# Učinak različitih oblika selena na oksidacijski i antioksidacijski odgovor klijanaca pšenice (Triticum aestivum L.)

**Matić, Magdalena**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:629565

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-03-29**

*Repository / Repozitorij:*

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni

Magdalena Matić

# Učinak različitih oblika selena na oksidacijski i antioksidacijski odgovor klijanaca pšenice (*Triticum aestivum* L.)

Diplomski rad

Osijek, 2018.

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku** **Diplomski rad**
**Odjel za biologiju**
**Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni**

**Znanstveno područje: Prirodne znanosti**
**Znanstveno polje: Biologija**

# Učinak različitih oblika selena na oksidacijski i antioksidacijski odgovor klijanaca pšenice (*Triticum aestivum* L.)

**Magdalena Matić**

**Rad je izrađen:** Laboratorij za biokemiju, Odjel za biologiju, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

**Mentor:** Dr.sc. Ivna Štolfa Čamagajevac, docent
**Komentor:** Dr.sc. Rosemary Vuković, docent

**Kratak sažetak diplomskog rada:**
Selen (Se) može imati dvostruki utjecaj na biljke, niske koncentracije imaju pozitivan učinak, dok visoke koncentracije mogu imati toksično djelovanje. Cilj ovog istraživanja bio je odrediti utjecaj različitih koncentracija dva oblika Se (selenata i selenita) na oksidacijski status i antioksidacijski odgovor u korijenu i izdanku klijanaca pšenice (*Triticum aestivum L.*, sorta Kraljica). Utjecaj Se na pokazatelje oksidacijskog stresa i antioksidacijskog odgovora ovisio je o kemijskom obliku i primijenjenoj koncentraciji Se te o vrsti biljnog organa. Oba oblika Se intenzivnije su djelovala na pokazatelje oksidacijskog stresa u korijenu pšenice u odnosu na izdanak što upućuje na tkivno-specifični odgovor. Daljnja istraživanja ostalih pokazatelja antioksidacijskog statusa su potrebna kako bi se dobila potpunija slika o djelovanju Se i predložio mogući mehanizam detoksikacije.

**Ključne riječi:** selenat, selenit, oksidacijski stres, LPO, $H_2O_2$

**Broj stranica:** 44
**Broj slika:** 14
**Broj literaturnih navoda:** 76
**Jezik izvornika:** hrvatski

**Datum obrane:** 16. svibnja 2018.

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. Dr.sc. Dubravka Špoljarić Maronić, doc., predsjednik,
2. Dr.sc. Ivna Štolfa Čamagajevac, doc., mentor, član,
3. Dr.sc. Zorana Katanić, doc., član,
4. Dr.sc. Selma Mlinarić, doc., zamjena člana.

**Rad je pohranjen:** na mrežnim stranicama Odjela za biologiju te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu.

**BASIC DOCUMENTATION CARD**

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek** **Master's Thesis**
**Department of Biology**
**Graduate university study programme in Biology**

**Scientific Area:** Natural sciences
**Scientific Field:** Biology

# Effect of different forms of selenium on the oxidative stress and antioxidative response in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.)

**Magdalena Matić**

**Thesis performed at:** Laboratory of Biochemistry, Department of Biology, J.J. Strossmayer University of Osijek

**Supervisor:** Ivna Štolfa Čamagajevac, PhD, Assistant Professor
**Co-supervisor:** Rosemary Vuković, PhD, Assistant Professor

**Short abstract:**
Selenium (Se) can have dual effects on plants, at low concentrations it has a beneficial effect, whereas at high concentrations it may have a toxic effect. The aim of this study was to determine the effect of different concentrations of two Se forms (selenate and selenite) on oxidative status and antioxidative response in root and shoot of wheat seedlings (*Triticum aestivum* L., cv. Kraljica). The effect of Se on indicators of oxidative stress and antioxidative response depended on the chemical form, applied concentration and on the type of plant organ. Both Se forms have a greater impact on indicators of oxidative stress in wheat root compared to shoot, suggesting a tissue-specific response. Further research of other indicators of antioxidant status should be conducted to obtain complete insight of Se effects and to suggest a possible mechanism of its detoxification.

**Number of pages:** 44
**Number of figures:** 14
**Number of references:** 76
**Original in:** Croatian

**Key words:** selenate, selenite, oxidative stress, LPO, $H_2O_2$

**Date of the thesis defence:** 16th May 2018.

**Reviewers:**

1. Dubravka Špoljarić Maronić, PhD, assistant professor, chair
2. Ivna Štolfa Čamagajevac, PhD, assistant professor, supervisor, member,
3. Zorana Katanić, PhD, assistant professor, member,
4. Selma Mlinarić, PhD, assistant professor, member.

**Thesis deposited:** on the Department of Biology website and the Croatian Digital Theses Repository of the National and University Library in Zagreb.

*Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Ivni Štolfi Čamagajevac i komentorici doc. dr. sc. Rosemary Vuković na pomoći i stručnom vodstvu pri izvođenju eksperimentalnog dijela rada te na svim savjetima i strpljenju tijekom pisanja ovog rada, ali i tijekom cijelog studiranja.*

*Veliko hvala i Ani Vuković na pomoći pri izvođenju eksperimentalnog dijela rada.*

*Hvala svim prijateljima! Amini i Ivani što su uz mene već toliko godina, a posebno hvala Anji i Maji na motivaciji i svim nezaboravnim trenutcima tijekom studiranja.*

*I najveće hvala mojoj obitelji bez koje ništa ne bi bilo moguće. Hvala Vam od srca na svoj ljubavi, podršci, strpljenju i razumijevanju.*

# SADRŽAJ:

1. UVOD ..... 1
1.1. Selen - dvostruka uloga u organizmu ..... 1
1.2. Unos, transport i metabolizam Se u biljkama ..... 2
1.3. Oksidacijski stres u biljnim stanicama ..... 5
1.3.1. Komponente antioksidacijskog odgovora - enzimski antioksidansi ..... 7
1.3.2. Komponente antioksidacijskog odgovora - neenzimski antioksidansi ..... 8
1.4. Utjecaj Se na oksidacijski i antioksidacijski status biljaka ..... 9
1.5. Cilj diplomskog rada ..... 11
2. MATERIJALI I METODE ..... 12
2.1. Sterilizacija sjemenki i postavljanje eksperimenta ..... 12
2.2. Određivanje količine produkata lipidne peroksidacije ..... 13
2.3. Određivanje koncentracije vodikovog peroksida ..... 13
2.4. Određivanje ukupnog glutationa ..... 14
2.5. Priprema proteinskih ekstrakata za određivanje aktivnosti katalaze i askorbat-peroksidaze ..... 14
2.6. Mjerenje aktivnosti enzima katalaze ..... 15
2.7. Mjerenje aktivnosti enzima askorbat-peroksidaze ..... 15
2.8. Određivanje koncentracije topljivih proteina ..... 15
2.9. Statistička obrada podataka ..... 15
3. REZULTATI ..... 17
3.1. Utjecaj različitih koncentracija selenata na količinu produkata lipidne peroksidacije u izdanku i korijenu pšenice ..... 17
3.2. Utjecaj različitih koncentracija selenita na količinu produkata lipidne peroksidacije u izdanku i korijenu pšenice ..... 18
3.3. Utjecaj različitih koncentracija selenata na koncentraciju $H_2O_2$ u izdanku i korijenu pšenice ..... 19
3.4. Utjecaj različitih koncentracija selenita na koncentraciju $H_2O_2$ u izdanku i korijenu pšenice ..... 21
3.5. Utjecaj različitih koncentracija selenata na koncentraciju tGSH u izdanku i korijenu pšenice ..... 23
3.6. Utjecaj različitih koncentracija selenita na koncentraciju tGSH u izdanku i korijenu pšenice ..... 25

3.7. Utjecaj različitih koncentracija selenata na aktivnost CAT u izdanku i korijenu pšenice ..... 26
3.8. Utjecaj različitih koncentracija selenita na aktivnost CAT u izdanku i korijenu pšenice ..... 28
3.9. Utjecaj različitih koncentracija selenata na aktivnost APX u izdanku i korijenu pšenice ..... 29
3.10. Utjecaj različitih koncentracija selenita na aktivnost APX u izdanku i korijenu pšenice ..... 31
4. RASPRAVA ..... 33
5. ZAKLJUČCI ..... 37
6. LITERATURA ..... 38

# 1. UVOD

## 1.1. Selen - dvostruka uloga u organizmu

Selen (Se) je element u tragovima esencijalan za mnoge organizme, uključujući sisavce, mnoge bakterije i određene niže biljke (zelena alga *Chlamydomonas reinhardtii* P. A. Dang.) (Novoselov i sur. 2002; Combs 2001). Kod navedenih organizama pronađeni su selenoproteini koji sadrže nespecifičnu aminokiselinu selenocistein (SeCys) u svom aktivnom mjestu (Pilon-Smits i Quinn 2010). Selenoproteini sisavaca važni su za uklanjanje slobodnih radikala (prevencija raka), imunološke reakcije (otpornost na patogene), normalni rad štitnjače i spermatogenezu (Rayman 2012). Stoga je nedostatak Se povezan s povećanim rizikom razvoja karcinoma i virusnih infekcija, a kod muškaraca nedostatak Se može uzrokovati i neplodnost. Iako je Se esencijalan za navedene organizme, do danas ne postoje jasni dokazi da je Se esencijalan i za više biljke (Pilon-Smits i Quinn 2010). Ipak pri nižim koncentracijama Se može imati pozitivno djelovanje. Brojna su istraživanja pokazala da Se ne samo da može stimulirati rast i razvoj biljaka, nego može i povećati otpornost i antioksidacijski kapacitet biljaka (Chu i sur. 2010). Niske koncentracije Se štite biljke od različitih vrsta abiotičkog stresa kao što su hladnoća (Chu i sur. 2010), suša (Hasanuzzaman i Fujita 2011), isušivanje (Pukacka i sur. 2011) i stres uzrokovan teškim metalima (Pandey i Gupta 2015; Kumar i sur. 2012). Ipak, povišena koncentracija Se ima toksičan utjecaj na većinu organizama. Zbog kemijske sličnosti sa sumporom (S), biljke asimiliraju i metaboliziraju Se koristeći iste prijenosnike i puteve kao i S (Dumont i sur. 2006; Sors i sur. 2005). Toksičnost se javlja kao posljedica zamjene S sa Se u proteinima i drugim spojevima koji sadrže S, čime se narušava funkcija ovih molekula (Pilon-Smits i Quinn 2010). Na primjer, hrana koja sadrži 1 mg $kg^{-1}_{\text{suhe tvari}}$ Se može dovesti do kroničnog trovanja čovjeka i životinja, a konzumacija biljnog materijala koji sadrži 1000 mg $kg^{-1}_{\text{suhe tvari}}$ Se može dovesti do akutnog trovanja i smrti (Pilon-Smits i Quinn 2010).

Razlika između količine Se potrebnog za normalno funkcioniranje organizma i količine koja je toksična vrlo je mala, stoga su i nedostatak i toksičnost Se česti problemi diljem svijeta (Terry i sur. 2000). Sadržaj Se u životinjama i biljkama, a tako i u čovjeku, snažno je povezan sa sadržajem bioraspoloživog Se u tlu (Durán i sur. 2013), stoga mnoge zemlje imaju prosječni unos Se koji nije dovoljan za postizanje odgovarajuće aktivnosti zaštitnih selenoproteina. Takav nedostatak Se doveo je do sve većeg zanimanja za razvoj prehrambenih proizvoda i dodataka prehrani obogaćenih Se. Istraživanja pokazuju kako je

pšenica, u odnosu na ostale žitarice (kukuruz, ječam, zob), najučinkovitija u akumulaciji Se, te predstavlja jedan od najvažnijih izvora Se za ljude (Lyons i sur. 2003). Jedna od strategija povećanja koncentracije Se i ostalih mikronutrijenata u hrani je agronomska biofortifikacija usjeva. Biofortifikacija se definira kao proces povećanja biološki raspoloživih koncentracija važnih elemenata u jestivim dijelovima kultiviranih biljaka putem agronomske biofortifikacije (gnojidba) ili genetičke biofortifikacije (genetičko poboljšanje usjeva) (Ducsay i sur. 2016; White i Broadley 2005). Agronomske strategije za povećanje koncentracije mineralnih elemenata u jestivim tkivima općenito se oslanjaju na primjenu mineralnih gnojiva ili poboljšanje topljivosti i transporta mineralnih elemenata u tlu (White i Broadley 2009). Općenito, postoji nekoliko načina biofortifikacije Se, uključujući direktnu aplikaciju u tlo, folijarni tretman, tretman sjemena i predsjetveni tretman sjemena (Ducsay i sur. 2016). Gnojidba usjeva može znatno povećati koncentraciju Se u usjevima koji rastu na tlima s niskom koncentracijom Se. Zbog izuzetno niskog unosa Se u Finskoj (0,025 mg na dan), 1984. godine donesena je službena odluka o obaveznom dodatku Se u gnojiva u obliku natrijevog selenata (Ducsay i sur. 2016). Trenutni propisi u Finskoj odnose se na tekuća gnojiva koja se primjenjuju direktno na tlo (10 g $ha^{-1}$) i folijarna gnojiva (4 g $ha^{-1}$) (Ducsay i sur. 2016). S obzirom da na učinkovitost biofortifikacije utječu brojni uvjeti kao što su stanje tla, klimatski uvjeti i vrsta usjeva, potrebno je pronaći optimalne koncentracije za svaku regiju svijeta. Kada se usjevi uzgajaju na tlima siromašnim mineralnim elementima, primjenjuju se ciljana topljiva anorganska gnojiva direktno na korijen ili listove, a u situacijama gdje je otežan transport mineralnih elemenata u jestive dijelove biljke, primjenjuje se folijarni tretman topljivim anorganskim gnojivima (White i Broadley 2009). Folijarna primjena Se učinkovita je metoda biofortifikacije usjeva Se. $Na_2SeO_4$ i $K_2SeO_4$ predstavljaju glavne bioraspoložive oblike selenata za neposredno primanje od strane usjeva, dok primjena selenita ili manje topljivih oblika selenata, kao što je $BaSeO_4$, osigurava dugotrajniji učinak (White i Broadley 2009).

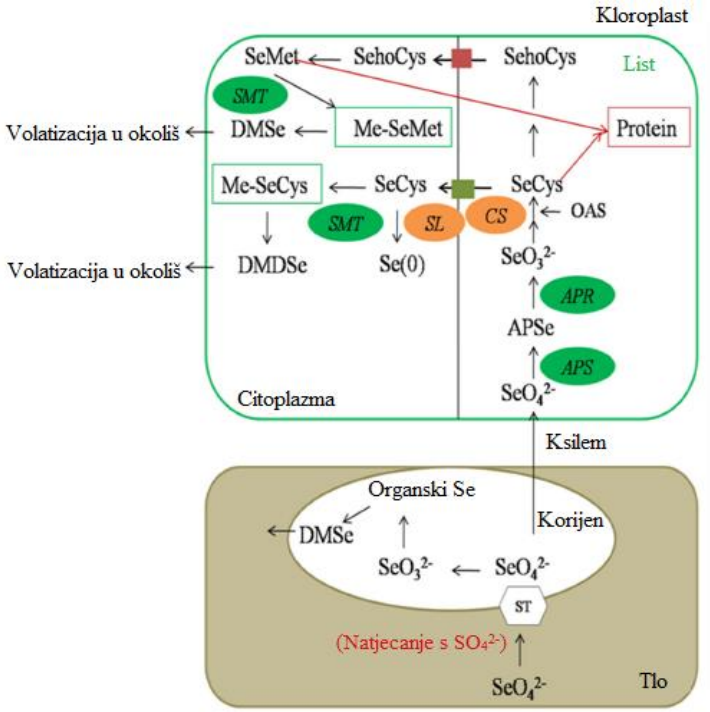
### 1.2. Unos, transport i metabolizam Se u biljkama

Iako ne postoje jasni dokazi da je Se esencijalan za više biljke, dokazano je da Se ima pozitivan utjecaj, potičući rast biljaka i otpornost na stres (Pilon-Smits i sur. 2009; Hartikainen 2005). No, pri povišenim koncentracijama Se pokazuje toksično djelovanje. U biljkama se selenoza ili toksičnost Se pojavljuje kada koncentracija Se premašuje optimalnu (Gupta i Gupta 2017). Kao što je već navedeno, sadržaj Se u biljkama snažno je povezan sa sadržajem bioraspoloživog Se u tlu (Durán i sur. 2013). Koncentracije Se u tlima vrlo su

različite, a prag dopuštene koncentracije ukupnog Se u tlu na području Europske unije iznosi 3 mg $kg^{-1}$ (Kabata-Pendias i Adriano 1995). Selen se u prirodi pojavljuje u anorganskom i organskom obliku. Anorganski oblici Se su: selenit ($SeO_3^{2-}$), selenat ($SeO_4^{2-}$), selenid ($Se^{2-}$) i elementarni Se ($Se^0$), dok su glavni organski oblici selenocistein (SeCys) i selenometionin (SeMet) (Wu i sur. 2015; Bodnar i sur. 2012; Sors i sur. 2005). Asimilacija, translokacija i distribucija Se ovise o biljnoj vrsti, razvojnom stadiju biljke, obliku i koncentraciji Se, fiziološkim uvjetima (salinitet i pH tla), prisutnosti drugih tvari, aktivnosti membranskih prijenosnika i mehanizmima translokacije (Gupta i Gupta 2017). Selenat ($SeO_4^{2-}$) predstavlja glavni oblik bioraspoloživog Se u poljoprivrednim tlima što se može povezati s činjenicom da mu je i topljivost u vodi veća od selenita (Gupta i Gupta 2017). U alkalnim tlima, Se se uglavnom pojavljuje kao selenat, dok je u kiselim tlima većinom prisutan kao selenit (Gupta i Gupta 2017). Selenat i selenit se razlikuju prema pokretljivosti i apsorpciji unutar biljke, a metaboliziraju se tako da tvore organske spojeve Se (Li i sur. 2008). Iako selenoproteini nisu pronađeni kod viših biljaka, SeCys je temeljni međuprodukt korišten za proizvodnju drugih Se-aminokiselina i volatilnih metabolita Se (Mangiapane i sur. 2014). Homolozi gena koji kodiraju selenoproteine u drugim organizmima kao npr. glutation-peroksidazu (GPX), kod biljaka kodiraju cistein (Cys) umjesto SeCys (Novoselov i sur. 2002). Na temelju analiza *in silico* postavljena je hipoteza kako je esencijalni metabolizam Se primitivna značajka koja se izgubila tijekom evolucije viših biljaka i ostalih skupinama koje ne zahtijevaju Se (Pilon-Smits i Quinn 2010). Međutim, moguće je da pojedine biljke mogu posttranslacijski pretvoriti aminokiseline (npr. serin) u SeCys i tako sintetizirati selenoproteine.

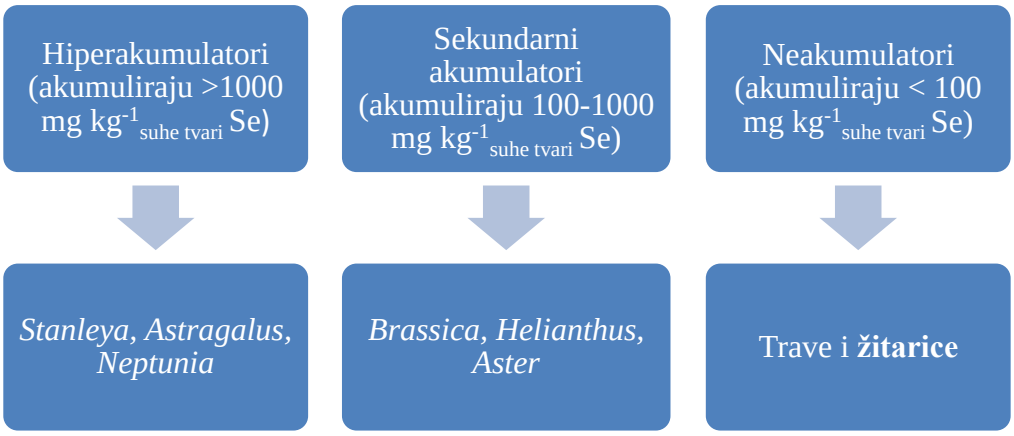
Korijen biljaka može primati Se u obliku selenata, selenita ili organskih spojeva, kao što su SeCys) i SeMet, ali ne može primati koloidno vezani elementarni Se ili metalne selenide (White i Broadley 2009). Mehanizam asimilacije selenata dobro je istražen. Biljka prima selenat preko korijena posredovanjem visokoafinitetnih prijenosnika za sulfate, iako različite biljne vrste pokazuju različitu selektivnost za sulfat ili selenat (Li i sur. 2008). Za selenit se mislilo da u biljku ulazi korijenom putem pasivne difuzije, no Li i suradnici (2008) su otkrili kako je asimilacija selenita aktivan proces koji je vjerojatno posredovan prijenosnicima za fosfate. Osim razlika u mehanizmima asimilacije, selenat i selenit se razlikuju i po pokretljivosti unutar biljaka. Selenat se lako prenosi od korijena do izdanka, dok selenit ili njegovi metabolički produkti imaju tendenciju akumulacije u korijenu (Li i sur. 2008). U preglednom radu Gupta i Gupta (2017) detaljno su objašnjeni proces asimilacije i metabolizam Se u biljci (Slika 1). Ukoliko biljka prima Se u obliku selenata, prvi korak u

asimilaciji Se je redukcija selenata u selenit. Za ovu pretvorbu potrebno je djelovanje dvaju enzima: ATP-sulfurilaze (APS) i APS-reduktaze (APR). APS katalizira hidrolizu ATP-a pri čemu nastaje adenozin-fosfoselenat, koji se dalje reducira do selenita djelovanjem APR-a. Selenit se zatim pretvara u selenid pomoću enzima sulfit-reduktaze. Selenid se tada prevodi u SeCys povezivanjem s O-acetilserinom (OAS) u prisutnosti enzima cistein-sintaze (CS). Ovisno o biljnoj vrsti i uvjetima okoliša SeCys se može pretvori u elementarni Se djelovanjem enzima SeCys-liaze (SL) ili se može metilirati u metil-SeCys (Me-SeCys) aktivnošću enzima selenocistein-metiltransferaze (SMT) ili se pak djelovanjem nekoliko različitih enzima može pretvoriti u SeMet. Pogrešna ugradnja SeCys ili SeMet u proteine može dovesti do narušavanja strukture i funkcije proteina, što predstavlja uzrok toksičnosti Se u biljkama (Pilon-Smits i Quinn 2010). Metiliarni oblici, Me-SeCys ili metil-SeMet (Me-SeMet) mogu se isparavanjem otpustiti u atmosferu kao netoksični dimetil-selenid (DMSe) u biljaka neakumulatora ili dimetil-diselenid (DMDSe) u biljaka hiperakumulatora (Pilon-Smits i Quinn 2010).




**Slika 1.** Shematski prikaz metabolizma Se unutar biljnih stanica. APS, ATP-sulfurilaza; APR, APS-reduktaza; CS, cistein-sintaza; DMDSe, dimetil-diselenid; DMSe, dimetil-selenid; Me-SeCys, metil-selenocistein; Me-SeMet, metil-selenometionin; OAS, O-acetilserin; SeCys, selenocistein; SehoCys, Se-homocistein; SeMet, selenometionin; SL, selenocistein-liaza; $SeO_3^{2-}$, selenit (anion); $SeO_4^{2-}$, selenat (anion); SMT, selenocistein-metil-transferaza; (preuzeto i prilagođeno prema Gupta i Gupta 2017).

Ovisno o akumulaciji Se unutar stanica, biljke su klasificirane kao: hiperakumulatori, sekundarni akumulatori i neakumulatori (Bodnar i sur. 2012; Galeas i sur. 2007; Slika 2). Hiperakumulatori imaju sposobnost akumuliranja većih količina Se u stanicama (>1000 mg $kg^{-1}_{suhe\ tvari}$) i uspješno rastu na tlima bogatim Se, npr. *Stanleya,* kozlinac (*Astragalus*), *Neptunia*, *Xylorhiza* (Gupta i Gupta 2017). Ove vrste sadrže metilirane oblike SeCys i SeMet koji upravo i omogućavaju spomenutu toleranciju. Neka istraživanja su pokazala kako hiperakumulatorne vrste mogu razlikovati S i Se (White i sur. 2007) te kako imaju metabolizam specifičan za Se. Budući da hiperakumulatorne vrste bolje rastu u prisustvu Se, može se pretpostaviti kako je Se esencijalan za navedene vrste. Međutim, još ne postoje dokazi o nužnosti Se za dovršetak životnog ciklusa ovih biljaka (Pilon-Smits i Quinn 2010). Sekundarni akumulatori pohranjuju Se i ne pokazuju nikakve znakove toksičnosti u rasponu od 100 do 1000 mg $kg^{-1}_{suhe\ tvari}$, npr. smeđa gorušica (*Brassica juncea* L.), uljana repica (*Brassica napus* L.), suncokret (*Helianthus*), zvjezdan (*Aster*), podlanak (*Camelina*), lucerna (*Medicago sativa* L.) (Gupta i Gupta 2017). Neakumulatori su one biljke koje pohranjuju Se u koncentracijama manjim od 100 mg $kg^{-1}_{suhe\ tvari}$ te ako rastu na Se bogatim tlima ne mogu preživjeti, zaostalog su rasta, a Se isparavaju u obliku DMSe, kao npr. trave i žitarice (Gupta i Gupta 2017).




**Slika 2.** Podjela biljaka ovisno o akumulaciji Se unutar stanica (preuzeto i prilagođeno prema Gupta i Gupta 2017).

### 1.3. Oksidacijski stres u biljnim stanicama

Oksidacijski je stres složeni kemijski i fiziološki fenomen koji prati gotovo sve biotičke i abiotičke stresne uvjete u višim biljkama i razvija se kao posljedica prekomjerne proizvodnje i akumulacije reaktivnih kisikovih jedinki (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS)

(Demidchik 2015). ROS u biljkama imaju dvostruku ulogu, kao toksični nusproizvodi aerobnog metabolizma, ali i kao ključni regulatori važni za rast, razvoj i obranu biljaka (Demidchik 2015). U uvjetima ravnoteže, ROS se uklanjaju različitim antioksidacijskim obrambenim mehanizmima (Foyer i Noctor 2005a). Ravnoteža između proizvodnje i uklanjanja ROS-a može biti narušena različitim abiotičkim i biotičkim čimbenicima stresa kao što su solni stres, UV zračenje, suša, teški metali, ekstremne temperature, nedostatak hranjivih tvari, onečišćenje zraka, herbicidi i napad patogena (Gill i Tuteja 2010). Poremećaj u ravnoteži dovodi do iznenadnog porasta unutarstaničnih razina ROS-a koji mogu uzrokovati značajnu štetu različitih staničnih struktura. Među mnogim ROS pronađenim u biološkim sustavima, za indukciju oksidacijskog stresa ključni su singletni kisik ($^1O_2$), hidroksilni radikal ($^{\bullet}OH$), vodikov peroksid ($H_2O_2$), superoksidni radikal ($O_2^{\bullet-}$) i dušikov oksid (NO) (Apel i Hirt 2004). ROS utječu na mnoge stanične funkcije, jer uzrokuju oštećenja nukleinskih kiselina, oksidaciju proteina i lipidnu peroksidaciju (LPO) (Foyer i Noctor 2005a). Hoće li ROS djelovati kao štetne, zaštitne ili signalne jedinke ovisi o osjetljivoj ravnoteži između proizvodnje i uklanjanja ROS-a na odgovarajućem mjestu i u odgovarajućem vremenu (Gratao i sur. 2005).

$H_2O_2$ predstavlja važnu signalnu molekulu uključenu u razvoj biljaka i njihov odgovor na okolišne uvjete. Relativno je stabilna molekula u usporedbi s $O_2^{\bullet-}$, $^{\bullet}OH$ i $^1O_2$. Slaba je kiselina bez nesparenih elektrona, odnosno nije slobodni radikal (Demidchik 2015). Može nastati direktno redukcijom kisika (reakcija katalizirana određenim oksidazama) ili neizravno putem redukcije ili dismutacije $O_2^{\bullet-}$ koji nastaje djelovanjem određenih oksidaza i peroksidaza ili prilikom prijenosa elektrona u fotosintetskim i respiratornim lancima (Mhamdi i sur. 2010). Biljke sadrže nekoliko različitih enzima koji mogu metabolizirati $H_2O_2$, a to su katalaza (CAT), askorbat-peroksidaza (APX), različite vrste peroksiredoksina, GPX i glutation S-transferaza (GST) (Mhamdi i sur. 2010). $H_2O_2$ ima dvostruku ulogu u biljkama: pri niskim koncentracijama djeluje kao signalna molekula uključena u molekularne mehanizme tolerancije različitih oblika biotičkog i abiotičkog stresa, dok pri povišenim koncentracijama dovodi do apoptoze ili programirane smrti stanice (Gill i Tuteja 2010; Quan i sur. 2008).

LPO je proces oksidacije, odnosno razgradnje višestruko nezasićenih masnih kiselina (engl. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA). Cjelokupni proces LPO sastoji se od tri faze: inicijacije, propagacije i terminacije. U fazi inicijacije LPO, prooksidans poput $^{\bullet}OH$, odvaja alilni vodik od molekule prekursora (PUFA) pri čemu nastaje lipidni radikal ($L^{\bullet}$). U aerobnim

uvjetima, L• brzo reagiraju s kisikom pri čemu nastaju peroksilni radikali (LOO•) koji odvajaju vodik iz susjednih molekula lipida pri čemu nastaju novi L• (nastavljaju lančanu reakciju) i lipidni hidroperoksidi (LOOH). Zbog lančane reakcije koju izazivaju L• ova faza naziva se fazom propagacije. U fazi terminacije, antioksidans poput vitamina E donira vodikov atoma radikalu LOO• čime nastaje radikal vitamina E, koji reagira s drugim LOO• što u konačnici dovodi do nastanka nereaktivnih produkata. Glavni primarni produkti LPO su LOOH (Ayala i sur. 2014). No, tijekom LPO mogu nastati i različit aldehidi kao sekundarni produkti, a najčešći su malondialdehid (MDA), propanal, heksanal i 4-hidroksinonenal (4-HNE), koji predstavljaju biomarkere oksidacijskog stresa. Smatra se da MDA pokazuje najjača mutagena svojstva, dok je 4-HNE najtoksičniji (Ayala i sur. 2014). Povećana razina LPO dovodi do oštećenja membrana (smanjenje fluidnosti i povećanje propusnosti), što posljedično uzrokuje raspadanje organela, oksidaciju i disfunkciju proteina, DNA i RNA molekula (Demidchik 2015).

### 1.3.1. Komponente antioksidacijskog odgovora - enzimski antioksidansi

CAT i APX su antioksidacijski enzimi koji su dio biljnog antioksidacijskog obrambenog mehanizma, čija je uloga uklanjanje $H_2O_2$ u biljnim stanicama. CAT je sveprisutni hemoprotein koji katalizira dismutaciju $H_2O_2$ u molekule $H_2O$ i $O_2$, prema jednadžbi $2H_2O_2 \leftrightarrow 2H_2O + O_2$ (Berg i sur. 2013). Građen je od 4 polipeptidna lanca veličine 50-70 kDa organiziranih u tetramer, pri čemu svaki monomer u aktivnom centru sadrži molekulu hema (Mhamdi i sur. 2010). Važan je enzim za uklanjanje $H_2O_2$ nastalog u peroksisomima djelovanjem oksidaza, koje su uključene u oksidaciju β-masnih kiselina, fotorespiraciju i razgradnju purina (Gill i Tuteja 2010). CAT se razlikuje od ostalih enzima jer ne zahtijeva redukcijsko sredstvo dok katalizira reakciju dismutacije, a ima i visoku specifičnost za $H_2O_2$ (Mhamdi i sur. 2010). Prometni broj CAT jedan je od najvećih: jedna molekula CAT može reducirati oko 6 milijuna molekula $H_2O_2$ u $H_2O$ i $O_2$ u minuti (Gill i Tuteja 2010). Zbog svih navedenih svojstava, CAT je neophodan u detoksikaciji ROS-a tijekom oksidacijskog stresa.

APX je dio askorbat-glutationskog ciklusa, glavnog sustava uklanjanja $H_2O_2$ u biljnim stanicama, u kojem ima ključnu ulogu u procesu kataliziranja pretvorbe $H_2O_2$ u $H_2O$, koristeći askorbat (AsA) kao specifični donor elektrona (Caverzan i sur. 2012). Za redukciju jedne molekule $H_2O_2$ potrebne su dvije molekule AsA, a produkt reakcije su dvije molekule $H_2O$ i dvije molekule monodehidroksiaskorbata (Ambriović Ristov 2007). Postoje različiti izooblici

ovog enzima prisutni u različitim substaničnim kompartimentima, kao što su kloroplasti, mitohondriji, peroksisomi i citosol (Caverzan i sur. 2012). Također, APX je najvažniji enzim za uklanjanje $H_2O_2$, organskih hidroperoksida i lipidnih peroksida kako ne bi došlo do nastajanja jako reaktivnih radikala u citosolu te u stromi i tilakoidima kloroplasta (Ambriović Ristov 2007).

### 1.3.2. Komponente antioksidacijskog odgovora - neenzimski antioksidansi

Jedan od glavnih staničnih neenzimskih antioksidansa je glutation (GSH). GSH je tripeptid male molekularne mase građen od aminokiselina glutamata, cisteina i glicina. U biljnim tkivima prisutan je u milimolarnim koncentracijama, a pojavljuje se ili u reduciranom obliku (GSH) sa slobodnom tiolnom skupinom ili u oksidiranom obliku (GSSG) s disulfidnom vezom između dvije molekule GSH (Gill i sur. 2013). Unutar biljnih tkiva većinom se nalazi u reduciranom obliku, a nalazi se u gotovo svim staničnim kompartimentima (citosolu, endoplazmatskom retikulumu, vakuoli, mitohondrijima, kloroplastima, peroksisomima, ali i u apoplastu) (Gill i Tuteja 2010). Prisutnost tiolne skupine (-SH) u cisteinu, njezina kemijska reaktivnost i visoka topljivost u vodi daju GSH glavna biološka svojstva i čine ga ključnim metabolitom za obavljanje brojnih uloga. Dokazano je kako GSH sudjeluje u brojnim procesima vezanim uz rast i razvoj biljaka uključujući regulaciju diferencijacije stanica, regulaciju stanične smrti i senescencije, sudjeluje u odgovoru biljaka na razne stresne uvjete iz okoliša, u regulaciji rezistencije na napad patogena i regulaciji enzimskih reakcija (Gill i sur. 2013; Rausch i Wachter 2005). Budući je GSH jedan od ključnih metabolita u biljnim stanicama uključen u mehanizam obrane od oksidacijskih oštećenja uzrokovanih ROS-om (Gill i Tuteja 2010), Tausz i suradnici (2004) i Grill i suradnici (2001) su predložili upotrebu GSH kao markera oksidacijskog stresa u biljkama. GSH je potreban za održavanje normalnog reduciranog stanja stanica kako bi se neutralizirali inhibicijski učinci oksidacijskog stresa uzrokovanog ROS-om (Meyer 2008). Brojna istraživanja potvrđuju da je reducirani oblik GSH u biljkama (barem u listovima) izuzetno konstantan, ali je vrlo osjetljiv na ekstremni oksidacijski stres uzrokovan nizom stresnih čimbenika, te da tijekom neenzimskih reakcija s različitim oblicima ROS-a GSH prelazi u GSSG (Anjum i sur. 2012).

### 1.4. Utjecaj Se na oksidacijski i antioksidacijski status biljaka

Niska koncentracija Se ima pozitivan utjecaj na rast biljaka i toleranciju različitih stresnih uvjeta. Brojnim je istraživanjima dokazano kako niske koncentracije Se štite biljke od različitih vrsta abiotičkog stresa kao što su hladnoća (Chu i sur. 2010), suša (Hasanuzzaman i Fujita 2011), isušivanje (Pukacka i sur. 2011) i stres uzrokovan teškim metalima (Pandey i Gupta 2015; Kumar i sur. 2012; Slika 3). Međutim, istraživanja utjecaja selena na biljke koje nisu bile izložene stresu i dalje su vrlo rijetka. Ríos i suradnici (2009) su istraživali utjecaj različitih koncentracija selenita i selenata (5, 10, 20, 40, 60, 80 i 120 μM) na proizvodnju i detoksikaciju $H_2O_2$ u salati (*Lactuca sativa* cv. Philipus) koja nije bila izložena stresu. Dobiveni su rezultati pokazali kako je selenat manje toksičan oblik Se u odnosu na selenit. Biljke su tolerirale i pozitivno reagirale na tretman selenatom, a došlo je i do povećanja rasta (do koncentracije od 40 μM selenata). Za razliku od selenata, primjena selenita izazvala je veću koncentraciju $H_2O_2$ u listovima i veću indukciju LPO. Također, kod biljaka tretiranih selenatom došlo je do povećanja aktivnosti enzima koji uklanjaju $H_2O_2$, osobito APX-a i GPX-a. Zabilježeno je i povećanje koncentracije neenzimskih antioksidacijskih spojeva kao što su AsA i GSH. Nowak i suradnici (2004) proučavali su utjecaj različitih koncentracija selenita (0,05, 0,15, 0,45 mM $kg^{-1}$) u tlu na aktivnost oksidoreduktaza kod pšenice (*Triticum aestivum* L.). Kod biljaka tretiranih s 0,05 mM $kg^{-1}$ selenita došlo je do povećanja aktivnosti CAT i peroksidaze, dok je najveća koncentracija (0,45 mM $kg^{-1}$) uzrokovala smanjenje aktivnosti oba enzima. I ovo istraživanje potvrđuje kako niže koncentracija Se pozitivno utječu na antioksidacijski status biljaka, dok veće koncentracije djeluju kao prooksidans.

Pri koncentracijama većim od optimalnih Se pokazuje toksično djelovanje. Toksičnost u biljkama izazvana je putem dva mehanizma, jedan je malformacija proteina, a drugi je indukcija oksidacijskog stresa. Naime, do malformacije proteina dolazi uslijed pogrešne ugradnje SeCys i SeMet umjesto Cys i Met u polipeptidni lanac (Gupta i Gupta 2017). U polipeptidnom lancu, Cys ostaci igraju važnu ulogu u strukturi i funkciji proteina, pomažu u stvaranju disulfidnih mostova, enzimskoj katalizi i stvaranju veznih mjesta za metale (Gupta i Gupta 2017). Stoga je zamjena Cys s SeCys štetna za strukturu i funkciju proteina, jer je SeCys veći, reaktivniji i lakše se deprotonirana u odnosu na Cys (Hondal i sur. 2012). Drugi mehanizam toksičnosti je spomenuta indukcija oksidacijskog stresa. Naime, pri visokim koncentracijama Se djeluje kao prooksidans stvarajući velike količine ROS-a što uzrokuje oksidacijski stres u biljkama (Gupta i Gupta 2017). Asimilacija visokih koncentracija Se putem korijena biljke može pokazati brojne simptome toksičnosti koji uključuju zaustavljanje

rasta, kloroze, sušenje listova, smanjenje sinteze proteina i preranu smrt biljke (Hasanuzzaman i sur. 2010). Između biljaka akumulatora i neakumulatora postoje značajne razlike u maksimalnoj količini Se koju mogu apsorbirati bez pokazivanja simptoma toksičnosti. Također, prag koncentracije Se može ovisiti i o starosti biljke kao i o koncentraciji sulfata u okolišu (Hasanuzzaman i sur. 2010).

Akbulut i Çakır (2010) su proučavali utjecaj selenata na fiziološke i biokemijske karakteristike kultivara ječma (*Hordeum vulgare* L.). Kod klijanaca ječma tretiranih s 2, 4, 8, i 16 ppm selenata, došlo je do značajnog povećanja sadržaja reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline (TBARS), ali i do povećanja aktivnosti CAT, APX-a, glutation-reduktaze (GR) i GST-a, dok aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) nije značajno izmijenjena. Iako je došlo do značajnog povećanja aktivnosti antioksidacijskih enzima, sami enzimi nisu dovoljni kako bi zaštitili stanice ječma od toksičnosti Se, stoga autori pretpostavljaju kako kod Se-tolerantnih vrsta mora postojati dodatni mehanizam za detoksikaciju Se.




**Slika 3.** Pozitivna djelovanja selena na biljke (preuzeto i prilagođeno prema Gupta i Gupta 2017).

## 1.5. Cilj diplomskog rada

Cilj ovog istraživanja bio je:

- odrediti utjecaj različitih kemijskih oblika i različitih koncentracija Se na oksidacijski stres i antioksidacijski odgovor klijanaca pšenice (*Triticum aestivum L.*, sorta Kraljica)
- utvrditi postoje li razlike između utjecaja selenita i selenata na oksidacijski i antioksidacijski odgovor klijanaca pšenice
- utvrditi tkivno-specifične razlike u oksidacijskom i antioksidacijskom odgovoru na primjenu oba oblika Se.

# 2. MATERIJALI I METODE

## 2.1. Sterilizacija sjemenki i postavljanje eksperimenta

U ovom istraživanju korišteno je sjeme ozime pšenice sorte Kraljica, visokorodne i najraširenije sorte u proizvodnji u Republici Hrvatskoj, dobivene na Poljoprivrednom institutu u Osijeku. Za potrebe pokusa, sjeme pšenice bilo je potrebno dobro isprati u $dH_2O$ kako bi se uklonile grube nečistoće, te sterilizirati. Sjeme je kratko držano u 96%-om etanolu uz miješanje, nakon čega je dodatno sterilizirano 8 minuta u 1%-tnoj otopinu izosana s dodatkom Tweena (1 µL/100 mL), uz neprestano miješanje. Po završetku sterilizacije, sjeme je temeljito isprano $dH_2O$ nakon čega je prebačeno u $dH_2O$ te je držano u hladnjaku na +4 °C radi procesa bubrenja. Nakon 24 sata sjeme je postavljeno na klijanje u sterilne plastične Petrijeve zdjelice (50 sjemenki/Petrijevci). Vata i filter papir unutar Petrijevih zdjelica prethodno su natopljeni s 15 mL otopine selenata i selenita različitih koncentracija, osim kontrolnih uzoraka koji su tretirani s 15 mL vode. U istraživanju su korišteni natrijev selenat ($Na_2SeO_4$) i natrijev selenit ($Na_2SeO_3$). Tretman je vršen s 5 koncentracija selenata (0,1, 1, 5, 10, 100 mg $L^{-1}$) i 5 koncentracija selenita (0,1, 1, 5, 10, 50 mg $L^{-1}$). Istraživanje utjecaja različitih koncentracija selenata i selenita na količinu produkata LPO, koncentraciju $H_2O_2$ i aktivnosti CAT i APX, u korijenu i izdanku pšenice, provedeno je u 9 ponavljanja (3 petrijevke po ponavljanju), dok je količina tGSH u pojedinim skupinama određivana u 7 ponavljanja (2 petrijevke po ponavljanju). Pšenica je uzgajana u klima-sobi na temperaturi od 25 °C pri svjetlosnom režimu 16 sati dan/8 sati noć tijekom 7 dana, uz redovito razlijevanje s $dH_2O$ (Slika 4).



**Slika 4.** Pšenica (*Triticum aestivum* L.) uzgajana u klima-sobi (fotografirala: Magdalena Matić).

## 2.2. Određivanje količine produkata lipidne peroksidacije

Količina produkata LPO određena je metodom koju su opisali Verma i Dubey (2003), mjerenjem TBARS-a, uglavnom MDA. Tkivo izdanka i korijena usitnjeno je u tekućem dušiku pomoću tarionika i tučka, te je oko 0,2 g usitnjenog praha ekstrahirano s 1 mL 0,1%-tne otopine trikloroctene kiseline (TCA). Nakon 15 min inkubacije na ledu, homogenati su centrifugirani 5 min pri 6 000 g na temperaturi od +4 °C. Supernatantu (0,5 mL) je dodan 1 mL otopine 0,5%-tne tiobarbiturne kiseline u 20%-tnoj otopini TCA. Reakcijska smjesa je promiješana na vibracijskoj miješalici te potom inkubirana 30 min u vodenoj kupelji na +95 °C, prilikom čega dolazi do raspada lipidnih peroksida te nastaju produkti (većinom MDA) koji reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom. Nakon isteka inkubacije, reakcija je zaustavljena držanjem 10 min na ledu, nakon čega je reakcijska smjesa centrifugirana 10 min pri 22 000 g na temperaturi od +4 °C. Apsorbancija dobivenog supernatanta je mjerena pri valnim duljinama od 532 nm i 600 nm, pri čemu se apsorbancija pri 600 nm oduzima od apsorbancije pri 532 nm zbog korekcije za nespecifičnu reakciju. Količina TBARS-a tj. MDA određena je pomoću jednadžbe pravca standardnog dijagrama, a kao standard korišten je 1,1,3,3-tetrametoksipropan. Rezultati su izraženi kao nmol po gramu svježe tvari (nmol $g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$).

## 2.3. Određivanje koncentracije vodikovog peroksida

Koncentracija $H_2O_2$ u tkivu izdanka i korijena pšenice određena je metodom koju su opisali Mukherjee i Choudhuri (1983). Tkivo izdanka i korijena usitnjeno je u tekućem dušiku pomoću tarionika i tučka. $H_2O_2$ je ekstrahiran iz oko 0,1 g usitnjenog tkiva 15 min u 1 mL ledeno-hladnog acetona. Napravljena je i slijepa proba s 1 mL hladnog acetona bez biljnog tkiva. Homogenati i slijepa proba centrifugirani su 5 min pri 6 000 g na temperaturi od +4 °C. Dobiveni supernatant kvanitativno je prebačen u drugu tubicu te mu je dodano 400 μL otopine titan-sulfata i 500 μL koncentriranog amonijevog hidroksida ($NH_4OH$), pri čemu nastaje kompleks titan-peroksida. Reakcija nastanka kompleksa titan-peroksida iznimno je egzotermna reakcija pa je sve potrebno raditi na ledu. Titan-peroksid odvojen je centrifugiranjem tijekom 10 min na 15 000 g na temperaturi od +4 °C. Dobiveni bijeli talog je zatim, uz miješanje na vibracijskoj miješalici, otopljen s 1 mL 2M otopine $H_2SO_4$. Otopljeni talog potrebno je prije mjerenja apsorbancije još jednom centrifugirati 10 min pri 15 000 g na +4 °C. Apsorbancija je mjerena pri valnoj duljini od 415 nm. Koncentracija $H_2O_2$ izračunata je iz standardne krivulje otopina poznate koncentracije $H_2O_2$. Koncentracija $H_2O_2$ u tkivu izdanka i korijena pšenice izražena je kao nmol po gramu svježe tvari (nmol $g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$).

## 2.4. Određivanje ukupnog glutationa

Ukupni glutation (tGSH) mjeri se kinetičkom metodom, u kojoj GSH uzrokuje kontinuiranu redukciju 5,5-ditiobis 2-nitrobenzoične kiseline (DTNB) uslijed koje nastaje žuto obojeni produkt 5-tio-2-nitrobenzoična kiselina (TNB) i GSSG koji se reciklira pomoću enzima GR-a i NADPH (jednadžbe (1) i (2); Nair i sur. 1991; Akerboom i Sies 1981). Uslijed nastanka TNB-a dolazi do porasta apsorbancije koja se mjeri na 412 nm.

$$2\ GSH\ +\ DTNB \longrightarrow GSSG\ +\ 2\ TNB \qquad (1)$$

$$GSSG + NADPH + H^{+} \xrightarrow{\text{glutation-reduktaza}} NADP^{+}\ +\ 2\ GSH \qquad (2)$$

Tkivo izdanka i korijena usitnjeno je u tarioniku s tučkom uz korištenje tekućeg dušika. Zatim je oko 0,1 g tkiva homogenizirano u 1 mL 5%-tne otopine sulfosalicilne kiseline (SSA). Prije centrifugiranja, dobiveni homogenat držan je 10 min na ledu, nakon čega je centrifugiran 10 min pri 10 000 g i +4 °C. Dobiveni supernatant je korišten za određivanja količine tGSH (tGSH=GSH+GSSG). Reakcijska smjesa za mjerenje tGSH sastojala se od deproteiniziranog uzorka, 100 mM kalij-fosfatnog pufera (pH 7,0) s 1 mM EDTA, 1,115 U $mL^{-1}$ GR-a, DTNB-a koncentracije 0,03 mg $mL^{-1}$ u konačnom volumenu od 1,05 µL. U UV/VIS kiveti reakcija je započeta, nakon 5 min inkubacije, dodatkom NADPH konačne koncentracije od 48 µM. Porast apsorbancije praćen je na 412 nm tijekom 5 min. Količina tGSH određena je pomoću standardne krivulje s GSH. Količina tGSH izražena je u nmol po gramu svježe tvari (nmol $g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$).

## 2.5. Priprema proteinskih ekstrakata za određivanje aktivnosti katalaze i askorbat-peroksidaze

Korijen i izdanak pšenice usitnjavani su u tekućem dušiku pomoću tarionika i tučka. Usitnjenom tkivu (0,3 g) dodano je 1,5 mL hladnog ekstrakcijskog pufera (100 mM Na-fosfatni pufer, pH 7,0, 1 mM EDTA) nakon čega je uzorak homogeniziran snažnim miješanjem na vibracijskoj miješalici. Proteini su zatim ekstrahirani stajanjem 10 min na ledu te centrifugiranjem 15 min pri 20 000 g i na +4 °C. Dobiveni supernatanti korišteni su za spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima CAT i APX, te određivanje koncentracije proteina.

## 2.6. Mjerenje aktivnosti enzima katalaze

Aktivnost CAT određena je metodom po Aebi-u (1984). Neposredno prije mjerenja pripremljena je reakcijska smjesa koja se sastoji od 0,036% otopine $H_2O_2$ u 50 mM kalij-fosfatnom puferu (pH=7,0). Aktivnost enzima mjerena je u UV-kiveti, pri čemu je u 1450 µL reakcijske smjese dodano 50 µL proteinskog ekstrakta izdanka, odnosno 100 µL proteinskog ekstrakta korijena. Pad apsorbancije praćen je spektrofotometrijski pri 240 nm svakih 10 sek tijekom 3 min. Specifična aktivnost enzima izražena je kao količina (µmol) razgrađenog $H_2O_2$ po minuti po miligramu proteina, odnosno u jedinicama aktivnosti CAT po miligramu proteina (U $mg^{-1}_{proteina}$; U = µmol $min^{-1}_{proteina}$).

## 2.7. Mjerenje aktivnosti enzima askorbat-peroksidaze

Aktivnost APX određena je metodom koju su opisali Nakano i Asada (1981). Reakcijska smjesa sastojala se od 930 µL 50 mM kalij-fosfatnog pufera s 0,1 mM EDTA, 10 µL askorbinske kiseline koncentracije 50 mM i 50 µL proteinskog ekstrakta (razrijeđenog i nerazrijeđenog). Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi, reakcija je započeta dodatkom 10 µL $H_2O_2$ (12 mM). Pad apsorbancije mjeren je spektrofotometrijski pri 290 nm svake sekunde tijekom 3 min. Specifična aktivnost enzima izražena je kao količina (µmol) razgrađenog askorbata po minuti po miligramu proteina, odnosno u jedinicama aktivnosti APX po miligramu proteina (U $mg^{-1}_{proteina}$; U = µmol $min^{-1}_{proteina}$).

## 2.8. Određivanje koncentracije topljivih proteina

Koncentracija topljivih proteina u proteinskim ekstraktima određena je metodom po Bradford-u (1976), koristeći albumin goveđeg seruma kao standard. Razrijeđeni i nerazrijeđeni proteinski ekstrakti (10 µL) pipetirani su u mikrotitarsku pločicu (96 jažica) u triplikatu, nakon čega je dodan reagens Bradford. Nakon 5 min inkubacije pri sobnoj temperaturi, apsorbancija je mjerena pri 595 nm.

## 2.9. Statistička obrada podataka

Dobiveni podaci obrađeni su u statističkom programu Statistica 13.3 (TIBCO Inc., SAD). Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (SD). Normalnost distribucije testirana je Shapiro-Wilksovim testom, a homogenost varijanci Levene testom. S obzirom na normalnu distribuciju i homogenost varijanci korištena je jednofaktorska analiza varijance (engl. *One-way* ANOVA), kako bi se utvrdilo postojanje razlika između skupina

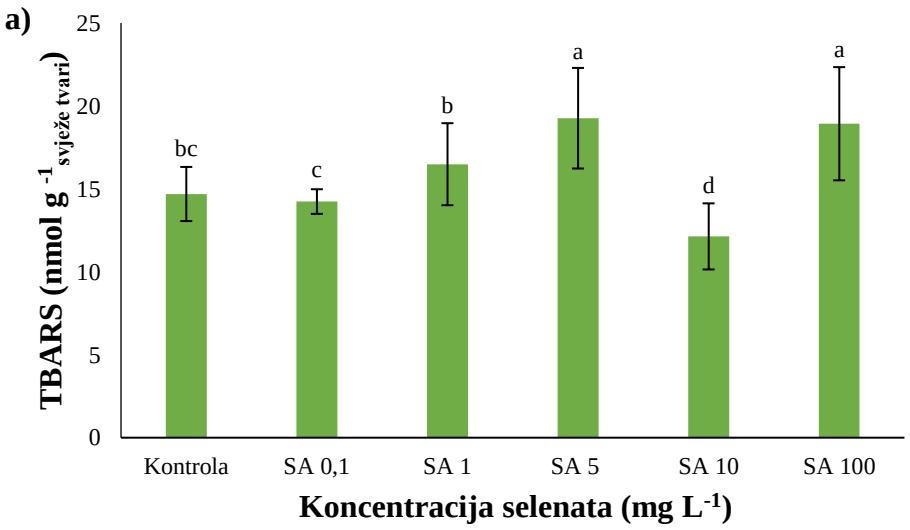
pšenice tretiranih različitim koncentracijama selenata i selenita. Nakon što je utvrđeno postojanje razlika, proveden je Duncan *post hoc* test kako bi se odredilo između kojih skupina postoji razlika. Svi testovi provedeni su na razini značajnosti od 5% ($p < 0,05$).

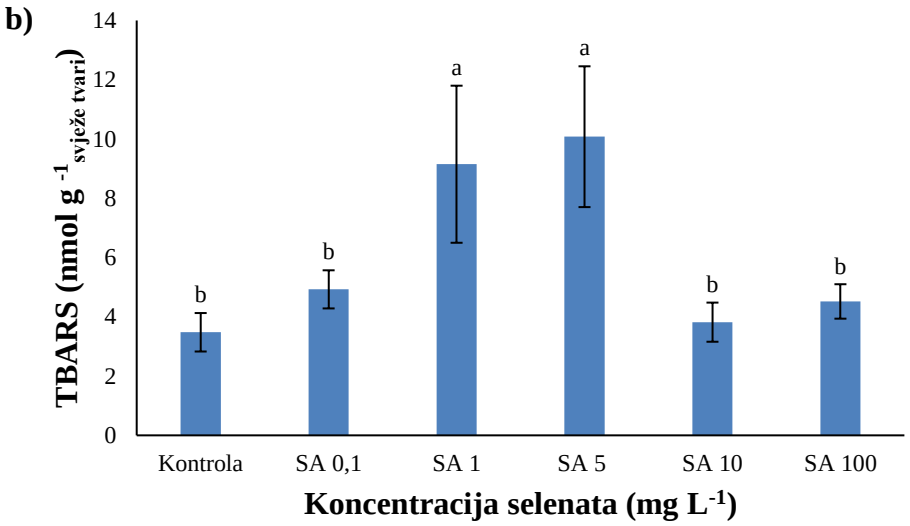
# 3. REZULTATI

## 3.1. Utjecaj različitih koncentracija selenata na količinu produkata lipidne peroksidacije u izdanku i korijenu pšenice

Razina LPO u izdanku i korijenu pšenice praćena je mjerenjem količine TBARS-a. Rezultati su pokazali statistički značajno povećanje TBARS-a u izdancima pšenice tretirane selenatom u koncentracijama od 5 i 100 mg $L^{-1}$, dok je koncentracija od 10 mg $L^{-1}$ selenata uzrokovala smanjenje TBARS-a odnosu na kontrolu (Slika 5, a). Nakon tretmana s 5 mg $L^{-1}$ selenata, količina TBARS-a iznosila je 19,261 ± 2,290 nmol $g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$, odnosno povećala se u odnosu na kontrolu za 31,12%, dok je tretman s 100 mg $L^{-1}$ selenata uzrokovao povećanje od 28,25% (18,928 ± 2,347 nmol $g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$), u odnosu na kontrolu. Količina TBARS-a nakon tretmana s 10 mg $L^{-1}$ selenata iznosila 12,136 ± 1,684 nmol $g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$, odnosno smanjila se u odnosu na kontrolu za 17,39%.

Rezultati mjerenja količine TBARS-a u korijenu pokazali su statistički značajno povećanje kod pšenice tretirane s 1 i 5 mg $L^{-1}$ selenata, u odnosu na kontrolu (Slika 5, b). Količina TBARS-a je nakon tretmana s 1 mg $L^{-1}$ selenata iznosila 9,148 ± 2,650 nmol $g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$, odnosno povećala se u odnosu na kontrolu za 163,02%. Tretmana s 5 mg $L^{-1}$ selenata uzrokovao je povećanje TBARS-a od 189,76% (10,078 ± 2,375 nmol $g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$) u odnosu na kontrolu. Ostale koncentracije selenata (0,1, 10 i 100 mg $L^{-1}$) također su uzrokovale povećanje količine TBARS-a, ali povećanje nije bilo statistički značajno.



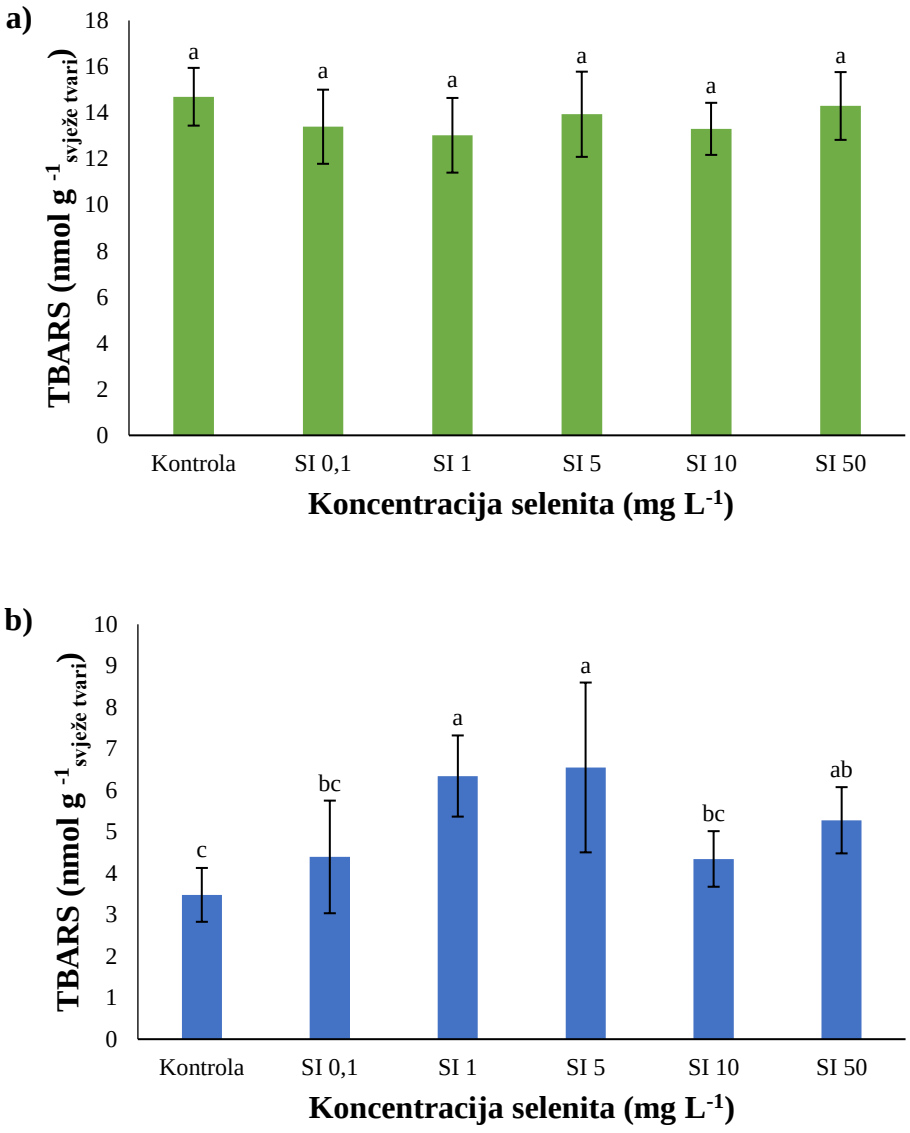



**Slika 5.** Količina TBARS-a u izdanku (a) i korijenu (b) pšenice nakon tretmana s različitim koncentracijama selenata (SA 0,1, SA 1, SA 5, SA 10 i SA 100 mg $L^{-1}$). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Duncan *post hoc* testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($p < 0,05$).

### 3.2. Utjecaj različitih koncentracija selenita na količinu produkata lipidne peroksidacije u izdanku i korijenu pšenice

Razina LPO u izdanku i korijenu pšenice praćena je mjerenjem količine TBARS-a. Rezultati su pokazali kako tretmani različitim koncentracijama selenita nisu značajno utjecali na količinu TBARS-a u izdanku pšenice (Slika 6, a).

Rezultati mjerenja količine TBARS-a u korijenu su pokazali statistički značajno povećanje kod pšenice tretirane s 1, 5 i 50 mg $L^{-1}$ selenita, u odnosu na kontrolu (Slika 6, b). Izmjerena količina TBARS-a u skupinama sa statističkim značajnim povećanjem iznosila je 6,343 ± 0,979 nmol $g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$ (1 mg $L^{-1}$ selenita), 6,550 ± 2,047 nmol $g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$ (5 mg $L^{-1}$ selenita) i 5,277 ± 0,798 nmol $g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$ (50 mg $L^{-1}$ selenita). Količina TBARS-a se u korijenu tretirane pšenice, u odnosu na kontrolu, povećala za 82,37% kod tretmana s 1 mg $L^{-1}$ selenita, za 88,33% kod tretmana s 5 mg $L^{-1}$ selenita, te za 51,73% kod tretmana s 50 mg $L^{-1}$ selenita. Ostale koncentracije selenita (0,1 i 10 mg $L^{-1}$) također su uzrokovale povećanje količine TBARS-a u korijenu pšenice, ali povećanje nije bilo statistički značajno.



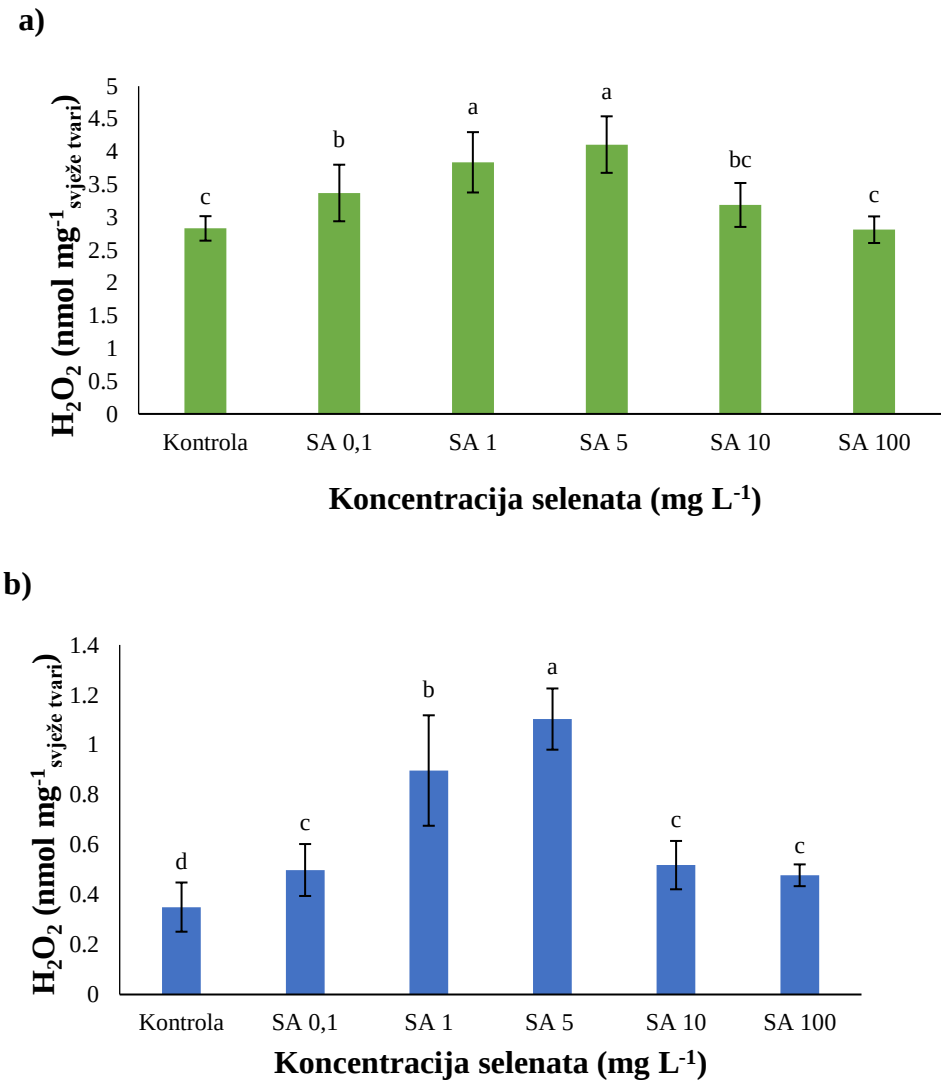

**Slika 6.** Količina TBARS-a u izdanku (a) i korijenu (b) pšenice nakon tretmana s različitim koncentracijama selenita (SI 0,1, SI 1, SI 5, SI 10 i SI 50 mg $L^{-1}$). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Duncan *post hoc* testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($p < 0,05$).

### 3.3. Utjecaj različitih koncentracija selenata na koncentraciju $H_2O_2$ u izdanku i korijenu pšenice

Rezultati mjerenja koncentracije $H_2O_2$ u izdanku pšenice pokazali su statistički značajno povećanje, u odnosu na kontrolu, kod pšenice koja je bila tretirana s 0,1, 1 i 5 mg $L^{-1}$ selenata (Slika 7, a). Izmjerena koncentracije $H_2O_2$ u izdanku pšenice sa statistički značajnim povećanjem iznosila je 3,371 ± 0,431 nmol $g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$ (0,1 mg $L^{-1}$ selenata), 3,839 ± 0,460

nmol $g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$ (1 mg $L^{-1}$ selenata) i 4,109 ± 0,431 nmol $g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$ (5 mg $L^{-1}$ selenata). Koncentracija $H_2O_2$ se u izdanku pšenice tretirane selenatom, u odnosu na kontrolu, povećala redom za 19,12% kod tretmana s 0,1 mg $L^{-1}$ selenata, za 35,65% kod tretmana s 1 mg $L^{-1}$ selenata, te za 45,19% kod tretmana s 5 mg $L^{-1}$ selenata. Koncentracija od 10 mg $L^{-1}$ također je uzrokovala povećanje koncentracije $H_2O_2$, ali povećanje nije bilo statistički značajno. Samo je najveća koncentracija selenata (100 mg $L^{-1}$) uzrokovala smanjenje koncentracije $H_2O_2$, ali smanjenje nije bilo statistički značajno.

Rezultati mjerenja koncentracije $H_2O_2$ u korijenu pšenice pokazali su statistički značajno povećanje kod tretmana sa svim primijenjenim koncentracijama selenata (0,1, 1, 5, 10, 100 mg $L^{-1}$) u odnosu na kontrolu (Slika 7, b). Izmjerena koncentracija $H_2O_2$, u skupinama sa statističkim značajnim povećanjem, iznosila je redom 0,499 ± 0,104 nmol $g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$ (0,1 mg $L^{-1}$ selenata), 0,897 ± 0,221 nmol $g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$ (1 mg $L^{-1}$ selenata), 1,103 ± 0,123 nmol $g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$ (5 mg $L^{-1}$ selenata), 0,518 ± 0,097 nmol $g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$ (10 mg $L^{-1}$ selenata) i 0,477 ± 0,044 nmol $g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$ (100 mg $L^{-1}$ selenata). Najveći porast koncentracije $H_2O_2$, u odnosu na kontrolu, zabilježen je kod tretmana s 1 mg $L^{-1}$ selenata (156,29%) i 5 mg $L^{-1}$ selenata (215,14%), dok se kod ostalih tretmana koncentracija $H_2O_2$ povećala za 42,57% kod tretmana s 0,1 mg $L^{-1}$ selenata, za 48% kod tretmana s 10 mg $L^{-1}$, te za 36,29% kod tretmana s 100 mg $L^{-1}$.



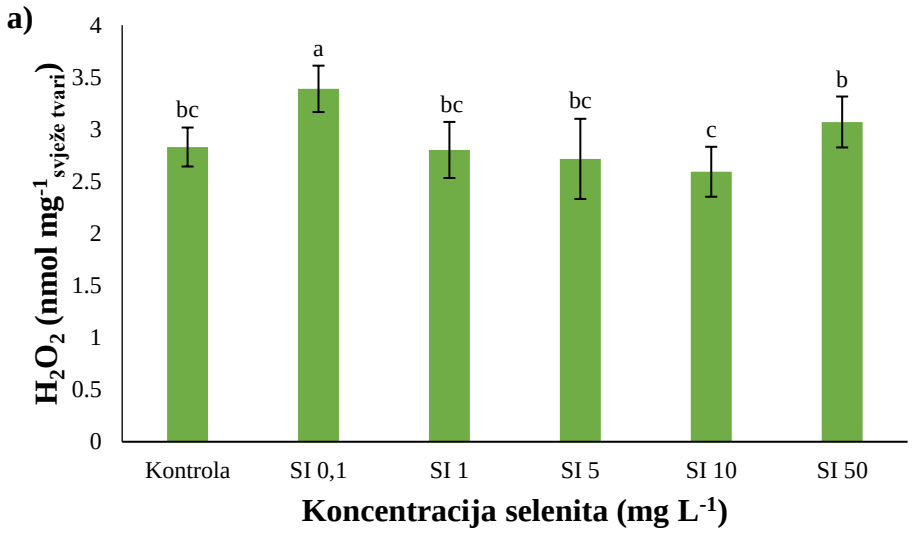

**Slika 7.** Koncentracija $H_2O_2$ u izdanku (a) i korijenu (b) pšenice nakon tretmana s različitim koncentracijama selenata (SA 0,1, SA 1, SA 5, SA 10 i SA 100 mg $L^{-1}$). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Duncan *post hoc* testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($p < 0,05$).

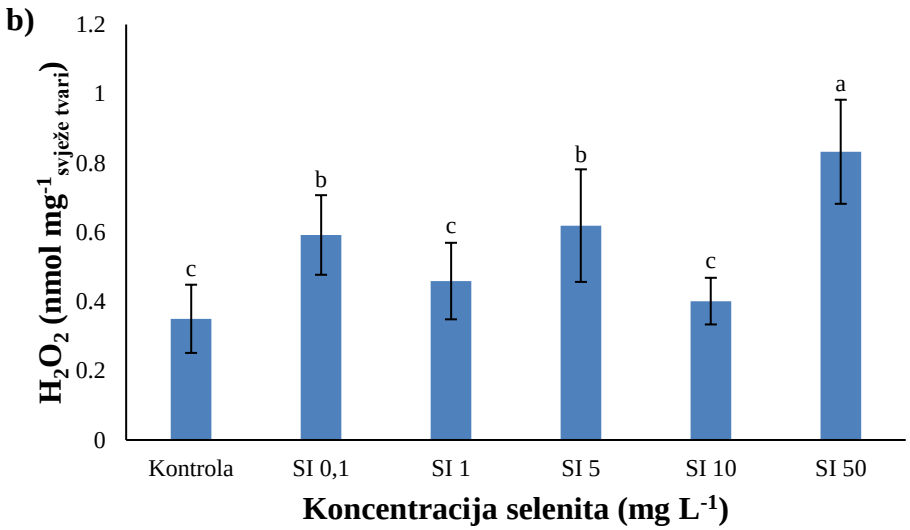
### 3.4. Utjecaj različitih koncentracija selenita na koncentraciju $H_2O_2$ u izdanku i korijenu pšenice

Rezultati mjerenja koncentracije $H_2O_2$ u izdanku pšenice pokazali su statistički značajno povećanje, u odnosu na kontrolu, samo kod pšenice koja je tretirana s najmanjom koncentracijom selenita (Slika 8, a). Koncentracija $H_2O_2$ u izdanku nakon tretmana s 0,1 mg $L^{-1}$ selenita iznosila je 3,389 ± 0,460 nmol $g^{-1}_{svježe\ tvari}$, odnosno povećala se u odnosu na kontrolu za 19,75%. I najveća je koncentracija selenita (50 mg $L^{-1}$) uzrokovala povećanje

koncentracije $H_2O_2$, ali povećanje nije bilo statistički značajno. Ostale su koncentracije selenita (1, 5 i 10 mg $L^{-1}$) uzrokovale smanjenje koncentracije $H_2O_2$, ali smanjenje nije bilo statistički značajno.

Koncentracija $H_2O_2$ u korijenu pšenice statistički je značajno porasla kod tretmana s koncentracijama 0,1, 5 i 50 mg $L^{-1}$ selenita (Slika 8, b). Izmjerena koncentracija $H_2O_2$ u skupinama sa statističkim značajnim povećanjem iznosila je 0,592 ± 0,115 nmol $g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$ (0,1 mg $L^{-1}$ selenita), 0,619 ± 0,163 nmol $g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$ (5 mg $L^{-1}$ selenita) i 0,832 ± 0,150 nmol $g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$ (50 mg $L^{-1}$ selenita). Koncentracija $H_2O_2$ se u korijenu pšenice povećala, u odnosu na kontrolu, za 69,14% kod tretmana s 0,1 mg $L^{-1}$ selenita, za 76,86% kod tretmana s 5 mg $L^{-1}$ selenita, dok je najveći porast od 137,71% zabilježen kod tretmana s najvećom koncentracijom selenita (50 mg $L^{-1}$). Koncentracije selenita od 1 i 10 mg $L^{-1}$ također su uzrokovale povećanje koncentracije $H_2O_2$ u korijenu, ali povećanje nije bilo statistički značajno.





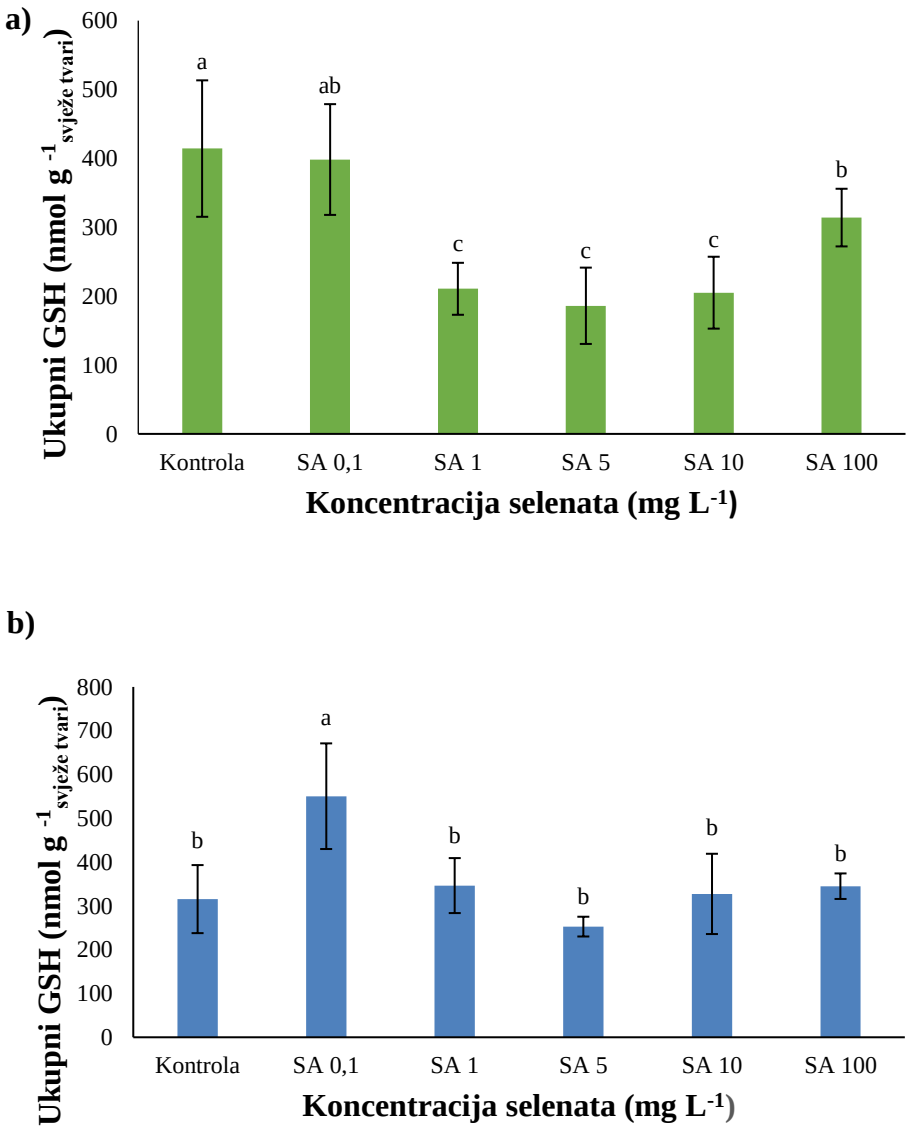

**Slika 8.** Koncentracija $H_2O_2$ u izdanku (a) i korijenu (b) pšenice nakon tretmana s različitim koncentracijama selenita (SI 0,1, SI 1, SI 5, SI 10 i SI 50 mg $L^{-1}$). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Duncan *post hoc* testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($p < 0,05$).

### 3.5. Utjecaj različitih koncentracija selenata na koncentraciju tGSH u izdanku i korijenu pšenice

U izdanku pšenice, koncentracija tGSH u odnosu na kontrolu, značajno se smanjila uslijed tretmana s 1, 5, 10 i 100 mg $L^{-1}$ selenata (Slika 9, a). Izmjerena koncentracija tGSH u skupinama sa statističkim značajnim smanjenjem iznosila je 210,660 ± 37,717 nmol $g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$ (1 mg $L^{-1}$ selenata), 185,998 ± 55,4 nmol $g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$ (5 mg $L^{-1}$ selenata), 205,012 ± 52,188 nmol $g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$ (10 mg $L^{-1}$ selenata) i 314,035 ± 41,837 nmol $g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$ (100 mg $L^{-1}$ selenata). Koncentracija tGSH u izdanku pšenice se smanjila, u odnosu na kontrolu, za 49,14% kod tretmana s 1 mg $L^{-1}$ selenata, za 55,10% kod tretmana s 5 mg $L^{-1}$ selenata, za 50,51% kod tretmana s 10 mg $L^{-1}$ selenata, te za 24,19% kod tretmana s 100 mg $L^{-1}$ selenata. Najmanja korištena koncentracija selenata (0,1 mg $L^{-1}$) također je uzrokovala smanjenje koncentracije tGSH, ali smanjenje nije bilo statisitički značajno.

Rezultati mjerenja koncentracije tGSH u korijenu pšenice, pokazali su statistički značajno povećanje, u odnosu na kontrolu, samo kod pšenice koja je tretirana s najmanjom koncentracijom selenata (Slika 9, b) Koncentracija tGSH u korijenu pšenice nakon tretmana s 0,1 mg $L^{-1}$ selenata iznosila je 550,467 ± 120,617 nmol $g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$, odnosno povećala se u

odnosu na kontrolu za 74,46%. Koncentracije selenata od 1, 5, 10 i 100 mg $L^{-1}$ nisu uzrokovale statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu.



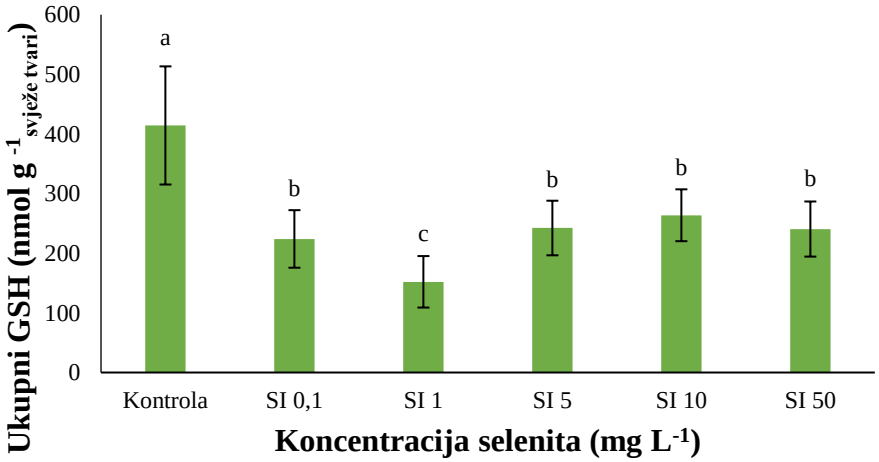

**Slika 9.** Koncentracija tGSH u izdanku (a) i korijenu (b) pšenice nakon tretmana s različitim koncentracijama selenata (SA 0,1, SA 1, SA 5, SA 10 i SA 100 mg $L^{-1}$). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Duncan *post hoc* testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($p < 0,05$).

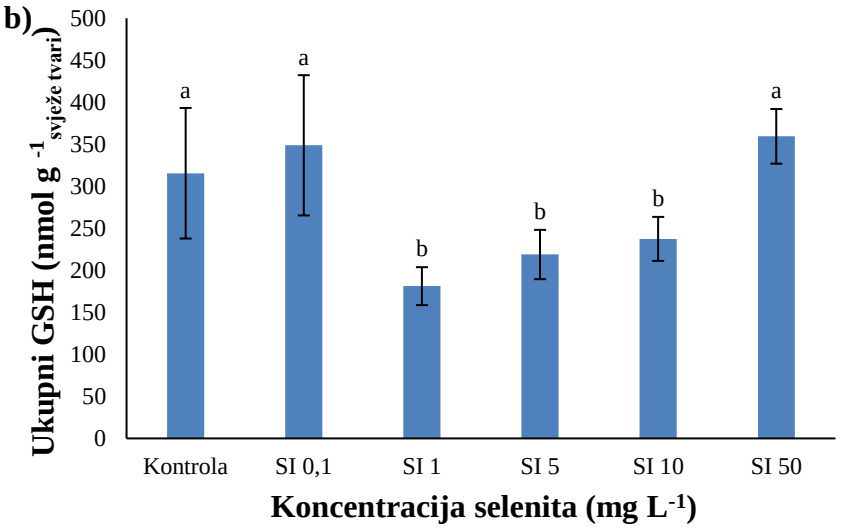
### 3.6. Utjecaj različitih koncentracija selenita na koncentraciju tGSH u izdanku i korijenu pšenice

U izdanku pšenice, koncentracija tGSH značajno se smanjila uslijed svih primijenjenih koncentracija selenita (0,1, 1, 5, 10, 50 mg $L^{-1}$) u odnosu na kontrolu (Slika 10, a). Izmjerena koncentracija tGSH u svim skupinama iznosila je redom 223,932 ± 48,266 nmol $g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$ (0,1 mg $L^{-1}$ selenita), 152,058 ± 43,156 nmol $g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$ (1 mg $L^{-1}$ selenita), 242,286 ± 45,774 nmol $g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$ (5 mg $L^{-1}$ selenita), 263,659 ± 43,471 nmol $g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$ (10 mg $L^{-1}$ selenita) i 240,544 ± 46,245 nmol $g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$ (50 mg $L^{-1}$ selenita). Koncentracija tGSH u izdanku pšenice se, u odnosu na kontrolu, smanjila za 45,94% kod tretmana s 0,1 mg $L^{-1}$ selenita, za 63,29% kod tretmana s 1 mg $L^{-1}$ selenita, za 41,51% kod tretmana s 5 mg $L^{-1}$ selenita, za 36,35% kod tretmana s 10 mg $L^{-1}$ selenita, te za 41,93% uslijed tretmana s 50 mg $L^{-1}$ selenita.

U korijenu pšenice, koncentracija tGSH značajno se smanjila, u odnosu na kontrolu, uslijed tretmana s koncentracijama selenita od 1, 5 i 10 mg $L^{-1}$ (Slika 10, b). Izmjerena koncentracija tGSH u skupinama sa statističkim značajnim smanjenjem iznosila je 181,204 ± 22,573 nmol $g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$ (1 mg $L^{-1}$ selenita), 218,836 ± 29,322 nmol $g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$ (5 mg $L^{-1}$ selenita) i 237,413 ± 26,187 nmol $g^{-1}_{\text{svježe tvari}}$ (10 mg $L^{-1}$ selenita). Koncentracija tGSH se u korijenu pšenice tretirane selenitom, u odnosu na kontrolu, smanjila za 42,57% (1 mg $L^{-1}$ ), 30,64% (5 mg $L^{-1}$) i za 24,76% (10 mg $L^{-1}$) Najmanja (0,1 mg $L^{-1}$) i najveća (50 mg $L^{-1}$) koncentracija selenita nisu uzrokovale statistički značajne promjene.

**a)**





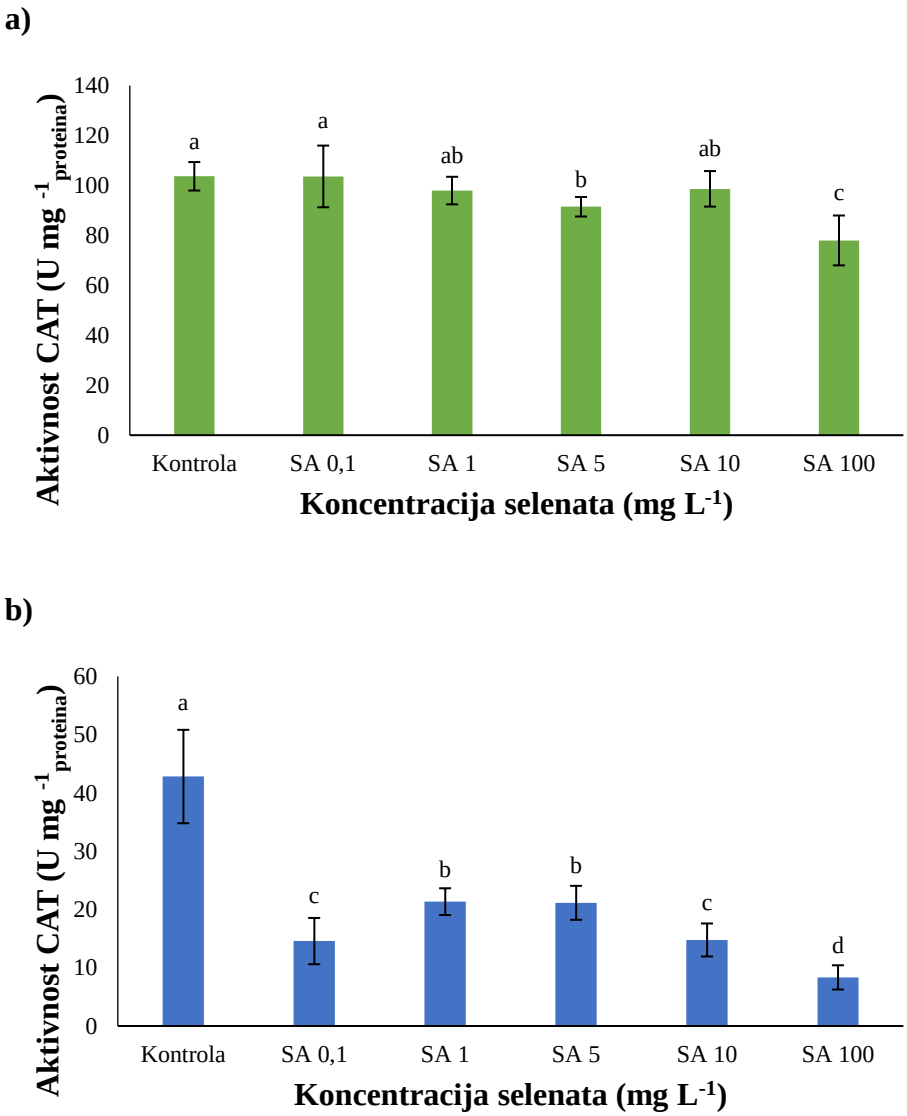

**Slika 10.** Koncentracija tGSH u izdanku (a) i korijenu (b) pšenice nakon tretmana s različitim koncentracijama selenita (SI 0,1, SI 1, SI 5, SI 10 i SI 50 mg $L^{-1}$). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Duncan *post hoc* testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($p < 0,05$).

### 3.7. Utjecaj različitih koncentracija selenata na aktivnost CAT u izdanku i korijenu pšenice

Aktivnost CAT u izdanku pšenice značajno se smanjila, u odnosu na kontrolu, nakon tretmana s otopinom selenata koncentracije 5 i 100 mg $L^{-1}$ (Slika 11, a). Aktivnost CAT je u izdanku pšenice tretirane s 5 mg $L^{-1}$ selenata iznosila 91,486 ± 3,901 U $mg^{-1}_{proteina}$, odnosno aktivnost se u odnosu na kontrolu smanjila za 11,76%. Tretman s 100 mg $L^{-1}$ selenata uzrokovao je smanjenje aktivnosti CAT za 24,77% (77,998 ± 9,984 U $mg^{-1}_{proteina}$), u odnosu na kontrolu. Tretman ostalim koncentracijama selenata (0,1, 1 i 10 mg $L^{-1}$) nije uzrokovao statistički značajne promjene.

U korijenu pšenice, aktivnost CAT značajno se smanjila uslijed svih primijenjenih koncentracija selenata (0,1, 1, 5, 10, 100 mg $L^{-1}$) u odnosu na kontrolu (Slika 11, b). Izmjerena aktivnost CAT iznosila je redom 14,573 ± 3,971 U $mg^{-1}_{proteina}$ (0,1 mg $L^{-1}$ selenata), 21,342 ± 2,298 U $mg^{-1}_{proteina}$ (1 mg $L^{-1}$ selenata), 21,142 ± 2,916 U $mg^{-1}_{proteina}$ (5 mg $L^{-1}$ selenata), 14,763 ± 2,831 U $mg^{-1}_{proteina}$ (10 mg $L^{-1}$ selenata) i 8,340 ± 2,082 U $mg^{-1}_{proteina}$ (100 mg $L^{-1}$ selenata). Aktivnost enzima se u korijenu pšenice tretirane otopinom selenata smanjila, u odnosu na kontrolu, redom za 65,96% (0,1 mg $L^{-1}$), 50,15% (1 mg $L^{-1}$), 50,62% (5 mg $L^{-1}$) i

65,52% (10 mg $L^{-1}$). Najveće smanjenje aktivnosti CAT od 80,52%, u odnosu na kontrolu, zabilježeno je u korijenu pšenice tretirane otopinom selenata koncentracije 100 mg $L^{-1}$.



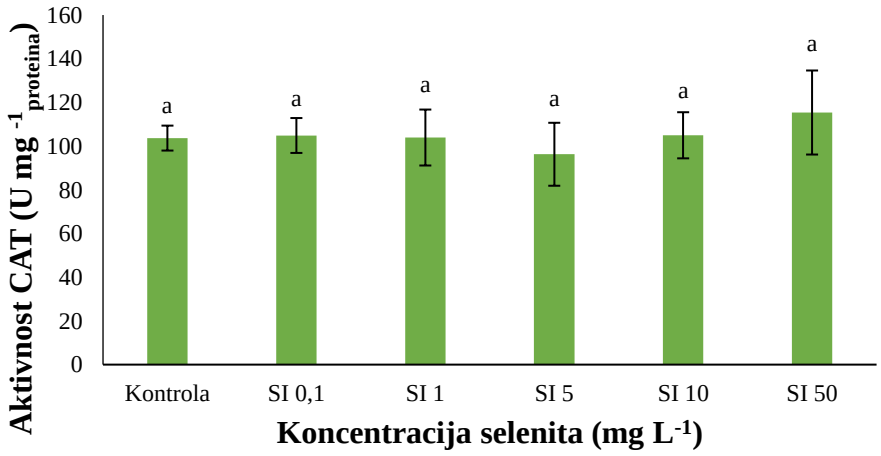

**Slika 11.** Aktivnost katalaze (CAT) u izdanku (a) i korijenu (b) pšenice nakon tretmana s različitim koncentracijama selenata (SA 0,1, SA 1, SA 5, SA 10 i SA 100 mg $L^{-1}$). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Duncan *post hoc* testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($p < 0,05$).

### 3.8. Utjecaj različitih koncentracija selenita na aktivnost CAT u izdanku i korijenu pšenice

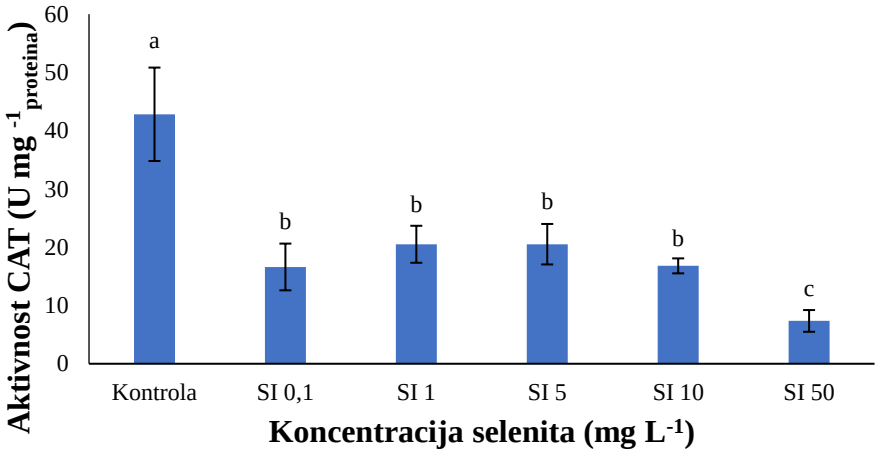
U izdanku pšenice, tretman svim primijenjenim koncentracijama selenita (0,1, 1, 5, 10, 50 mg $L^{-1}$) nije značajno utjecao na aktivnost CAT, u odnosu na kontrolu (Slika 12, a).

Za razliku od izdanka, u korijenu pšenice se aktivnost CAT značajno smanjila uslijed svih primijenjenih koncentracija selenita (0,1, 1, 5, 10, 50 mg $L^{-1}$) u odnosu na kontrolu (Slika 12, b). Izmjerena aktivnost CAT iznosila je redom 16,610 ± 4,010 U $mg^{-1}_{proteina}$ (0,1 mg $L^{-1}$ selenita), 20,507 ± 3,176 U $mg^{-1}_{proteina}$ (1 mg $L^{-1}$ selenita), 20,518 ± 3,476 U $mg^{-1}_{proteina}$ (5 mg $L^{-1}$ selenita), 16,798 ± 1,288 U $mg^{-1}_{proteina}$ (10 mg $L^{-1}$ selenita) i 7,351 ± 1,866 U $mg^{-1}_{proteina}$ (50 mg $L^{-1}$ selenita). Aktivnost enzima se u korijenu pšenice tretirane otopinom selenita smanjila, u odnosu na kontrolu, redom za 61,21% (0,1 mg $L^{-1}$), 52,10% (1 mg $L^{-1}$), 52,08% (5 mg $L^{-1}$) i 60,77% (10 mg $L^{-1}$). Najveće smanjenje aktivnosti CAT od 82,83%, u odnosu na kontrolu, zabilježeno je u korijenu pšenice tretirane otopinom selenita koncentracije 50 mg $L^{-1}$.

**a)**



**b)**



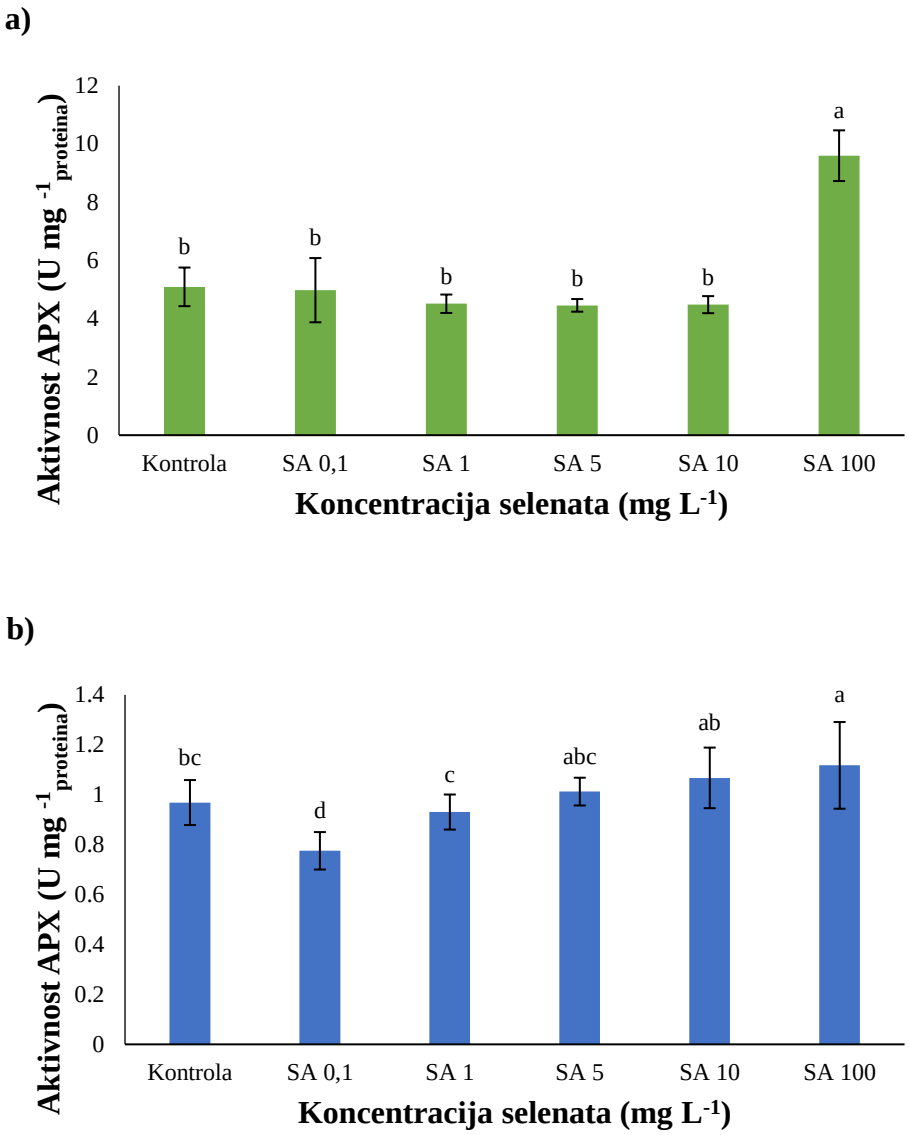

**Slika 12.** Aktivnost katalaze (CAT) u izdanku (a) i korijenu (b) pšenice nakon tretmana s različitim koncentracijama selenita (SI 0,1, SI 1, SI 5, SI 10 i SI 50 mg $L^{-1}$). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Duncan *post hoc* testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($p < 0,05$).

### 3.9. Utjecaj različitih koncentracija selenata na aktivnost APX u izdanku i korijenu pšenice

Nakon tretmana pšenice s različitim koncentracijama selenata, aktivnost APX u izdanku se statistički značajno povećala, u odnosu na kontrolu, jedino kod tretmana s najvećom koncentracijom selenata (100 mg $L^{-1}$; Slika 13, a). Ostali tretmani selenatom (0,1, 1, 5 i 10 mg $L^{-1}$) nisu uzrokovali statistički značajne promjene u odnosu na kontrolu. Aktivnost APX u izdanku tretiranim s 100 mg $L^{-1}$ selenata iznosila 9,595 ± 0,871 U $mg^{-1}_{proteina}$, odnosno aktivnost se povećala za 88,43% u odnosu na kontrolu.

U korijenu pšenice, rezultati tretmana različitim koncentracijama selenata pokazali su (Slika 13, b) statistički značajnu razliku između kontrolne skupine i skupina tretiranih s najmanjom (0,1 mg $L^{-1}$) i najvećom koncentracijom (100 mg $L^{-1}$) selenata. Koncentracija od 0,1 mg $L^{-1}$ selenata uzrokovala je statistički značajno smanjenje aktivnosti APX u korijenu, dok je koncentracija od 100 mg $L^{-1}$ selenata uzrokovala statistički značajno povećanje aktivnosti APX. Aktivnost APX je u skupini tretiranoj s 0,1 mg $L^{-1}$ selenata iznosila 0,775 ± 0,075 U $mg^{-1}_{proteina}$, odnosno aktivnost enzima se smanjila za 19,94%, dok se aktivnost APX kod tretmana s 100 mg $L^{-1}$ selenata povećala za 15,39% (1,117 ± 0,174 U $mg^{-1}_{proteina}$), u

odnosu na kontrolu. Koncentracije selenata od 5 i 10 mg $L^{-1}$ uzrokovale su povećanje aktivnosti APX u korijenu, ali povećanje nije bilo statistički značajno.

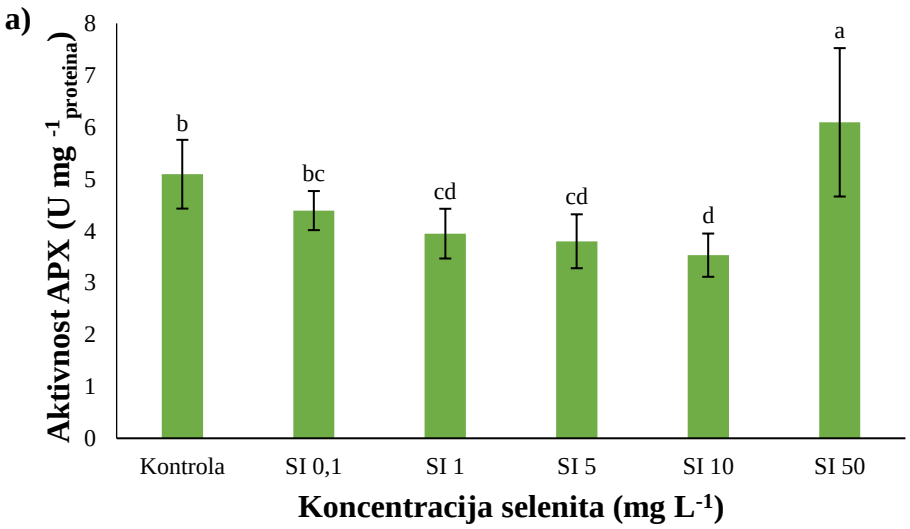



**Slika 13.** Aktivnost askorbat-peroksidaze (APX) u izdanku (a) i korijenu (b) pšenice nakon tretmana s različitim koncentracijama selenata (SA 0,1, SA 1, SA 5, SA 10 i SA 100 mg $L^{-1}$). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Duncan *post hoc* testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($p < 0,05$).

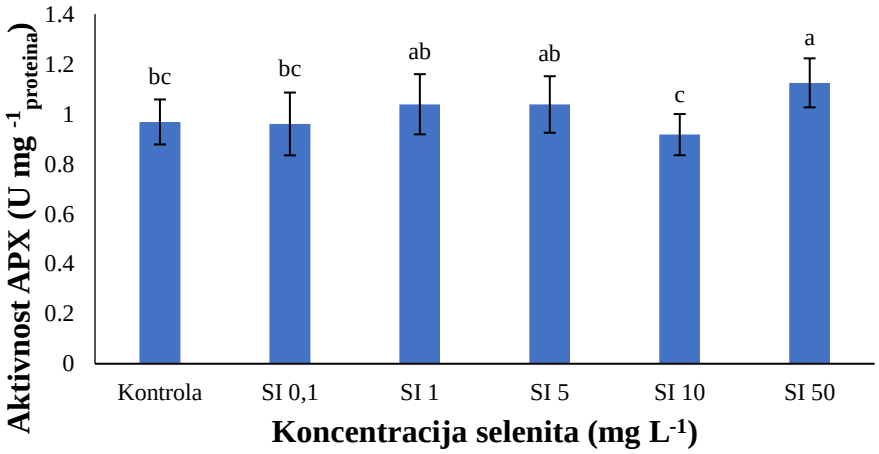
### 3.10. Utjecaj različitih koncentracija selenita na aktivnost APX u izdanku i korijenu pšenice

U izdanku pšenice, nakon tretmana s različitim koncentracijama selenita, zabilježeno je značajno povećanje i smanjenje aktivnosti APX ovisno o primijenjenoj koncentraciji (Slika 14, a). Tako su tretmani s otopinama selenita koncentracije 1, 5 i 10 mg $L^{-1}$ uzrokovali statistički značajno smanjenje aktivnosti APX, za 22,51% (1 mg $L^{-1}$), za 25,39% (5 mg $L^{-1}$), te za 30,66% (10 mg $L^{-1}$), u odnosu na kontrolu. Izmjerene aktivnosti APX iznosile su redom 3,946 ± 0,480 U $mg^{-1}_{proteina}$ (1 mg $L^{-1}$), 3,799 ± 0,520 U $mg^{-1}_{proteina}$ (5 mg $L^{-1}$) i 3,531 ± 0,417 U $mg^{-1}_{proteina}$ (10 mg $L^{-1}$). Koncentracija od 50 mg $L^{-1}$ selenita uzrokovala je statistički značajno povećanje aktivnosti APX za 19,66% (6,093 ± 1,431 U $mg^{-1}_{proteina}$) u odnosu na kontrolu. Najmanja primijenjena koncentracija selenita (0,1 mg $L^{-1}$) uzrokovala je smanjenje aktivnosti APX koje nije bilo statistički značajno.

Nakon tretmana pšenice s različitim koncentracijama selenita, aktivnost APX u korijenu se statistički značajno povećala, u odnosu na kontrolu, jedino kod tretmana s najvećom koncentracijom selenita (50 mg $L^{-1}$; Slika 14, b). Ostali tretmani selenitom (0,1, 1, 5 i 10 mg $L^{-1}$) nisu uzrokovali značajne promjene u odnosu na kontrolu. Aktivnost APX je u korijenu pšenice tretirane s 50 mg $L^{-1}$ selenita iznosila 1,125 ± 0,098 U $mg^{-1}_{proteina}$, odnosno aktivnost enzima se povećala za 15,98% u odnosu na kontrolu.



**b)**




**Slika 14.** Aktivnost askorbat-peroksidaze (APX) u izdanku (a) i korijenu (b) pšenice nakon tretmana s različitim koncentracijama selenita (SI 0,1, SI 1, SI 5, SI 10 i SI 50 mg $L^{-1}$). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Duncan *post hoc* testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($p < 0,05$).

## 4. RASPRAVA

Iako se smatra da Se nije esencijalan za više biljke, brojna su istraživanja pokazala da Se može stimulirati rast i razvoj, te povećati otpornost i antioksidacijski kapacitet biljaka (Chu i sur. 2010). Suprotno tomu, povišene koncentracije Se mogu biti toksične za biljke, životinje i ljude. Granica između pozitivnog djelovanja Se i njegove toksičnosti vrlo je uska te ovisi o kemijskom obliku, koncentraciji Se i ostalim okolišnim regulacijskim faktorima (Shardendu i sur. 2003). Slično kao i drugi aerobni organizmi, biljke proizvode ROS kao dio normalnog staničnog metabolizma, pri čemu ROS djeluju kao signalne molekule važne za regulaciju i koordinaciju brojnih procesa (rast i razvoj, stanični ciklus, programirana smrt stanice, odgovor na abiotički stres, obrana od patogena i drugi). Suprotno tome, povišene razine ROS-a i produkata njihovih reakcija vrlo su reaktivne i toksične te mogu dovesti do pojave oksidacijskog stresa (Gill i sur. 2013). Glavni pokazatelji oksidacijskog stresa određivani u okviru ovog istraživanja bili su količina produkata LPO i koncentracija $H_2O_2$. Akbulut i Çakır (2010) utvrdili su značajno povećanje količine TBARS-a u izdanku klijanaca ječma koje je bilo proporcionalno s porastom koncentracija selenata (2, 4, 8 i 16 ppm). Ovakav trend povećanja TBARS-a u izdanku uočen je i u našem istraživanju, ali samo do koncentracije od 5 mg $L^{-1}$ selenata. U korijenu je tretman selenatom uzrokovao značajno povećanje količine TBARS-a kod skupina tretiranih s koncentracijama od 1 i 5 mg $L^{-1}$ selenata. Što se tiče djelovanja selenita, pokazano je kako selenit ne utječe značajno na količinu TBARS-a u izdanku pšenice, dok su u korijenu koncentracije od 1, 5 i 50 mg $L^{-1}$ selenita uzrokovale statistički značajno povećanje količine TBARS-a.

$H_2O_2$ predstavlja jedan od oblika ROS-a pronađenih u biološkim sustavima uključenih u indukciju LPO. U izdanku su samo niže koncentracije selenata (0,1, 1 i 5 mg $L^{-1}$) uzrokovale statistički značajno povećanje koncentracije $H_2O_2$, dok su u korijenu pšenice sve korištene koncentracije selenata uzrokovale statistički značajno povećanje $H_2O_2$. U izdanku pšenice je samo tretman najmanjom koncentracijom selenita (0,1 mg $L^{-1}$) uzrokovao statistički značajno povećanje koncentracije $H_2O_2$, dok je tretman selenitom u korijenu uzrokovao intenzivnije promjene u koncentraciji $H_2O_2$. Promatrajući rezultate našeg istraživanja moguće je uočiti kako oba oblika Se puno intenzivnije djeluju na pokazatelje oksidacijskog stresa u korijenu pšenice, što upućuje na tkivno-specifične razlike u oksidacijskom i antioksidacijskom odgovoru izdanka i korijena pšenice. Ovakav rezultat moguća je posljedica različitog načina transporta selenata i selenita unutar biljke. Selenat se lako prenosi od korijena do izdanka, dok se selenit primarno akumulira u korijenu (Zayed i

sur. 1998). Povećana koncentracija $H_2O_2$ posljedično bi mogla uzrokovati povećanje LPO, ali u našem istraživanju takav trend nije uočen kod svih tretmana. Jedan od mogućih razloga zbog kojih koncentracija $H_2O_2$ i količina TBARS-a u našem istraživanju nisu u korelaciji je što su i ostali oblici ROS-a, čija koncentracija nije mjerena u okviru ovog istraživanja, također mogli uzrokovati povećanje LPO. Također, zbog relativno dugog životnog vijeka i visoke propusnosti kroz membrane, sve veći broj autora ističe ulogu $H_2O_2$ kao sekundarnog glasnika u prijenosu signala koji nastaju djelovanjem ROS-a (Huang i sur. 2002; Neill i sur. 2002; Yang i Poovaiah 2002). Istraživanja su pokazala da su ROS, posebno $H_2O_2$, središnja komponenta kaskade prijenosa signala uključenih u prilagodbu biljaka na promjenjive uvjete u okolišu (Neill i sur. 2002). Iako mogu djelovati kao štetne jedinke, ROS također djeluju i kao sekundarni glasnici u različitim staničnim procesima, uključujući toleranciju stresnih uvjeta iz okoliša (Yan i sur. 2007; Neill i sur. 2002; Desikan i sur. 2001). Hoće li ROS djelovati kao štetne, zaštitne ili signalne jedinke ovisi o osjetljivoj ravnoteži između proizvodnje i uklanjanja ROS-a na odgovarajućem mjestu i u odgovarajućem vremenu (Gratao i sur. 2005). Zbog višestrukih uloga ROS-a, neophodno je da stanice imaju mehanizam kontrole njihove razine kako bi se izbjegla oksidativna oštećenja, ali i kako se ROS ne bi u potpunosti uklonili (Sharma i sur. 2012).

Kako bi smanjile količinu ROS-a u stanicama, biljke su razvile različite zaštitne mehanizme. Jedan od mehanizama je enzimski antioksidacijski sustav koji uključuje enzime kao što su CAT, APX, SOD, GPX i GST (Mittler i sur. 2004; Wagner i sur. 2002). Također, postoji i neenzimski antioksidacijski sustav, a jedan od glavnih staničnih neenzimskih antioksidansa je GSH. GSH je neophodan za održavanje normalnog redoks stanja stanice kako bi se neutralizirao inhibicijski učinak oksidacijskog stresa uzrokovanog ROS-om (Meyer 2008). Osim toga, GSH regenerira stvaranje AsA, drugog u vodi topljivog antioksidansa, putem askorbat-glutationskog ciklusa (Foyer i Halliwell 1976). GSH i drugi sulfhidrilni spojevi mogu imati važnu ulogu u mehanizmima tolerancije Se. Freeman i suradnici (2010) utvrdili su da je mehanizam tolerancije Se kod *Stanleya pinnata* (Brassicaceae) povezan s povećanim razinama AsA, GSH, ukupnog S i neproteinskih -SH skupina. U našem istraživanju jedino je tretman najmanjom koncentracijom selenata (0,1 mg $L^{-1}$) uzrokovao statistički značajno povećanje količine tGSH u korijenu pšenice, što u ovom slučaju ukazuje na pozitivno djelovanje Se pri nižim koncentracijama. Za razliku od korijena tretiranog s različitim koncentracijama selenata, u izdanku tretiranom sa selenatom došlo je do statistički značajnog smanjenja količine tGSH. Primijenjene koncentracije selenita također su

uzrokovale statistički značajno smanjenje količine tGSH i u izdanku i korijenu pšenice. Ukoliko se intenzitet stresa poveća, obično se smanjuje količina GSH, a redoks stanje stanice pomiče se prema oksidaciji što dovodi do pogoršanja sustava (Tausz i sur. 2004). Važan čimbenik u određenim redoks signalnim putevima je i promjena omjera GSH/GSSG zbog uklanjana ROS-a, uključujući $H_2O_2$ (Millar i sur. 2003). Naime, tijekom neenzimskih reakcija s različitim oblicima ROS-a, GSH prelazi u GSSG (Anjum i sur. 2012). Foyer i Noctor (2005b) i Millar i suradnici (2003) smatraju da je omjer GSH/GSSG važan indikator stanične redoks ravnoteže, stoga bi omjer GSH/GSSG možda bio točniji pokazatelj antioksidacijskog statusa klijanaca pšenice. GSH može kemijski reagirati s $O_2^{\bullet-}$, $^{\bullet}OH$ i $H_2O_2$ i tako izravno djelovati kao hvatač slobodnih radikala. Također, GSH može zaštititi makromolekule (proteine, lipide, DNA) stvaranjem adukata izravno s reaktivnim elektrofilima (glutationilacija) ili djelovanjem kao proton donor u prisutnosti ROS-a ili organskih slobodnih radikala pri čemu nastaje GSSG (Sharma i sur. 2012). Kod brojnih je biljnih vrsta dokazano kako konjugacija GSH s lipidnim peroksidima, toksičnim produktima metabolizma ili ksenobioticima također utječe na njegovu koncentraciju (Anderson i Davis 2004; Dixon i sur. 2002). Reakcija konjugacije je katalizirana djelovanjem GST-a, čija je aktivnost inducirana abiotičkim stresom (Coleman i sur. 1997). Konjugacija se odvija u citoplazmi, a nastali se konjugati prenose u vakuolu gdje se dalje obrađuju (Dixon i sur. 2002). Kada se govori o GSH, osim GST-a, vrlo je važno mjeriti i aktivnosti ostalih enzima koji ga u svojim reakcijama troše ili pak obnavljaju, kao što su GR i GPX. U istraživanju Akbulut i Çakır (2010) uočeno je značajno povećanje aktivnosti GST-a i GR-a u klijancima ječma izloženim višim koncentracijama Se. Budući da u našem istraživanju nije mjerena aktivnost navedenih enzima, ne može se sa sigurnošću znati kakav su utjecaj ovi enzimi imali na količinu tGSH. Jedan od mogućih uzroka smanjenja količine tGSH u našem istraživanju je negativan utjecaj Se na sintezu GSH (Terry i sur. 2000). Naime, toksičnost Se proizlazi iz zamjene S sa Sa u aminokiselinama pri čemu nastaju Se-aminokiseline. Glavni razlog promjene biološke aktivnosti proteina je ugradnja Se-aminokiselina u proteine što dovodi do zamjene S-S veza s manje stabilnim Se-Se vezama (Terry i sur. 2000). Dodatak selenata snažno smanjuje sulfatom inducirano nakupljanje GSH u izdancima špinata (De Kok i sur. 1986), a inkubacija iglica smreke sa selenatom snažno smanjuje sadržaj GSH (Bosma i sur. 1991). Stoga, interferencija selenata i drugih Se spojeva sa sintezom GSH može smanjiti obranu biljaka od $^{\bullet}OH$ i oksidacijskog stresa (Terry i sur. 2000).

Gotovo sve korištene koncentracije oba oblika Se nisu značajno utjecale na aktivnost CAT u izdanku pšenice. Samo su tretmani s otopinom selenata koncentracija 5 i 100 mg $L^{-1}$ uzrokovali statistički značajno smanjenje aktivnosti enzima u izdanku pšenice. Suprotno tome, u korijenu su sve koncentracija oba oblika Se imale inhibitorno djelovanje na aktivnost CAT. Jedan od mogućih razloga gotovo nepromijenjene aktivnosti CAT u izdanku pšenice je povećana aktivnost drugih antioksidacijskih enzima koji kao supstrat također koriste $H_2O_2$. U istraživanju Xue i Hartikainen (2000) dokazano je kako tretman selenatom ($H_2SeO_4$) povećava aktivnost GPX koji pak uklanja većinu $H_2O_2$ i tako smanjuje potrebu za aktivacijom drugih antioksidacijskih enzima kao što su APX, SOD i CAT. Takeda i suradnici (1997) su otkrili kako je 40% $H_2O_2$ u stanicama alge *Chlamydomonas reinhardti,* koja je uzgajana u mediju bez Se, uklonjeno pomoću APX, a ostatak uklanja CAT. S druge strane, u mediju obogaćenom selenitom ($NaSeO_3$) većina $H_2O_2$ uklonjena je djelovanjem GPX. Smatra se da je u višim biljkama aktivan isti mehanizam. Budući da u našem istraživanju nije mjerena aktivnost GPX, ne može se sa sigurnošću tvrditi da ovaj enzim ima glavnu ulogu u detoksikaciji $H_2O_2$ nastalog uslijed toksičnog djelovanja Se.

Oba oblika Se značajno su utjecala na aktivnost APX u izdanku i korijenu pšenice. Iako je kod nekih skupina došlo do statistički značajnog smanjenja aktivnosti APX, zanimljiva je činjenica kako su samo tretmani s najvećim koncentracijama selenata i selenita uzrokovali statistički značajno povećanje aktivnosti enzima i u izdanku i u korijenu pšenice. Akbulut i Çakır (2010) uočili su da je aktivnost antioksidacijskih enzima (CAT, APX, GR i GST) linearno ovisna o dozi primijenjenog selenata na izdanak klijanaca ječma te da je najveća koncentracija od 16 ppm selenata uzrokovala najveće povećanje aktivnosti mjerenih antioksidacijskih enzima. Također su uočili i značajno povećanje sadržaja TBARS-a, te su zaključili kako sami enzimi nisu dovoljni kako bi zaštitili stanice od toksičnosti Se. U okviru našeg istraživanja nije utvrđena jasna negativna poveznica između aktivnosti mjerenih antioksidacijskih enzima i pokazatelja oksidacijskog stresa. Stoga, kako bi se dobila potpunija slika o tkivno-specifičnim razlikama u odgovoru biljaka na različite oblike Se i predložio mogući mehanizam detoksikacije različitih oblika Se, potrebno je odrediti i ostale pokazatelje antioksidacijskog statusa.

# 5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- Utjecaj Se na pokazatelje oksidacijskog stresa i antioksidacijskog odgovora ovisi o kemijskom obliku i primijenjenoj koncentraciji Se te o vrsti biljnog organa.
- Oba oblika Se intenzivnije djeluju na pokazatelje oksidacijskog stresa u korijenu pšenice u odnosu na izdanak što upućuje na tkivno-specifični odgovor.
- Oba oblika Se su pri višim koncentracijama uzrokovala smanjenje koncentracije tGSH, dok je niža koncentracija Se imala suprotan učinak.
- Tretman Se nije utjecao na aktivnost CAT u izdanku pšenice, štoviše inhibirao je aktivnost CAT u korijenu, dok je aktivnost APX bila povećana samo pri najvišoj koncentraciji Se u izdanku i korijenu.
- Budući da u okviru ovog istraživanja nije utvrđena jasna negativna poveznica između aktivnosti mjerenih antioksidacijskih enzima i pokazatelja oksidacijskog stresa, potrebna su daljnja istraživanja ostalih pokazatelja antioksidacijskog statusa kako bi se dobila potpunija slika o toksičnom djelovanju Se i predložio mogući mehanizam detoksikacije.

# 6. LITERATURA


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

Akbulut, M., Çakır, S. (2010) The effects of Se phytotoxicity on the antioxidant systems of leaf tissues in barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. Plant Physiology and Biochemistry 48: 160-166.

Akerboom, T. P., Sies, H. (1981) Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. Methods in Enzymology 77: 373-382.

Ambriović Ristov, A. (ur.) (2007) Metode u molekularnoj biologiji. Institut Ruđer Bošković, Zagreb.

Anderson, J. V., Davis, D. G. (2004) Abiotic stress alters transcript profiles and activity of glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in *Euphorbia esula*. Physiologia Plantarum 120: 421-433.

Anjum, N. A., Ahmad, I., Mohmood, I., Pacheco, M., Duarte, A. C., Pereira, E., Umar, S., Ahmad, A., Khan, N. A., Iqbal, M., Prasad, M. N. V. (2012) Modulation of glutathione and its related enzymes in plants' responses to toxic metals and metalloids. Environmental and Experimental Botany 75: 307-324.

Apel, K., Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review of Plant Biology 55: 373-399.

Ayala, A., Muñoz, M. F., Argüelles, S. (2014) Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2014: 1-31.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. (2013) Biokemija. Školska knjiga, Zagreb.

Bodnar, M., Konieczka, P., Namiesnik, J. (2012) The properties, functions, and use of selenium compounds in living organisms. Journal of Environmental Science and Health. Part C: Environmental Carcinogenesis Reviews 30: 225-252.

Bosma, W., Schupp, R., De Kok, L. J., Rennenberg, H. (1991) Effect of selenate on assimilatory sulphate reduction and thiol content of spruce needles. Plant Physiology and Biochemistry 29: 131-138.

Bradford, M. M. (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Caverzan, A., Passaia, G., Barcellos Rosa, S., Werner Ribeiro, C., Lazzarotto, F., Margis-Pinheiro, M. (2012) Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. Genetics and Molecular Biology 35(4): 1011-1019.

Chu, J., Yao, X., Zhang, Z. (2010) Responses of wheat seedlings to exogenous selenium supply under cold stress. Biological Trace Element Research 136: 355-363.

Coleman, J. O. D., Randall, R., Blake-Kalff, M. M. A. (1997) Detoxification of xenobiotics in plant cells by glutathione conjugation and vacuolar compartmentalization: a fluorescent assay using monochlorobimane. Plant, Cell & Environment 20: 449-460.

Combs, G. F. (2001) Selenium in global food systems. British Journal of Nutrition 85: 517-547.

De Kok, L. J., Kuiper, P. J. C. (1986) Effect of short-term dark incubation with sulfate, chloride and selenate on the glutathione content of spinach leaf discs. Physiologia Plantarum 68: 477-482.

Demidchik, V. (2015) Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. Environmental and Experimental Botany 109: 212-228.

Desikan, R., Mackerness, S. A. H., Hancock, S. J. T., Neill, S. J. (2001) Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. Plant Physiology 127: 159-172.

Dixon, D. P., Lapthorn, A., Edwards, R. (2002). Plant glutathione transferases. Genome Biology 3: 1-10.

Ducsay, L., Ložek, O., Marček, M., Varényiová, M., Hozlár, P., Lošák, T. (2016) Possibility of selenium biofortification of winter wheat grain. Plant, Soil and Environment 62(8): 379-383.

Dumont, E., Vanhaecke, F., Cornelis, R. (2006) Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. Analytical and Bioanalytical Chemistry 385: 1304-1323.

Durán, P., Acuña, J. J., Jorquera, M. A., Azcón, R., Borie, F., Cornejo, P., Mora, M. L. (2013) Enhanced selenium content in wheat grain by co-inoculation of selenobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi: a preliminary study as a potential Se biofortification strategy. Journal of Cereal Science 57: 275-280.

Foyer, C. H., Halliwell, B. (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. Planta 133: 21-25.

Foyer, C. H., Noctor, G. (2005a) Redox homeostis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. Plant Cell 17: 1866-1875.

Foyer, C. H., Noctor, G. (2005b) Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. Plant Cell and Environment 28: 1056-1071.

Freeman, J. L., Tamaoki, M., Stushnoff, C., Quinn, C. F., Cappa, J. J., Devonshire, J., Fakra, S. C., Marcus, M. A., McGrath, S. P., Hoewyk, D. V., Pilon-Smits, E. A. H. (2010) Molecular mechanisms of selenium tolerance and hyperaccumulation in *Stanleya pinnata*. Plant Physiology 153(4): 1630-1652.

Galeas, M. L., Zhang, L. H., Freeman, J. L., Wegner, M., Pilon-Smits, E. A. H. (2007) Seasonal fluctuations of selenium and sulfur accumulation in selenium-hyperaccumulators and related non-accumulators. New Phytologist 173: 517-525.

Gill, S. S., Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry 48: 909-930.

Gill, S. S., Anjum, N. A., Hasanuzzaman, M., Gill, R., Trivedi, D. K., Ahmad, I., Pereira, E., Tuteja, N. (2013) Glutathione and glutathione reductase: A boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. Plant Physiology and Biochemistry 70: 204-212.

Gratao, P. L., Polle, A., Lea, P. J., Azevedo, R. A. (2005) Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. Functional Plant Biology 32: 481-494.

Grill, D., Tausz, M., De Kok, L. J. (ur.) (2001) Significance of Glutathione to Plant Adaptation to the Environment. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Gupta, M., Gupta, S. (2017) An Overview of Selenium Uptake, Metabolism, and Toxicity in Plants. Frontiers in Plant Science 7: 2074.

Hartikainen, H. (2005) Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 18: 309-318.

Hasanuzzaman, M., Hossain, M. A., Fujita, M. (2010) Selenium in Higher Plants: Physiological Role, Antioxidant Metabolism and Abiotic Stress Tolerance. Journal of Plant Sciences 5(4): 354-375.

Hasanuzzaman, M., Fujita, M. (2011) Selenium pretreatment upregulates the antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system and confers enhanced tolerance to drought stress in rapeseed seedlings. Biological Trace Element Research 143: 1758-1776.

Hondal, R. J., Marino, S. M., Gladyshev, V. N. (2012) Selenocysteine in thiol/disulfide-like exchange reactions. Antioxidants & Redox Signaling 18: 1675-1689.

Huang, X., Kiefer, E., Rad, U. N., Ernst, D., Foissner, I., Durner, J. (2002) Nitric oxide burst and nitric oxide-dependent gene induction in plants. Plant Physiology and Biochemistry 40: 625-631.

Kabata-Pendias, A., Adriano, D. C. (1995) Trace Metals. U: Rechcigl, J. E. (ur.) Soil Amendments and Environmental Quality. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, USA, str. 139-168.

Kumar, M., Bijo, A. J., Baghel, R. S., Reddy, C. R. K., Jha, B. (2012) Selenium and spermine alleviates cadmium induced toxicity in the red seaweed *Gracilaria dura* by regulating antioxidant system and DNA methylation. Plant Physiology and Biochemistry 51: 129-138.

Li, H. F., McGrath, S. P., Zhao, F. J. (2008) Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite. New Phytologist 178: 92-102.

Lyons, G., Stangoulis, J., Graham, R. (2003) High-selenium wheat: biofortification for better health. Nutrition Research Reviews 16(1): 45-60.

Mangiapane, E., Pessione, A., Pessione, E. (2014) Selenium and selenoproteins: an overview on different biological systems. Current Protein & Peptide Science 15(6): 598-607.

Meyer, A. J. (2008) The integration of glutathione homeostasis and redox signaling. Journal of Plant Physiology 165: 1390-1403.

Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F., Noctor, G. (2010) Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. Journal of Experimental Botany 61: 4197-4220.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. Trends in Plant Science 9: 490-498.

Mukherjee, S. P., Choudhuri, M. A. (1983) Implications of water stress-induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in *Vigna* seedlings. Physiologia Plantarum 58: 166-170.

Nair, S., Singh, S. V., Krishan, A. (1991) Flow cytometric monitoring of glutathione content and anthracycline retention in tumor cells. Cytometry 12: 336-342.

Nakano, Y., Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and Cell Physiology 22: 867-880.

Neill, S. J., Desikan, R., Hancock, J. (2002) Hydrogen peroxide signaling. Current Opinion in Plant Biology 5: 388-395.

Novoselov, S. V., Rao, M., Onoshko, N. V., Shi, H., Kryukov, G. V., Xiang, Y., Weeks, D. P., Hatfield, D. L., Gladyshev, V. N. (2002) Selenoproteins and selenocysteine insertion system in the model plant cell system, *Chlamydomonas reinhardtii*. The EMBO Journal 21(14): 3681-3693.

Nowak, J., Kaklewski, K., Ligocki, M. (2004) Influence of selenium on oxidoreductive enzymes activity in soil and in plants. Soil Biology and Biochemistry 36: 1553-1558.

Pandey, C., Gupta, M. (2015) Selenium and auxin mitigates arsenic stress in rice (*Oryza sativa* L.) by combining the role of stress indicators, modulators and genotoxicity assays. Journal of Hazardous Materials 287: 384-391.

Pilon-Smits, E. A. H., Quinn, C. F., Tapken, W., Malagoli, M., Schiavon, M. (2009) Physiological functions of beneficial elements. Current Opinion in Plant Biology 12: 267-274.

Pilon-Smits, E. A. H., Quinn, C. F. (2010) Selenium Metabolism in Plants. U: Hell, R., Mendel, R. R. (ur.) Cell Biology of Metals and Nutrients. Plant Cell Monographs, vol 17. Springer, Berlin, Heidelberg, str. 225-241.

Pukacka, S., Ratajczak, E., Kalemba, E. (2011) The protective role of selenium in recalcitrant *Acer saccharinum* L. seeds subjected to desiccation. Journal of Plant Physiology 168: 220-225.

Quan, L. J., Zhang, B., Shi, W. W., Li, H. Y. (2008) Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. Journal of Integrative Plant Biology 50: 2-18.

Rausch, T., Wachter, A. (2005) Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations. Trends in Plant Science 10: 503-509.

Rayman, M. P. (2012) Selenium and human health. The Lancet 379: 1256-1268.

Ríos, J. J., Blasco, B., Cervilla, L. M., Rosales, M. A., Sanchez-Rodriguez, E., Romero, L., Ruiz, J. M. (2009) Production and detoxification of $H_2O_2$ in lettuce plants exposed to selenium. Annals of Applied Biology 154: 107-116.

Shardendu, S. N., Boulyga, S. F., Stengel, E. (2003) Phytoremediation of selenium by two helophyte species in subsurface flow constructed wetland. Chemosphere 50: 967-973.

Sharma, P., Bhushan Jha, A., Shanker Dubey, R., Pessarakli, M. (2012) Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. Journal of Botany 2012: 1-26.

Sors, T. G., Ellis, D. R., Na, G. N., Lahner, B., Lee, S., Leustek, T., Pickering, I. J., Salt, D. E. (2005) Analysis of sulfur and selenium assimilation in *Astragalus* plants with varying capacities to accumulate selenium. The Plant Journal 42: 785-797.

Takeda, T., Ishikawa, T., Shigeoka, S. (1997) Metabolism of hydrogen peroxide by the scavenging system in *Chlamydomonas reinhardtii*. Physiologia Plantarum 99: 49-55.

Tausz, M., Sircelj, H., Grill, D. (2004) The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? Journal of Experimental Botany 55: 1955-1962.

Terry, N., Zayed, A. M., De Souza, M. P., Tarun, A. S. (2000) Selenium in higher plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 51: 401-432.

Verma, S., Dubey, R. S. (2003) Leads toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. Plant Science 164: 645-655.

Wagner, U., Edwards, R., Dixon, D. P., Mauch, F. (2002) Probing the diversity of the *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene family. Plant Molecular Biology 49: 515-532.

White, P. J., Bowen, H. C., Marshall, B., Broadley, M. R. (2007) Extraordinarily high leaf selenium to sulfur ratios define 'Se-accumulator' plants. Annals of Botany 100: 111-118.

White, P. J., Broadley, M. R. (2005) Biofortifying crops whith essential mineral elements. Trends in Plant Science 10: 586-593.

White, P. J., Broadley, M. R. (2009) Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets - iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. New Phytologist 182: 49-84.

Wu, Z., Bañuelos, G. S., Lin, Z. Q., Liu, Y., Yuan, L., Yin, X., Li, M. (2015) Biofortification and phytoremediation of selenium in China. Frontiers in Plant Science 6: 136.

Xue, T., Hartikainen, H. (2000) Association of antioxidative enzymes with the synergistic effect of selenium and UV irradiation in enhancing plant growth. Agricultural and Food Science 9: 177-186.

Yan, J., Tsuichihara, N., Etoh, T., Iwai, S. (2007) Reactive oxygen species and nitric oxide are involved in ABA inhibition of stomatal opening. Plant, Cell and Environment 30(10): 1320-1325.

Yang, T., Poovaiah, B. W. (2002) Hydrogen peroxide homeostasis activation of plant catalase by calcium/calmodulin. Plant Biology 99: 4097-4102.

Zayed, A., Lytle, C. M., Terry, N. (1998) Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants. Planta 206: 284-292.