Uloga glutationa u odgovoru biljaka na različite oblike selena

Sabo, Nikolina

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

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:181:451226

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

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

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski studij biologije

Nikolina Sabo

Uloga glutationa u odgovoru biljaka na različite oblike selena

Završni rad

Mentor: doc. dr. sc. Ivna Štolfa Čamagajevac

Neposredni voditelj: dr. sc. Rosemary Vuković

Osijek, 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku **Završni rad**
Odjel za biologiju
Preddiplomski studij biologije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

ULOGA GLUTATIONA U ODGOVORU BILJAKA NA RAZLIČITE OBLIKE SELENA

Nikolina Sabo

Rad je izrađen: Laboratorij za biokemiju, Odjel za biologiju, Osijek

Mentor: dr. sc. Ivna Štolfa Čamagajevac, doc.
Neposredni voditelj: dr. sc. Rosemary Vuković

Selen je nutrijent koji, primjenjen u odgovarajućim koncentracijama, ima brojne pozitivne učinke na biljke. Međutim, tretman prekomjernim koncentracijama selena vodi k pro-oksidacijskim reakcijama, koje rezultiraju pojavama toksičnosti i oksidacijskog stresa. Glutation, kao kelatirajući agens, antioksidans, signalna komponenta i reducens, ima središnju ulogu u metabolizmu selena i antioksidacijskoj obrani biljaka. S ciljem istraživanja potencijalne uloge glutationa u održavanju ravnoteže pri apsorpciji selena i sprječavanju stresa, sjeme pšenice (*Triticum aestivum*) tretirano je trima različitim koncentracijama dva oblika selena (otopine selenata i selenita). U izdancima je došlo do značajnog porasta koncentracije ukupnog glutationa (tGSH, GSH+GSSG) jedino u slučaju primjene najveće koncentracije selenita (1 mg/kg) te do značajnog porasta aktivnosti glutation peroksidaze (GPx). Dakle, utvrđena je pozitivna korelacija između koncentracije tGSH i antioksidacijske aktivnosti GPx-a. Dobiveni rezultati sugeriraju uključenost GSH i GPx-a u odgovor pšenice na suplementaciju selenom, pri čemu čine učinkovit obrambeni sustav biljaka sudjelujući u antioksidacijskim reakcijama, koje omogućuju regulaciju stvaranja ROS-a i sprječavanje oštećenja biljnog tkiva kao posljedicu oksidacijskog stresa.

Broj stranica: 21
Broj slika: 3
Broj tablica: 1
Broj literaturnih navoda: 24
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: selen, selenoproteini, *Triticum aestivum*, izdanci, glutation, glutation-peroksidaza

Rad je pohranjen u: u knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i u Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, u elektroničkom obliku, te je objavljen na web stranici Odjela za biologiju.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek **Final thesis**
Department of Biology
Undergraduate Study of Biology

Scientific area: Natural science
Scientific Field: Biology

THE ROLE OF GLUTATHIONE IN PLANTS SUBJECTED TO DIFFERENT FORMS OF SELENIUM

Nikolina Sabo

Thesis performed at: Laboratory of Biochemistry, Department of Biology, Osijek

Supervisor: Ph. D. Ivna Štolfa Čamagajevac, Assistant Professor
Assistant in charge: Ph. D. Rosemary Vuković

Selenium is a nutrient that, applied in appropriate concentrations, has many positive effects on plants. However, Selenium excessive concentration treatment leads to pro-oxidation reactions, which results in manifestations of toxicity and oxidative stress. Glutathione, as chelating agent, antioxidant, reducing agent and the signal component, has a central role in the metabolism of Selenium and antioxidant defense of plants. With the aim of investigating the potential role of glutathione in maintaining a balance in the absorption of Selenium and the prevention of stress, the seeds of wheat (*Triticum aestivum*) were treated with three different concentrations of two different forms of selenium (selenate and selenite solutions). There was a significant increase in the concentration of total glutathione content (tGSH, GSH+GSSG) in wheat shoots, but only in the case of application of the highest concentrations of selenite (1 mg/kg) and there was a significant increase in activities of glutathione peroxidase (GPx). Therefore, a positive correlation was found between the concentration of tGSH and antioxidant activity of GPx's. Obtained results suggest the involvement of GSH and GPx subjected to selenium supplementation in wheat, therefore making an effective defense system of plants by participating in antioxidant reactions, which allow the regulation of ROS formation and prevent damage of plant tissue as a result of oxidative stress.

Number of pages: 21
Number of figures: 3
Number of tables: 1
Number of references: 24
Original in: Croatian

Key words: Selenium, selenoproteins, *Triticum aestivum*, shoots, glutathione, glutathione peroxidase

Thesis deposited in: Library of Department of Biology, University of J.J. Strossmayer Osijek and in National university library in Zagreb in elektronic form. It is also disposable on the web site of Departmetnt of Biology, University of J.J. Strossmayer Osijek.

Sadržaj

1. UVOD **1**

1.1. Selen – status u biljkama, oblici i bioraspoloživost 1

1.2. Biokemijska uloga i potencijal selena 2

1.3. Utjecaj selena na enzimske i neenzimske antioksidacijske mehanizme 3

1.3.1. Glutation peroksidaza 3

1.3.2. Glutation 4

1.4. Pregled najvažnijih transformacija i enzima u metabolizmu selena 4

1.5. Cilj rada 5

2. MATERIJALI I METODE **6**

2.1. Materijali 6

2.2. Opis eksperimenta 6

2.3. Metode 7

2.3.1. Određivanje koncentracije ukupnog glutationa 8

2.3.2. Ekstrakcija proteina 9

2.3.3. Određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze (EC 1.11.1.9;GPx) 9

2.3.4. Određivanje koncentracije proteina 10

2.3.5. Statistička obrada podataka 10

3. REZULTATI **11**

3.1. Utjecaj primjene različitih koncentracija selenata i selenita na koncentraciju selena u tkivu izdanka pšenice 11

3.2. Utjecaj primjene različitih koncentracija selenata i selenita na sadržaj ukupnog glutationa u izdancima pšenice 12

3.3. Utjecaj primjene različitih koncentracija selenata i selenita na aktivnost glutation peroksidaze u izdancima pšenice 13

4. RASPRAVA **14**

5. ZAKLJUČCI **19**

6. PREGLED LITERATURE **20**

1. UVOD

1.1. Selen – status u biljkama, oblici i bioraspoloživost

Selen (Se) je element koji u prirodi dolazi u obliku organskih i anorganskih spojeva. Esencijalan je nutrijent za mnoge organizme, ali također toksičan pri visokim koncentracijama. Najbitniji oblici Se za biljke su selenati (SeO_4^{2-}) i seleniti (SeO_3^{2-}), odnosno anorganski oblici koji se efikasno apsorbiraju, te organski oblici poput selenometionina (SeMet) i selenocisteina (SeCys), čija je sposobnost zadržavanja u organizmu puno veća (Pilon-Smits i Quinn, 2010). U biljke se uglavnom unosi anorganski selenat, koji se reducira i ugrađuje u organske komponente. Se u reakciji s metalima daje jedan elektron, čime se stvara selenidni ion (Se^{2-}), a metalni selenidi su široko rasprostranjeni u prirodi. Prema konvencionalnoj pretpostavci, selenat je prevladavajući oblik u alkalnim tlima bogatim kisikom i brže se asimilira, dok je selenit zastupljeniji u uvjetima anoksije i povećane kiselosti i vlažnosti. Međutim, prema novijim istraživanjima (Li i sur., 2008) selenit se smatra dominatnim u dobro aeriranim tlima. Podaci o kemijskim svojstvima anorganskog Se i metaboličkim transformacijama ključni su u procjeni bioraspoloživosti Se. Sadržaj Se, kako u biljnim tako i u životinjskim organizmima, može varirati s obzirom na okolišne uvjete, točnije kvantitetu i kvalitetu selena kojima je organizam izložen, pri čemu postoji interval od tala siromašnih Se sve do iznimno bogatih, selenifernih tala (Fairweather-Trait i sur., 2010). Unos i akumulacija Se određeni su njegovim kemijskim oblikom i koncentracijom, zatim svojstvima tla, kao što su pH, salinitet i udio karbonata, vrsta i koncentracija iona te sposobnost biljke da apsorbira i metabolizira Se. Biljke konstantno unose i asimiliraju Se koristeći transportne sustave kemijski srodnog elementa sumpora (S), budući da Se i S dolaze u sličnim kemijskim spojevima i nastaju u sličnim biokemijskim putevima. Količina akumuliranog Se u biljkama ograničena je, dakle, i brojem transportera S i visokim udjelom njegovih komponenata u tlu, zbog kompetitivnosti dvaju elemenata. Metabolizam Se povezuje se i s unosom dušika, kao i nekih teških metala. Najveće količine akumuliranog Se zadržavaju se u aktivno rastućim tkivima (Germ i Stibilj, 2007).

S obzirom na sposobnost apsorpcije i kapacitet akumulacije Se te provođenje metabolizma i stupanj tolerancije, biljke su podijeljene u 3 skupine: primarni akumulatori (hiperakumulatori), sekundarni akumulatori i neakumulatori. Akumulatorne vrste metaboliziraju

Se i S u istoj mjeri, no s povišenom stopom u odnosu na neakumulatorne. Neakumulatornim vrstama pripadaju gotovo sve žitarice i trave, koje mogu rasti na selenifernom tlu, no akumuliraju samo nekoliko miligrama Se, a supstitucija S sa Se smatra se glavnim uzrokom pojave toksičnosti (Terry i sur., 2000). Biljni neakumulatori kojima su u tlu dostupni selenati uglavnom akumuliraju selenate, dok su s dostupnim selenitom sklone akumuliranju organskih oblika selena, uz napomenu da je dominantna komponenta Se u žitaricama SeMet. SeMet se pojavljuje u relativno velikim koncentracijama, a to je ujedno i oblik Se koji se najlakše asimilira i odlikuje antikancerogenim svojstvima (Fairweather-Tait i sur., 2010; Germ i Stibilj, 2007). Hiperakumulatori imaju velik omjer Se/S, rastu na tlima bogatim Se i akumuliraju ga u 100 puta većoj koncentraciji nego okolna vegetacija (do 0.1% mase suhe tvari), a bez pojave toksičnosti. Zahvaljujući metaboličkim transformacijama u kojima nastaju brojni organski derivati, ove biljke su povećale toleranciju prema Se. Razvile su selenospecifičan metabolizam i pretpostavlja se da je tim biljkama Se postao esencijalan element (Pilon-Smits i Quinn, 2010).

1.2. Biokemijska uloga i potencijal selena

Se se pojavljuje kao element u tragovima i sudjeluje u antioksidacijskim procesima. Fiziološke uloge Se u direktnoj su vezi s funkcijama proteina, točnije selenoproteina, od kojih većina kao integralni funkcionalni dio polipeptida sadrže netipičnu aminokiselinu SeCys, koja se ugrađuje kotranslacijski, a kodirana je stop kodonom UGA odgovarajuće mRNA. U sastavu SeCys, Se je oko sto puta jači nukleofilni agens u odnosu na S iz Cys, što mu daje karakteristična biokemijska svojstva. Sinteza SeCys i SeMet odvija se na specijaliziranim seleno-tRNA, koje određuju njihovu ugradnju u selenoproteine. Takve tRNA ne razlikuju modificirane aminokiseline od konvencionalnih, stoga ih ugrađuju ravnomjerno u polipeptidni lanac (Milanović i sur., 2015). Moguće je i da biljke posttranslacijski pretvaraju neke aminokiseline, primjerice serin (Ser), u SeCys. Korist selenoproteina je u tome što imaju antioksidacijsko djelovanje i uklanjaju reaktivne kisikove tvari (ROS, engl. *reactive oxygen species*) koji oštećuju stanice, a imaju ulogu i u imunološkom odgovoru (Pilon-Smits i Quinn, 2010). U svrhu reguliranja koncentracije ROS-a u organizmu, pokreće se niz enzimskih i neenzimskih reakcija koje predstavljaju učinkovit mehanizam tolerancije stresa i omogućuju normalan rast i razvoj biljke, čak i u uvjetima pojačanog stresa. S druge strane, toksičnost Se pojavljuje se onda kada je on zastupljen pri višim koncentracijama nego što je organizam sposoban tolerirati, pri čemu

dolazi do akutnog ili kroničnog trovanja te smrti organizma. Glavni razlog visoke koncentracije Se u biljkama je to što su proteini bogati aminokiselinama koje sadrže S, a zamjena S sa Se u proteinima uzrokuje pogrešno slaganje i metaboličku disfunkciju tih molekula te dovodi do pojave stresa uzrokovanog pro-oksidacijskim reakcijama. Ugradnjom u aminokiseline, koje se normalno ugrađuju u proteine, smanjena je koncentracija unutarstaničnog Se (Çakır i sur., 2012). Granica između djelotvorne i prekomjerne koncentracije Se u organizmu vrlo je mala i ovisi o kemijskom obliku, koncentraciji i različitim parametrima okoliša. Nedostatak Se očituje se pojavom brojnih bolesti, kako kod ljudi, tako i kod životinja i biljaka, stoga je velik potencijal upotrebe Se u procesima biofortifikacije (Germ i Stibilj, 2007).

Čini se da je metabolizam Se kao esencijalnog elementa primitivna osobina koja se tijekom evolucije izgubila, jer se u višim biljkama nije pokazao kao esencijalan, iako pokazuje brojne pozitivne učinke. Se može povećati toleranciju biljaka na stres induciran UV svjetlošću, odgoditi senescenciju, regulirati vodni režim tijekom perioda suše te potaknuti sazrijevanje sjemena i rast (Xue i sur., 2001; Pennan i sur., 2002; Kuznetsov i sur., 2003; Hartikainen, 2000). Biljke djeluju kao svojevrsni puferi, kojima je redukcija rasta indikator povećane koncentracije Se u tlu, dok je pri nižim koncentracijama vidljiv pozitivan učinak. Stres uzrokovan senescencijom može se umanjiti pojačanim antioksidacijskim djelovanjem, povezanim s pojačanom aktivnošću glutation-peroksidaze (GPx) (Germ i Stibilj, 2007). U skladu s tim, bitno je naglasiti da tretman biljaka Se pojačava aktivnost GPx-a, a suprimira peroksidaciju lipida (Pilon-Smits i Quinn, 2010; Germ i Stibilj, 2007). Izražen je i ekološki aspekt Se, koji uključuje toleranciju na sušu i visoku temperaturu, alelopatiju, a osim toga predstvlja i vrlo učinkovit obrambeni mehanizam protiv herbivora i patogena (Quinn i sur., 2007).

1.3. Utjecaj selena na enzimske i neenzimske antioksidacijske mehanizme

1.3.1. Glutation-peroksidaza

GPx je prvi enzim za kojeg je dokazano da u svom sastavu ima ugrađen SeCys. SeCys u aktivnom mjestu GPx-a ima katalitičku ulogu i antioksidacijski djeluje na način da suprimira štetno djelovanje ROS-a u reakcijama oksidoredukcije, u kojima je Se prisutan u obliku reduciranog selenola i predstavlja reakcijsko središte. Mehanizam djelovanja GPx-a uključuje oksidaciju aminokiselinskog ostatka SeCys koju provodi vodikov peroksid (H_2O_2) pri čemu nastaje oksidirani glutation disulfid (GSSG). On se regenerira reakcijom koju provodi glutation-

reduktaza (GR), a reakcija je ovisna o NADPH kao donoru elektrona. Prethodno provedene studije pokazale su da SeCys ima kritičnu ulogu, jer njegova zamjena cisteinskim ostatkom u velikoj mjeri reducira katalitičku aktivnost (Terry i sur., 2000).

1.3.2. Glutation

Jedan od najpoznatijih te ujedno i najvažnijih neenzimskih antioksidansa je glutation (GSH, γ-glutamil-cisteinil-glicin), tiolni tripeptid, čija je važna uloga sudjelovanje u reakcijama detoksikacije, keliranja i odlaganja teških metala kojima su biljke u svom okolišu izložene, a sudjeluje i u signalnim putevima (Jozefczak i sur., 2012). Reducirani oblik glutationa (GSH) ima brojne uloge u redoks procesima u stanicama zbog stabilnosti i jake nukleofilnosti centralnog cisteina, što ga čini idealnim reducensom. Mehanizmi prilagodbe povišenim koncentracijama ROS-a zasnivaju se na uklanjanju njihova suviška upravo zahvaljujući redoks potencijalu GSH, uz druge antioksidacijske mehanizme bilo enzimske ili neenzimske. To utječe na koncentraciju slobodnog GSH i njegovog redoks stanja u stanicama, tj. GSSG. Omjer GSSG/GSH daje specifične informacije koje su važne u regulaciji staničnih signalnih puteva i u odgovoru na stres iz okoliša. Glutation je, djelujući kao negativni regulator odnosno supresor, zaslužan za snižavanje unosa S i njegove asimilacije (Pilon-Smits i Quinn, 2010). Istraživanjima je potvrđeno da GSH može direktno reagirati sa Se kako bi se formirale SeCys i SeMet, aminokiseline koje bi se konačno ugradile u proteine (Terry i sur., 2000). Nadalje, dostupnost GSH u biljkama parametar je koji utječe na rad GPx-a.

1.4. Pregled najvažnijih transformacija i enzima u metabolizmu selena

Više biljke reduciraju Se koristeći enzime uključene u asimilaciju S. Potreba za Se ovisi o biljnoj vrsti, ali kod svih se SeCys izdvaja kao središnji metabolički međuprodukt i zatim transformira u ostale organske komponente i akumulira ili otpušta u plinovitom obliku. Mjesto asimilacije primarno su kloroplasti listova. Enzim koji katalizira prvu reakciju u nizu, tj. asocijaciju selenata i adenozin-trifosfata (ATP-a), je ATP-sulfurilaza (APS), a to je ujedno i enzim koji ograničava stopu akumulacije. U slijedećim reakcijama kataliziranim enzimima APS-reduktazom, sulfit-reduktazom i O-acetilserin(tiol)-liazom nastaje prvi organski spoj, SeCys, aminokiselina koja se nespecifično ugrađuje u proteine, što može biti uzrok toksičnog djelovanja na biljku. SeCys se može prevesti u različite spojeve, a tri su puta najznačajnija: pretvorba u SeMet i dimetilselenid (DMSe) u kloroplastima i citosolu, prevorba u elementarni selen (Se^0) u

kloropastima te nastanak metil-SeCys (MeSeCys) i DMSe u kloroplastima. DMSe je spoj u plinovitom stanju i može lako izaći iz biljke, što je jedan od načina kako se biljke nose s viškom Se. Alternativno, SeCys se prevodi do Se^0 uz otpuštanje međuprodukta, aminokiseline Ala. Se^0 je neškodljiv, stoga ovaj mehanizam pretvorbe ima detoksikacijski učinak. Konačno, metilacijom SeCys nastaje MeSeCys, u reakciji posredovanom enzimom SeCys-metiltransferazom (SMT), izrazito aktivnim u biljaka hiperakumulatora. Ovaj oblik se ne ugrađuje u proteine, zato može biti bezopasno akumuliran u specijaliziranim stanicama epiderme lista, kamo odlazi posebnim mehanizmima transporta, a dalje se prevodi u još jedan plinoviti oblik – dimetildiselenid (DMDSe), dominantan produkt kod hiperakumulatornih vrsta (Pilon-Smits i Quinn, 2010). Navedeni metabolički putevi imaju detoksikacijski i antioksidacijski učinak, sprječavajući nastanak štete u tkivima kao posljedicu oksidacijskog stresa. Iako je u ovom istraživanju naglasak na neenzimskim reakcijskim mehanizmima, s GSH u glavnoj ulozi, također je bilo važno spomenuti i doprinos enzimski posredovanih reakcija, koje zajedno s GSH i GPx-om sudjeluju u odgovoru biljaka na povećane koncentracije Se i višak ROS-a kao izravnu posljedicu.

1.5. Cilj rada

Se je koristan biljkama u suočavanju sa stresnim uvjetima okoliša jer sudjeluje u smanjenju štetnog učinka na organizam. Regulira unos ostalih elemenata i antioksidacijske aktivnosti u situacijama oksidacijskog stresa, kao i popravak oštećenja fotosustava uzrokovanog poremećajem elektronske ravnoteže. Utječe na razinu enzimskih i neenzimskih antioksidansa, koji čine efikasan obrambeni sustav i zajedno doprinose održanju stabilnih uvjeta u stanicama. Dodatna istraživanja su potrebna kako bi se ustanovio prag pozitivnog učinka Se i početka njegove toksičnosti te potvrdio utjecaj na fiziološke i morfološke karakteristike biljaka.

Budući da uloga GSH i mehanizmi antioksidacijskog djelovanja u tkivima biljaka prilikom tretiranja različitim oblicima selena nisu u potpunosti poznati, cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utjecaj različitih koncentracija selenita i selenata na sadržaj GSH te aktivnost GPx-a u klijancima pšenice (*Triticum aestivum*), te time odrediti ulogu GSH u odgovoru biljaka na različite oblike Se kao i njihove koncentracije. U kontekstu dobivenih rezultata te na temelju proučene literature, jedan od ciljeva je i prodiskutirati o statusu i metabolizmu Se u biljkama.

2. MATERIJALI I METODE

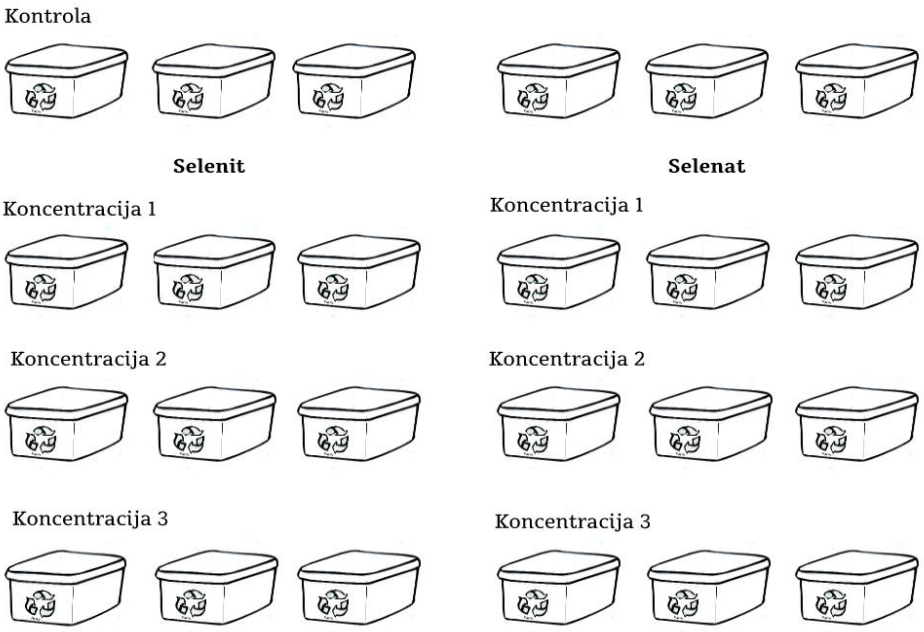
2.1. Materijali

Biljni materijal na kojem je provedeno istraživanje je pšenica (*Triticum aestivum*). Sjeme pšenice je dobiveno s Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku.

2.2. Opis eksperimenta

Po 100 sjemenki pšenice zasađeno je u ukupno 24 posude dimenzija 19.5×17.5×11 cm, volumena 2 L i površine 0.034 m^2, u kojima se nalazilo po 1.8 kg tla s postotkom vlage od 11%. Dakle, količina suhog tla po posudi iznosila je 1.6 kg. U svaku posudu dodano je 250 mL vode i 50 mL otopine selenita odnosno selenata odgovarajućih koncentracija, isključujući 3 kontrolne posude gdje dodana samo voda, s ukupnim iznosom vlage ≈ 30%. Dodane otopine sadržavale su 0.01 mg/kg (koncentracija 1), 0.1 mg/kg (koncentracija 2) i 1 mg/kg (koncentracija 3) selenata odnosno selenita. Posude su stavljene u fitotron na 20 °C, 70% vlage, te na 16/8h ciklus dana i noći tijekom 15 dana (Slika 1.).

Nakon 15 dana, izdanci pšenice, odnosno nadzemni dijelovi klijanaca, uzorkovani su, smrznuti u tekućem dušiku te pohranjeni na -80 °C do laboratorijske analize.



Slika 1. Shema eksperimenta

2.3. Metode

Tijekom istraživanja izmjereni su:

- koncentracija selena u tlu,
- koncentracija selena u biljkama,
- aktivnost enzima GPx,
- koncentracija ukupnog glutationa (tGSH)

2.3.1. Određivanje koncentracije ukupnog glutationa

Koncentracija tGSH mjeri se spektrofotometrijski. Princip metode zasniva se na kinetičkoj metodi, odnosno mjerenju kontinuirane redukcije 5,5`-ditiobis(2-nitrobenzojeva kiselina) (DTNB) katalitičkim količinama GSH, pri čemu nastaje žuto obojeni produkt 5-tio-2-nitrobenzojeva kiselina (TNB) i GSSG. Porast apsorbancije mjeri se pri valnoj duljini od 412 nm, a događa se zbog nastajanja TNB. Nastali TNB i GSSG se recikliraju u enzimskoj reakciji kataliziranoj glutation-reduktazom (GR) uz NADPH kao donora elektrona (jednadžbe (1) i (2); Akerboom i Sies, 1981).

$$2\,\mathrm{GSH} + \mathrm{DTNB} \rightarrow \mathrm{GSSG} + 2\,\mathrm{TNB} \quad (1)$$

$$\mathrm{GSSG} + \mathrm{NADPH} + \mathrm{H}^{+} \xrightarrow{glutation\ reduktaza} \mathrm{NADP}^{+} + 2\,\mathrm{GSH} \quad (2)$$

Smrznuti izdanci pšenice usitnjeni su u tarionika s tučkom uz korištenje tekućeg dušika. Potom je 100 mg tkiva homogenizirano u 1 mL %5-tne (w/v) sulfosalicilne kiseline (SSA), a dobiveni homogenat ostavljen na ledu 10 minuta. Slijedilo je centrifugiranje homogenata 10 minuta pri 10 000 g i +4 °C. Supernatanti su dekantirani i čuvani na ledu do korištenja za određivanje koncentracije tGSH. Reakcijski koktel sastojao se od reakcijskog pufera (8 mL 100 mM kalij-fosfatnog pufera + 1 mM EDTA, pH 7.0), 228 µL otopine GR (6 U/mL) i 228 µL otopine DTNB koncentracije 1.5 mg × mL^{-1}, a komponente su dobro promiješane. Mjerenju količine GSH u ekstraktima prethodila je izrada standardne krivulje, izrađena serijskim razrijeđivanjem 50 µM otopine GSH (pripremljene razrjeđenjem alikvota 10 mM stock otopine glutationa) s 5% otopinom SSA, u rasponu koncentracija od 50 do 0.781 µM. U UV kivete dodano je po 750 µL reakcijskog koktela i 50 µL pripremljenog uzorka. Sadržaj kivete je ekvilibriran na 25 °C tijekom 5 minuta kako bi se otopina stabilizirala. Potom je dodano 250 µL otopine NADPH koncentracije 0.16 mg × mL^{-1}, sadržaj kivete 3 puta je promiješan inverznim okretanjem kivete i smješten u spektrofotometar. Kinetika reakcije prati se porastom apsorbancije, zbog nastalog žuto obojenog TNB, svake 1 minute tijekom 5 minuta na valnoj duljini od 412 nm. Koncentracija ukupnog glutationa izražena je kao nmol GSH po g svježe tvari (nmol GSH $g^{-1}_{svj.\ tvari}$).

2.3.2. Ekstrakcija proteina

Smrznuti izdanci pšenice usitnjeni su u tarioniku pomoću tekućeg dušika uz dodatak polivinil-polipirolidona (PVPP, služi za uklanjanje fenolnih spojeva iz biljnog ekstrakta). Iz usitnjenog su tkiva (0.2 g) proteini ekstrahirani 15 minuta na ledu uz dodatak 1 mL hladnog pufera za ekstrakciju (100 mM KH_2PO_4, 100 mM K_2HPO_4, 1 mM EDTA, pH 7.0). Homogenati su zatim centrifugirani 15 minuta na 22 000 g i +4 °C. Dobiveni su supernatanti služili za trenutačno određivanje koncentracije proteina i mjerenje aktivnosti GPx.

2.3.3. Određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze (EC 1.11.1.9;GPx)

Metoda mjerenja aktivnosti GPx zasnovana je na principu oksidacije reduciranog oblika glutationa (GSH), koju provodi H_2O_2 pri čemu nastaje GSSG (Wendel, 1980). GSSG se zatim regenerira u prisutnosti GR, a reakcija je ovisna o NADPH kao reducensu (donoru elektrona). Prati se pad apsorbancije pri valnoj duljini od 340 nm, do kojeg dolazi zbog oksidacije i smanjenja koncentracije NADPH, odnosno otpuštanja elektrona i nastanka $NADP^+$ (jednadžbe (3) i (4)).

$$2\ \mathrm{GSH} + \mathrm{H_2O_2} \xrightarrow{glutation\ peroksidaza} \mathrm{GSSG} + 2\ \mathrm{H_2O} \quad (3)$$

$$\mathrm{GSSG} + \beta\text{-NADPH} \xrightarrow{glutation\ reduktaza} \beta\text{-NADP} + 2\ \mathrm{GSH} \quad (4)$$

Pripremljen je reakcijski koktel koji se sastojao od 9.2 mL reakcijskog pufera (50 mM kalij-fosfatnog pufera + 0.4 mM EDTA, pH 7.0), 1 mg NADPH, 100 µL otopine GR (100 U/ mL) i 50 µL 200 mM otopine GSH. Promiješan je inverznim okretanjem te je pH podešen na 7.0 pomoću 1 M HCl ili 1M NaOH. U UV-kivetu za mjerenje redom je pipetirano 1500 µL reakcijskog koktela te 25 µL pripremljenog proteinskog ekstrakta nakon čega je uslijedilo ekvilibriranje na 25 °C, odnosno stabiliziranje otopine tijekom 5 minuta. Nakon što je dodano 25 µL 0.042% (w/w) otopine H_2O_2, sadržaj kivete odmah je promiješan 3 puta inverznim okretanjem kivete koja je potom smještena u spektrofotometar. Smanjenje apsorbance mjereno je

na 340 nm svakih 30 sekundi tijekom 5 minuta. Jedna jedinica enzima (1U) uz supstrat H_2O_2 katalizira oksidaciju 1 μmola GSH u GSSG po minuti pri pH 7.0 i 25 °C. Aktivnost GPx izražena je u enzimskim jedinicama (U) po miligramu proteina ($U \times g^{-1}_{proteina}$).

2.3.4. Određivanje koncentracije proteina

Za određivanje koncentracije proteina u ekstraktima korištena je metoda po Bradfordu (1967). Postupak se temelji na nespecifičnom vezanju anionskog oblika boje Coomassie briljant plavo G-250 (CBB G-250) za proteine u kiselom mediju, uslijed čega dolazi do stvaranja kompleksa protein – boja i pomaka maksimuma apsorbancije s 465 nm na 595 nm. Proteinski ekstrakt (100 μL) je razrijeđen i pomiješan s 1 mL Bradford reagensa (100 mg CBB G-250, 50 mL etanola, 100 mL 85% fosforne kiseline, dH2O do 1 L) i inkubiran 5 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim je na spektrofotometru izmjeren intenzitet obojenja otopine pri valnoj duljini 595 nm. Za standardizaciju je korišten albumin goveđeg seruma (BSA) u području koncentracija 0.01 – 0.15 $mg \times mL^{-1}$. Iz vrijednosti izmjerenih apsorbancija poznatih koncentracija BSA dobiva se standardna krivulja iz koje se potom određuje koncentracija proteina u ekstraktima.

2.3.5. Statistička obrada podataka

Unutar svake skupine uzorkovano je 6 replika tkiva, po dvije replike iz svake uzgojne posude. Podaci dobiveni u ovom radu obrađeni su u statističkom programu STATISTICA 12.0 (Statsoft, Inc, Tulsa, SAD). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (SD). Razlike između srednjih vrijednosti skupina (kontrola i različiti tretmani) utvrđene pomoću analize varijance s jednim promjenjivim faktorom (*one-way* ANOVA). Nakon što je utvrđeno postojanje razlika, provedeno je *post hoc* testiranje pomoću LSD testa. Svi testovi provedeni su uz razinu značajnosti od 5%.

3. REZULTATI

3.1. Utjecaj primjene različitih koncentracija selenata i selenita na koncentraciju selena u tkivu izdanka pšenice

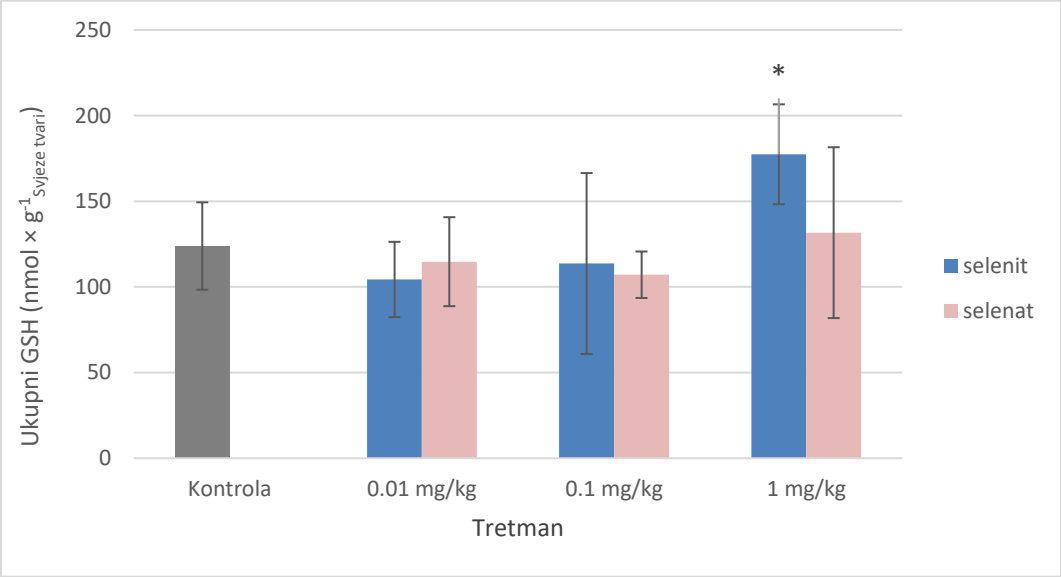
Tretman pšenice otopinama selenata i selenita u trima različitim koncentracijama u trajanju od 15 dana rezultirao je značajnijim porastom koncentracije Se u tkivu izdanaka, sukladno primijenjenoj koncentraciji. Značajno veće koncentracije Se pojavile su se u tkivu izdanaka nakon tretmana selenatom, a najveća koncentracija Se nalazila se u izdancima tretiranim otopinom selenata koncentracije 1 mg/kg. Koncentracije Se u tkivu nakon tretmana selenitom sličnije su koncentracijama u kontrolnim uzorcima, s tim da rastu razmjerno s koncentracijom selenita (Tablica 1.).

Tablica 1. Utjecaj primjene otopine triju različitih koncentracija selenata i selenita na koncentraciju Se u izdancima pšenice (*Triticum aestivum*).

UZORAK	Koncentracija Se [mg kg^{-1} suhe tvari]
pšenica Kontrola - 1	1.582
pšenica Kontrola - 2	0.3232
pšenica Kontrola - 3	0.2163
pšenica Kontrola - 4	0.2168
pšenica Kontrola - 5	0.2027
pšenica Kontrola - 6	0.2448
pšenica Selenit 0.01 mg/kg	0.2579
pšenica Selenit 0.01 mg/kg	0.2907
pšenica Selenit 0.01 mg/kg	0.2924
pšenica Selenit 0.1 mg/kg	0.3132
pšenica Selenit 0.1 mg/kg	0.4652
pšenica Selenit 0.1 mg/kg	0.3771
pšenica Selenit 1 mg/kg	1.912
pšenica Selenit 1 mg/kg	1.781
pšenica Selenit 1 mg/kg	1.711
pšenica Selenat 0.01 mg/kg	3.369
pšenica Selenat 0.01 mg/kg	5.508
pšenica Selenat 0.01 mg/kg	5.481
pšenica Selenat 0.1 mg/kg	11.52
pšenica Selenat 0.1 mg/kg	20.51
pšenica Selenat 0.1 mg/kg	21.85
pšenica Selenat 1 mg/kg	260.9
pšenica Selenat 1 mg/kg	331.5
pšenica Selenat 1 mg/kg	341.5

3.2. Utjecaj primjene različitih koncentracija selenata i selenita na sadržaj ukupnog glutationa u izdancima pšenice

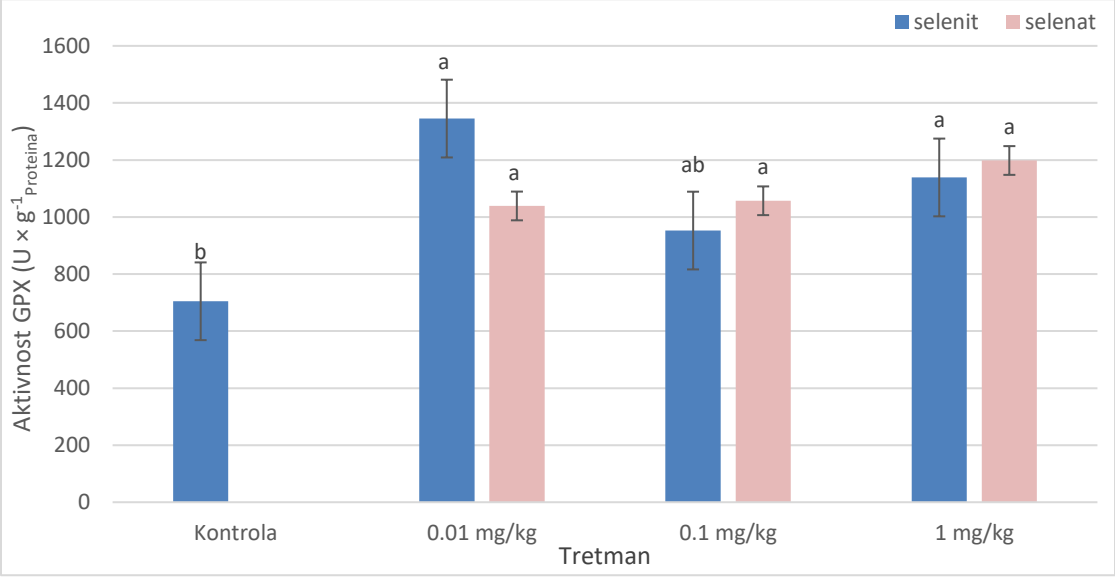
Nakon 15 dana provođenja eksperimenta, značajnije povećanje koncentracije ukupnog glutationa u odnosu na kontrolu zabilježeno je samo u slučaju primjene selenita. Statistički značajna promjena koncentracije tGSH (GSH+GSSG) zabilježena je kod izdanaka nakon tretmana otopinom selenita koncentracije 1 mg/kg i izražena je razlika u sadržaju tGSH u odnosu istu koncentraciju primijenjenog selenata. Tretman ostalim koncentracijama nije uzrokovao značajne promjene u koncentraciji tGSH. Postoji trend smanjenja razine tGSH prilikom aplikacije obje otopine (selenata i selenita) koncentracija 0.01 mg/kg i 0.1 mg/kg.



Slika 2. Koncentracija ukupnog glutationa (tGSH) u izdancima pšenice 15 dana nakon tretmana trima različitim koncentracijama selenita i selenata (0.01, 0.1 i 1 mg/kg). Kontrolni izdanci su tretirani vodom. Rezultati (n=6) su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Razlike između skupina testirane su LSD *post hoc* testom. Zvjezdica (*) označava utvrđenu statistički značajnu razliku ($P < 0.05$).

3.3. Utjecaj primjene različitih koncentracija selenata i selenita na aktivnost glutation-peroksidaze u izdancima pšenice

Rezultati statističke analize ukazuju na postojanje značajnih razlika u aktivnosti GPx-a proučavanih skupina u odnosu na kontrolu te na varijabilnost u aktivnosti između skupina tretiranih selenitom i selenatom istih koncentracija. Nakon 15 dana zabilježen je značajan porast aktivnosti GPx-a u odnosu na kontrolu kod proučavanih skupina, osim u slučaju one gdje je sjeme tretiranom otopinom selenita koncentracije 0.1 mg/kg. Ističe se značajan porast aktivnosti GPx-a u izdancima čije je sjemene tretirano otopinom selenita koncentracije 0.01 mg/kg i izražena je razlika u odnosu na primjenu otopine selenata iste koncentracije, gdje je porast aktivnosti znatno manji. Tretman otopinama selenata i selenita koncentracija 0.1 i 1 mg/kg rezultirao je značajnim povećanjem aktivnosti GPx-a u odnosu na kontrolne skupine, a trend porasta odgovara povećanju koncentracija primijenjenih otopina.



Slika 3. Specifična aktivnost glutation-peroksidaze (GPx) u izdancima pšenice 15 dana nakon tretmana trima različitim koncentracijama selenita i selenata (0.01, 0.1 i 1 mg/kg). Kontrolni izdanci su tretirani vodom. Rezultati (n=6) su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Razlike između skupina testirane su LSD *post hoc* testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

4. RASPRAVA

Se se u prirodi pojavljuje u nekoliko oksidacijskih stanja: -2 (selenid), 0 (elementaran Se), +2 (selenit) i +6 (selenat). Biljke se razlikuju s obzirom na kapacitet akumulacije Se, što je u korelaciji s ekspresijom sulfatnih transportera, reguliranom s GSH i O-acetilserinom (Terry, 2000). Postoje razlike i prema tome koji su oblik selena sklone akumulirati, s obzirom na prisutnost i aktivnost enzima uključenih u Se/S metabolizam. Mehanizam apsorpcije selenata dobro je istražen. Korijen apsorbira selenate aktivnim transportom preko visokoafinitetnog sulfatnog transportnog sustava, ovisno o različitoj selektivnosti biljnih vrsta prema sulfatima odnosno selenatima (Li i sur., 2008), a u obzir se mora uzeti i činjenica međusobnog isključivanja tih spojeva pri apsorpciji. S druge strane, saznanja o mehanizmu apsorpcije selenita prilično su oskudna. Arvy (1993) je predložio način apsorpcije korijenom putem pasivne difuzije, koji je, međutim, odbijen od strane drugih znanstvenika (Terry i sur., 2000). Osim toga, rezultati studije provede od strane Arvyja (1993) pokazali su da se unos selenata i selenita odvija približno istom stopom, moguće i brže. Nadalje, prema Li i sur. (2008), unos selenita reducira se unosom fosfata. Ustanovili su da pšenica može akumulirati selenit iz tla pomoću fosfatnih transportera smještenih u korijenu te da je unos selenita aktivan proces ovisan o metaboličkim reakcijama, a stopa unosa selenata i selenita podjednaka. U njihovu eksperimentu primjenom 5 μM otopine selenata i selenita, pšenica je apsorbirala više selenita nego selenata i zaključili su da je selenit, prisutan u otopinama, pšenici dostupniji nego selenat. Međutim, našim istraživanjem, na temelju usporedbe koncentracija u kontrolnim uzorcima i konačnih koncentracija uzoraka tretiranih s oba oblika Se, ispostavilo se da je selenat apsorbiran u puno većoj mjeri (Tablica 1). Cartes i sur. (2005) također su ustanovili povećanje koncentracije Se u izdancima nakon tretmana selenitom i selenatom (u oba slučaja), međutim, najviše koncentracije Se zapažene su nakon tretmana selenatom, što je u slaganju s našim eksperimentom. No, Li i sur. su također naglasili da je selenit uglavnom jače apsorbiran za čvrstu fazu tla (okside željeza i hidrokside) i tako manje dostupan u otopini tla, što je vjerojatno utjecalo i na provođenje našeg eksperimenta. Osim postojeće razlike mehanizma apsorpcije, selenat i selenit razlikuju se po njihovoj mobilnosti unutar biljaka. Selenat se ne asimilira u organske oblike i lako se prenosi od korijena do ogranaka stabljike i listova, dok selenit ili njegovi derivati imaju tendenciju akumulacije u

korijenu i transformacije u različite organske metaboličke produkte (Li i sur., 2008). U različitim vrstama tala korijenu mogu biti dostupna oba oblika Se. Nadalje, moguća je i apsorpcija volatiliziranog selena iz atmosfere preko površine listova, koji se tada zadržava u korijenu u obliku anorganskog selenita, SeMet, selenoglutationa (SeGSH) i sl. (Çakır i sur., 2012; Terry 2000). Dakle, tretman različitim koncentracijama selenita i selenata u uvjetima ovog eksperimenta pokazao je da je selenat dominantniji oblik Se za pšenicu, jer je uzrokovao značajno povećanje Se u tkivima. No, zbog različite mobilnosti selenata i selenita u drugim biljnim vrstama, za dobivanje vjernijih rezultata bilo bi potrebno proučiti koncentraciju Se i u korijenju pšenice. Stoga bi se, na temelju navedenih spoznaja, i proučavanje sadržaja tGSH i promjene aktivnosti GPx-a trebalo provesti u korijenu, što bi bio ispravniji način ispitivanja njihovih uloga u odgovoru biljaka na suplementaciju Se.

Različiti oblici stresa mogu rezultirati akumulacijom ROS-a u biljkama, uključujući hladnoću, sušu, previše svjetlosti, nedostatak vode, povišen salinitet i teške metale. Pojačana produkcija ROS-a biljkama predstavlja prijetnju. No, pretpostavlja se da ROS mogu imati i signalnu ulogu u aktivaciji odgovora na stres (Mittler, 2002). Primjerice, superoksidni anion ($O_2^{\bullet -}$) (jedna od najznačajnijih reaktivnih kisikovih tvari) inducira pokretanje enzima superoksid-dismutaza (SOD) i reakciju dismutacije. Primjer obrambenog mehanizma je i pojačan unos sulfata, što sprječava zamjenu S sa Se u proteinima. Dva su tipa antioksidansa uključena u održanje redoks ravnoteže: molekule niske molekularne mase (GSH, tokoferol i askorbat) i enzimi (SOD, gvajakol-peroksidaza, katalaza, askorbat-peroksidaza, GPx, GR i dr.) (Feng, 2013). U uvjetima pojačanog stresa, pokreće se niz enzimskih i neenzimskih reakcija koje reagiraju s ROS-om direktno, odnosno indirektno. Direktno ili indirektno (regulacijom antioksidansa), Se može kontrolirati proizvodnju i uništenje ROS-a. Mali dodatak Se može reducirati višak produkcije ROS-a, uzrokovan vanjskim ili unutrašnjim (metaboličkim) procesima. Tri su moguća mehanizma prema kojima se to odvija, a uključuju spontanu dismutaciju $O_2^{\bullet -}$ (bez katalitičkog djelovanja SOD), direktno uništavanje selenokomponentama te regulaciju antioksidacijskih enzima (primjerice reaktivacija GPx, pri čemu se snižava koncentracija H_2O_2). S druge strane, višak Se je snažan okidač za akumulaciju viška ROS-a. Feng i sur. (2013) predlažu hipotezu prema kojoj je pojačana akumulacija ROS-a uz povišene koncentracije Se djelomično povezana s pomakom ravnoteže razine GSH, tiola, feredoksina i/ili

NADPH, koji mogu utjecati na asimilaciju Se. Ukoliko ti spojevi nisu dostupni u dovoljnoj količini za sudjelovanje u asimilaciji Se i suzbijanje ROS-a, dodatak Se može voditi do eksplozivnog stvaranja ROS, inhibirajući rast biljaka. Za određivanje statusa Se u tkivu biljaka potrebni su pouzdani biomarkeri i ovom eksperimentu korišteni su GSH i GPx. Omjer GSH/GSSG i aktivnost GPx-a važni su parametri u određivanju fiziološkog statusa tijekom izloženosti toksičnim učincima Se za vrijeme oksidacijskog stresa. Uz korištenje biomarkera bitno je i usavršavanje metoda mjerenja, s obzirom da neki funkcionalni biomarkeri mogu reagirati na različite načine u ovisnosti o vrsti selenokomponenata zastupljenih u tkivu.

Dosadašnjim istraživanjima, primjerice na korijenju boba (*Vicia faba*), pokazalo se da je izloženost teškim metalima i maloj koncentraciji Se dovela do pojačane vijabilnosti stanica i sadržaja GSH, dok je dodatak značajnije koncentracije Se doveo do gomilanja $O_2^{\bullet -}$, smanjene vijabilnosti stanice i smanjenog sadržaja tGSH, odnosno do narušavanja ravnoteže u stanicama (Mroczek-Zdyrska i Wójcik, 2011). Rezultati našeg istraživanja pokazuju da je jedino kod pšenice uzgajane na selenitu koncentracije 1 mg / kg došlo do statistički značajnog povećanja koncentracije tGSH, premda je i primjena iste koncentracije selenata rezultirala trendom porasta u odnosu na kontrolu (Slika 2.). Porast tGSH označava aktivaciju obrambenog mehanizma, koji štiti biljno tkivo od mogućih oštećenja uzrokovanih viškom selenokomponenata, odnosno selenita u okviru ovog istraživanja. Poveznica između GSH i enzima uključenih u metabolizam Se je redukcija selenita u selenid. Pilon-Smits i Quinn (2010) iznose da se ova redukcija odvija jedino u kloroplastima, ukoliko je posredovana sulfit-reduktazom, analogno redukciji sulfata (enzimska redukcija). Međutim, moguća je i neenzimska redukcija selenita, koja se provodi pomoću GSH, pri čemu se stvaraju ROS djelovanjem sulfhidrilnih (–SH) skupina GSH. Adenozin fosfoselenat (APSe), prekursor selenita, nastao redukcijom akumuliranog selenata, reducira se do GSH-selenita. GSH-selenit se tada, opet djelovanjem GSH, reducira u selenodiglutation (GS-Se-SG). Dakle, kada biljka akumulira selenit, u reakciji s GSH formira se GS-Se-SG, koji se tada reducira do selenola (GS-SeH) i GS-konjugiranog selenida ($GS\text{-}Se^-$) djelovanjem GR uz pomoć NADPH (Terry i sur., 2000). Visoke koncentracije Se uzrokovale su gomilanje ROS-a, koje postaju signal za aktivaciju obrambenog mehanizma, u ovom slučaju pojačanu sintezu GSH uključenog u redukciju selenita. S druge strane, selenat može interferirati sa sintezom GSH na suprotan način. Terry i sur. (2000) iznose da je dodatak Se snažno reducirao

sulfatima induciranu sintezu GSH u listovima špinata (*Spinacia oleracea*), a u slučaju inkubacije iglica smreke (*Picea abies*) selenatom došlo je do opadanja razine GSH. Autori su zaključili da utjecaj selenata ili ostalih selenokomponenata na sintezu GSH može umanjiti sposobnost obrane biljaka od ROS-a i oksidacijskog stresa. Dakle, različiti oblici selenokomponenata mogu imati vrlo specifičan učinak na pojedine biljne vrste. Osim toga, uslijed antagonističkog djelovanja S i Se, odnosno natjecanja za S transportere u plazma membranama, sulfati mogu umanjiti unos viška Se. Stoga, ukoliko se Se dodaje biljkama pod utjecajem oksidacijskog stresa, jasno je da će biti potrebno više S za sintezu više GSH za potrebe asimilacije Se i uništavanja ROS-a. Brojne studije potvrđuju ovu hipotezu. Primjerice, Hassanuzzaman i sur. (2011) otkrili su da je sadržaj GSH povećan pod utjecajem Se u uljanoj repici (*Brassica napus*) podvrgnutoj stresu uzrokovanom sušom i soli. Feng i sur. (2013) predlažu hipotezu da visoke razine Se mogu potaknuti produkciju GSH, što će rezultirati pojačanim stvaranjem $O_2^{\bullet -}$, koji potom aktivira SOD i ostale antioksidativne enzime kako bi se koncentracija $O_2^{\bullet -}$ vratila u ravnotežno stanje. Zato se poboljšanje uvjeta nakon stresa uslijed prekomjerne razine Se može povezati s koncentracijom S i njegovih derivata, uključujući i proučavani GSH. Ukoliko biljke pod stresom izgube sposobnost održavanja ravnotežne koncentracije molekulskih vrsta, npr. GSH, ukupnog sadržaja S i neproteinskih –SH skupina, dodatak viška Se može pogoršati štetu uzrokovanu okolišnim uvjetima (Feng, 2013).

Povišena razina Se u tkivima koja prelazi fiziološke koncentracije, pokazale su studije, rezultira pojačanom aktivnošću GPx-a u mitohondrijima nekih biljaka (Cartes i sur. 2005; Djanaguiraman i sur., 2005; Hartikainen 2005). GPx ima ključnu ulogu u katalizi redukcije H_2O_2 ili lipidnog hidroperoksida uz pomoć GSH, pri čemu GSH prelazi iz svog reduciranog u oksidirano stanje. Dakle, ukoliko se pojača aktivnost GPx, smanjuje se sadržaj GSH zbog reakcije redukcije pri čemu se povećava koncentracija GSSG. GPx je ključan enzim koji se, pod utjecajem Se, može brzo aktivirati na svim svojim lokacijama, pri čemu se koncentracija H_2O_2 primarno smanjuje, a smanjena je i potreba za aktivnošću SOD-a (Feng i sur., 2013). Rezultati našeg istraživanja pokazali su značajan porast aktivnosti GPx-a u odnosu na kontrolu kod proučavanih skupina, osim u skupini tretiranoj selenitom koncentracije 0.1 mg × mL^{-1} (Slika 3.). Statistički značajan porast koncentracije GSH izmjeren je kod pšenice uzgajane na zemlji s dodatkom selenita koncentracije 1 mg × mL^{-1} (Slika 2.), stoga ovakvi rezultati ukazuju na

pozitivnu korelaciju između koncentracije tGSH i promjene u aktivnosti GPx-a. U prethodnim studijama proučavan je odgovor biljaka na Se u kombinaciji s ostalim okolišnim parametrima. Mjereni su fiziološki parametri biljaka *Eruca sativa*, čije su sjemenke uzgajane na Se i *Fagopyrum esculentum*, na kojoj je folijarno primijenjen Se (Germ i Stibilj, 2007). *Eruca sativa* pokazala je znatno pojačan respiracijski potencijal, mjeren aktivnošću elektronskog transportnog sistema (ETS), kod sjemenki tretiranih Se. ETS aktivnost je najjače izražena kod mladih listova s najvećim sadržajem Se, a posljedica toga je pojačana aktivnost GPx-a u mitohondrijima. U prethodnim istraživanjima koja su proveli Xue i Hartikainen (2000), Hartikainen i sur. (2000) te Xue i sur. (2001) zabilježen je porast aktivnost GPx-a u ljulju (*Lolium perenne*) i zelenoj salati (*Lactuca sativa).* Antikancerogeni efekt Se ogleda se u optimiziranju aktivnosti GPx-a. No, višak Se rezultirao je gomilanjem produkata peroksidacije lipida uslijed prooksidativnog učinka, što je značilo veću potrebu za antioksidacijskim enzimima, kakav je i GPx. U slučaju *Fagopyrum esculentum* i primjene folijarnog tretmana Se, nije došlo do značajnog efekta na respiratorni potencijal niti na aktivnost GPx-a. Cartes i sur. (2005) proučavali su antioksidacijski utjecaj Se koji se očituje regulacijom aktivnosti GPx-a i u njihovom eksperimentu sjeme ljulja (*Lolium perenne* cv. Aries) tretirano je otopinama selenita i selenata. Dobiveni rezultati mjerenja koncentracije Se u izdancima, aktivnosti GPx-a i lipidne peroksidacije pokazali su povećanje sadržaja Se u izdancima, što je u slaganju s našim rezultatima, zatim pozitivnu korelaciju između koncentracije Se u izdancima i aktivnosti GPx-a te ovisnost aktivnosti GPx-a o primjenjenom obliku Se. Uzrok potonjem su različiti putevi asimilacije selenata i selenita u višim biljkama. Na temelju navedenih saznanja i u usporedbi s našim istraživanjem, može se zaključiti da utjecaj Se na aktivnost GPx-a ovisi, ne samo o načinu fortifikacije Se, već i o biljnoj vrsti i prisutnosti različitih selenokomponenata u tkivima, odnosno specijaciji koja ovisi i o vremenu trajanja eksperimenta.

5. GLAVNI REZULTATI I ZAKLJUČCI

- Tretman pšenice otopinama selenita i selenata rezultirao je značajnim povećanjem koncentracije Se u biljnom tkivu. Utvrđena je pozitivna korelacija između koncentracije Se u izdacima i povećanja primijenjenih koncentracija oba oblika Se. Međutim, u uvjetima ovog eksperimenta, selenat je znatno bolje apsorbiran u odnosu na selenit prilikom tretmana istim koncentracijama. Uzrok tome bila bi analiza isključivo izdanaka pšenice, a ne i korijenja, u kojem selenit ima veću tendenciju zadržavanja.

- Koncentracija GSH je povećana samo u izdancima pšenice koji su bili tretirani najvećom koncentracijom selenita (1 mg/kg). Razlog tome je pojačana potreba za GSH koji sudjeluje u neenzimskoj redukciji selenita, odnosno metabolizmu Se, što također može pojasniti uzrok maloj koncentraciji selenita u tkivu izdanaka.

- Tretman s oba oblika Se uzrokovao je značajan porast aktivnosti GPx-a u proučavanim skupinama, uz iznimku tretmana selenitom koncentracije 0.1 mg/kg. Porast aktivnosti GPx-a kao odgovor na prisutnost Se sugerira jedinstvenu ulogu ovog enzima u neutralizaciji oksidacijskog stresa u biljkama.

- GSH, kao supstrat GPx-a, sudjeluje u ograničavanju produkcije ROS-a. Na temelju smanjene koncentracije tGSH primjenom manjih koncentracija selenita i selenata (0.01 i 0.1 mg/kg) i povećane aktivnosti GPx-a, utvrđena je pozitivna korelacija između koncentracije tGSH i promjene aktivnosti GPx-a, što ukazuje na uključenost u odgovor biljaka na suplementaciju Se.

6. PREGLED LITERATURE

Akerboom, TP, Sies H. 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* 77:373-382

Arvy MP. 1993. Selenate and selenite uptake and translocation in bean plants (*Phaseolus vulgaris*). *J Exp Bot* 44: 1083–1087.

Çakır Ö, Turgut-Kara N, Arı Ş. 2012. Selenium Metabolism in Plants: Molecular Approaches, *Advances in Selected Plant Physiology Aspects*, Dr. Montanaro G (Ed.). Edited volume. InTech, Rijeka, Croatia, pp. 210-232.

Cartes P, Gianfreda L, Mora ML. 2005. Uptake of Selenium and its antioxidant activity in ryegrass when applied as selenate and selenite forms. *Plant Soil* 276:359–367.

Djanaguiraman M, Durga Devi D, Shanker AK, Annie Sheeba J, Bangarusamy U. 2005. Selenium – an antioxidative protectant in soybean during senescence. *Plant Soil* 272: 77–86.

Dolphin D, Poulson R, Avramović O. 1989. Glutathione: Chemical, biochemical, and medical aspects: John Wiley & Sons Inc.

Fairweather-Tait SJ, Collings R, Hurst R. 2010. Selenium bioavailability: current knowledge and future research requirements. *Am J Clin Nutr* 91: 1484-1491.

Feng R, Wei C, Tu S. 2013. The roles of selenium in protecting plants against abiotic stresses. *Environ Exp Bot* 87:58-68.

Germ M, Stibilj V. 2007, Selenium and plants. *Acta Agric Slov* 89: 65-71.

Hartikainen H. 2005. Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. *J Trace Elem Med Biol* 18: 309-318.

Hartikainen H, Xue T, Piironen V. 2000. Selenium as an antioxidant and pro-oxidant in ryegrass. *Plant Soil* 225: 193-200.

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. *Biol Trace Elem Res* 143: 1758–1776.

Hawkesford MJ, Zhao FJ. 2007. Strategies for increasing the selenium content of wheat. *J Cereal Sci* 46: 282–292.

Jozefczak M, Remans T, Vangronsveld J, Cuypers A. 2012. Glutathione Is a Key Player in Metal-Induced Oxidative Stress Defenses. *Int J Mol Sci* 13: 3145-3175.

Kuznetsov VV, Kholodova VP, Kuznetsov VIV, Yagodin BA. 2003. Selenium regulates the water status of plants exposed to drought. *Dokl Biol Sci* 390: 266-268.

Li HF, McGrath SP, Zhao FJ. 2008. Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite. *New Phytol* 178: 92–102.

Milanović S, Jovanović I, Valčić O. 2014. Selenoproteini. *Vet glasnik* 69 (1-2): 75-89.

Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7(9): 405-410.

Mroczek-Zdyrska M, Wójcik M. 2011. The influence of selenium on root growth and oxidative stress induced by lead in *Vicia faba* L. *minor* plants. *Biol Trace Elem* 147: 320-328.

Pennanen A, Xue T, Hartikainen H. 2002. Protective role of selenium in plant subjected to severe UV irridiation stress. *J Appl Bot* 76: 66–76.

Pilon-Smits EAH, Quinn CF. 2010. Selenium metabolism in plants. *Cell Biology of Metals and Nutrients* 17:225-241.

Terry N, Zayed AM, de Souza MP, Tarun AS. 2000. Selenium in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51:401–32.

Wendel A. 1980. Glutathione peroxidase. In: Jakoby WB, (ed) Enzymatic basis of detoxication. Academic Press, New York. 11:333-353.

Xue TL, Hartikainen H, Piironen V. 2001. Antioxidative and growth-promoting effects of selenium on senescing lettuce. *Plant Soil* 237: 55-61.