Report on Research Programme OECD Biological Resource Management for Sustainable Agricultural Systems. HRI, Wellesbourne.

Lebeda A, Astley D (1999) World genetic resources of *Lactuca* spp., their taxonomy and biodiversity. In: Lebeda A, Kristkova E (ed), *Eucarpia Leafy Vegetables '99*. Olomouc, Palacky University, pp: 81-94.

Lebeda A, Dolezalova I, Ferakova V, Astley D (2004a) Geographical distribution of wild *Lactuca* species (*Asteraceae*, *Lactuceae*). *The Botanical Review* 70, 328-356.

Lebeda A, Pink DAC, Astley D (2002) Aspects of the interactions between wild *Lactuca* spp. and related genera and lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*). In: Spenser-Phillips

PTN, Gisi U, Lebeda A.(eds, Advances in Downy Mildew Research. Dordrecht, Kluwer Academic Publisher, pp: 85-118.

Lebeda A, Ryder EJ, Grube R, Dolezalova I, Kristakova E (2007) Lettuce (*Asteraceae*; *Lactuca* spp.). In: SINGH R.J. (ed.), Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement, Vol. 3, Vegetable Crops. Boca Raton, CRC Press, Taylor and Francis Group: 377-472.

Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C (1994) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79, 583-593.

Lewis NG, Yamamoto E (1990) Lignin: Occurrence, Biogenesis and Biodegradation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41, 455-496.

Li W, Asada Y, Zoshikawa T (1998) Antimicrobial flavonoids from *Glycyrrhiza glabra* hairy roots culture. *Planta Medica* 64, 746-747.

Li Z, Burt T, Bowman R (2000) Sorption of Ionizable Organic Solutes by Surfactant Modified Zeolite. *Environmental Science and Technology* 34, 3756-3760.

Lichtenhaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods of enzymology* 148, 350-382.

Lim W, Park J, (2011) Re-evaluation of the effects of growth regulators on callus induction and shoot regeneration in *Agrobacterium*-mediated transformation of lettuce. *Acta Physiologiae Plantarum* 33, 1631-1637.

Lin KH, Huang MY, Huang WD, Hsu MH, Yang ZW, Yang CM (2013) The effect of red, blue and white light-emitting diodes on the growth, development, and edible quality of hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *capitata*). *Scientia Horticulturae* 150, 8691.

Linnaeus C (1753) *Species Plantarum*, Tomus II.



- Linnqvist K 1960 On the origin of cultivated lettuce. *Hereditas* 46, 319-350.
- Liu X, Ardo S, Bunning M, Parry J, Zhou K, Stushnoff C, Stoniker F, Yu L, Kendall P (2007) Total phenolic content and DPPH\* radical scavenging activity of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in Colorado. *LWT* 40, 552-557.
- Llorach R, Martinez-Sanchez A, Tomas-Barberan FA (2008) Characterization of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and ascarole. *Food Chemistry* 108, 1028-1038.
- Lockhart JA (1965) An analysis of irreversible plant cell elongation. *Journal of Theoretical Biology* 8, 264-275.
- Lončar N, Božić N, Anđelković I, Milovanović A, Dojnov B, Vujčić M, Roglić G, Vujčić Z (2011) Removal of aqueous phenol and phenol derivatives by immobilized potato polyphenol oxidase. *Journal of Serbian Chemical Society* 76, 513-522.
- Lopez-Delgado H, Dat JF, Foyer CH, Scott IM (1998) Induction of thermotolerance in potato microplants by acetylsalicylic acid and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Journal of Experimental Botany* 49, 713-720.
- Lorenz OA, Maynard DM (1988) *Knott's handbook for vegetable growers*. John Wiley and Sons, New York.
- Lutatkin AS (2002) Contribution of oxidative stress to the development of cold-induced damage to leaves of chilling-sensitive plants: 2. The activity of antioxidant enzymes during plant chilling. *Russian Journal of Plant Physiology* 49, 782-788.
- Maboko MM (2007) Leafy lettuce grown in a hydroponics system. *Undercover Farming* 3, 8.
- Maboko MM, Du Plooy CP (2009) Effect of plant spacing on growth and yield of lettuce (*Lactuca sativa* L.) in a soilless production system, *South African Journal of Plant and Soil* 26, 195-198.

Mahmoudi H, Nasri MB, Huang J, Tarchoun I, Nasri N, Rym K, Gruber M, Lachaâl M, Hannoufa A, Ouerghi Z (2012) Differential response to elevated NaCl by antioxidant enzymes and gene transcripts in two contrasting lettuce genotypes. *Australian Journal of Crop Science* 6, 632-640.

Mai F, Glomb MA (2013) Isolation of phenolic compounds from iceberg lettuce and impact on enzymatic browning. *Agricultural and Food Chemistry* 61, 2868-2874.

Maki H, Morohashi Y (2006) Development of polyphenol oxidase in the micropylar endosperm of tomato seeds. *Journal of Plant Physiology* 163, 1-10.

Marok MA, Tarrago L, Ksas B, Henri P, Abrous-Belbachir O, Havaux M, Rey P (2013) A drought-sensitive barley variety displays oxidative stress and strongly increased contents in low-molecular weight antioxidant compounds during water deficit compared to a tolerant variety. *Journal of Plant Physiology* 170, 633-645.

Marrot B, Barios-Martinez A, Moulin P, Roche N (2006) Biodegradation of high phenol concentration by activated sludge in an immersed membrane bioreactor. *Biochemical Engineering Journal* 30, 174-183.

Matvieieva NA, Vasylenko MY, Shakhovsky AM, Kuchuk NV. Agrobacterium-mediated transformation of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with genes coding bacterial antigens from *Mycobacterium tuberculosis*. *Cytology and Genetics* 43, 94-98.

Meusel H, Jager EJ (1992) *Vergleichende Chorologie der Zentraleuropaischen Flora*. Jena, Stuttgart, New York, Gustav Fischer Verlag.

May MJ, Vernoux T, Leaver C, Van Montagu M, Inze D (1998) Induction of cell death in transgenic plants expressing a fungal glucose oxidase. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 11, 555-562.

Mayer AM, Harel E (1979) Polyphenol oxidases in plants-review. *Phytochemistry* 18, 193-218.

- Mayer AM (2006) Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places?. A review. *Phytochemistry* 67, 2318-2331.
- Melo JS, Kholi S, Padwardhan AW, Souza SFD (2005) Effect of oxygen transfer limitations in phenol biodegradation. *Process Biochemistry* 40, 625-628.
- Michalski WP (1996) Chromatographic and electrophoretic methods for analysis of superoxide dismutases. *Jornal of Chromatography B* 684, 59–75.
- Miladinović Ž, Damjanović M, Brkić S, Marković Ž, Stevanović D, Sretenović-Raičić T, Zečević B, Djordjević R, Čorokalo D, Stanković Lj, Zdravković M, Zdravković J, Marinković N, Mijatović M, Obradović A, Starčević M, Milić B, Todorović V (1997) Gajenje povrća. Institut za istraživanje u poljoprivredi Srbija, Smederevska palanka: Centar za povrtarstvo
- Milošević S, Subotić A, Cingel A, Jevremović S, Ninković S (2009) Efficient genetic transformation of *Impatiens hawkerii* Bull. (Balsamiaceae) using *Agrobacterium rhizogenes*. *Archives of Biological Sciences* 61, 467-474.
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7, 405-410.
- Mizuno, M., Kamei, M., Tsuchida, H. (1998) Ascorbate peroxidase and catalase cooperate for protection against hydrogen peroxide generated in potato tubers during low-temperature storage. *Biochemistry and Molecular Biology International Journal* 44, 717-726.
- Moniruzzaman M (2006) Effects of plant spacing and mulching on yield and profitability of lettuce (*Lactuca sativa* L.) *Journal of Agriculture and Rural Development* 4, 107-111.
- Morohashi Y (2002) Peroxidase activity develops in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle protusion. *Journal of Experimental Botany* 53, 1643-1650.
- Mou B (2008) Lettuce. In: Prohens J, Nuez F (ed), *Handbook of Plant Breeding. Vegetables I. Asteraceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae, and Cucurbitaceae*. New York, Springer Science, pp. 75-116.

Moustakas M, Sperdouli I, Kouna T (2011) Exogenous proline induces soluble sugar accumulation and alleviates drought stress effects on photosystem II functioning of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Growth Regulation* 65, 315-325.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473-497.

Nazari K, Esmaeili N, Mahmoudi A, Rahimi H, Moosavi-Movahedi AA (2007) Peroxidative phenol removal from aqueous solution activated peroxidase biocatalyst. *Enzyme Microbial Technology* 41, 226-223.

Nakamoto S, Machida N (1992) Phenol removal from aqueous solution by peroxidase-catalysed reaction using additives. *Water Resource* 26, 49-54.

Nicolle C, Cardinault N, Gueux E, Jaffrelo L, Rock E, Mazur A i sar. (2004) Health effect of vegetable-based diet: Lettuce consumption improves cholesterol metabolism and antioxidant status in the rat. *Clinical Nutrition* 23, 605-614.

Niederwieser JG (2001) Guide to hydroponic vegetable production, 2nd edn. Agricultural Research Council, Roodeplaat, Vegetable and Ornamental Plant Institute. Pretoria, South Africa.

Nedelkoska TV, Doran PM (2000) Characteristics of heavy metal uptake by plant species with potential for phytoremediation and phytomining. *Mineral Engineering* 13, 549-561.

Nedelkoska TV, Doran PM (2001) Hyperaccumulation of cadmium by hairy roots of *Tsaipei caerulescens*. *Biotechnology and Bioengineering* 67, 607-615.

Neuman DS, Smit RA (1991) The influence of leaf water status and ABA on leaf growth and stomata of *Phaseolus* seedlings with hypoxic roots. *Journal of Experimental Botany* 42, 1499-1506.

Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49, 249-279.

Okuma E, Soeda K, Tada M, Murata Y (2000) Exogenous proline mitigates the inhibition of growth of *Nicotiana tabacum* cultured cells under saline conditions. *Soil Science and Plant Nutrition* 46, 257-263.

Ono NN, Tian L (2011) The multiplicity of hairy root cultures: Profilic possibilities. *Plant Science* 180, 439-446.

Ouzounidou G, Moustakes M, Symeonidis L, Kartagilis S (2006) Response of wheat seedlings to Ni stress: Effects of supplemental calcium. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 50, 91-99.

Ouzounidou G, Asfi M, Sotirakis N, Papadopoulou P, Gaitis F (2008) Olive mill wastewater triggered changes in physiology and nutritional quality of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) depending on growth substrate. *Journal of Hazardous Material* 158, 523-530.

Ouzounidou G, Ntougias S, Asfi M, Gaitis F, Zervakis G (2012) Raw and fungal-treated olive-mill wastewater effects on selected parameters of lettuce (*Lactuca sativa* L.) growth-The role of proline. *Journal of Environmental Science and Health Part B* 47, 728-735.

Park SY, Ryu SH, Kwon SY, Lee HS, Kim Jg, Kwak SS (2003) Differential expression of six novel peroxidase cDNA from cell culture of sweet potato in response to stress. *Molecular Genetic and Genomics* 269, 542-552.

Park JE, Park JY, Kim YS, Staswick PE, Jeon J, Yun J, Kim SY, Kim J, Lee YH, Park CM (2007) GH3-mediated auxin homeostasis links growth regulation with stress adaptation response in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 10036-10046.

Park KH, Park M, Choi SE, Jeong MS, Kwon JH, Oh MH, Choi HK, Seo SJ, Lee MW (2009) The anti-oxidative and anti-inflammatory effects of caffeoyl derivatives from the roots of *Aconium koreanum* R. *Raymond Biological and Pharmaceutical Bulletin* 32, 2029-2033.

Passardi F, Longet D, Penel C, Dunand C (2004) The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry* 65, 1879-1893.

Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C (2005) Peroxidases have a more function than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports* 24, 255-265.

Paterson S, Mackay D, Tam D, Shiu WT (1990) Uptake of organic chemicals by plants: A review of processes, correlation and models. *Chemosphere* 21, 297-331.

Pennell R I, Janniche L, Kjellbom P, Scofield GN, Booij H, de Vries SC, Roberts, K (1992) Identification of a transitional cell state in the developmental pathway to carrot somatic embryogenesis. *Journal of Cell Biology* 119, 1371-1380.

Pilon-Smits E (2005) Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology* 56, 15-39.

Pilleggi M, Pereira AAM, Silva J dos S, Pilleggi SAV, Verma DPS. An improved Method for Transformation of Lettuce by *Agrobacterium tumefaciens* with a gene that confers freezing resistance. *Brayilian Archives of Biology and Technology* 44, 191-196.

Pollard AJ, baker AJM (1996) Quantitative genetics of zink hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist* 132, 113-118.

Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Jansen AK (2009) Different stresses, similar morphogenic responses: integrating a plethora of pathways. *Plant Cell and Environment* 32, 158-169.

Prasad TK, Anderson MD, Martin B, Steward CR (1994) Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell* 6, 65-74.

Prasad NV, de Oliveria HM (2003) Metal hyperaccumulation in plants. Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology* 6, 3.

Puiu M, Raducan A, Babaligea I, Oancea D (2008) Oxidase-peroxidase reaction: kinetics of peroxidase-catalysed oxidation of 2-aminophenol. *Boprocess and Biosystem Engineering* 31, 579-586.

Purvis AC, Shewfelt RL (1993) Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissue? *Physiologia Plantarum* 88, 712-718.

Qi X, Behrens BX, West PR, Mort AJ (1995) Solubilisation and partial characterization of extensin fragments from cell walls of cotton suspension cultures. Evidence for a covalent cross-link between extensin and pectin. *Plant Physiology* 108, 1691-1701.

Radojčić RM (2006) Oksidativni stres i antioksidativna zaštita. *Opšta ekofiziologija*. Beograd.

Ramel F, Sulmon C, Gouesbet G (2009) Natural variation reveals relationship between pre-stress carbohydrate nutritional status and subsequent responses to xenobiotic and oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany* 104, 1323-1337.

Rayan JA, Bell RM, Davidson JM, O' Connor GA (1988) Plant uptake of nonionic organic chemicals from soil. *Chemosphere* 17, 2299-2323.

Rayder EJ (1999) Lettuce, endive and chicory. CAB Intl., New York.

Reymond P, Weber H, Damond M, Farmer EE (2000) Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12, 707-720.

Reynaerts A, De Block M, Hernalsteens JP, Van Montagu M (1988) Selectable and screenable markers In: Gelvin, S.B., Schilperoort, R.A., Verma, D.P.S. (eds) *Plant molecular biology manual*. Kluwer Academic Publ., London, A9, 1-16.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* 2, 152-159.

Rigal D, Gauillard F, Richard-Forget F (2000) Changes in the carotenoid content of apricot (*Prunus armeniaca*, var *Bergeron*) during enzymatic browning: Beta-carotene inhibition of chlorogenic acid degradation. *Journal of the Science of food and agriculture* 80, 763-768.

Riker AJ, Banfield WM, Wright WH, Keitt GW, Sagen HE (1930) Studies on infectious hairy root of nursery apple trees. *Journal of Agriculture Research* 41, 507.

Rojas-Beltran JA, Dejaeghere F, Abd Alla Kotb M, Du Jardin P (2000) Expression and activity of antioxidant enzymes during potato tuber dormancy. *Potato Research* 43, 383-393.

Rodenburg CM (1960) *Varieties of Lettuce. An International Monograph.* Zwolle, W.E.J. Tjeenk Willink.

Rubatzky VE, Yamaguchi M (1997) *World Vegetables.* New York, Chapman & Hall.

Saha MR, Hasan SMR, Akter R, Hossain MM, Alam MS, Alam MA, Mazumder MEH (2008) *In vitro* free radical scavenging activity of methanol extract of the leaves of *Mimusops elengi*, Linn. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine* 6, 197-202.

Salin ML, Bridges SM (1981) Chemiluminescence in wounded root tissue. Evidence for peroxidase involvement. *Plant Physiology* 67, 43-46.

Sandermann H (2004) Bound and unextractable pesticidal plant residues: Chemical characterization and consumer exposure. *Pesticide Management Science* 60, 613-623.

Seppänen MM, Fagerstedt K (2000) The role of superoxide dismutase activity in response to cold acclimation in potato. *Physiologia Plantarum* 108, 279-285.

Serafini M, Bugianesi R, Salucci M, Azzani E, Raguzzini A, Maiani G (2002) Effect of acute ingestion of fresh and stored lettuce (*Lactuca sativa*) on plasma total antioxidant levels in human subjects. *British Journal of Nutrition* 88, 615-623.



Schnabelrauch LS, Kieliszewski M, Upham BL, Alizedeh H, Lamport DT (1996) Isolation of pI 4.6 extensin peroxidase from tomato cell suspension cultures and identification of Val-Tyr-Lys as putative intermolecular cross-link site. *Plant Journal* 9, 477-489.

Schmidt B (2001) Metabolic profiling using plant cell suspension cultures. In: Hall JC, Hoagland RE, Zablotowicz RM (ed.) *Pesticide biotransformation in plants and microorganisms*. ACS Symp Ser 777, Washington DC, American Chemical Society pp: 40-56.

Scialabba A, Bellani LM, Dell'Aquila A (2002) Effects of ageing on peroxidase activity and localization in radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *European Journal of Histochemistry* 46, 351-358.

Siegel BZ, Galston W (1967) The peroxidase of *Pisum sativum*. *Plant Physiology* 42, 221-226.

Sidrach L, Hiner ANP, Chazzara S, Tudela J, Garcia-Canovas F, Rodriguez-Lopez JN (2006) Effects of calcium on the thermal stability in organic solvents and resistance to hydrogen peroxide of artichoke (*Cynara scolymus* L.) peroxidase: A Potential method of enzyme control. *Journal Molecular Catalysis B Enzyme* 42, 78-84.

Simonović A (2010) *Biotehnologija i genetičko inženjerstvo biljaka*.

Singh S, Sinha S, Saxena R, Pandey K, Bhatt K (2004) Translocation of metals and its effects in the tomato plants grown on various amendments of tannery waste: Evidence for involvement of antioxidant. *Chemosphere* 57, 91-99.

Sinsabaugh RL (2010) Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 391-404.

Sevon N, Oksman-Caldentey KM (2002) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids. *Planta Medica* 68, 859-868.

Shafran E, Dudai N, Mayer AM (2007) Polyphenol oxidases in *Ocimum basilicum* during growth, development and following cold stress. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 5, 254-257.

Shanks JV, Morgan J (1999) Plant hairy root culture. *Current Opinion in Biotechnology* 10, 151-155.

Shen WH, Petit A, Guern J, Tempe J (1988) Hairy roots are more sensitive to auxin than normal roots. *PNSA* 85, 3417-3421.

Slater A, Scott NW, Fowler MR (2004) *Plant Biotechnology. The genetic manipulation of plants*. Oxford University Press, New York pp: 35-52.

Smeekens S, Ma JK, Hanson J (2009) Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Current Opinion in Plant Biology* 13, 274-279.

Schmidt B, Joussen N, Bode M, Schuphan I (2006) Oxidative metabolic profiling of xenobiotic by human P450s expressed in tobacco cell suspension cultures. *Biochemical Society Transaction* 34, 1241-1245.

Schroder P, Scheer CE, Diekmann F, Stampfl A (2007) How plants cope with foreign compounds: Translocation of xenobiotic glutathione conjugates in roots of barley (*Hordeum vulgare*). *Environmental Science Pollution Research* 14, 114-122.

Smit R, Stachowiak M, Van Volkenburgh E (1989) Cellular processes limiting leaf growth in plants under hypoxic root stress. *Journal of Experimental Botany* 40, 89-94.

Sosa-Alderete LG, Talano MA, Ibanez SG, Purro S, Agostini E, Medina MI (2009) Establishment of transgenic tobacco hairy roots expressing basic peroxidases and its application for phenol removal. *Journal of Biotechnology* 139, 273-279.

Sosa Alderete LG, Ibáñez SG, Agostini E, Medina MI (2012) Phytoremediation of Phenol at pilot scale tobacco hairy roots. *International Journal of Environmental Science* 3, 398-407.

- Sretenović-Raičić T, Ninković S, Miljuš-Đukić J, Vinterhalter B, Vinterhalter D (2006) Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of *Brassica oleracea* var. sabauda and *B. oleracea* var. capitata. *Biologia Plantarum* 50, 525-530.
- Stadtman ER (1992) Protein oxidation and ageing. *Science* 257, 1220-1224.
- Steiert JG, Crawford RL (1985) Microbial degradation of chlorinated phenols. *Trends in Biotechnology* 3, 300-305.
- Stojakowska A, Malarz J, Szewczyk A, Kisiel W (2012) Caffeic acid derivatives from a hairy root culture of *Lactuca virosa*. *Acta Physiologiae Plantarum* 34, 291-298.
- Suresh B, Ravishankar GA (2004) Phytoremediation-a novel and promising approach for environmental clean-up. *Critical Review in Biotechnology* 24, 97-124.
- Suza W, Harris RS, Lorence A (2008) Hairz Roots: From High-Value Metabolite Production to Phytoremediation. *Electronic Journal of Integrative Bioscience* 3, 57-65.
- Tadić V, Petrić M, Milošević S, Raspor M, Spasojević D, Subotić A. (2014) Effect of phenol on germination capacity and polyphenol oxidase, peroxidase and catalase activity of lettuce. *Archives of Biological Sciences*, 66 (4), 1503-1514.
- Tadić V, Milošević S, Cingel A, Petrić M, Trifunović M, Antonić D, Tadić J, Subotić A (2014) Production of hairy roots culture of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Central European Journal of Biology* 9, 1196-1205.
- Takahama U (1997) Enchancement of the peroxidase-dependent oxidation of DOPA by component of *Vicia* leaves. *Phytochemistry* 46, 427-432.
- Takahama U, Oniki T (1997) A peroxide/phenolics/ascorbate system can scavenge hydrogen peroxide in plant cells. *Physiologia Plantarum* 101, 845-852.
- Takahashi MA, Asada K (1983) Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoid. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 226, 558-566.

Tamás E, Dûrčekova K, Haluškova L, Huttova J, Mistic I, Olle M (2007) Rhizosphere localized cationic peroxidase from barley roots is strongly activated by cadmium and correlated with root growth inhibition. *Chemosphere* 66, 1292-1300.

Tanaka Y, Katsumoto Y, Brugliera F, Mason J (2005) Genetic engineering in floriculture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 80, 1–24.

Taneja SR, Sachar RC (1974) Induction of polyphenol oxidase in germination wheat seeds. *Phytochemistry* 13, 2695-2702.

Tegelberg T, Julkunen-Tiito R, Vartiainen M, Paunonen R, Rousi M, Kellomaki S (2008) Exposure to elevated CO<sub>2</sub>, elevated temperatures and enhanced UV-B radiation modify activities of polyphenol oxidase and guaiacol peroxidase and concentration of chlorophylls, polyamines and soluble proteins in the leaves of *Betula pendula* seedlings. *Environ Exp Bot* 62, 308-315.

Thyapong P, Hunt MD, Steffens JC (1996) Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenol oxidase. *Phytochemistry* 43: 673-676.

Thomas SM, Gebicki JM, Dean RT (1989) Radical initiated  $\alpha$ -tocopherol depletion and lipid peroxidation in mitochondrial membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1002, 189-197.

Tiwari RK, Trivedi M, Guang ZC, Guo GQ, Zheng GC (2008) Agrobacterium rhizogenes mediated transformation of *Scutellaria baicalensis* and production of flavonoids in hairy roots. *Biologia Plantarum* 52, 26-35.

Tomas-Barberan F, Loaiza-Velarde J, Bonfanti A, Saltveit ME (1997) Early wound and ethylene-induced changes in phenylpropanoid metabolism in harvested lettuce. *Journal of American Society of Horticultural Science* 122, 399-404.

Tomb AS (1977) *Lactuceae* - systematic review. In: Hey-Wood VH, Harborne JB, Turner BL (ed), *The biology and chemistry of the Compositae*, II. London, New York, Academic Press, pp. 1067-1079.

Tran LT, Constabel CP (2011) The polyphenol oxidase gene family in poplar: phylogeny, differential expression and identification of a novel, vacuolar isoform. *Planta* 234, 799-813.

Tran LT, Taylor JS, Constabel CP (2012) The polyphenol oxidase gene family in land plants: Lineage-specific duplication and expansion. *BMC Genomics* 13, 395-407.

Trebst A, Hilp U, Draber W (1993) Response in the inhibitor efficiency of substituted phenols on PSII activity in six mutants of the D1 protein subunit in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phytochemistry* 33, 969-977.

Turgut C, Pepe MK, Cutright T (2004) The effect of EDTA and citric acid on phytoremediation Cd, Cr and Ni from soil using *Helianthus annuus*. *Environmental pollution* 131, 147-154.

Urszula Z, Świeca M, Jakubczyk A (2014) Effect of abiotic elicitation on main health-promoting compounds, antioxidant activity and commercial quality of butter lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Food Chemistry* 148, 253-260.

Wacksman JT (1997) DNA methylation and the association between genetic and epigenetic changes: relation to carcinogenesis. *Mutation Research* 375, 1-8.

Waite JH (1976) Calculating extinction coefficients for enzymatically produced o-quinones. *Analytical Biochemistry* 75, 211-218.

Walker MA, McKersie BD (1993) Role of Ascorbate-Glutathione Antioxidant System in Chilling Resistance of Tomato. *Journal of Plant Physiology* 141, 234-239.

Weaver C (1997) Weaver, Williams Woys Heirloom Vegetable Gardening: A Master Gardener's Guide to Planting, Seed Saving and Cultural History, Henry Holt and Company pp: 170–172.

Weber M, Weber M, Kleine-Boymann M (2004). *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 7th ed, VCH, Weinheim.

- Wingler A, Roitsch T (2008) Metabolic regulation of leaf senescence: interaction of sugar signaling with biotic and abiotic stress responses. *Plant Biology* 10, 50-62.
- Wright H, Nicell JA (1999) Characterization of soybean peroxidase for the treatment of aqueous phenols. *Bioresource Technology* 70, 69-79.
- Xingmao M, Burken JG (2003) TCE Diffusion to the atmosphere in phytoremediation application. *Environmental Science Technology* 37, 2534-2539.
- Zhou BL, Arakawa K, Fujikawa S, Yoshida S (1994) Cold-induced alterations in plasma membrane proteins that are specifically related to the development of freezing tolerance in cold-hardy winter wheat. *Plant Cell Physiology* 35, 175-182.
- Zhou Y, O Hare TJ, Jobin-Décor M, Underhill SJR, Wills RBH, Graham MW (2003) Transcriptional regulation of pineapple oxidase gene and its relationship to blackheart. *Plant Biotechnology Journal* 1, 463-478.
- Yapar S, Klahre P, Klumpp E (2004) Hydrotalcite as A potential Sorbent for the Removal of 2,4 Dichlorophenol. *Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences*, 28, 4-48.
- Yingsanga P, Srilaong V, McGlasson WB, Kabanoff E, Kanlayanarat S, Noichinda S (2006) Morphological differences associated with water loss in Rambutan fruit cv. Rongrien and See-chompo. *Acta Horticulturae* 712, 453-460.
- Yingsanga P, Srilaong V, Kanlayanarat S, Noichinda S, McGlasson WB (2008) Relationship between browning and related enzymes (PAL, PPO and POD) in rambutan fruit (*Nephelium lappaceum* Linn.) cvs. Rongrien and See-chompo. *Postharvest Biology and Technology* 50, 164-168.
- Yoshida S, Kitano, M, Eguchi H (1996) Growth analysis of cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) under control of dissolved O<sub>2</sub> concentration in hydroponics (Japanese with English summary). *Environmental Control in Biology* 34, 223-229.

- Vamos-Vigyazo L (1981) Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Critical Review in Food Science and Nutrition* 15, 49-126.
- Van Aken B (2008) Transgenic plants for phytoremediation: helping nature to clean up environmental pollution. *Trends in Biotechnology* 26, 225-227.
- Van Eerd LL, Hoagland RE, Zablutowicz RM, Hall JC (2003) Pesticide metabolism in plants and microorganism. *Weed Science* 51, 472-495.
- van Gelder CWG, Flurkey WH, Wichers HJ (1997) Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry* 45, 1309-1323.
- Van Larebeke N, Genetello C, Shell J, Schilperooort RA, Hermans AK, Hernalsteens JP, Van Montagu M (1975) Acquisition of tumour-inducing ability by non-oncogenic agrobacteria as a result of plasmid transfer. *Nature* 255, 742-743.
- Van Soest LJM, Boukema I (1997) Genetic resources conservation of wild relatives with a user's perspectives. *Bocconea* 7, 305-316.
- Vázquez I, Rodríguez-Iglesias J, Marañón E, Castrillón L, Álvarez M (2007) Removal of residual phenols from coke wastewater by adsorption. *Journal of Hazardous Materials* 147, 395-400.
- Veena V, Taylor GC (2007) *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 43, 383-403.
- Vilaine F, Casse-Delbart F (1987) Independent induction of transformed roots by the TL and TR regions of the Ri plasmid of the agropine type *Agrobacterium rhizogenes*. *Molecular and General Genetics* 206, 17-23.
- Vranová E, Van Breusegem F, Dat J, Belles-Boix E, Inzé D (2002) The role of active oxygen species in plant signal transduction. In: *Plant Signal Transduction*, (Frontiers in Molecular Biology, Vol. 38), D. Scheel, and C. Wasternack (eds.), Oxford, Oxford University Press, pp. 45-73.

Webb DT, Torres LD, Forbet P (1984) Interaction of growth regulators, explant age, and culture environment controlling organogenesis from lettuce cotyledons *in vitro*. Canadian Journal of Botany 62, 586-590.

Wilberg K, Assenhaimer C, Rubio J (2002) Removal of aqueous phenol catalysed by a low purity soybean peroxidase. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 77, 851-857.

Wu JY, Shi M (2008) Ultrahigh diterpenoid tanshinone production through repeated osmotic stress and elicitor stimulation in fed-batch culture of *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. Applied Microbiology and Biotechnology 78, 441-448.

Zdravković JM, Aćamović-Djoković GS, Mladenović JD, Pavlović RM, Zdravković MS (2014) Antioxidant capacity and contents of phenols, ascorbic acid,  $\beta$ -carotene and lycopene in lettuce. Hemijska industrija 68 (2), 193-198.

Zhan L, Hu J, Pang L, Li Y, Shao J (2014) Light exposure reduced browning enzyme activity and accumulated total phenols in cauliflower heads during storage. Postharvest Biology and Technology 88, 17-20.

Zhenyan H, Jiangchuan L, Haiyan Z, Mi M (2005) Different effects of calcium and lanthanum on the expression of phytochelatin synthase gene and cadmium absorption in *Lactuca sativa*. Plant Science 168, 309-318.

Ziv M (1991) Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: Debergh PC and Zimmerman RH (ed.) Micropropagation: Technology and Applications, Kluwer Academic Publishers pp, 45-70.

Zohary D (1991) The wild genetic resources of cultivated lettuce (*Lactuca sativa* L.). Euphytica 53, 31-35.



## 8. BIOGRAFIJA AUTORA

Vojin (Milan) Tadić rođen je 14. februara 1980. godine u Beogradu. Osnovnu i srednju školu završio je u Beogradu.

Hemijski fakultet, Univerziteta u Beogradu, smer diplomirani biohemičar, upisao je 1999. godine. Diplomirao je na Hemijskom fakultetu 2008. godine. Iste godine upisuje doktorske studije na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, na modulu Fiziologija i molekularna biologija biljaka.

U decembru 2010. godine zaposlen je kao istraživač pripravnik u Institutu za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Univerzitet u Beogradu, dok se sledeće godine, 2011., zapošljava kao vodeći inženjer za monitoring kvaliteta zemljišta u JP Elektroprivreda Srbije, sektor za zaštitu životne sredine gde i danas radi. Tokom perioda jul-septembar 2012. godine posećuje, tokom studijskog boravka, NASA centar u Americi tokom koga se stručno usavršava iz oblasti fitoremedijacije.

Vojin Tadić je učestvovao na dva nacionalna projekta pod nazivom "Primena i razvoj biotehnoloških postupaka u proizvodnji ukrasnih biljaka" (TR23010A) i "Razvoj i primena biotehnoloških postupaka u dobijanju zdravog sadnog materijala ukrasnih biljaka" (TR31019).

Od 2015. godine je istraživač saradnik na Institutu za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerzitet u Beogradu.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписана \_\_\_\_\_ Војин Тадић \_\_\_\_\_

број уписа \_\_\_\_\_ Б3304/2009 \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

#### **Уклањање фенола из отпадних вода сортама зелене салате**

#### **(*Lactuca sativa* L.)**

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

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_ 12.05.2015. \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Војин Тадић \_\_\_\_\_

Број уписа \_\_\_\_\_ Б3304/2009 \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_ Физиологија и молекуларна биологија биљака \_\_\_\_\_

Наслов рада Уклањање фенола из отпадних вода сортама зелене салате

(*Lactuca sativa* L.)

Ментор \_\_\_\_\_ др Марија Петрић \_\_\_\_\_

Потписан \_\_\_\_\_ Војин Тадић \_\_\_\_\_

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања 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 докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_ 12.05.2015. \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

Уклањање фенола из отпадних вода сортама зелене салате (*Lactuca sativa* 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 Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучила.

① Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_ 12.05.2015. \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

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 прераде. 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 прераде. 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.