

SORTNO I TKIVNO-SPECIFIČNI UČINAK KADMIJA NA METABOLIZAM GLUTATIONA U TRI KULTIVARA SOJE (GLYCINE MAX L.)

Ćosić, Josipa

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:181:395638>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



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

Josipa Ćosić

**Sortno i tkivno-specifični učinak kadmija na metabolizam
glutaciona u tri kultivara soje (*Glycine max* L.)**

Diplomski rad

Osijek, 2019.

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

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

**SORTNO I TKIVNO-SPECIFIČNI UČINAK KADMIJA NA METABOLIZAM GLUTATIONA U
TRI KULTIVARA SOJE (*GLYCINE MAX* L.)**

Josipa Ćosić

Rad je izrađen na: Zavodu za biokemiju i ekofiziologiju biljaka, Odjel za biologiju Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku

Mentor: dr. sc. Rosemary Vuković, doc.

Komentor: dr. sc. Ivna Štolfa Čamagajevac, doc.

Kratak sažetak diplomskog rada

Različite antropogene aktivnosti prouzrokovale su povećanje koncentracija kadmija (Cd) u okolišu što za posljedicu ima povećanu akumulaciju Cd u biljkama. Indukcija oksidacijskog stresa glavni je mehanizam toksičnosti Cd u biljkama. Za obranu od stresa uzrokovanog Cd biljke su razvile različite antioksidacijske i detoksikacijske obrambene mehanizme u kojima glutathion ima jako značajnu ulogu. Različite biljne vrste kao i kultivari iste vrste pokazuju značajne razlike u akumulaciji i toleranciji na Cd. Cilj ovoga istraživanja bio je odrediti učinak Cd na metabolizam glutathiona u izdanku i korijenu tri kultivara soje (*Glycine max* L.) koji se međusobno razlikuju u stupnju akumulacije Cd u zrnu. Osim što su mjerene količine ukupnog, reduciranog i oksidiranog glutathiona, mjerene su i pojedine enzimске komponente metabolizma glutathiona, kao što su aktivnosti glutathion-reduktaze, askorbat-peroksidaze, glutathion S-tranferaze i glutathion-peroksidaze. Učinak Cd na komponente metabolizma glutathiona ovisio je o primjenjenoj koncentraciji Cd, tipu tkiva i u konačnici o kultivaru. Veći antioksidacijski i detoksikacijski odgovor Cd je potaknuo u korijenu što upućuje na tkivno-specifični odgovor. Lucija, sa srednjim akumulacijskim potencijalom za Cd, pokazala je najučinkovitiji odgovor na Cd, čime se može izdvojiti kao najtolerantniji kultivar. Nove spoznaje o biokemijskim mehanizmima toksičnosti odnosno tolerancije na Cd daju širi uvid u istraživanu problematiku, te razvijanje daljnjih strategija za povećanje tolerancije na Cd.

Broj stranica: 49

Broj slika: 14

Broj tablica: 2

Broj literaturnih navoda: 69

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: antioksidacijski odgovor, kadmij, metabolizam glutathiona, soja

Datum obrane: 22.7.2019.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. dr. sc. Zorana Katanić, doc.
2. dr. sc. Rosemary Vuković, doc.
3. dr. sc. Selma Mlinarić, doc.
4. dr. sc. Lidija Begović, doc.

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

University Josip Juraj Strossmayer of Osijek
Department of Biology
Graduate university study programme in Biology

Master's Thesis

Scientific Area: Natural sciences
Scientific Field: Biology

CULTIVAR AND TISSUE-SPECIFIC EFFECT OF CADMIUM ON GLUTATHIONE METABOLISM IN THREE SOYBEAN CULTIVARS (*GLYCINE MAX* L.)

Josipa Ćosić

Thesis performed at: Subdepartment of Plant Ecophysiology and Biochemistry, Department of Biology, J. J. Strossmayer University of Osijek

Supervisor: Rosemary Vuković, PhD, Assist. Prof.

Cosupervisor: Ivna Štolfa Čamagajevac, PhD, Assist. Prof.

Short abstract

Different anthropogenic activities caused an increase in cadmium (Cd) content in the environment, resulting in higher accumulation of Cd in plants. Induction of oxidative stress is the main mechanism of Cd toxicity in plants. In order to defend against Cd induced stress plants developed different antioxidative and detoxification defense mechanisms in which glutathione plays an important role. Different plant species, but also different cultivars of the same species vary widely in the terms of Cd accumulation and tolerance. The aim of this study was to determine the effect of Cd on glutathione metabolism in the shoot and root of three soybean cultivars (*Glycine max* L.), which differ in Cd accumulation capacity in seeds. Along with the measurement of total, reduced and oxidized glutathione content, activities of some enzymatic components of the glutathione metabolism were also measured, such as glutathione reductase, ascorbat peroxidase, glutathione S-transferase and glutathione peroxidase. The effect of Cd on glutathione metabolism components depended upon Cd concentration, type of tissue and the cultivar. Cd induced a higher antioxidative and detoxification response in root than in shoot indicating tissue-specific response. Lucija, with a medium Cd accumulation potential, showed the most effective response to Cd, and can be characterized as the most tolerant cultivar. New insights in biochemical toxicity mechanisms and plant tolerance to Cd provide a wider view in the investigated issue and the developing of further strategies for increasing Cd tolerance.

Number of pages: 49

Number of figures: 14

Number of tables: 2

Number of references: 69

Original in: Croatian

Key words: antioxidative response, cadmium, glutathione metabolism, soybean

Date of the thesis defence: 22.7.2019.

Reviewers:

- 1. Zorana Katanić, PhD, Assist. Prof.**
- 2. Rosemary Vuković, PhD, Assist. Prof.**
- 3. Selma Mlinarić, PhD, Assist. Prof.**
- 4. Lidija Begović, PhD, Assist. Prof.**

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

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Rosemary Vuković i komentorici doc. dr. sc. Ivni Štolfa Čamagajevac na ukazanom povjerenju, savjetima, strpljenju i prenesenom znanju tijekom pisanja ovog rada, ali i tijekom cijelog studiranja.

Zahvale idu i mag. biol. Ani Vuković na pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela rada.

Posebne zahvale idu mojoj Mici na zajedničkim iskustvima te na svakoj pomoći i razumijevanju još od prvih studentskih dana.

Veliko hvala Ivani, Mariji i Nataši na podršci i druženju tijekom studiranja.

Najveće hvala ide mojoj obitelji, mojim roditeljima, sestrama i bratu na pruženoj ljubavi i potpori bez kojih ovo ne bi bilo moguće.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Teški metali u okolišu	1
1.2. Kadmij	2
1.3. Utjecaj kadmija na metabolizam glutaciona	4
1.3.1. Sinteza glutaciona u biljci	4
1.3.2. Uloga glutaciona u detoksikacijskim mehanizmima	5
1.3.3. Uloga glutaciona u antioksidacijskim mehanizmima	7
1.4. Kadmij i soja (<i>Glycine max</i> L.)	10
1.5. Cilj diplomskog rada	14
2. MATERIJALI I METODE	15
2.1. Biljni materijal	15
2.2. Opis eksperimenta	15
2.3. Određivanje ukupnog, reduciranog i oksidiranog glutaciona	17
2.4. Priprema proteinskih ekstrakata za određivanje aktivnosti enzima	18
2.5. Mjerenje aktivnosti enzima glutation-reduktaze	19
2.6. Mjerenje aktivnosti enzima askorbat-peroksidaze	19
2.7. Mjerenje aktivnosti enzima glutation-peroksidaze	20
2.8. Mjerenje aktivnosti enzima glutation S-transferaze	20
2.9. Određivanje koncentracije topljivih proteina	21
2.10. Statistička obrada podataka	21
3. REZULTATI	22
3.1. Učinak Cd na količinu ukupnog, reduciranog i oksidiranog glutaciona u izdanku i korijenu tri kultivara soje	22
3.2. Učinak Cd na aktivnost glutation-reduktaze u izdanku i korijenu tri kultivara soje	26
3.3. Učinak Cd na aktivnost askorbat-peroksidaze u izdanku i korijenu tri kultivara soje	28
3.4. Učinak Cd na aktivnost glutation-peroksidaze u izdanku i korijenu tri kultivara soje	30
3.5. Učinak Cd na aktivnost glutation S-transferaze u izdanku i korijenu tri kultivara soje	32
3.6. Sažetak rezultata	33
4. RASPRAVA	35
5. ZAKLJUČCI	41
6. LITERATURA	42

1. UVOD

1.1. Teški metali u okolišu

Biljke su sesilni organizmi koji su tijekom cijelog svog životnog ciklusa neprestano izloženi različitim okolišnim čimbenicima s potencionalnim negativnim učinkom na njihov rast, razvoj i produktivnost. Značajni fiziološki i metabolički procesi u biljkama narušeni su u prisutnosti toksičnih tvari iz okoliša, poput teških metala (Hossain i sur. 2012). Teškim metalom smatra se svaki metal čija je gustoća veća od 5 g/cm^3 , a od 90 elemenata prirodno prisutnih u okolišu 53 se smatraju teškim metalima. Na temelju topljivosti u fiziološkim uvjetima njih 17 dostupno je živim stanicama te imaju značajnu ulogu u živim organizmima i ekosustavima (Jali i sur. 2016). Među ovim elementima Fe, Mo i Mn bitni su kao mikronutrijenti, dok su Zn, Ni, Cu, Co, V, W, i Cr više ili manje značajni kao elementi u tragovima, ali su toksični u većim koncentracijama. Ag, As, Hg, Cd, Pb i Sb nemaju do sada poznatu funkciju kao nutrijenti te se smatraju toksičnima za biljke i mikroorganizme, u manjoj ili većoj mjeri (Hameed i sur. 2016; Hoseini i Zargari 2013; Benavides i sur. 2005). Zbog toga što ne prolaze mikrobijalnu ili kemijsku razgradnju većina teških metala zadržava se u tlima jako dugo nakon unosa u okoliš (Alves i sur. 2016).

Akumulacija teških metala u okolišu odvija se zbog prirodnih procesa, ali i zbog sve učestalijih antropogenih aktivnosti kao što su rudarenje, korištenje kanalizacijske vode i mulja, različitih industrijskih aktivnosti i korištenja fosfatnih gnojiva (Hussain i sur. 2019; Benavides i sur. 2005). Prisutnost i esencijalnih i neesencijalnih teških metala u atmosferi, tlu i vodi u prekomjernim koncentracijama uzrokuje ozbiljne probleme svim živim organizmima (Benavides i sur. 2005). Teški metali čimbenik su abiotičkog stresa čiji se toksični učinak očituje inaktivacijom i denaturacijom proteina, blokiranjem funkcionalnih skupina važnih metaboličkih molekula, zamjenom esencijalnih metalnih iona biomolekula, konformacijskim promjenama i narušavanjem integriteta membrana (Hossain i sur. 2012). U uvjetima stresa uzrokovanog teškim metalima dolazi i do povećane proizvodnje reaktivnih kisikovih jedinki (ROS od engl. *Reactive Oxygen Species*,) što uzrokuje dodatna oštećenja nukleinskih kiselina, lipida i proteina. Teški metali narušavaju i apsorpciju i prijenos esencijalnih nutrijenata (Hameed i sur. 2016). Svi navedeni negativni učinci teških metala zajedno dovode do inhibicije fotosinteze, respiracije i narušavanja metaboličkih

procesa čiji je krajnji učinak inhibicija rasta viših biljaka i smanjenje prinosa (Hossain i sur. 2012).

O negativnom učinku teških metala na više biljke svjedoče i brojna istraživanja u kojima je u uvjetima povišenih koncentracija teških metala zabilježeno značajno smanjenje mase suhe tvari korijena i izdanka kukuruza (*Zea mays*; Ghani 2010), smanjenje rasta suncokreta (*Helianthus annuus*; Chaves i sur. 2011), kloroza i smanjeni rast riže (*Oriza sativa*) i soje (*Glycine max*; Silva i sur. 2014; Srivastava i sur. 2011), smanjeni rast pšenice (*Triticum durum*; Paradiso i sur. 2008).

1.2. Kadmij

Kadmij (Cd) je neesencijalni teški metal bez poznate metaboličke funkcije u biljkama, ali ga biljke akumuliraju zajedno s esencijalnim elementima (Khan i sur. 2017). Prirodna mobilizacija malih koncentracija Cd, prisutnih u kontinentalnoj kori i plaštu, odvija se putem vulkanskih erupcija, mehaničkog i kemijskog trošenja matičnih stijena i sagorijevanjem vegetacije (Cullen i Maldonado 2013). Posljedično tome Cd je prirodno prisutan u svim tlima, tako da svaka biljna prehrambena namirnica sadrži određenu količinu Cd te su posljedično tome sva živa bića, pa tako i čovjek, izloženi prirodnim količinama Cd (Jali i sur. 2016). Dodatnom povećanju koncentracije Cd u okolišu doprinose antropogene aktivnosti, kao što su korištenje umjetnih gnojiva i pesticida, sagorijevanje fosilnih goriva, industrijski otpad, povećana proizvodnja Zn, Pb i Cu prilikom koje Cd nastaje kao nusprodukt (Grobelak i sur. 2019; Khan i sur. 2017). Prirodni izvori zaslužni su za samo 10% ukupne kontaminacije tla Cd dok su za ostalih 90% odgovorne navedene antropogene aktivnosti (Khan i sur. 2017; Cloquet i sur. 2006). Od svih izvora Cd, korištenje fosfatnih gnojiva smatra se glavnim izvorom zagađenja poljoprivrednih površina (Smolders i Mertens 2013). Normalan raspon koncentracije Cd u tlima obično se kreće između 0.06 i 1.1 ppm (0.5-10 μM ; Kabata-Pendias i Pendias 2001) dok Smolders i Mertens (2013) navode vrijednosti 0.1-1.0 ppm (1-9 μM). Dok se njihove vrijednosti poklapaju, Wagner (1993) s druge strane navodi kako se u nezagađenim tlima koncentracija Cd kreće od 0.04 mM do 0.32 mM (4.5-36 ppm), dok se tla s koncentracijom Cd između 0.32 mM do 1 mM (36-112 ppm) smatraju umjereno zagađenima. Koncentracija Cd u otopini tla kreće se između 0.0002-0.0006 ppm (0.2-0.6 $\mu\text{g/L}$, 0.002-0.005 μM ; Kabata-Pendias i Pendias 2001), odnosno 0.0001-0.005 ppm (0.1-5 $\mu\text{g/L}$, 0.001-0.045 μM ; Smolders i Mertens 2013). Što znači da se samo mali dio od ukupnog Cd

u tlu nalazi u otopini tla i da su godišnji gubitci Cd ispiranjem tla generalno zanemarivi (Smolders i Mertens 2013). Veći broj dugogodišnjih istraživanja u Velikoj Britaniji, Danskoj, Francuskoj i Australiji svjedoče o postupnom povećanju koncentracije Cd u tlu od 0.1 do 0.3 ppm tijekom zadnjih 100 godina (Smolders i Mertens 2013). Sollitto i sur. (2010) navode da je srednja vrijednost koncentracije Cd u urbanom području grada Zagreba 0.4 ppm (4 μM), s time da je maksimalna izmjerena vrijednost od 4.94 ppm (44 μM) veća od maksimalne vrijednosti koju navode Romic i Romic (2003), a koja je iznosila 3.85 ppm (34 μM) na istom području 7 godina ranije. Povećana akumulacija Cd ključan je razlog zagađenja okoliša (Jali i sur. 2016).

Cd je jedan od najštetnijih teških metala u tragovima, kako u biljkama tako i u životinjama (Hoseini i Zargari 2013). Razlikuje se od ostalih teških metala zbog svoje velike topljivosti u vodi te je njegova velika pokretljivost, kako u tlu tako i u biljkama, glavni razlog njegove toksičnosti (Alyemeni i sur. 2017). Zagađenje Cd privlači sve veću pažnju jer ione Cd apsorbira korijenje velikog broja biljnih vrsta i njegova se toksičnost smatra 2-20 $\times$ većom od toksičnosti ostalih teških metala (Hoseini i Zargari 2013). Ukupni sastav metala u biljkama usko je vezan za svojstva supstrata, poput pH, količine organskih tvari i koncentracije svih iona (Grobelak i sur. 2019). Cd se u tlima najčešće nalazi u obliku iona, poput CdCl^+ , CdOH^+ , CdHCO_3^- , CdCl_3^- , CdCl_4^{2-} , $\text{Cd}(\text{OH})_3^-$ i $\text{Cd}(\text{OH})_4^{2-}$ ili u obliku organskih kelata. Međutim, najvažniji oblik Cd u prirodi je Cd^{2+} , a najbitniji faktori koji određuju mobilnost iona Cd u tlu su pH i oksidacijski potencijal. U uvjetima snažne oksidacije, Cd može formirati minerale kao što su CdO i CdCO_3 . Kisela tla dovode do raspadanja kemijskih spojeva u ionski oblik u kojem metali lako prodiru u biljke (Grobelak i sur. 2019). Prema Kabata-Pendias i Pendiasu (2001) stupanj bioraspoloživosti Cd mijenja se od vrlo visoke vrijednosti pri pH 2.0 do vrlo niske pri pH 7.0.

Cd se, poput i drugih neesencijalnih teških metala (npr. Pb), natječe s esencijalnim elementima za unos u korijen putem proteinskih nosača za Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} ili Ca^{2+} te je to jedan od načina na koji teški metali interferiraju s primanjem i metabolizmom ostalih nutrijenata (Naeem i sur. 2019). Iako, Hameed i sur. (2016) navode da je u soji i smreki zabilježen i aktivni i pasivni unos Cd u biljku. Nakon ulaska u korijen Cd dospijeva do ksilema apoplastnim i simplastnim putem vezanjem s ligandima poput organskih kiselina i fitokelatina. Međutim, najveći dio iona Cd zadržava se u korijenu dok se samo mala količina prenosi u izdanak (Benavides i sur. 2005). Prijenos Cd iz korijena u izdanak

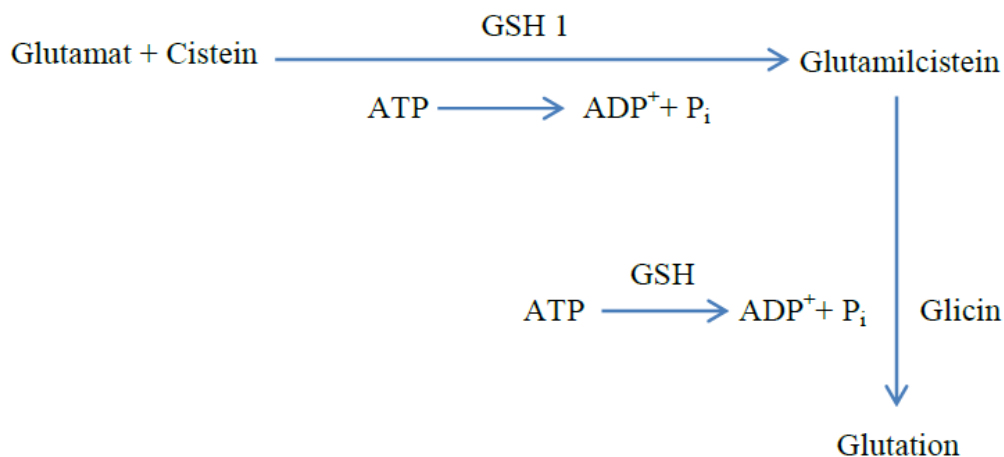
odvija se ksilemom dok se prijenos iz listova u ostale dijelove biljke odvija isključivo floemom (Smolders i Mertens 2013). Količina Cd redom se smanjuje: korijen > stabljika > list > sjeme (Chen i sur. 2003; Dixit i sur. 2001).

Cd negativno djeluje na aktivnost enzima, prijenos i unos esencijalnih elemenata, narušava fotosintezu što sve u konačnici rezultira tamnjenjem korijena, nekrozom, klorozom i odumiranjem tkiva biljaka (Zhi i sur. 2015; Silva i sur. 2014; Qadir i sur. 2014). Xu i sur. (2015) navode da izlaganje Cd uzrokuje klorozu mladih listova i narušavanje prijenosa Fe, Zn i Cu u uročnjaku (*Arabidopsis thaliana*). Također se i akumulira u različitim biljnim dijelovima (Chaves i sur. 2011; Arao i sur. 2003). Apsorpcija iz tla u biljke glavni je put kojim ljudi bivaju izloženi Cd. Povećan unos Cd putem hrane može uzrokovati ozbiljnu štetu vitalnih organa uključujući pluća i jetra, a povezuje se i s nastankom tumora i srčanih bolesti (Khan i sur. 2017). Stoga je zagađenje Cd od velikog značaja i s ekološkog i sa zdravstvenog stajališta (Chaves i sur. 2011).

1.3. Utjecaj kadmija na metabolizam glutationa

1.3.1. Sinteza glutationa u biljci

Glutation (GSH) je niskomolekularni tiol i najučestaliji antioksidans u biljnim stanicama (Grobelač i sur. 2019). Prisutan je u svim staničnim odjeljcima, uključujući citosol, endoplazmatski retikulum, vakuolu i mitohondrije, dok je u najvećoj koncentraciji prisutan u kloroplastima (1-4 mM; Ahmad i sur. 2010). GSH je tripeptid građen od aminokiselina glutamata, cisteina i glicina. U stanicama može postojati u reduciranom obliku (GSH) sa slobodnom tiolnom skupinom ili u oksidiranom obliku (GSSG) s disulfidnom vezom između dvije molekule GSH (Gill i Tuteja, 2010). Biosinteza GSH odvija se dvjema reakcijama. Prvo γ -glutamilcistein-sintetaza katalizira stvaranje peptidne veze između γ -glutamata i cisteina, a potom glutation-sintaza katalizira nastanak glutationa spajanjem nastalog glutamilcisteina i glicina. Obje reakcije odvijaju se uz utrošak ATP-a (Slika 1; Hameed i sur. 2014).



Slika 1. Biosinteza glutationa u biljkama (GSH 1, γ -glutamylcistein-sintetaza; GSH2, glutathione-sintaza). Preuzeto i prilagođeno prema Hameed i sur. 2014.

GSH ima ulogu u rastu i razvoju biljaka sudjelujući u procesima poput diferencijacije i smrti stanice, senescencije, otpornosti na patogene i regulacije enzimske aktivnosti te je uključen u različite mehanizme obrane od stresnih uvjeta u okolišu (Hossain i sur. 2012; Gill i Tuteja 2010). Bitan je u održavanju stabilnosti redoks stanja u stanici i zaštiti tiolnih skupina proteina od oksidacije, detoksikaciji ksenobiotika i konjugaciji metabolita, ekspresiji gena kao odgovora na stres, prijenosu signala i regulaciji transporta sumpora (Bill i Tuteja 2010). GSH služi kao skladišni oblik sumpora u stanicama i uključen je u regulaciju asimilacije sumpora djelovanjem na specifične transportere i enzime poput ATP-sulfurilaze 1 i adenozin 5'-fosfosulfat-redukataze (Hameed i sur. 2014; Noctor i sur. 2012).

1.3.2. Uloga glutationa u detoksikacijskim mehanizmima

Uloga GSH u detoksikacijskim mehanizmima stanice je višestruka (Slika 2). Jedan od mehanizama djelovanja uključuje enzim glutathione S-transferazu (GST). GST je enzim koji katalizira konjugaciju elektrofilnih i hidrofobnih toksičnih tvari s GSH pri čemu nastaju netoksični peptidni derivati (Hameed i sur. 2014). Nastali derivati mogu se izlučiti izvan stanice, prebaciti u vakuolu ili katabolizirati (Hossain i sur. 2012). GST ima bitnu ulogu u neutralizaciji lipidnih hidroperoksida nastalih peroksidacijom membrana, koristeći GSH kao reducens, time štiteći biljku od štetnog djelovanja lipidnih radikala (Hameed i sur. 2014).

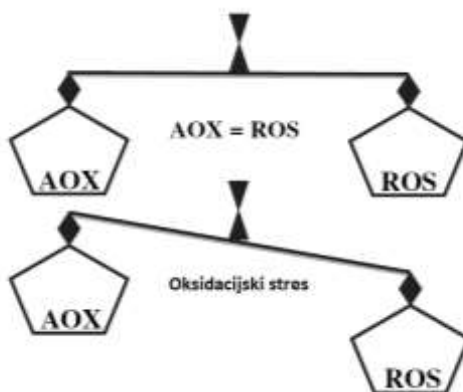
GSH ima bitnu ulogu i u uvjetima stresa uzrokovanim teškim metalima kao prekursor fitokelatina (Noctor i sur. 2012). Fitokelatini su cisteinom bogati polipeptidi s općenitom strukturom $[\gamma\text{-Glu-Cys}]_n\text{-X}$ gdje X može biti Gly, $\gamma\text{-Ala}$, Ser, Gln ili Glu dok n odgovara broju ponavljanja $\gamma\text{-Glu-Cys}$ jedinica, koji obično varira između 2 i 10 (Hossain i sur. 2012). Za sintezu fitokelatina odgovoran je enzim fitokelatin-sintaza (Noctor i sur. 2012). Od svih teških metala Cd je onaj koji u najvećoj mjeri potiče nastanak fitokelatina koji s Cd^{2+} stvara niskomolekularne komplekse u citosolu koji se potom prenose u vakuolu ograničavajući cirkulaciju slobodnih Cd^{2+} iona u citosolu smanjujući time njegovu toksičnost (Hameed i sur. 2014; Hossain i sur. 2012).

1.3.3. Uloga glutationa u antioksidacijskim mehanizmima

Uz ulogu u detoksikacijskim mehanizmima, GSH je uključen i u antioksidacijsku obranu i toleranciju biljaka na stres uzrokovan teškim metalima (Noctor i sur. 2012). Glavni mehanizam fitotoksičnosti Cd je indukcija oksidacijskog stresa, što je naziv za štetno djelovanje ROS-a (Grobelak i sur. 2019). Za razliku od drugih teških metala, Cd je redoks inertan (inaktivan) te ne uzrokuje nastanak ROS-a direktno putem Fentove ili Haber-Weissove reakcije nego indirektno narušavanjem oksidacijskih ili fotosintetskih procesa ili inhibicijom antioksidacijskih enzima uzrokujući smanjenu stopu uklanjanja ROS-a (Andresen i Küpper 2013). Također može zamijeniti redoks-aktivne metale u proteinima mijenjajući njihovu aktivnost (Loix i sur. 2017).

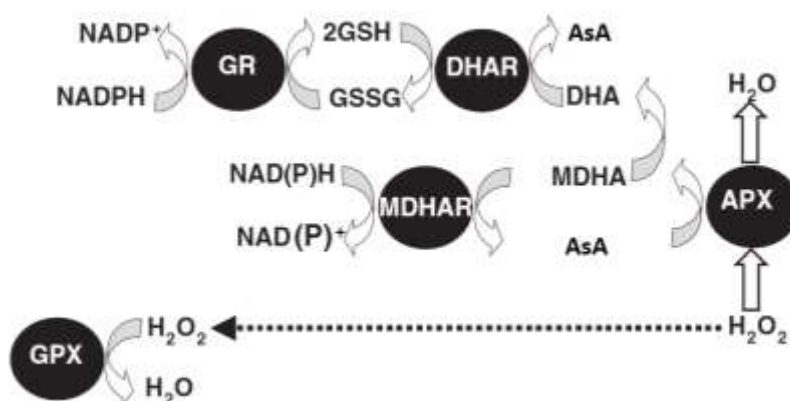
ROS obuhvaćaju slobodne radikale poput superoksidnog radikala ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hidroksilnog radikala ($\text{OH}^{\bullet}$), alkoksi radikala ($\text{RO}^{\bullet}$) i peroksi radikala ($\text{ROO}^{\bullet}$), ali i neke neradikalne produkte poput vodikovog peroksida (H_2O_2) i singletnog kisika ($^1\text{O}_2$; Hasanuzzaman i sur. 2016). Kada su ROS prisutni u malim koncentracijama imaju signalnu ulogu u kontroli i regulaciji rasta i razvoja, prilikom odgovora na abiotički i biotički stres, te u procesima koji dovode do programirane smrti stanice. Radi ovih uloga bitno je održavanje ravnoteže između stvaranja ROS-a i njihove inaktivacije pomoću antioksidacijskog obrambenog sustava. U uvjetima stresa dolazi do pretjeranog formiranja ROS-a i narušavanja ravnoteže što za posljedicu ima oštećenje nukleinskih kiselina, lipida i proteina stanice (Slika 3; Grobelak i sur. 2019). Oštećenje nukleinskih kiselina uključuje deleciju baza, dimerizaciju pirimidina, križno povezivanje lanaca, lomove lanaca i modifikaciju baza poput alkilacije i oksidacije, dok oštećenje lipida podrazumijeva formiranje lipidnih radikala i produkata poput ketona i malondialdehida (Gill i Tuteja

2010). Oksidativne promjene u strukturi proteina uključuju karbonilaciju, oksidaciju tiolnih skupina uz stvaranje disulfidnih mostova, fragmentaciju polipeptidnih lanaca ili agregaciju proteina kao posljedicu stvaranja dodatnih disulfidnih veza (Grobelak i sur. 2019).



Slika 3. Ravnoteža između aktivnosti antioksidacijskog obrambenog sustava (AOX) i formiranja reaktivnih kisikovih jedinki (ROS) i njezino narušavanje u uvjetima oksidacijskog stresa. Preuzeto i prilagođeno prema Gill i Tuteja 2010.

Stres se prvo detektira receptorima na plazmatskoj membrani biljne stanice te se prenosi u unutrašnjost stanice što u konačnici dovodi do aktivacije različitih gena uključenih u odgovor na stres. Produkti tih gena na kraju dovode do tolerancije i adaptacije biljke te joj pomažu preživjeti i nadvladati nepovoljne uvjete u okolišu (Hasanuzzaman i sur. 2016). Stanični antioksidacijski obrambeni sustav uklanja ROS i ponovno uspostavlja narušenu redoks ravnotežu (Hameed i sur. 2014). Antioksidansom se smatra svaka tvar koja je sposobna inaktivirati ROS, a da se pri tome sama ne pretvori u destruktivni oblik, dok antioksidacijski enzimi kataliziraju takve reakcije. Djelujući zajedno, antioksidansi i antioksidacijski enzimi prekidaju kaskadu nekontroliranih reakcija (Gratao i sur. 2005). Ovaj obrambeni mehanizam sastoji se od različitog broja enzima, uključujući i glutathion-reduktazu (GR), askorbat-peroskidazu (APX), glutathion-peroksidazu (GPX) te metabolite poput askorbata (AsA) i GSH koji su svi uključeni u askorbat-glutathionski ciklus koji se još naziva i Halliwell-Asada ciklusom (Slika 4; Hameed i sur. 2014; Ahmad i sur. 2010).



Slika 4. Uloga glutationa u anitoksidacijskom obrambenom sustavu i askorbat-glutationskom ciklusu (GR, glutation-reduktaza; DHAR, dehidroaskorbat-reduktaza; MDHAR, monodehidroaskorbat-reduktaza; APX, askorbat-peroksidaza; GPX, glutation-peroksidaza; GSH, reducirani glutation; DHA, dehidroaskorbat; MDHA, monodehidroaskorbat; GSSG, oksidirani glutation; AsA, askorbat). Preuzeto i prilagođeno prema Gratao i sur. 2005.

Već je dugo poznato da GSH oksidiraju molekule ROS-a, uz nastanak GSSG-a, kao dio antioksidacijske obrane koja sprječava oksidaciju drugih osjetljivih staničnih dijelova (Noctor i sur. 2012). GSH može direktno neutralizirati molekule ROS-a, poput $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\bullet-}$ i $\text{OH}^{\bullet}$, sprječavajući time oksidaciju tiolnih skupina proteina (Hossain i sur. 2012). Veća koncentracija GSH u kloroplastima, u odnosu na ostale dijelove stanice, upućuje na posebnu važnost ove molekule u zaštiti fotosintetskog aparata od oksidacijske štete (Gill i Tuteja 2010). Nadalje, GSH indirektno štiti membrane održavajući u reduciranom stanju α -tokoferol i zeaksantin, koji su uključeni u uklanjanje ROS-a. GSH je ujedno i supstrat nekoliko enzima koji su zaslužni za uklanjanje ROS-a i toksičnih tvari prisutnih u stanici, uključujući i ione teških metala (Hossain i sur. 2012).

GR je flavoprotein i ključan enzim za redukciju nastalog GSSG-a u GSH pri čemu se NADPH koristi kao donor elektrona (Hameed i sur. 2012). Lokaliziran je prvenstveno u kloroplastima, ali je pronađen i u mitohondrijima i citosolu (Gill i Tuteja 2010). Oksidacijom GSH dolazi do dimerizacije i nastanka GSSG-a koji GR reducira natrag u dvije molekule GSH (Kováčik 2019). GR štiti stanicu od oksidacijske štete održavajući stabilnost omjera GSH/GSSG indirektno djelujući i na antioksidacijski kapacitet AsA putem askorbat-glutationskog ciklusa (Hameed i sur. 2012). Kako GR koristi NADPH kao

reducirajući supstrat povećana aktivnost GR-a u biljkama, uz održavanje razine GSH, povećava i omjer $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ te tako osigurava dostupnost NADP^+ kao akceptora u fotosintetskom transportnom lancu elektrona. Na taj način je prijenos elektrona na kisik i stvaranje $\text{O}_2^{\bullet-}$ minimalizirano (Ahmad i sur. 2010).

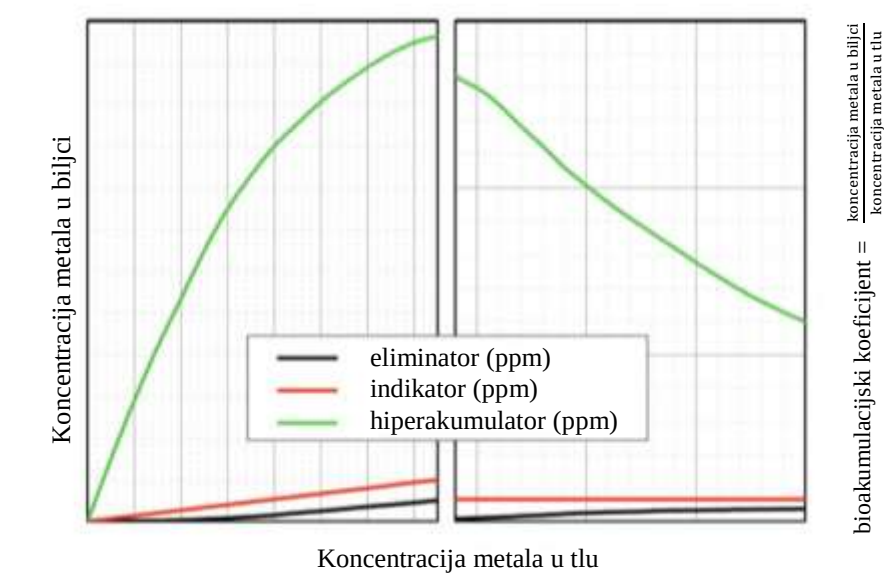
AsA je, uz GSH, jedan od ključnih antioksidansa koji direktno može neutralizirati ROS ($^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\bullet-}$, $\text{OH}^{\bullet-}$) ili služi kao kofaktor enzima APX. U uvjetima stresa biljke moraju održavati visoke razine AsA za borbu protiv oksidacijskog stresa (Hameed i sur. 2016). APX specifičan je za H_2O_2 i nema značajniju ulogu u metaboliziranju drugih peroksida (Noctor i sur. 2012). Porodica APX-a sastoji se od najmanje 5 različitih izooblika uključujući kloroplastni tilakoidni i stromatalni oblik, kao i oblik prisutan u glioksisomima i citosolu (Gill i Tuteja 2010). APX koristi AsA kao reducirajući supstrat za redukciju H_2O_2 u vodu, pri čemu se AsA oksidira u monodehidroaskorbat (MDHA; Hossain i sur. 2012). Nastali MDHA, zatim enzim monodehidroaskorbat-reduktaza reducira u AsA koristeći NAD(P)H kao donor elektrona (Noctor i sur. 2012). Ako se MDHA ne reducira dovoljno brzo natrag u AsA spontano će se pretvoriti u dehidroaskorbat (DHA). Nastali DHA može se reducirati do AsA djelovanjem enzima dehidroaskorbat-reduktaze (DHAR) u reakciji koja zahtjeva GSH. U uvjetima nedostatka DHAR-a ili GSH-a, DHA se ireverzibilno hidrolizira u 2,3-diketoglukonsku kiselinu. Brza regeneracija DHA stoga je nužna za održavanje antioksidacijskog kapaciteta AsA (Hossain i sur. 2012).

GPX su još jedna obitelj enzima koji koriste GSH kao reducirajući supstrat. GPX su prisutni u različitim biljnim tkivima i organelima. U uročnjaku (*A. thaliana*) identificirano je 8 članova ove obitelji enzima čija se ekspresija razlikuje u različitim razvojnim stadijima biljke. Smatra se da imaju ulogu u prijenosu signala i regulaciji razvoja biljaka iako ta uloga još nije potpuno razjašnjena (Bela i sur. 2015). Njihova uloga kao enzimskih antioksidansa, u borbi protiv oksidacijskog stresa, temelji se na redukciji H_2O_2 , organskih i lipidnih hidroperoksida u H_2O i alkohol uz oksidaciju GSH (Hossain i sur. 2012).

1.4. Kadmij i soja (*Glycine max* L.)

Negativan utjecaj teških metala najviše se očituje induciranjem oksidacijskog stresa, dok antioksidacijski odgovor može varirati ovisno o vrsti ili kultivaru. Teški metali induciraju stres različitim mehanizmima, a različito raspoređeni antioksidansi u biljnim dijelovima dovode do različitog odgovora u različitim organelima, stanicama i tkivima, pri

čemu u procesu detoksikacije i kompleksiranja teških metala mogu reducirati njihovu toksičnost (Gratão i sur. 2005). Iako je Cd toksičan za biljke u većim koncentracijama, u malim koncentracijama njegova fitotoksičnost varira ovisno o koncentraciji u tlu kao i o različitim biljnim vrstama pa i različitim kultivarima iste vrste (Anjum i sur. 2015; Silva i sur. 2014; Arao i sur. 2003). Različite biljne vrste razlikuju se u potencijalu akumulacije za Cd, tako žitarice akumuliraju najmanje koncentracije dok povrće sa širokim listovima akumulira najveće koncentracije Cd (Smolders i Mertens 2013). Na temelju razlika u akumulaciji teških metala biljke se mogu podijeliti u tri skupine: biljke eliminatori, indikatori i hiperakumulatori (Slika 5; Küpper i Leitenmaier 2013).



Slika 5. Tri glavne skupine biljaka na temelju sposobnosti akumulacije teških metala: shematski prikaz korelacije između koncentracije metala u tlu (ili hranjivom mediju) i koncentracije metala u biljkama. Preuzeto i prilagođeno prema Kupper i Leitenmaire 2013.

Da bi biljka bila klasificirana kao hiperakumulator mora zadovoljiti četiri kriterija: 1) vrijednost koncentracije teškog metala u izdanku podijeljena s koncentracijom teškog metala u korijenu mora iznositi > 1 ; 2) vrijednost koncentracije teškog metala u izdanku podijeljena s koncentracijom teškog metala u tlu mora iznositi > 1 (bioakumulacijski koeficijent > 1); 3) mora akumulirati između 10 i $500\times$ više teških metala u usporedbi s drugim biljkama; i 4) koncentracija Cd mora iznositi više od 100 mg/kg tkiva (za Cu, Pb, Ni i Cr ta vrijednost iznosi 1000 g/kg, a za Zn 10000 mg/kg). Biljke eliminatori su biljke koje imaju visoke koncentracije teškog metala u korijenu, ali odnos koncentracije

izdanak/korijen iznosi < 1 . Biljka je indikator kada koncentracije teških metala u tkivima reflektiraju koncentracije u okolnom tlu (Mehes-Smith i sur. 2013).

Hiperakumulatorske biljne vrste aktivno uzimaju povećane koncentracije teških metala iz okoliša i skladište ih u nadzemnom dijelu bez negativnog učinka na rast te se mogu koristiti za fitoremedijaciju teškim metalima zagađenih područja (Miransari 2016; Küpper i Leitenmaier 2013). Trenutno je poznato oko 400 vrsta iz 45 biljnih porodica koje mogu hiperakumulirati teške metale u svojim tkivima, a većina njih pripada porodici *Brassicaceae*, a najpoznatiji rodovi su *Alyssum* i *Thlaspi* (Mehes-Smith i sur. 2013). Indikatorske biljke s druge strane akumuliraju teške metale iz tla (ili hranjivog medija) tako da koncentracija metala u tkivima gotovo linearno odražava koncentraciju metala u okolišu, te se na taj način mogu koristiti kao indikatori zagađenja okoliša, po čemu su i dobili naziv (Küpper i Leitenmaier 2013). Ukoliko ove biljke nastave akumulirati teške metale, s vremenom će uvenuti (Mehes-Smith i sur. 2013). Većina biljaka koje su tolerantne na teške metale pripadaju u skupinu biljaka eliminatora, koje sprječavaju akumulaciju teških metala u tkivima. One se mogu koristiti za ponovnu sadnju na toksičnim mjestima gdje povećana ekstrakcija teških metala iz tla nije moguća ili nije poželjna. U tom slučaju, mala koncentracija metala u nadzemnim dijelovima biljke predstavlja prednost jer životinje prilikom hranjenja tim biljkama neće unositi povećane koncentracije metala u svoj organizam. Sprječavanje akumulacije teških metala poželjna je karakteristika i poljoprivrednih kultura (Küpper i Leitenmaier 2013). Primjeri nekih biljaka eliminatora su vrste dvogodišnja pupoljka (*Oenothera biennis*), komelina (*Commelina communis*), *Silene maritima*, troskot (*Agrostis stolonifera*), te neke drvenaste vrste iz roda *Salix*, *Populus* i kalifornijski bor (*Pinus radiata*; Mehes-Smith i sur. 2013).

U dosad provedenim istraživanjima izmjerena koncentracija Cd bila je veća u korijenu nego u izdanku soje (Alyemeni i sur. 2017; Felici i sur. 2014; Hashem 2014; Shute i Macfie 2006; Arao i sur. 2003), što znači da je omjer koncentracija izdanak/korijen < 1 te se soja, na temelju akumulacije teških metala, a u ovom slučaju Cd, svrstava u skupinu biljaka eliminatora.

Soja (*Glycine max* L.) je jedna od najsvestraniji biljnih vrsta i ključan izvor proteina i ulja kako u umjerenim tako i u tropskim područjima. Osim što se koristi za proizvodnju ulja i hrane za ljudsku konzumaciju, koristi se i kao hrana za životinje, biognojivo za usjeve te za proizvodnju biogoriva (Slika 6; Hasanuzzaman i sur. 2016). Ako se u obzir

uzmu površine koje danas zauzima (oko 123 milijuna hektara) i iznos ukupne proizvodnje u svijetu (oko 352 milijuna tona) soja se smatra jednim od glavnih izvora bjelančevina na globalnoj razini. U Republici Hrvatskoj u zadnjih nekoliko godina proizvodnja soje pokazuje povećanje kako u površinama tako i u urodima zrna (Web1).



Slika 6. Raznolikost upotrebe soje (*Glycine max* L.). Preuzeto i prilagođeno prema Hasanuzzaman i sur. 2016.

Soja je kultura prikladna za rast u širokom rasponu klimatskih uvjeta i na različitim tipovima tla, ali je često pod utjecajem različitih abiotičkih stresora, poput saliniteta, suše, ekstremnih temperatura, toksičnog djelovanja teških metala, nedostatka nutrijenata, UV radijacije, koji mogu dovesti do znatnih gubitaka u prinosu i kvaliteti usjeva. Kako su biljke sésilni organizmi ne mogu izbjeći štetne okolišne čimbenike nego im se pokušavaju prilagoditi (Hasanuzzaman i sur. 2016). Nekoliko dosad provedenih istraživanja navodi da se različiti genotipovi soje mogu znatno razlikovati u akumulacijskom potencijalu za Cd, a posljedično i u toleranciji na stres uzrokovan Cd (Alyemeni i sur. 2017; Zhi i sur. 2015; Arao i sur. 2003). Ukoliko se određena svojstva soje, uključujući skladištenje teških metala u vakuole, sinteza molekula koje mogu prenositi teške metale u korijen i tolerancija na

stres uzrokovan teškim metalima poboljšaju, soja će moći rasti i davati veći prinos u uvjetima takvog stresa (Miransari 2016). Prema tome, prinos soje može se povećati minimaliziranjem štete nastale kao rezultat stresa u okolišu te je iz toga razloga nužno istraživanje odgovora i adaptacije biljaka na stres (Hasanuzzaman i sur. 2016).

1.5. Cilj diplomskog rada

Za obranu od stresa uzrokovanog Cd biljke su razvile različite antioksidacijske i detoksikacijske mehanizme u kojima GSH ima jako značajnu ulogu. Tako, GSH sudjeluje kao supstrat enzima koji su dio različitih detoksikacijskih procesa, te je direktno i indirektno uključen u antioksidacijski obrambeni sustav biljaka. Kako je proizvodnja soje kao vodeće uljne i proteinske kulture često ugrožena uslijed povišenih koncentracija Cd u tlu, cilj je ovog istraživanja bio:

- odrediti utjecaj različitih koncentracija Cd na metabolizam GSH, odnosno na količinu ukupnog, reduciranog i oksidiranog GSH, kao i na pojedine enzimске komponente metabolizma GSH u tri hrvatska kultivara soje, koji se međusobno razlikuju prema sposobnosti akumulacije Cd u zrnu (Korana > Lucija > Ika)
- utvrditi postoje li razlike u biokemijskom odgovoru na tretman Cd između tri istraživana kultivara, te na temelju dobivenih rezultata izdvojiti najotporniji kultivar soje
- utvrditi postoje li razlike u mjerenim komponentama metabolizma GSH između izdanka i korijena tri kultivara soje

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Biljni materijal

U istraživanju je korišteno sjeme tri hrvatska kultivara soje, Korana, Lucija i Ika, proizvedena na Poljoprivrednom institutu u Osijeku. Navedeni su kultivari odabrani na temelju preliminarnih istraživanja provedenih na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti u Osijeku, kojima je utvrđeno kako se ova tri kutivara razlikuju po stupnju akumulacije Cd u zrnu. Korana je okarakterizirana kao kultivar s najvećim akumulacijskim potencijalom, nakon čega slijedi Lucija sa srednjim akumulacijskim potencijalom, te je kao kultivar s najmanjim akumulacijskim kapacitetom okarakterizirana Ika (neobjavljeno istraživanje).

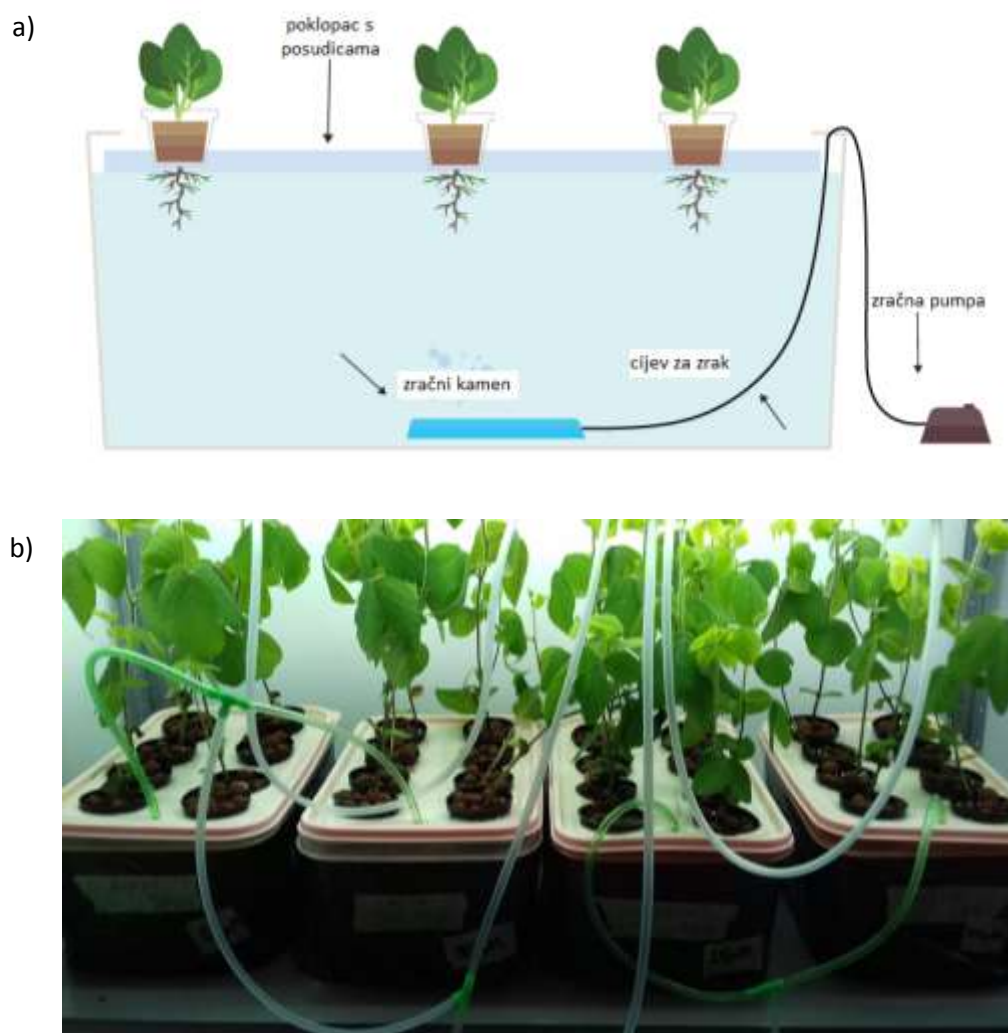
2.2. Opis eksperimenta

Sjeme soje je prije naklijavanja sterilizirano, tako što je prvo dobro isprano u dH₂O kako bi se uklonile grube nečistoće, nakon čega je sterilizirano 5 min u 75%-om etanolu uz stalno miješanje. Nakon sterilizacije alkoholom sjeme je isprano u sterilnoj dH₂O te je dodatno sterilizirano 10 min u 1%-noj otopini izosana uz dodatak Tween-a (u konačnoj koncentraciji od 0.001%) uz stalno miješanje. Sjeme je potom nekoliko puta dobro isprano u sterilnoj dH₂O, u kojoj je i ostavljeno preko noći na +4 °C zbog procesa bubrenja. Kao hranjivi medij u eksperimentu je korištena hranjiva otopina po Hoaglandu (pH 6.0, Tablica 1; Hoagland i Arnon 1950). Nakon procesa bubrenja sjeme je postavljeno na klijanje u plastične posude (dimenzije 10×20 cm, 40 sjemenki/posudi) sa sterilnim kvarcnim pijeskom koji je prethodno natopljen otopinom Hoaglanda jakosti 1/4 (volumen od 100 mL). Sjemenke su klijale 7 dana u tami, na temperaturi od 23 °C. Klijanci soje podjednake veličine postavljeni su dalje na hidroponski uzgoj. Korišten je najjednostavniji tip hidroponskog sustava tzv. vodena kultura (Slika 7a). Hidroponski se sustav sastojao od plastičnih posuda zapremnine 4 L, na koje je postavljen poklopac s 8 malih posudica mrežaste strukture za hidropon (Ø 5 cm), punjenih sterilnom ekspandiranom glinom kao supstratom u koji se postavlja po jedan klijanac soje. Plastične su posude punjene hranjivom otopinom po Hoaglandu (3.5 L), te se u svakoj posudi nalazio zračni kamen povezan sa zračnom pumpom koja raspršuje kisik i snabdijeva korijen kisikom, budući da je u ovom sustavu korijen direktno uronjen u hranjivu otopinu. Hidroponski sustav sa sojom postavljen je u klima sobu na temperaturu od 23 °C, s fotoperiodom 16h dan/8h noć (Slika 7b).

Tablica 1. Sastav hranjive otopine po Hoaglandu.

Makronutrijenti – stock otopine	Mr (g/mol)	c (M)	γ (g/L)	Volumen za 1L (mL)	Element	Koncentracija elementa u 1L otopine (mM)
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	115.03	1	115.03	1	P	1
KNO_3	101.11	1	101.11	6	K	6
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	236.16	1	236.16	4	Ca	4
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246.47	1	246.47	2	Mg	2
Mikronutrijenti – stock otopine	Mr (g/mol)	c (mM)	γ (g/L)	Volumen stock-a za 1l otopine (mL)	Element	Koncentracija elementa u 1L otopine (μM)
H_3BO_3	61.84	46.25	2.86	1	B	46.25
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	197.91	9.146	1.81		Mn, Cl	9.146
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	289.55	0.765	0.22		Zn	0.765
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	249.71	3.204	0.8		Cu	3.204
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	241.97	1.033	0.25		Mo	1.033
Fe-EDTA	346.08	20	6.922	0.25	Fe	5

Tijekom kultivacije, ukupnog trajanja 3 tjedna, hranjiva otopina po Hoaglandu redovito je mijenjana svaki tjedan, pri tome je prvi tjedan korištena otopina jakosti 1/3, drugi tjedan kultivacije otopina jakosti 1/2, i treći tjedan otopina pune jakosti. Nakon 2. tjedna kultivacije klijanci soje tretirani su Cd u trajanju od 7 dana. Tretman je vršen sa stock otopinom kadmijeva acetata ($\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$), pri čemu su konačne koncentracije Cd bile 25, 50 i 100 μM . Kontrolne biljke tretirane su dH_2O (8 replika/tretmanu/kultivaru).



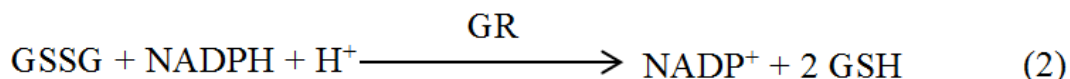
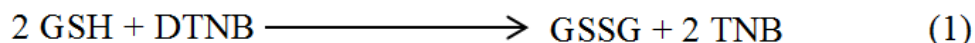
Slika 7. Shematski prikaz korištenog hidroponskog sustava vodena kultura (a; preuzeto s web2) i uzgoj soje u hidroponskom sustavu (b; fotografirala: Josipa Ćosić).

2.3. Određivanje ukupnog, reduciranog i oksidiranog glutationa

Količina ukupnog (tGSH), reduciranog i oksidiranog GSH određena je metodom koju su opisali Akerboom i sur. (1981) i Nair i sur. (1991). Tkivo izdanka i korijena usitnjeno je u tekućem dušiku pomoću tarionika i tučka te je 0.1 g usitnjenog praha homogenizirano u 1 mL 5% 5-sulfosalicilne kiseline (SSA) na vibracijskoj miješalici. Nakon inkubacije na ledu u trajanju od 10 min, homogenat je centrifugiran 15 min pri 22 000 g na +4 °C. Dobiveni deproteinizirani supernatant korišten je za mjerenje tGSH, GSH i GSSG.

Za mjerenje tGSH ($\text{tGSH} = \text{GSSG} + \text{GSH}$) i GSSG koristila se kinetička metoda u kojoj GSH uzrokuje kontinuiranu redukciju 5,5-ditiobis (2-nitrobenzoične kiseline)

(DTNB) pri čemu nastaje žuto obojeni produkt 5-tio-2-nitrobenzoična kiselina (TNB), dok se nastali GSSG reciklira pomoću GR-a i NADPH (jednadžbe (1) i (2)). Porast apsorbancije, do kojeg dolazi nastankom TNB-a, mjeri se na 412 nm.



Reakcijska smjesa za spektrofotometrijsko kinetičko mjerenje sastojala se od 0.115 U/mL GR-a, 0.031 mg/mL DTNB-a i deproteiniziranog uzorka u 100 mM kalij-fosfatnom puferu s 1 mM EDTA (pH 7.0), u konačnom volumenu od 1.05 mL. Nakon 4 min ekvibracije na sobnoj temperaturi reakcija je započeta dodatkom NADPH konačne koncentracije 48 μM . Porast apsorbancije mjeren je pri 25 °C na 412 nm, svakih 30 s tijekom 4 min. Količina tGSH određena je pomoću standardne krivulje s GSH-om, a rezultati su izraženi u nmol/g svježe tvari.

Za određivanje GSSG-a, alikvot deproteiniziranog uzorka inkubiran je s 2-vinilpiridinom i trietanolaminom, pri pH 7.0. Nakon 60 min inkubacije provedeno je spektrofotometrijsko mjerenje na isti način kao i kod mjerenja tGSH. Količina GSSG-a određena je pomoću standardne krivulje s GSSG-om, a rezultati su izraženi u nmol/g svježe tvari. Količina GSH izračunata je iz razlike tGSH i GSSG-a, i izražena u nmol/g svježe tvari.

2.4. Priprema proteinskih ekstrakata za određivanje aktivnosti enzima

Tkivo izdanka i korijena soje usitnjeno je u tekućem dušiku pomoću tarionika i tučka uz dodatak polivinil-polipirolidona. Oko 0.2 g usitnjenog praha homogenizirano je u 1 mL hladnog ekstrakcijskog pufera (100 mM kalij-fosfatni pufer s 1 mM EDTA, pH 7.0) na vibracijskoj miješalici. Proteini su potom ekstrahirani inkubacijom na ledu u trajanju od 15 min i centrifugiranjem 15 min pri 22 000 g na +4 °C. Proteinski ekstrakt korijena odvojen je i pohranjen na -80 °C do daljnjih analiza, dok je talog izdanka, nakon odvajanja dobivenog supernatanta, reekstrahiran ponovnim dodatkom ekstrakcijskog pufera i centrifugiranjem. Pulirani proteinski ekstrakt izdanka je zatim pročišćavan gel-filtracijskom kromatografijom pomoću PD-10 kolonica punjenih sa Sephadex G-25 medijem. Prije upotrebe kolona je ekvilibrirana s 25 mL ekstrakcijskog pufera, nakon čega

je na kolonu dodano 2 mL proteinskog ekstrakta i 0.5 mL ekstrakcijskog pufera. Proteinska frakcija skupljena je u 3.5 mL eluensa koji je pohranjen na -80 °C do daljnjih analiza. Dobiveni proteinski ekstrakti korišteni su za spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima i određivanje koncentracije proteina.

2.5. Mjerenje aktivnosti enzima glutation-reduktaze

Aktivnost GR-a određena je metodom koju su opisali Dolphin i sur. (1989). Metoda se temelji na redukciji GSSG-a koju katalizira GR koristeći NADPH (jednadžba (3)). Pad apsorbancije, do kojeg dolazi uslijed smanjenja količine NADPH-a, prati se spektrofotometrijski na 340 nm.



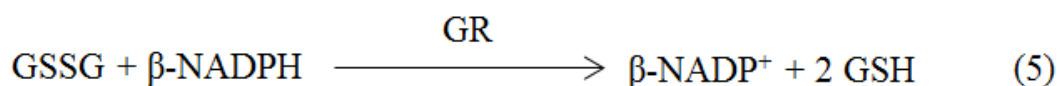
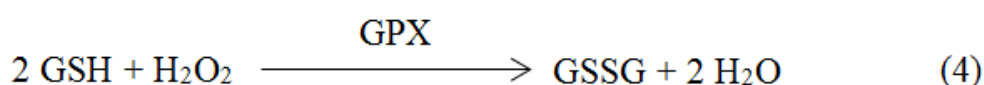
Reakcijska smjesa za kinetičko mjerenje sastojala se od 1 mM GSSG-a i proteinskog ekstrakta u 100 mM kalij-fosfatnom puferu s 1 mM EDTA (pH 7.5). Nakon ekvibracije na sobnoj temperaturi u trajanju od 10 min reakcija je započeta dodatkom NADPH u konačnoj koncentraciji od 0.1 mM. Smanjenje apsorbancije praćeno je pri 25 °C, na 340 nm svakih 30 s tijekom 4 min. Specifična aktivnost GR-a računata je koristeći molarni ekstinkcijski koeficijent za NADPH ($\epsilon = 6.220 \text{ mM/cm}$), a izražena je u jedinicama aktivnosti GR-a po gramu proteina (U/g proteina, $U = \mu\text{mol/min}$).

2.6. Mjerenje aktivnosti enzima askorbat-peroksidaze

Aktivnost APX-a određena je metodom koju su opisali Nakano i Asada (1981). Reakcijska smjesa za kinetičko mjerenje sastojala se od 0.5 mM askorbinske kiseline i proteinskog ekstrakta u 50 mM kalij-fosfatnom puferu s 0.1 mM EDTA (pH 7.0). Nakon ekvibracije, reakcija je potaknuta dodatkom H_2O_2 u konačnoj koncentraciji od 0.12 mM. Pad apsorbancije mjeren je pri 25 °C na 290 nm svakih 15 s tijekom 3.5 min. Specifična aktivnost enzima izražena je kao količina (μmol) razgrađenog askorbata po minuti po gramu proteina, odnosno u jedinicama aktivnosti APX-a po gramu proteina (U/g proteina, $U = \mu\text{mol/min}$).

2.7. Mjerenje aktivnosti enzima glutation-peroksidaze

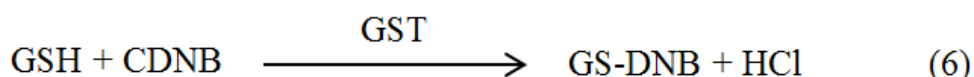
Aktivnost GPX-a određena je prema modificiranoj metodi koju je opisao Wendel (1980), a koristi H_2O_2 kao supstrat. Metoda je modificirana i prilagođena za kinetičko mjerenje u mikrotitarskim pločicama s 96 jažica. Metoda se zasniva na redukciji H_2O_2 u H_2O pomoću GPX-a pri čemu se GSH oksidira u GSSG. Nastali GSSG reducira se natrag u GSH pomoću GR-a pri čemu se NADPH oksidira u NADP^+ (jednadžba (4) i (5)). Smanjenje apsorbancije, koje nastaje zbog smanjenja količine NADPH-a, prati se na 340 nm.



Reakcijska smjesa sastojala se od 0.12 mM NADPH, 3.2 U GR-a, 1 mM GSH i proteinskog ekstrakta u 50 mM kalij-fosfatnom puferu s 0.4 mM EDTA (pH 7.0), u ukupnom volumenu od 300 μL . Nakon 5 min inkubacije reakcija je započeta dodatkom H_2O_2 u konačnoj koncentraciji od 0.0007% (w/w). Pad apsorbancije praćen je na 340 nm tijekom 5 min. Specifična aktivnost GPX-a računata je koristeći molarni ekstinkcijski koeficijent za NADPH ($\epsilon = 6.220 \text{ mM/cm}$), a izražena je u jedinicama aktivnosti GPX-a po gramu proteina (U/g proteina, $\text{U} = \mu\text{mol/min}$).

2.8. Mjerenje aktivnosti enzima glutation S-transferaze

Aktivnost GST-a određena je metodom koja se temelji na konjugaciji GSH-a s 1-kloro-2,4-dinitrobenzenom (CDNB), koju katalizira GST, pri čemu nastaje GS-DNB konjugat (jednadžba (6)). Porast apsorbancije, do kojeg dolazi nastankom GS-DNB-a, mjeri se na 340 nm (Habig i sur. 1974).



Reakcijska smjesa sastojala se od 2 mM GSH, 1 mM CDBN-a i proteinskog ekstrakta u 100 mM kalij-fosfatnom puferu s 1 mM EDTA (pH 6.5), u ukupnom volumenu

od 200 μL . Porast apsorbancije praćen je na 340 nm svake minute tijekom 6 min. Specifična aktivnost GST-a izražena je kao količina (μmol) nastalog GS-DNB-a po minuti po gramu proteina, odnosno u jedinicama aktivnosti GST-a po gramu proteina (U/g proteina, $\text{U} = \mu\text{mol/min}$).

2.9. Određivanje koncentracije topljivih proteina

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

2.10. Statistička obrada podataka

Dobiveni podaci obrađeni su u statističkom programu GraphPad Prism 5.03. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti $\pm$ standardna devijacija. Normalnost distribucije testirana je Shapiro-Wilksovim testom, a homogenost varijanci Levene testom. Jednofaktorska analiza varijance (engl. *one-way ANOVA*) korištena je kako bi se odredilo postoji li razlika između različitih skupina istog kultivara. Nakon što je utvrđeno postojanje razlike korišten je *post hoc* test Dunnett kako bi se utvrdilo koje se skupine tretirane Cd razlikuju od kontrolne skupine istog kultivara. Svi testovi provedeni su na razini značajnosti od 5% ($p < 0.05$) dok je *post hoc* test Dunnett proveden na razini značajnosti od 5, 1 i 0.1% (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

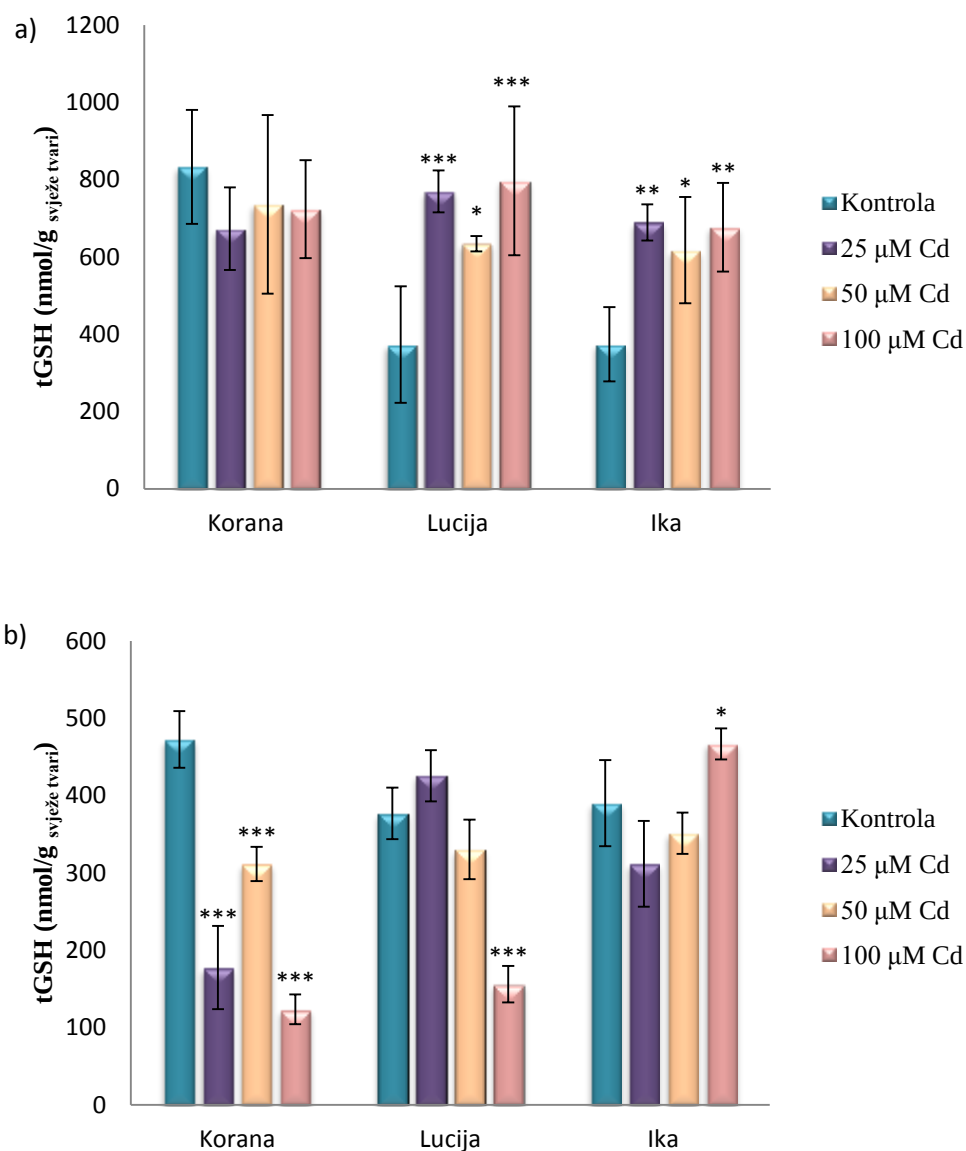
3. REZULTATI

3.1. Učinak Cd na količinu ukupnog, reduciranog i oksidiranog glutationa u izdanku i korijenu tri kultivara soje

U izdanku soje, svi tretmani Cd uzrokovali su statistički značajno povećanje količine tGSH u kultivarima Lucija i Ika, dok isti tretmani kod kultivara Korana nisu uzrokovali značajnu promjenu u količini tGSH, u odnosu na kontrolu (Slika 8a). U izdanku Lucije najveće povećanje količine tGSH zabilježeno je kod tretmana s najvećom koncentracijom Cd (113%), dok su tretmani s 25 μM i 50 μM Cd uzrokovali povećanje redom za 106% i 70%. U kultivaru Ika zabilježeno je povećanje od 84% nakon tretmana 25 μM koncentracijom Cd, od 65% nakon tretmana 50 μM koncentracijom Cd, odnosno 81% nakon tretmana 100 μM koncentracijom Cd.

U korijenu kultivara Korana tretman svim koncentracijama Cd uzrokovao je statistički značajno smanjenje količine tGSH, koje je iznosilo redom 62% (25 μM), 34% (50 μM) i 74% (100 μM). U korijenu kultivara Lucija, statistički značajno smanjenje tGSH (59%) uzrokovao je samo tretman najvećom koncentracijom Cd (100 μM), dok ostale koncentracije nisu uzrokovale značajne promjene u odnosu na kontrolu. Za razliku od Lucije, u kultivaru Ika, najveća koncentracija Cd uzrokovala je značajno povećanje količine tGSH za 20%, dok ostali tretmani nisu uzrokovali značajnu razliku u količini tGSH, u odnosu na kontrolu (Slika 8b).

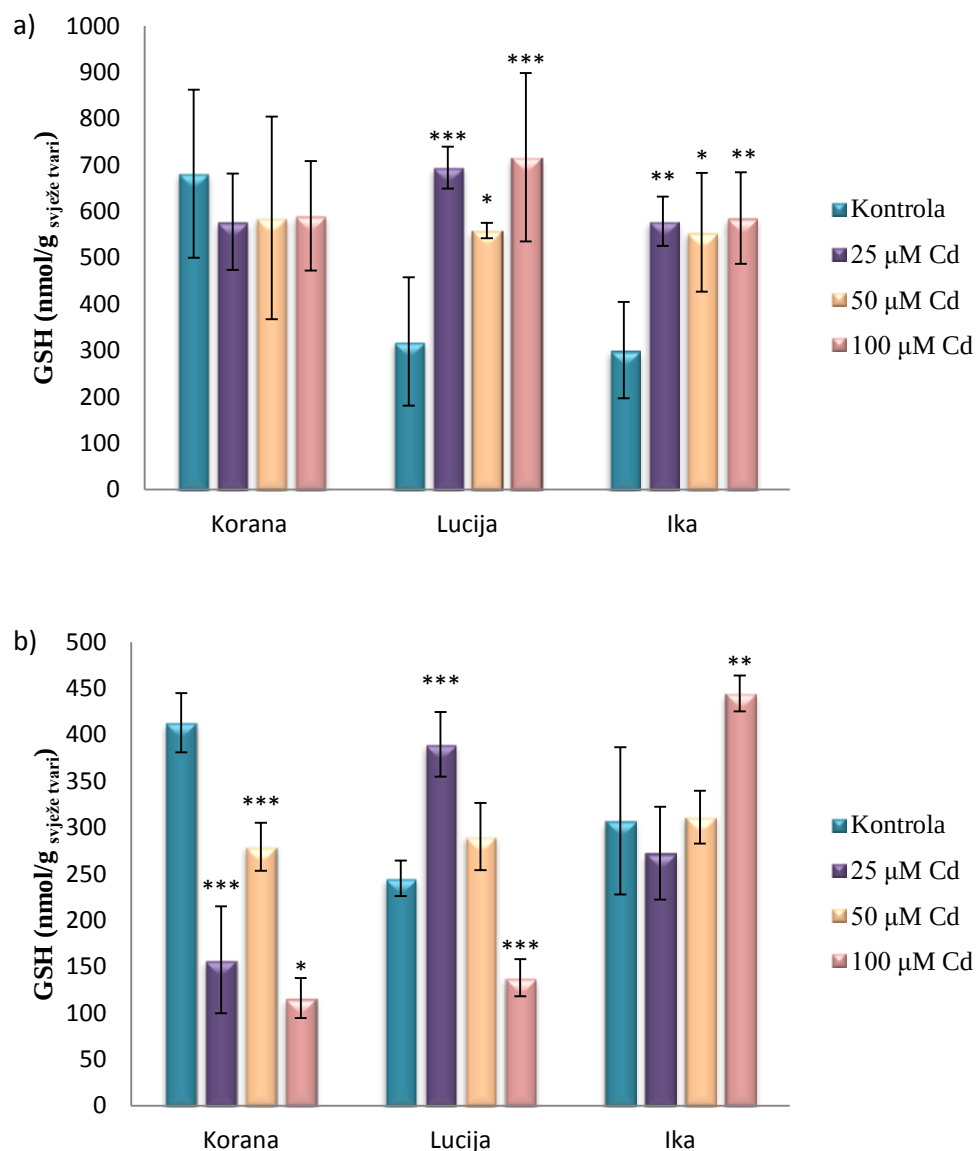
Vrlo sličan obrazac učinka Cd na količinu tGSH uočen je i kod količine reduciranog GSH u izdanku i korijenu triju kultivara. Kao što je bio slučaj kod tGSH, tako su i u izdanku soje svi tretmani Cd uzrokovali statistički značajno povećanje količine GSH u kultivarima Lucija i Ika, dok isti tretmani u kultivara Korana nisu uzrokovali značajnu promjenu u količini GSH, u odnosu na kontrolu (Slika 9a). U izdanku Lucije, najveće povećanje količine GSH zabilježeno je kod tretmana s najvećom koncentracijom Cd (124%), dok su ostali tretmani uzrokovali povećanje GSH redom za 117% (25 μM) i 75% (50 μM). U izdanku kultivara Ika povećanje količine GSH također je bilo najveće kod najveće primijenjene koncentracije Cd (95%), dok su ostali tretmani uzrokovali povećanje za 92% (25 μM) i 85% (50 μM), u odnosu na kontrolu.



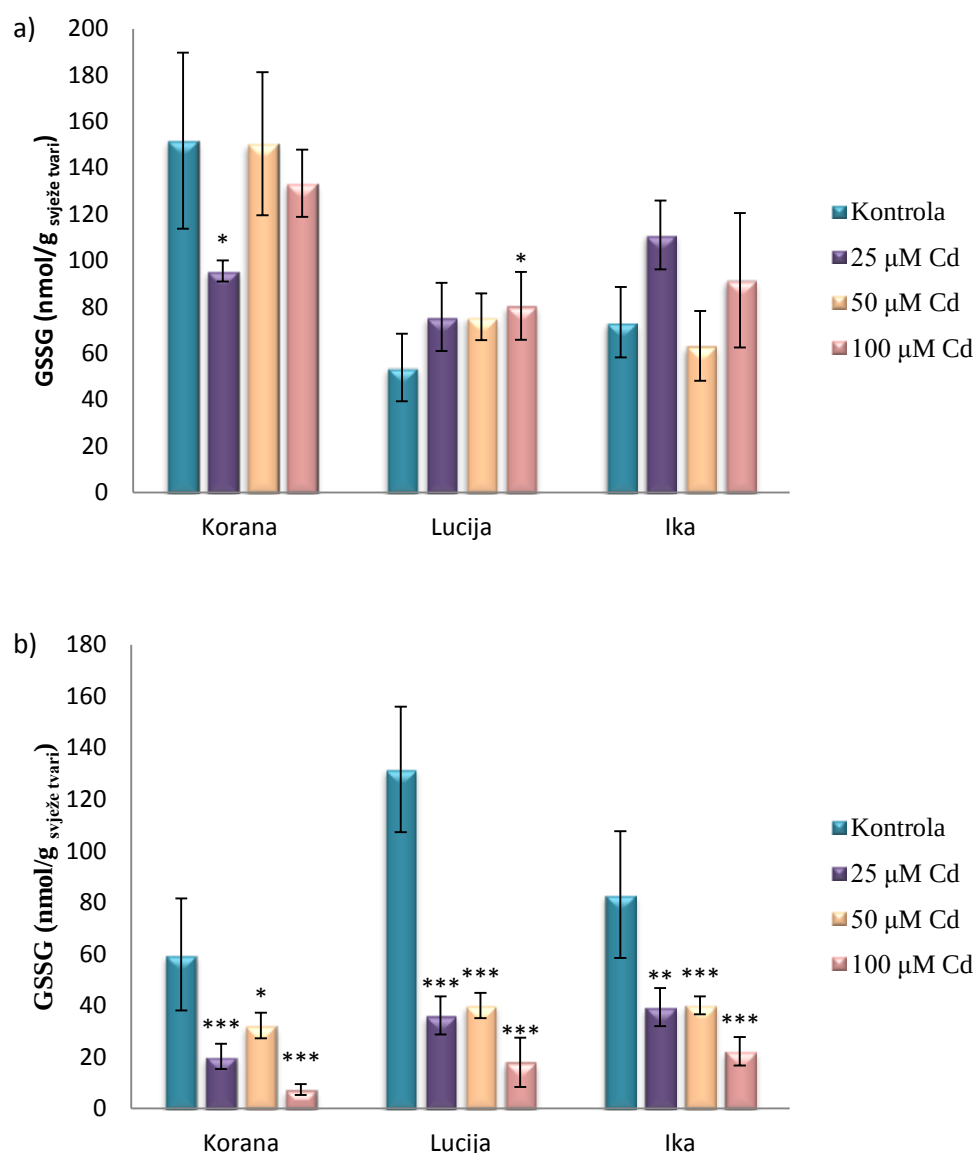
Slika 8. Količina ukupnog glutationa (tGSH) u izdanku (a) i korijenu (b) tri kultivara soje (Korana, Lucija, Ika) nakon tretmana s različitim koncentracijama Cd (25, 50 i 100 µM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti $\pm$ standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su unutar kultivara *post hoc* testom Dunnett, pri čemu različit broj zvjezdica (*) označava razinu statističke značajnosti tretiranih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

U korijenu kultivara Korana tretman svim koncentracijama Cd uzrokovao je statistički značajno smanjenje količine GSH, koje je iznosilo redom 62% za tretman 25 µM Cd, 32% za tretman 50 µM Cd i 72% za tretman 100 µM Cd. U korijenu kultivara Lucija statistički značajno smanjenje GSH (44%) uzrokovao je tretman najvećom koncentracijom Cd (100 µM), dok je tretman najmanjom koncentracijom (25 µM) uzrokovao značajno

povećanje GSH za 59% u odnosu na kontrolu. U kultivara Ika, najveća koncentracija Cd uzrokovala je značajno povećanje količine GSH za 45%, dok ostali tretmani nisu uzrokovali značajnu razliku u količini GSH, u odnosu na kontrolu (Slika 9b). Veće vrijednosti GSH izmjerene su u izdanku u usporedbi s korijenom soje.



Slika 9. Količina reduciranog glutationa (GSH) u izdanku (a) i korijenu (b) tri kultivara soje (Korana, Lucija, Ika) nakon tretmana s različitim koncentracijama Cd (25, 50 i 100 µM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti $\pm$ standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su unutar kultivara *post hoc* testom Dunnett, pri čemu različit broj zvjezdica (*) označava razinu statističke značajnosti tretiranih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).



Slika 10. Količina oksidiranog glutaciona (GSSG) u izdanku (a) i korijenu (b) tri kultivara soje (Korana, Lucija, Ika) nakon tretmana s različitim koncentracijama Cd (25, 50 i 100 μM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti $\pm$ standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su unutar kultivara *post hoc* testom Dunnett, pri čemu različit broj zvjezdica (*) označava razinu statističke značajnosti tretiranih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Količina GSSG-a u izdanku kultivara Korana značajno je smanjena (37%) jedino kod tretmana s najmanjom koncentracijom Cd, dok ostali tretmani nisu imali učinak na koncentraciju GSSG-a, u odnosu na kontrolnu skupinu. U kultivaru Lucija zabilježeno je jedino značajno povećanje količine GSSG-a od 49% u odnosu na kontrolu, nakon tretmana najvećom primijenjenom koncentracijom Cd koja je iznosila 100 μM , dok u kultivara Ika

nema značajnih promjena u odnosu na kontrolu kod svih primijenjenih tretmana Cd (Slika 10a).

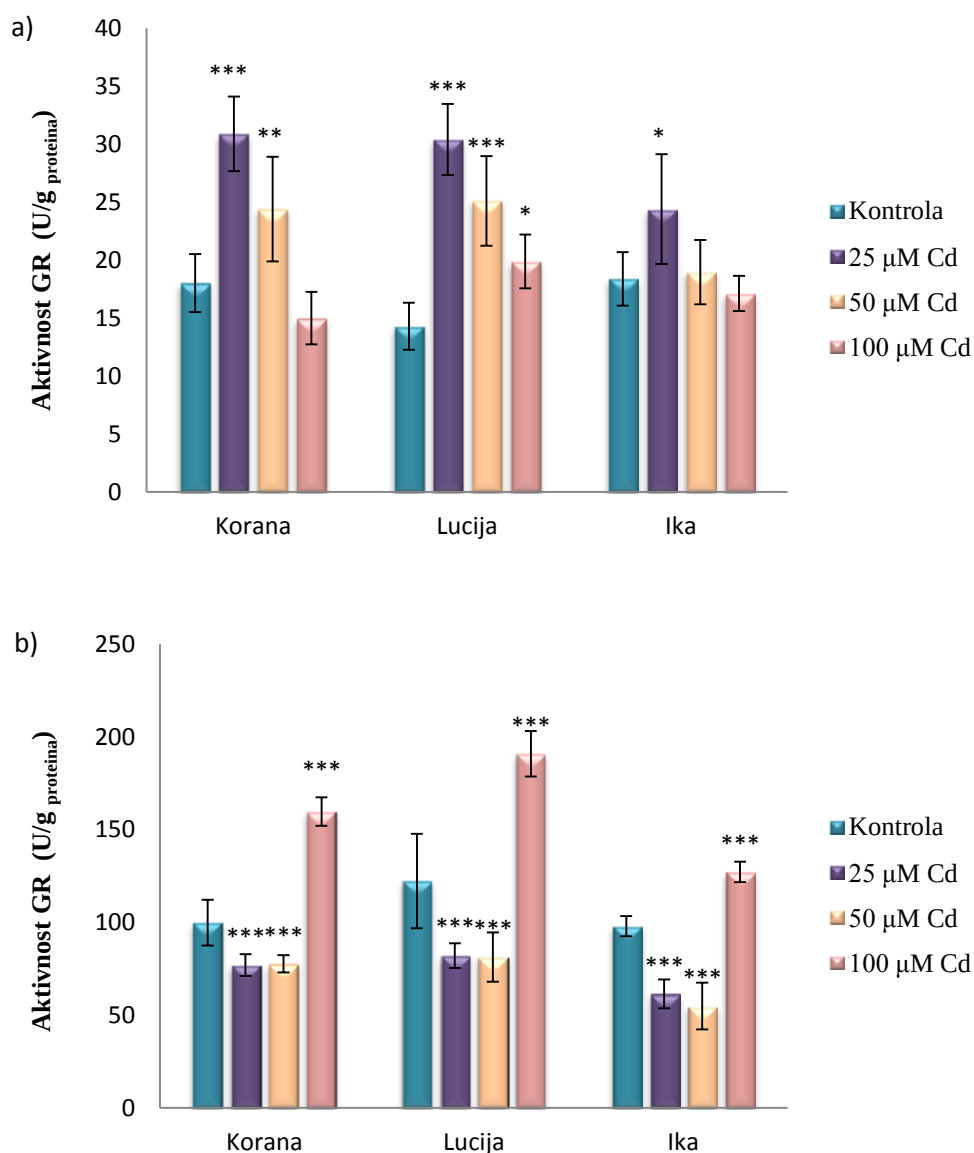
Tretmani svim koncentracijama Cd uzrokovali su statistički značajno smanjenje količine GSSG-a u korijenu sva tri kultivara, pri čemu je najveće smanjenje, u odnosu na kontrolnu skupinu, zabilježeno kod primjene najveće koncentracije Cd (Slika 10b). U Korani, količina GSSG-a smanjila se za 66% (25 μ M), 46% (50 μ M) i 88% (100 μ M), u Luciji za 73% (25 μ M), 70% (50 μ M) i 86% (100 μ M), dok je smanjenje u Iki iznosilo 53% (25 μ M), 52% (50 μ M) i 73% (100 μ M). Veće vrijednosti GSSG-a izmjerene su u izdanku u usporedbi s korijenom soje.

3.2. Učinak Cd na aktivnost glutathion-reduktaze u izdanku i korijenu tri kultivara soje

U izdanku kultivara Korana tretmani 25 i 50 μ M Cd uzrokovali su statistički značajno povećanje aktivnosti GR-a redom za 71% i 35%, dok kod najveće primijenjene koncentracije Cd nije bilo promjene u odnosu na kontrolu. U kultivara Lucija svi su primijenjeni tretmani uzrokovali statistički značajno povećanje aktivnosti GR-a u izdanku, u odnosu na kontrolnu skupinu. Tako je najveće povećanje aktivnosti zabilježeno kod najmanje primijenjene koncentracije Cd (113%), dok su koncentracije od 50 μ M i 100 μ M Cd značajno povećale aktivnosti redom za 76% i 39%. U kultivara Ika značajno povećanje uzrokovao je samo tretman s najmanjom koncentracijom Cd, i to za 33% u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 11a). Dakle, u sva tri kultivara, najveće povećanje aktivnosti GR-a zabilježeno je nakon tretmana najmanjom koncentracijom Cd (25 μ M).

U korijenu sva tri kultivara soje, tretmani različitim koncentracijama Cd uzrokovali su podjednak obrazac aktivnosti GR-a. Tako su tretmani 25 i 50 μ M Cd uzrokovali statistički značajno smanjenje aktivnosti GR-a, dok je tretman najvećom koncentracijom Cd (100 μ M) uzrokovao značajno povećanje aktivnosti GR-a u sva tri kultivara, u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 11b). Smanjenje aktivnosti u Korani iznosilo je 23% (25 μ M) i 22% (50 μ M), dok je povećanje pri koncentraciji od 100 μ M iznosilo 60%. U Luciji je aktivnost enzima smanjena za 33% nakon tretmana koncentracijama Cd od 25 i 50 μ M, a povećana za 56% nakon tretmana 100 μ M koncentracijom Cd. U Iki smanjenje aktivnosti enzima iznosilo je 37% (25 μ M) i 44% (50 μ M), a povećanje 30% (100 μ M). Izmjerene

aktivnosti enzima u korijenu su za oko 5× veće u odnosu na vrijednosti izmjerene u izdanku soje.

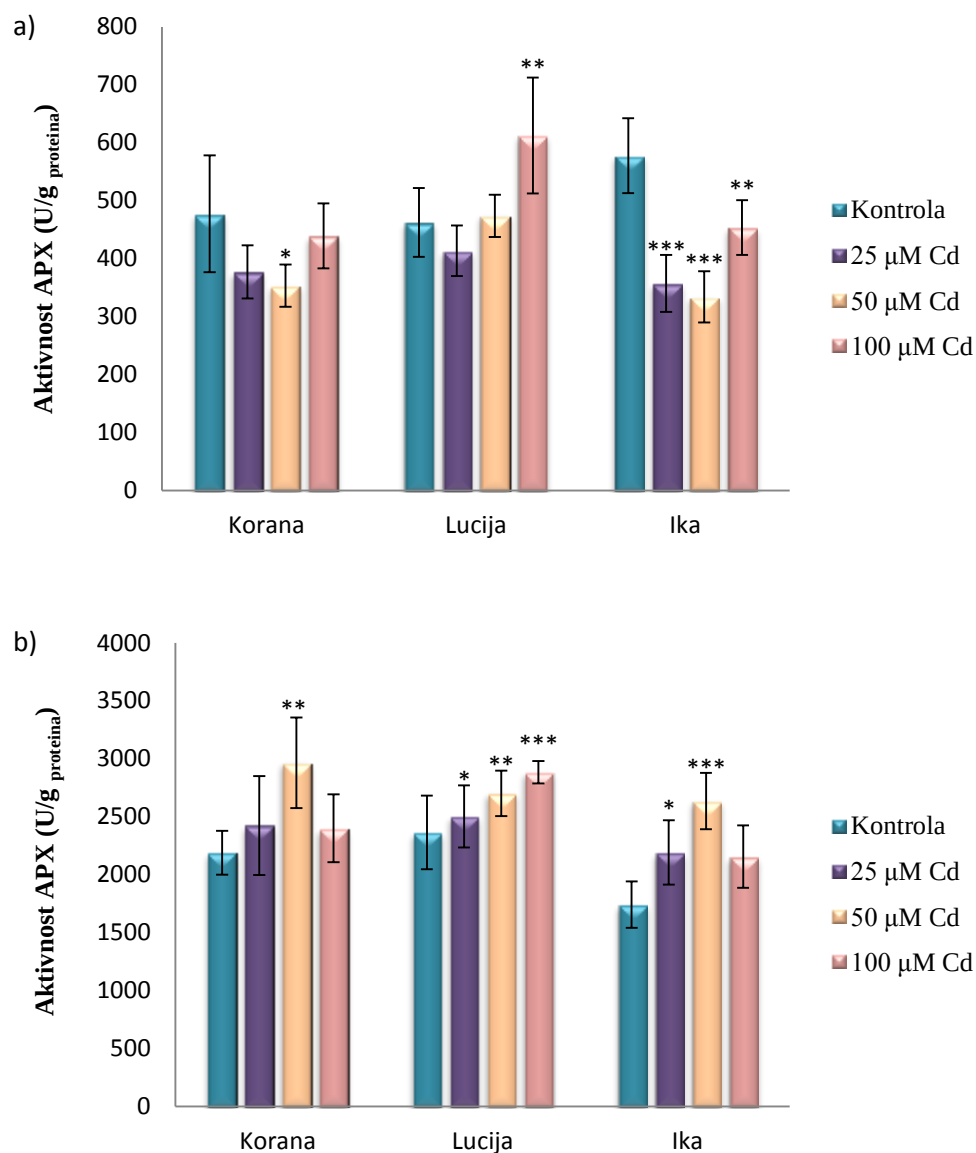


Slika 11. Aktivnost glutation-reduktaze (GR) u izdanku (a) i korijenu (b) tri kultivara soje (Korana, Lucija, Ika) nakon tretmana s različitim koncentracijama Cd (25, 50 i 100 μM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su unutar kultivara *post hoc* testom Dunnett, pri čemu različit broj zvjezdica (*) označava razinu statističke značajnosti tretiranih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

3.3. Učinak Cd na aktivnost askorbat-peroksidaze u izdanku i korijenu tri kultivara soje

U izdanku kultivara Korana aktivnost APX-a statistički se značajno smanjila za 26% pri tretmanu s 50 μM Cd, dok ostali tretmani nisu uzrokovali značajne promjene u odnosu na kontrolnu skupinu. U kultivaru Lucija tretman najvećom koncentracijom Cd uzrokovao je značajno povećanje aktivnosti APX-a za 32%, dok ostali tretmani nisu uzrokovali značajne promjene u odnosu na kontrolu. U kultivara Ika svi su primijenjeni tretmani uzrokovali smanjenje aktivnosti APX-a u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 12a). Tako su se aktivnosti enzima redom smanjile za 38% (25 μM), 42% (50 μM) i 21% (100 μM).

Većina primijenjenih tretmana je u korijenu tri ispitivana kultivara uzrokovala povećanje aktivnosti APX-a (Slika 12b). U kultivara Korana aktivnost APX-a značajno je povećana jedino pri tretmanu 50 μM koncentracijom Cd za 35%, dok ostali tretmani nisu uzrokovali promjenu u odnosu na kontrolu. U kultivara Lucija sve su primijenjene koncentracije Cd značajno povećale aktivnosti APX-a. Tako su aktivnosti APX-a uslijed tretmana povećane redom za 14% (25 μM), 19% (50 μM), 27% (100 μM), u odnosu na kontrolu. U kultivara Ika aktivnosti APX-a su se značajno povećale nakon tretmana s 25 μM i 50 μM koncentracijom Cd, redom za 26% i 51% u odnosu na kontrolu. Izmjerene aktivnosti APX-a u korijenu soje su za oko 5× veće od vrijednosti izmjerenih u izdanku soje.

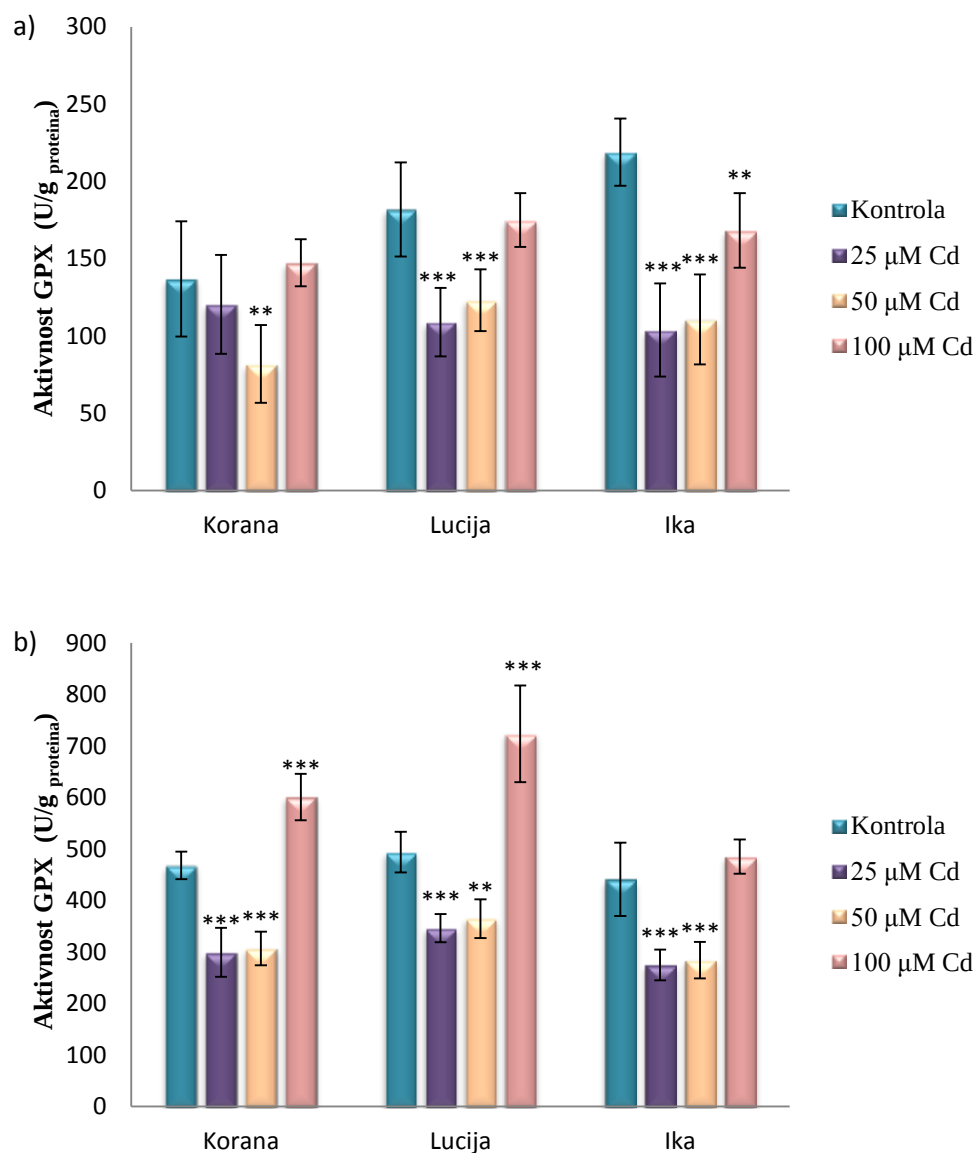


Slika 12. Aktivnost askorbat-peroksidaze (APX) u izdanku (a) i korijenu (b) tri kultivara soje (Korana, Lucija, Ika) nakon tretmana s različitim koncentracijama Cd (25, 50 i 100 µM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti $\pm$ standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su unutar kultivara *post hoc* testom Dunnett, pri čemu različit broj zvjezdica (*) označava razinu statističke značajnosti tretiranih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

3.4. Učinak Cd na aktivnost glutation-peroksidaze u izdanku i korijenu tri kultivara soje

Većina primijenjenih tretmana Cd je u izdanku tri ispitivana kultivara uzrokovala smanjenje aktivnosti GPX-a (Slika 13a). U kultivara Korana aktivnost GPX-a statistički je značajno smanjena za 40% u odnosu na kontrolu, nakon tretmana 50 μ M koncentracijom Cd. U kultivara Lucija aktivnost GPX-a značajno je smanjena za 40% pri tretmanu s 25 μ M koncentracijom Cd, odnosno za 32% pri tretmanu s 50 μ M Cd. U kultivara Ika sve su primijenjene koncentracije Cd uzrokovale značajno smanjenje aktivnosti enzima. Tako je najveće smanjenje, za 53%, uzrokovao tretman s 25 μ M Cd, tretman s 50 μ M Cd uzrokovao je smanjenje od 49%, te tretman s 100 μ M Cd za 23%, u odnosu na kontrolu.

U korijenu sva tri kultivara soje, tretmani različitim koncentracijama Cd uzrokovali su podjednak obrazac aktivnosti GPX-a. Tako su tretmani s 25 i 50 μ M Cd uzrokovali statistički značajno smanjenje aktivnosti GPX-a u sva tri kultivara, dok je tretman najvećom koncentracijom Cd (100 μ M) uzrokovao povećanje aktivnosti GPX-a, iako je povećanje statistički značajno samo u Korani i Luciji (Slika 13b). Smanjenje aktivnosti u Korani iznosilo je 36% (25 μ M) i 34% (50 μ M), dok je povećanje pri koncentraciji od 100 μ M iznosilo 28%. U Luciji je aktivnost enzima smanjena za 30% i 26% nakon tretmana koncentracijama Cd od 25 i 50 μ M, a povećana je za 46% nakon tretmana 100 μ M koncentracijom Cd. U Iki smanjenje aktivnosti enzima iznosilo je 38% (25 μ M) i 36% (50 μ M) u odnosu na kontrolu. Izmjerene aktivnosti enzima u korijenu su za oko 3× veće u odnosu na vrijednosti izmjerene u izdanku soje.

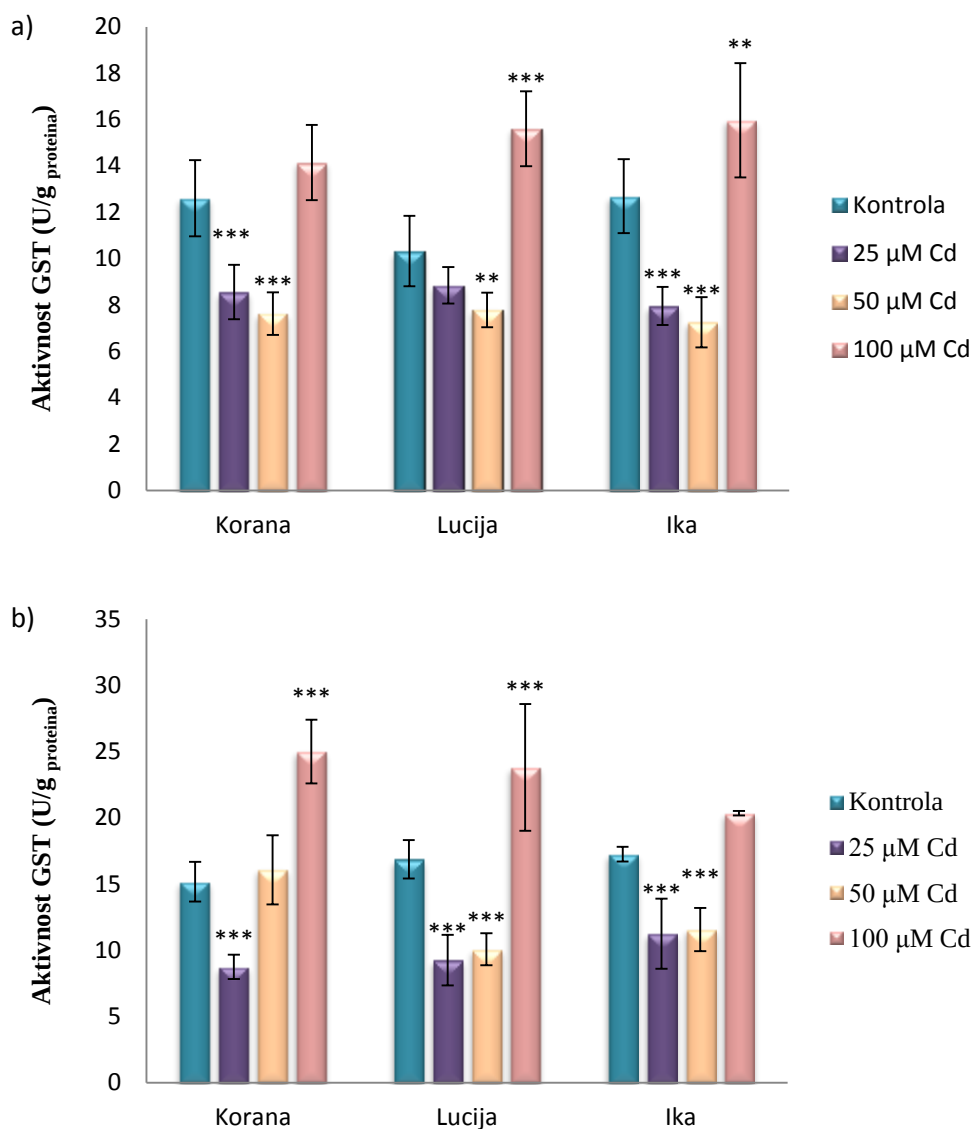


Slika 13. Aktivnost glutation-peroksidaze (GPX) u izdanku (a) i korijenu (b) tri kultivara soje (Korana, Lucija, Ika) nakon tretmana s različitim koncentracijama Cd (25, 50 i 100 µM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti $\pm$ standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su unutar kultivara *post hoc* testom Dunnett, pri čemu različit broj zvjezdica (*) označava razinu statističke značajnosti tretiranih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

3.5. Učinak Cd na aktivnost glutation S-transferaze u izdanku i korijenu tri kultivara soje

U izdanku kultivara Korana aktivnost GST-a statistički se značajno smanjila za 32% pri tretmanu s 25 μM Cd, i 39% pri tretmanu s 50 μM Cd, dok je aktivnost enzima pri najvećoj koncentraciji Cd nepromijenjena u odnosu na kontrolnu skupinu. U kultivara Lucija tretman 50 μM koncentracijom Cd uzrokovao je značajno smanjenje aktivnosti GST-a za 25%, dok je tretman najvećom koncentracijom Cd uzrokovao značajno povećanje za 51%, u odnosu na kontrolu. U kultivara Ika tretmani s 25 μM i 50 μM Cd uzrokovali su smanjenje aktivnosti enzima redom za 37% i 43%, dok je tretman najvećom koncentracijom Cd uzrokovao povećanje aktivnosti GST-a za 26%, u odnosu na kontrolu (Slika 14a).

U korijenu kultivara Korana aktivnost GST-a značajno se smanjila pri tretmanu s 25 μM koncentracijom Cd za 42%, dok je tretman najvećom koncentracijom uzrokovao povećanje aktivnosti enzima za 65% u odnosu na kontrolu. U kultivara Lucija aktivnost enzima značajno je smanjena kod tretmana s 25 μM i 50 μM koncentracijom Cd, redom za 45% i 40%, dok je najveća koncentracija uzrokovala značajno povećanje aktivnosti enzima za 41%, u odnosu na kontrolu. Kao i kod Lucije, u kultivara Ika su tretmani s 25 μM i 50 μM Cd uzrokovali značajno smanjenje aktivnosti GST-a, redom za 35% i 33% u odnosu na kontrolu, dok je aktivnost pri najvećoj koncentraciji povećana, ali nije statistički značajna. Veće aktivnosti GST-a zabilježene su u korijenu soje u odnosu na izdanak (Slika 14b).



Slika 14. Aktivnost glutation S-transferaze (GST) u izdanku (a) i korijenu (b) tri kultivara soje (Korana, Lucija, Ika) nakon tretmana s različitim koncentracijama Cd (25, 50 i 100 µM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti $\pm$ standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su unutar kultivara *post hoc* testom Dunnett, pri čemu različit broj zvjezdica (*) označava razinu statističke značajnosti tretiranih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

3.6. Sažetak rezultata

Količina tGSH i GSH bila je povećana u izdanku, a smanjena u korijenu soje, dok je količina GSSG bila nepromijenjena u izdanku, a smanjena u korijenu. Izmjerene vrijednosti u izdanku znatno su veće u usporedbi s korijenom. Aktivnost GR-a u izdanku

bila je veća pri manjim koncentracijama (25 i 50 μM), a u korijenu pri većim koncentracijama Cd (100 μM). Aktivnost APX-a smanjena je u izdanku, a povećana u korijenu, dok je aktivnost GPX-a smanjena u izdanku, a u korijenu je povećana nakon tretmana 100 μM Cd. Aktivnost GST-a, i u izdanku i u korijenu, povećala je samo najveća koncentracija Cd (Tablica 2a i b).

Tablica 2. Sažetak rezultata mjerenih parametara u izdanku (a) i korijenu (b) tri kultivara soje (Korana, Lucija, Ika) nakon tretmana različitim koncentracijama Cd (25, 50 i 100 μM ; -, parametar je nepromijenjen u odnosu na kontrolu; $\uparrow$, parametar je povećan u odnosu na kontrolu; $\downarrow$, parametar je smanjen u odnosu na kontrolu).

a)

	Korana			Lucija			Ika		
Koncentracija Cd (μM)	25	50	100	25	50	100	25	50	100
tGSH	-	-	-	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$
GSH	-	-	-	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$
GSSG	$\downarrow$	-	-	-	-	$\uparrow$	-	-	-
GR	$\uparrow$	$\uparrow$	-	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	-	-
APX	-	$\downarrow$	-	-	-	$\uparrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$
GPX	-	$\downarrow$	-	$\downarrow$	$\downarrow$	-	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$
GST	$\downarrow$	$\downarrow$	-	-	$\downarrow$	$\uparrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\uparrow$

b)

	Korana			Lucija			Ika		
Koncentracija Cd (μM)	25	50	100	25	50	100	25	50	100
tGSH	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	-	-	$\downarrow$	-	-	$\uparrow$
GSH	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\uparrow$	-	$\downarrow$	-	-	$\uparrow$
GSSG	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$
GR	$\downarrow$	$\downarrow$	$\uparrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\uparrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\uparrow$
APX	-	$\uparrow$	-	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	-
GPX	$\downarrow$	$\downarrow$	$\uparrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\uparrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	-
GST	$\downarrow$	-	$\uparrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\uparrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	-

4. RASPRAVA

Soja je poljoprivredna kultura izložena utjecaju različitih okolišnih stresora, iako utjecaj pojedinog stresora uvelike ovisi o genotipu, prirodi stresa i trajanju stresnih uvjeta (Hasanuzzaman i sur. 2016). Toksično djelovanje teških metala, kao čimbenika abiotičkog stresa, očituje se u fiziološkim i biokemijskim promjenama koje dovode i do promjena u rastu i razvoju biljaka (Felici i sur. 2014). Jedna od najčešćih posljedica abiotičkog stresa, pa tako i stresa uzrokovanog Cd kao teškim metalom, nastanak je prekomjerne količine ROS-a koji dovode do oksidacijskog stresa što rezultira oštećenjima biljne stanice putem oksidacije lipida i nukleinskih kiselina te degradacije proteina (Hasanuzzaman i sur. 2016). Biljke detoksiciraju molekule ROS-a mehanizmima koji uključuju neenzimske i enzimске komponente. Neenzimski sustav podrazumijeva antioksidanse poput GSH i AsA dok su u enzimsku obranu uključeni enzimi kao što su GR, APX, GPX i GST (Felici i sur. 2014).

GSH je u biljkama glavni topljivi antioksidans koji direktno neutralizira molekule ROS-a ili sudjeluje kao supstrat u enzimskim reakcijama koje su dio različitih detoksikacijskih procesa, između ostalog i dio askorbat-glutationskog ciklusa (Felici i sur. 2014). Veće vrijednosti količine GSH izmjerene su u izdanku soje u odnosu na korijen što može biti povezano s time da i u uvjetima bez stresa postoji veća stopa nastanka ROS-a u fotosintetski aktivnom u usporedbi s fotosintetski neaktivnim tkivom (Kováčik i sur. 2019; Xu i sur. 2012; Paradiso i sur. 2008). Povećanje količine tGSH i GSH u izdanku Lucije i Ike nakon tretmana svim koncentracijama Cd upućuje na ulogu GSH u uklanjanju molekula ROS-a i održavanju stabilnosti askorbat-glutationskog ciklusa. GSH ima ključnu ulogu i u sintezi fitokelatina i kompleksiranju Cd, te prema tome povećane količine GSH bitne su i za smanjenje toksičnog djelovanja Cd drugim mehanizmima izuzev askorbat-glutationskog ciklusa (Molina i sur. 2008). U istraživanju koje su proveli Jinadasa i sur. (2015) povećana količina GSH u korijenu vrtnje vrzine (*Brassica oleracea*) bila je u korelaciji s povećanom sintezom fitokelatina nakon 4-tjednog tretmana 500 µg/L Cd. Slične podatke o povećanju količine GSH u biljkama soje povećanjem koncentracije Cd dobili su Srivastava i sur. (2011) nakon tretmana 0.05, 0.10, 0.50, 1.00 i 2.00 mM Cd te Felici i sur. (2014) nakon tretmana 40 µM Cd. U navedenim radovima povećanje količine GSH povezuje se s povećanom sintezom i ulogom u uklanjanju ROS-a. Povećanje količine GSH u izdanku zabilježeno je i u drugim biljnim vrstama kao što su uljana repica (*Brassica napus*; Wu i sur. 2015), zelenkasti ravan (*Chrysanthemum coronarium*), špinat

(*Spinacia oleracea*), zelena salata (*Latuca sativa*; Meng i sur. 2019) i ramiija (*Bechmeria nivea*; Liu i sur. 2007). U korijenu soje količine tGSH i GSH bile su različite i ovisile su o kultivaru i o tretmanu Cd, dok su količine GSSG-a bile značajno smanjenje nakon svih tretmana Cd u svim kultivarima. I u korijenu i u izdanku soje količina GSH je najviše doprinijela količini tGSH. U korijenu Ike zabilježen je trend smanjenja količine GSH pri manjim koncentracijama dok je 100 μ M koncentracija Cd uzrokovala statistički značajno povećanje, a slično povećanje količine GSH nakon izlaganja većim koncentracijama Cd (10 i 33 mg/kg tla) dobili su i Lin i sur. (2007) u pšenici (*Triticum aestivum*). To može značiti da uslijed tretmana Cd dolazi do potrošnje postojećeg GSH i njegove dodatne sinteze kako bi se održala stabilna razina GSH za učinkovitu obranu biljke od stresa uzrokovanog teškim metalima. Ovu pretpostavku potkrepljuje i dobiveno povećanje količine tGSH nakon izlaganja najvećoj koncentraciji Cd. Korana je jedini kultivar u kojem su količine i tGSH i GSH bile značajno smanjene nakon izlaganja svim primijenjenim koncentracijama Cd u korijenu. Smanjenje količine GSH, ovisno o dozi i vremenu izlaganja, zabilježili su i Dixit i sur. (2001) u grašku (*Pisum sativum*) nakon izlaganja koncentraciji Cd od 4 i 40 μ M isto kao i Anjum i sur. (2011) u zlatnom grahu (*Vinga radiata*) nakon izlaganja koncentracijama Cd od 25, 50 i 100 mg/kg tla. Kao moguće objašnjenje Anjum i sur. (2011) navode povećanu oksidaciju GSH u GSSG djelovanjem enzima DHAR radi redukcije AsA. Smanjenje količine GSH može biti povezano i s povećanom detoksikacijom Cd i posljedičnim trošenjem GSH.

Povećanje aktivnosti GR-a dovodi do redukcije GSSG-a i recikliranja GSH time indirektno djelujući i na redukciju AsA putem askorbat-glutationskog ciklusa. Najveće povećanje aktivnosti GR-a uzrokovala je najmanja primijenjena koncentracija Cd (25 μ M) u izdanku, a slično povećanje aktivnosti GR-a pri manjoj koncentraciji Cd zabilježili su i Marakovska i sur. (2009) u smeđoj gorušici (*Brassica juncea*) nakon izlaganja 10 i 30 μ M Cd u usporedbi s većim primijenjenim koncentracijama (50 i 100 μ M) te Dixit i sur. (2001) u izdanku graška (*P. sativum*) nakon izlaganja 4 μ M Cd u usporedbi s tretmanom 40 μ M Cd. Mogući razlog tome je da povećanje koncentracije ili vremena izlaganja dovodi do inhibitornog djelovanja Cd na aktivnost enzima ili na njegovu sintezu. Povećana aktivnost GR-a u izdanku soje u korelaciji je s povećanjem količine GSH u Luciji, ali ne i u Iki što može upućivati na to da je povećanje količine GSH u izdanku Ike rezultat dodatne sinteze GSH, a ne recikliranja postojećeg GSH. U istraživanju koje su proveli Semane i sur. (2007) zabilježeno je povećanje ekspresije gena za enzime γ -glutamylcistein-sintetazu i

glutation-sintetazu, odgovorne za sintezu GSH, nakon izlaganja 1 i 10 μM Cd u uročnjaku (*A. thaliana*). Povećana aktivnost GR-a u izdanku Korane održava količinu GSH-a nepromijenjenom, neovisno o primijenjenoj koncentraciji Cd, sprječavajući kolaps askorbat-glutationskog ciklusa. Za razliku od izdanka, u korijenu soje, aktivnost GR-a povećala je samo 100 μM koncentracija Cd dok su dvije manje koncentracije (25 i 50 μM) smanjile aktivnost. Ferreira i sur. (2002) dobili su slično povećanje aktivnosti GR-a u soji samo nakon izlaganja najvećoj primijenjenoj koncentraciji Cd (0.5 mM) dok izlaganje manjoj koncentraciji (0.01 mM) nije uzrokovalo promjenu aktivnosti. Mogući razlog tomu je povećana sinteza GR-a inducirana povećanim stresom, koji je u ovom istraživanju uzrokovala 100 μM koncentracija Cd. U istraživanju koje su proveli Wu i sur. (2015) povećanje aktivnosti GR-a ovisno o povećanju koncentracije Cd u korijenu repice (*B. napus*) bilo je u korelaciji s povećanjem transkripcije gena za GR. Povećana aktivnost GR-a u korijenu Ike nakon izlaganja 100 μM Cd u korelaciji je s povećanjem količine GSH pri istoj koncentraciji. Za razliku od Ike, povećane aktivnosti GR-a u korijenu Korane i Lucije nakon tretmana 100 μM koncentracijom Cd nisu u korelaciji sa smanjenjem količine GSH u korijenu, što upućuje na moguće trošenje GSH djelovanjem drugih enzima, poput GST-a i GPX-a. Izmjerene aktivnosti GR-a u izdanku su za oko 5× manje od onih izmjerenih u korijenu, što ukazuje na postojanje tkivno-specifičnog odgovora. Suprotno našim podacima Liu i sur. (2007) zabilježili su veće aktivnosti GR-a u izdanku ramije (*B. nivea*) u odnosu na korijen. Lucija je jedini kultivar koji pokazuje povećanje aktivnosti GR-a nakon izlaganja svim koncentracijama Cd u izdanku i najveću izmjerenu vrijednost aktivnosti u korijenu nakon izlaganja 100 μM koncentraciji Cd. Povećana aktivnost GR-a pomaže i u održavanju stabilnosti $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ omjera, osiguravajući time NADP^+ potreban za prihvatanje elektrona oslobođenih u procesu fotosinteze, te time smanjujući prelazak elektrona na kisik i posljedični nastanak superoksidnog radikala (Alyemeni i sur. 2017).

APX uklanja molekule H_2O_2 katalizirajući reakciju redukcije u kojoj nastaje H_2O , a troši se AsA. U izdanku je aktivnost APX-a povećala samo 100 μM koncentracija Cd u Luciji, dok su ostale koncentracije uzrokovale smanjenje aktivnosti. U istraživanju koje je proveo Hashem (2014) aktivnost APX-a, u biljkama soje, bila je manja nakon 3-dnevnog izlaganja manjoj koncentraciji Cd (50 mM) u usporedbi s većim koncentracijama (100, 150 i 200 mM) te su u tome istraživanju glavnu ulogu u detoksikaciji molekula ROS-a, pri manjim koncentracijama Cd, imali drugi antioksidacijski enzimi kao što su superoksid-

dismutaza i katalaza. Aktivnost APX-a povećana je u korijenu u svim kultivarima, iako nije zabilježeno povećanje aktivnosti ovisno o dozi. Aktivnosti u korijenu veće su za oko 5× u odnosu na izdanak, kako u kontroli tako i nakon tretmana Cd. Dixit i sur. (2001) zabilježili su veće aktivnosti APX-a u korijenu graška (*P. sativum*) u odnosu na izdanak pri koncentracijama Cd od 4 μM i 40 μM što je u skladu s podacima dobivenim u ovom istraživanju. Povećana aktivnost APX-a, ovisna o dozi, zabilježena je u svih 5 genotipova soje izloženih koncentracijama od 50, 100 i 150 mg/L Cd u istraživanju koje su proveli Alyemeni i sur. (2017) i u biljkama soje izloženim 0.05, 0.10, 0.50, 1.00 i 2.00 mM koncentraciji Cd u istraživanju koje su proveli Srivastava i sur. (2011). Povećana aktivnost APX-a nakon izlaganja Cd zabilježena je i drugim biljnim vrstama poput uljane repice (*B. napus*; Wu i sur. 2015), zlatnog graha (*V. radiata*; Anjum i sur. 2011), ramije (*B. nivea*; Liu i sur. 2007) i uročnjaka (*A. thaliana*; Cho i Seo 2004). Povećanje aktivnosti APX-a ovisno o povećanju koncentracije Cd može biti potaknuto povećanom sintezom H₂O₂. Povećana aktivnost APX-a ukazuje na ključnu ulogu u detoksikaciji H₂O₂ u korijenu sva tri kultivara soje.

Povećane aktivnosti i GR-a i APX-a zabilježene su samo u izdanku i korijenu Lucije, i to jedino pri najvećoj koncentraciji Cd. Iako količina AsA, kao jednog od glavnih antioksidansa i ključnog člana askorbat-glutationskog ciklusa, i aktivnost ostalih enzima uključenih u metabolizam askorbata nije mjerena u sklopu ovog istraživanja, povećane aktivnosti enzima APX-a i GR-a nakon izlaganja Cd, posebice u kultivaru Lucija, održavaju antioksidacijski potencijal AsA i GSH za uklanjanje molekula ROS-a putem askorbat-glutationskog ciklusa.

GPX je enzim koji uklanja produkte oksidacijskog stresa koristeći GSH kao reducirajući supstrat, pri čemu se GSH oksidira u GSSG. Aktivnost GPX-a u izdanku soje je ili smanjena ili nepromijenjena nakon izlaganja Cd. Nepromijenjena ili smanjena aktivnost GPX-a u izdanku Korane u korelaciji je s nepromijenjenom količinom tGSH i GSH nakon svih tretmana Cd. Smanjenje aktivnosti GPX-a zabilježili su Dixit i sur. (2001) u biljkama graška (*P. sativum*) nakon izlaganja 4 i 40 μM koncentracijama Cd i Markovska i sur. (2009) u smeđoj gorušici (*B. juncea*) nakon izlaganja 10, 30, 50 i 100 μM Cd u trajanju od 5 dana. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da GPX nema ključnu ulogu u uklanjanju ROS-a u izdancima tri kultivara soje te da neodgovarajući odgovor GPX-a može biti nadoknađen djelovanjem drugih enzima čija aktivnost nije

mjerena u sklopu ovog istraživanja, poput gvajakol-peroksidaze. U korijenu je jedino tretman najvećom koncentracijom Cd (100 μ M) izazvao povećanje aktivnosti GPX-a. Povećanje aktivnosti u korijenu Korane i Lucije nakon tretmana 100 μ M Cd u skladu je sa smanjenjem količine GSH pri istoj koncentraciji. Povećanje aktivnosti samo nakon izlaganja najvećoj koncentraciji Cd može biti povezana s povećanim nastankom H₂O₂ što dovodi do aktivacije postojećeg ili indukcije dodatne sinteze GPX-a (Lin i sur. 2007).

GSH ima i ključnu ulogu u procesu detoksikacije metala zahvaljujući velikom vezujućem afinitetu tiolne skupine (-SH). Na taj način GSH omogućuje obranu biljke kelirajući ili sekvstrirajući teške metale i time ograničavajući akumulaciju slobodnih metala u stanici (Hameed i sur. 2014). GST katalizira konjugaciju iona teških metala s GSH time smanjujući kretanje slobodnih Cd²⁺ iona u citosolu, reducirajući njihovu toksičnost. Aktivnost GST-a povećana je i u izdanku i u korijenu soje samo nakon tretmana 100 μ M koncentracijom Cd, a Lucija je jedini kultivar kod kojeg je zabilježeno povećanje aktivnosti GST-a i u izdanku i u korijenu. Pri ostalim koncentracijama Cd aktivnost GST-a je ili nepromijenjena ili smanjena. Povećana aktivnost GST-a u korijenu Korane i Lucije u korelaciji je sa značajno smanjenom količinom GSH u ta dva kulture nakon tretmana 100 μ M koncentracijom Cd. Dixit i sur. (2001) zabilježili su povećanje aktivnosti GST-a i u korijenu i u izdanku graška (*P. sativum*) jedino nakon izlaganja 40 μ M koncentraciji Cd dok manja koncentracija Cd (4 μ M) nije uspjela utjecati na povećanje aktivnosti u oba tkiva nego jedino u korijenu. Moguće objašnjenje je da u uvjetima snažnog stresa, što je ovom istraživanju najveća koncentracija Cd, dolazi do iscrpljivanja osnovnog antioksidacijskog obrambenog mehanizma i dolazi do aktivacije učinkovitijih načina obrane poput GST-a (Hossaini i sur. 2012).

Aktivnosti svih enzima, određivanih u ovome istraživanju, veće su u korijenu soje u odnosu na izdanak. Zadržavanje teških metala u korijenu predstavlja obrambeni mehanizam biljaka kojem je cilj ograničiti toksičnost Cd u ostalim dijelovima biljke. U istraživanju koje su proveli Anjum i sur. (2011) tolerantniji kultivar zlatnog graha (*V. radiata*), koji je pokazao veći akumulacijski potencijal za Cd u korijenu, u isto vrijeme pokazuje manju stopu prijenosa Cd u listove u usporedbi s osjetljivijim kultivarom iste vrste. Iako je u većini provedenih istraživanja koncentracija Cd veća u korijenu nego u izdanku biljke (Meng i sur. 2019; Alyemeni i sur. 2017; Felici i sur. 2014; Markovska i sur. 2009; Paradiso i sur. 2008; Lin i sur. 2007; Liu i sur., 2007; Dixit i sur. 2001), kako u

ovom istraživanju nije određivana koncentracija Cd u analiziranim tkivima ne može se tvrditi je li razlika u izmjerenim aktivnostima enzima upravo rezultat razlike u akumulacijskom potencijalu između izdanka i korijena soje ili rezultat indukcije različitih mehanizama tolerancije na stres uzrokovan Cd u različitim dijelovima biljke.

5. ZAKLJUČCI

- Učinak Cd na komponente metabolizma GSH u soji ovisio je o primijenjenoj koncentraciji Cd, tipu tkiva i u konačnici o kultivaru.
- Tri kultivara soje, s različitim akumulacijskim potencijalom za Cd u zrnu (Korana > Lucija > Ika), pokazala su i razlike u količini GSH kao i razlike u aktivnosti enzima uključenih u metabolizam GSH, pod utjecajem tretmana trima koncentracijama Cd (25, 50 i 100 μ M). Ovaj sortno-specifični odgovor na Cd uglavnom se odnosi na detoksikacijske procese u izdancima, dok su u korijenu soje u sva tri kutivara ovi procesi vrlo slični.
- Lucija, sa srednjim akumulacijskim potencijalom za Cd u zrnu, na tretman Cd daje najučinkovitiji biokemijski odgovor u pogledu anitoksidacijske i detoksikacijske obrane, stoga ovaj kultivar možemo izdvojiti kao najtolerantniji kultivar i najpogodniji za uzgoj na tlima kontaminiranim Cd.
- Utvrđene su i razlike na tretman Cd u mjeranim komponentama metabolizma GSH između izdanka i korijena tri kultivara soje. Veći antioksidacijski i detoksikacijski odgovor na Cd potaknut je u korijenu što upućuje na tkivno-specifični odgovor. Kako u sklopu ovog istraživanja nije određena koncentracija Cd u tkivima ne može se tvrditi je li tkivno-specifični odgovor posljedica različite akumulacije Cd u izdanku i korijenu ili pak posljedica različitih mehanizama tolerancije u ovim dijelovima biljke.
- Nove spoznaje o biokemijskim mehanizmima toksičnosti, odnosno tolerancije na Cd daju širi uvid u istraživanu problematiku, te razvijanje daljnjih strategija za povećanje tolerancije na Cd.

6. LITERATURA

Ahmad, P., Jaleel, C. A., Salem, M. A., Nabi, G., Sharma, S. (2010) Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical reviews in biotechnology* 30(3): 161-175.

Akerboom, T. P., & Sies, H. (1981) Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. U: Jakoby, W. B. (ur.) *Methods in enzymology, Detoxication and drug Metabolism: Conjugation and Related Systems* 77. Academic Press, United States, str. 373-382.

Alves, L. R., dos Reis, A. R., Gratao, P. L. (2016) Heavy metals in agricultural soils: from plants to our daily life (a review). *Cientifica* 44(3): 346-361.

Alyemeni, M. N., Ahanger, M. A., Wijaya, L., Alam, P., Ahmad, P. (2017) Contrasting tolerance among soybean genotypes subjected to different levels of cadmium stress. *Pakistan Journal of Botany* 49(3): 903-911.

Anjum, N. A., Umar, S., Iqbal, M., & Khan, N. A. (2011). Cadmium causes oxidative stress in mung bean by affecting the antioxidant enzyme system and ascorbate-glutathione cycle metabolism. *Russian Journal of Plant Physiology* 58(1): 92-99.

Anjum, S. A., Tanveer, M., Hussain, S., Bao, M., Wang, L., Khan, I., ... & Shahzad, B. (2015) Cadmium toxicity in Maize (*Zea mays* L.): consequences on antioxidative systems, reactive oxygen species and cadmium accumulation. *Environmental Science and Pollution Research* 22: 17022-17030.

Andresen, E., Küpper, H. (2013) Cadmium toxicity in plants. U: Sigel, A., Sigel, H., Sigel, R. K. O. (ur.) *Cadmium: From toxicity to essentiality, Metal Ions in Life Sciences* 11, Springer, Dordrecht, str. 395-413.

Arai, M., Nihonmatsu-Kikuchi, N., Itokawa, M., Rabbani, N., Thornalley, P. J. (2014) Measurement of glyoxalase activities. *Biochemical Society Transactions* 42: 491-494.

Arao, T., Ae, N., Sugiyama, M., Takahashi, M. (2003) Genotypic differences in cadmium uptake and distribution in soybeans. *Plant and Soil* 251: 247-253.

- Bela, K., Horváth, E., Gallé, Á., Szabados, L., Tari, I., Csiszár, J. (2015) Plant glutathione peroxidases: emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses. *Journal of Plant Physiology* 176: 192-201.
- Benavides, M. P., Gallego, S. M., Tomaro, M. L. (2005) Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17(1): 131-136.
- 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.
- Chaves, L. H. G., Estrela, M. A., de Souza, R. S. (2011) Effect on plant growth and heavy metal accumulation by sunflower. *Journal of Phytology* 3(12): 4-9.
- Chen, Y. X., He, Y. F., Yang, Y., Yu, Y. L., Zheng, S. J., Tian, G. M., Luo, Y. M., Wong, M. H. (2003) Effect of cadmium on nodulation and N₂-fixation of soybean in contaminated soils. *Chemosphere* 50: 781-787.
- Cho, U. H., Seo, N. H. (2005) Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Science* 168(1): 113-120.
- Cloquet, C., Carignan, J., Libourel, G., Sterckeman, T., Perdrix, E. (2006) Tracing source pollution in soils using cadmium and lead isotopes. *Environmental science & technology* 40(8): 2525-2530.
- Cullen, J. T., Maldonado, M. T. (2013) Biogeochemistry of cadmium and its release to the environment. U: Sigel, A., Sigel, H., Sigel, R. K. O. (ur.) *Cadmium: From toxicity to essentiality*, *Metal Ions in Life Sciences* 11, Springer, Dordrecht, str. 31-62.
- Dixit, V., Pandey, V., Shyam, R. (2001) Differential responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *Journal of Experimental Botany* 52(358): 1101-1109.
- Dolphin, D., Poulson, R., Avramović, O. (1989) *Glutathione: Chemical, Biochemical and Medical Aspects*: John Wiley and Sony Inc.

Felici, E., Molina, A., Almeida, C. A., Baldo, F., Alejandro, M., Zirulnik, F., Gomez, M. R. A. (2014) Cadmium-induced oxidative damage and antioxidant defense mechanisms in *Glycine max* L. *Journal of Coastal Life Medicine* 2(10): 791-798.

Ferreira, R. R., Fornazier, R. F., Vitória, A. P., Lea, P. J., Azevedo, R. A. (2002) Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress. *Journal of Plant Nutrition* 25(2): 327-342.

Ghani, A. (2010) Toxic effects of heavy metals on plant growth and metal accumulation in maize (*Zea mays* L.). *Iranian Journal of Toxicology* 3(3): 325-334.

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.

Gratão, 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.

Grobelak, A., Świątek, J., Murtaś, A., Jaskulak, M. (2019) Cadmium-Induced Oxidative Stress in Plants. U: Hasanuzzaman, M., Prasad, M. N. V., Fujita, M. (ur.) *Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants: From Physiology to Remediation*. Academic Press, United States, str. 213-231.

Habig, W. H., Pabst, M. J., Jakoby, W. B. (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249 (22): 7130-7139.

Hameed, A., Rasool, S., Azooz, M. M., Hossain, M. A., Ahanger, M. A., Ahmad, P. (2016) Heavy metal stress: plant responses and signaling. U: Ahmad, P. (ur.) *Plant Metal Interaction: Emerging Remediation Techniques*. Elsevier, Netherlands, str. 557-583.

Hameed, A., Sharma, I., Kumar, A., Azooz, M. M., Lone, H. A., Ahmad, P. (2014) Glutathione metabolism in plants under environmental stress. U: Ahmad, P. (ur.) *Oxidative Damage to Plants*. Academic Press, United States, str. 183-200.

Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Rahman, A., Mahmud, J. A., Hossain, M. S., Fujita, M. (2016) Soybean production and environmental stresses. U: Miransari, M. (ur.)

Environmental Stresses in Soybean Production 2. Academic Press, United States, str. 61-102.

Hashem, H. A. (2014) Cadmium toxicity induces lipid peroxidation and alters cytokinin content and antioxidant enzyme activities in soybean. *Botany* 92: 1-7.

Hoagland, D. R., Arnon, D. I. (1950) The water-culture method of growing plants without soil. California Agricultural Experiment station 347.

Hoseini, S. M., Zargari, F. (2013) Cadmium in Plants: A Review. *International Journal of Farming and Allied Sciences* 2(17): 579-581

Hossain, M. A., Piyatida, P., da Silva, J. A. T., Fujita, M. (2012) Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. *Journal of Botany* 2012: 1-37.

Hussain, A., Ali, S., Rizwan, M., Zia-ur-Rehman, M., Yasmeen, T., Hayat, M. T., ... & Hussain, S. M. (2019) Morphological and Physiological Responses of Plants to Cadmium Toxicity. U: Hasanuzzaman, M., Prasad, M. N. V., Fujita, M. (ur.) *Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants: From Physiology to Remediation*. Academic Press, United States, str. 47-72.

Jali, P., Pradhan, C., Das, A. B. (2016) Effects of Cadmium Toxicity in Plants: A Review Article. *Scholars Academic Journal of Biosciences* 4(12): 1074-1081.

Jinadasa, N., Collins, D., Holford, P., Milham, P. J., Conroy, J. P. (2016) Reactions to cadmium stress in a cadmium-tolerant variety of cabbage (*Brassica oleracea* L.): is cadmium tolerance necessarily desirable in food crops?. *Environmental Science and Pollution Research* 23(6): 5296-5306.

Kabata-Pendias, A., Pendias, H. (2001) *Trace Elements in Soils and Plants*. 3rd ed., United States, CRC Press.

Khan, M. A., Khan, S., Khan, A., Alam, M. (2017) Soil contamination with cadmium, consequences and remediation using organic amendments. *Science of the Total Environment* 601-602: 1591-1605.

Kováčik, J. (2019) Role of Low Molecular Weight Compounds in Cadmium Stress Tolerance. U: Hasanuzzaman, M., Prasad, M. N. V., Nahar, K. Cadmium Tolerance in Plants: Agronomic, Genetic, Molecular and Omic Approaches. Academic Press, United States, str. 281-318.

Küpper, H., Leitenmaier, B. (2013) Cadmium-accumulating plants. U: Sigel, A., Sigel, H., R. K. O. Sigel (ur.) Cadmium: from toxicity to essentiality, Metal Ions in Life Sciences 11. Springer, Dordrecht, str. 373-393.

Lin, R., Wang, X., Luo, Y., Du, W., Guo, H., & Yin, D. (2007) Effects of soil cadmium on growth, oxidative stress and antioxidant system in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). Chemosphere 69: 89-98.

Liu, Y., Wang, X., Zeng, G., Qu, D., Gu, J., Zhou, M., & Chai, L. (2007) Cadmium-induced oxidative stress and response of the ascorbate–glutathione cycle in *Beckmannia nivea* (L.) Gaud. Chemosphere 69: 99-107.

Loix, C., Huybrechts, M., Vangronsveld, J., Gielen, M., Keunen, E., Cuypers, A. (2017). Reciprocal interactions between cadmium-induced cell wall responses and oxidative stress in plants. Frontiers in plant science 8: 1867.

Markovska, Y. K., Gorinova, N. I., Nedkovska, M. P., Miteva, K. M. (2009) Cadmium-induced oxidative damage and antioxidant responses in *Brassica juncea* plants. Biologia Plantarum 53(1): 151-154.

Mehes-Smith, M., Nkongolo, K., Cholewa, E. (2013) Coping mechanisms of plants to metal contaminated soil. U: Silvern, S. (ur.) Environmental change and sustainability. IntechOpen, United Kingdom, str. 53-90.

Meng, Y., Zhang, L., Wang, L., Zhou, C., Shangguan, Y., Yang, Y. (2019) Antioxidative enzymes activity and thiol metabolism in three leafy vegetables under Cd stress. Ecotoxicology and environmental safety 173: 214-224.

Miransari, M. (2016) Soybean production and heavy metal stress. U: Miransari M. (ur.) Abiotic and Biotic Stresses in Soybean Production: Soybean Production 1. Academic Press, United States, str. 197-216.

- Molina, A. S., Nievas, C., Chaca, M. V. P., Garibotto, F., González, U., Marsá, S. M., ... & Zirulnik, F. (2008) Cadmium-induced oxidative damage and antioxidative defense mechanisms in *Vigna mungo* L. *Plant growth regulation* 56(3): 285.
- Naeem, A., Zafar, M., Khalid, H., Zia-ur-Rehman, M., Ahmad, Z., Ayub, M. A., Qayyum, M. F. (2019) Cadmium-Induced Imbalance in Nutrient and Water Uptake by Plants. U: Hasanuzzaman, M., Prasad, M. N. V., Fujita, M. (ur.) *Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants: From Physiology to Remediation*. Academic Press, United States, str. 299-326.
- Nair, S., Singh, S. V., Krishan, A. (1991) Flow cytometric monitoring of glutathione content and anthracycline retention in tumor cells. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology* 12(4): 336-342.
- Nakano, Y., Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and cell physiology* 22(5): 867-880.
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y. I., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B., Queval, G., Foyer, C. H. (2012) Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, cell & environment* 35: 454-484.
- Paradiso, A., Berardino, R., de Pinto, M. C., Sanità di Toppi, L., Storelli, M. M., Tommasi, F., De Gara, L. (2008) Increase in ascorbate–glutathione metabolism as local and precocious systemic responses induced by cadmium in durum wheat plants. *Plant and Cell Physiology* 49(3): 362-374.
- Romic, M., Romic, D. (2003) Heavy metals distribution in agricultural topsoils in urban area. *Environmental geology* 43: 795-805.
- Semane, B., Cuypers, A., Smeets, K., Van Belleghem, F., Horemans, N., Schat, H., Vangronsveld, J. (2007) Cadmium responses in *Arabidopsis thaliana*: glutathione metabolism and antioxidative defence system. *Physiologia Plantarum* 129: 519-528.
- Shute, T., Macfie, S. M. (2006) Cadmium and zinc accumulation in soybean: A threat to food safety?. *Science of the Total Environment* 371: 63-73.
- Silva, M. L. D. S., Vitti, G. C., Trevizam, A. R. (2014) Heavy metal toxicity in rice and soybean plants cultivated in contaminated soil. *Revista Ceres* 61(2): 248-254.

Smolders, E., Mertens, J. (2013) Cadmium. U: Alloway B. J. (ur.) Heavy Metals in Soils: Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability, Environmental Pollution 22. Springer, Dordrecht, str. 283-311.

Sollitto, D., Romic, M., Castrignanò, A., Romic, D., Bakic, H. (2010) Assessing heavy metal contamination in soils of the Zagreb region (Northwest Croatia) using multivariate geostatistics. Catena 80: 182-194.

Srivastava, R., Khan, R., Manzoor, N. (2011) Responses of cadmium exposures on growth, physio-biochemical characteristics and the antioxidative defence system of soybean (*Glycine max* L.). Journal of Phytology 3(10): 20-25.

Qadir, S., Jamshieed, S., Rasool, S., Ashraf, M., Akram, N. A., Ahmad, P. (2014) Modulation of plant growth and metabolism in cadmium-enriched environments. U: Whitacre, D. M. (ur.) Reviews of environmental contamination and toxicology 229. Springer, Switzerland, str. 51-88.

Wagner, G. J. (1993) Accumulation of cadmium in Crop Plants and its Consequences to Human Health. Advances in Agronomy 51: 173-212.

Wendel A. 1980. Glutathione peroxidase. U: Jakoby W. B. (ur). Enzymatic basis of detoxication. Academic Press, New York, 11: str. 333-353.

Wu, Z., Zhao, X., Sun, X., Tan, Q., Tang, Y., Nie, Z., ... & Hu, C. (2015) Antioxidant enzyme systems and the ascorbate–glutathione cycle as contributing factors to cadmium accumulation and tolerance in two oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L.) under moderate cadmium stress. Chemosphere 138: 526-536.

Xu, S. S., Zu Lin, S., Lai, Z. X. (2015) Cadmium impairs iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana* by increasing the polysaccharide contents and the iron-binding capacity of root cell walls. Plant and Soil 392(1-2): 71-85.

Xu, J., Zhu, Y., Ge, Q., Li, Y., Sun, J., Zhang, Y., Liu, X. (2012) Comparative physiological responses of *Solanum nigrum* and *Solanum torvum* to cadmium stress. New Phytologist 196(1): 125-138.

Zhi, Y., He, K., Sun, T., Zhu, Y., Zhou, Q. (2015) Assessment of potential soybean cadmium excluder cultivars at different concentrations of Cd in soils. Journal of Environmental Sciences 35: 108-114.

Mrežne stranice

Web1. Food and Agriculture Organization of the United Nations: Food and Agriculture Data. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (24.06.2019.).

Web2. <https://www.greenandvibrant.com/deep-water-culture> (11.07.2019.)