

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

ODJEL ZA BIOLOGIJU

Preddiplomski studij biologije

Rebeka Bošnjaković

SELEN- ANTIOKSIDANS ILI PROOKSIDANS?

Završni rad

Mentorica: doc. dr. sc. Ivna Štolfa Čamagajevac

Neposredni voditelj: dr.sc. Rosemary Vuković

Osijek, 2016

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Završni rad

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

Selen-antioksidans ili prooksidans?

Rebeka Bošnjaković

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

Mentorica: doc.dr.sc. Ivna Štolfa Čamagajevac

Neposredni voditelj: dr.sc. Rosemary Vuković

Kratak sažetak završnog rada: Selen je u tragovima esencijalan mikronutrijent i iznimno je koristan za čovjeka i životinje, no njegova esencijalnost nije dokazana za više biljke. Specifični fiziološki mehanizmi, koji su zaslužni za njegovo pozitivno djelovanje u antioksidacijskoj obranibiljaka još nisu u potpunosti razjašnjeni. Selen ima dvojako djelovanje na biljke; u malim koncentracijama djeluje kao antioksidans, dok u velikim djeluje kao prooksidans. Cilj ovog rada bio je utvrditi kako različiti oblici i koncentracije Se utječu na antioksidacijski sustav, odnosno aktivnosti glutathion-reduktaze i katalaze u izdancima pšenice (*Triticum aestivum* L.) sorte Divana. Pšenica je tretirana trima različitim koncentracijama dva oblika Se (selenit i selenat). Sve koncentracije oba oblika selena nisu aktivirale katalazu. S druge strane, povećanje aktivnosti glutathion-reduktaze uzrokovale su samo dvije veće koncentracije selenata, dok je taj efekt izostao kod tretmana selenitom što se može povezati s učinkovitijom mobilnošću selenata u nadzemne dijelove biljke. Dobiveni rezultati mogu poslužiti kao osnova za daljnja istraživanja o učincima viših koncentracija selena na različite komponente antioksidativnog sustava.

Broj stranica:13

Broj slika:4

Broj tablica:0

Broj literaturnih navoda: 64

Web izbor: 0

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: selen, oksidacijski stres, glutathion-reduktaza, katalaza, *Triticum aestivum*

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Department of Biology

Bachelor's thesis

Scientific Area: Natural Sciences

Scientific Field: Biology

Selenium- antioxidant or pro-oxidant?

Rebeka Bošnjaković

Supervisor: Ph. D. Ivna Štolfa Čamagajevac, assistant professor

Assistant in charge: Ph. D. Rosemary Vuković

Short abstract: As a trace element selenium is an essential micronutrient and has important benefits for human and animals, but its essentiality has not been proven yet for higher plants. The specific physiological mechanisms that are responsible for positive effects in plants, primarily in antioxidant defense, have not yet been clarified. Selenium has dual effect on plants, in low concentrations acts as an antioxidant, while in higher concentrations acts as a pro-oxidant. The aim of this study was to determine how different forms and concentrations of selenium influence the antioxidant system, especially activities of glutathione reductase and catalase in the shoots of wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Divana. Wheat was treated with three different concentrations of two forms of Se (selenite and selenate). All concentrations of both selenium forms did not activate catalase. On the other hand, only the two highest selenate concentrations caused increase in glutathione reductase activity, while selenite did not have such an effect what can be connected with more efficient mobility of selenate in upper parts of plants. Obtained results can serve as a basis for further research of the effects of higher selenium concentrations on the various antioxidant system components.

Number of pages:13

Number of figures:4

Number of tables:0

Number of references:64

Web source:0

Original in: Croatian

Key words: selenium, oxidative stress, glutathione reductase, catalase, *Triticum aestivum*

This is deposited in Library of Department of Biology, University of J. J. Strossmayer Osijek and in National University Library in Zagreb. It is also available on the web site of Department of Biology, University of J.J. Strossmayer Osijek.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Selen.....	1
1.2. Selen u biljkama	1
1.3. Uloga selena u rastu i razvoju biljaka	3
1.4. Antioksidacijska uloga selena	3
1.5. Cilj rada	6
2. MATERIJALI I METODE	7
2.1. Biljni materijal i opis eksperimenta	7
2.2. Aktivnosti antioksidativnih enzima	7
2.2.1. Priprema enzimskih ekstrakata	7
2.2.2. Određivanje aktivnosti katalaze	7
2.2.3. Određivanje aktivnosti glutathion-reduktaze	8
2.3. Statistička obrada podataka	8
3. REZULTATI.....	9
3.1. Utjecaj tretmana Se na aktivnost katalaze u izdancima pšenice.....	9
3.2. Utjecaj tretmana Se na aktivnost glutathion-reduktaze u izdancima pšenice	9
4. RASPRAVA	11
5. GLAVNI REZULTATI I ZAKLJUČCI	13
6. LITERATURA	14

1. UVOD

1.1. Selen

Selen (Se) je kemijski element atomskog broja 34 s atomskom masom od 78.96 g/mol. Ima svojstva metaloida i srodan je sumporu. Se se može naći u 5 valentnih stanja: elementarni Se, selenid, selenit, selenat i tioselenat (Lauchli, 1993). Ovisno o geografskom području, koncentracija Se u tlima varira od 0,1 do 2,0 mg/kg (Mayland, 1994; Dhillon i Dhillon, 2003). Pripada skupini halkogenih elemenata. Važan je mikroelement kojeg pronalazimo u ljudima, životinjama, biljkama i mikroorganizmima (Germ i Stibilj, 2007). Esencijalan je i iznimno važan za zdravlje ljudi i životinja jer je sastavna komponenta antioksidacijskog enzima glutation-peroksidaze (GSH-Px) te drugih enzima kao što su tioredoksin-reduktaze, iodotironin-deiodinaze te niz selenoproteina (Pallud i sur., 1997; Birringer i sur., 2002). Većina Se se u organizam unosi putem prehrane, stoga je bitno da biljke sadržavaju dostatnu količinu Se u svojim tkivima. Međutim, mnoga tla, diljem svijeta, siromašna su Se (Cartes i sur., 2011). Zbog manjka Se mogu nastati zdravstveni problemi u ljudi. Mogu se razviti bolesti koje zahvaćaju jetru, kardiovaskularne bolesti te razni karcinomi (Chu i sur., 2013). Stoga se količina Se povećava raznim dodacima i biofortifikacijom.

1.2. Selen u biljkama

Iako je dokazano da je Se esencijalan za ljude i životinje, njegova esencijalnost za više biljke je i dalje upitna (Terry i sur., 2000). Međutim, istraživanja su pokazala da u malim koncentracijama Se ima pozitivan učinak na biljke, prvenstveno potpomaže samom rastu i razvoju (Hartikainen i Xue, 1999; Terry i sur., 2000; Xue i sur., 2001; Turkainen i sur., 2004; Djanaguiraman i sur., 2005). Bioraspoloživost Se za biljke ovisna je o tlu, odnosno o samoj teksturi tla, pH, oksidacijskom stanju i prisutnosti različitih iona koji pospješuju primanje Se. Se se apsorbira u dva anorganska oblika, kao selenit (SeO_3^{2-}) i kao selenat (SeO_4^{2-}) ili u organskom obliku kao Se-aminokiselina, kao na primjer Se-Met. (Kopsell i sur., 2007). Selenati imaju veću raspoloživost biljkama jer su manje vezani za čestice tla i lakše se ispiru dok se seleniti čvršće vežu i to prvenstveno za okside aluminija i željeza (Curtin i sur., 2006).

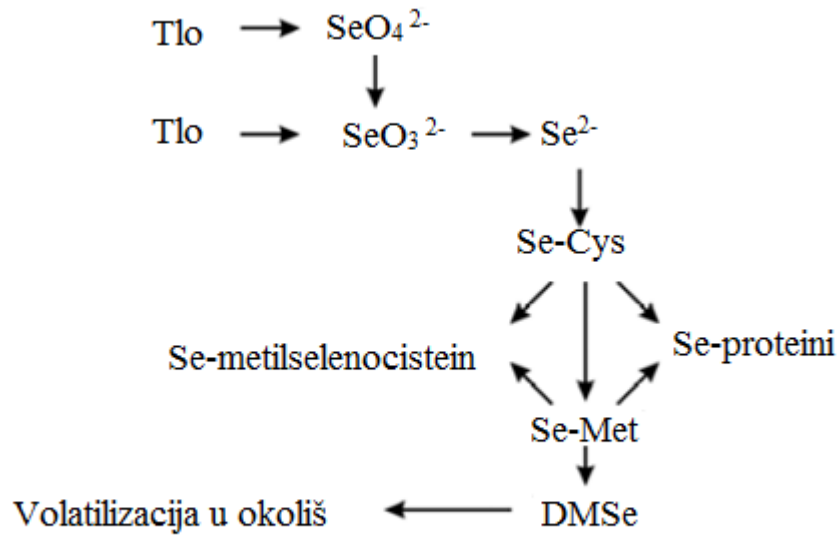
Interakcija čimbenika koji utječu na unos Se u biljke je složena. Unos i akumulacija Se u biljkama može biti pod utjecajem koncentracije različitih aniona, kao što su na primjer, kloridni (Cl^-) i sulfatni (SO_4^{2-}), koji su često prisutni u odvodnim vodama. Transport SeO_4^{2-} i SO_4^{2-} putem korijena velikog broja žitarica posredovan je zajedničkim membranskim

nosiocem te se ti anioni natječu za vezano mjesto istog nosača. Ovaj antagonizam utječe na unos Se koji je inhibiran u većoj mjeri s SO_4^{2-} nego s Cl^- (Grieve i sur., 2001).

Se može povećati otpornost biljaka na oksidativni stres uzrokovan UV-zrakama, ubrzati rast sadnica i usporiti proces starenja (Xue i sur. 2001., Pennanen i sur., 2002) a ima i važnu ulogu u povećavanju otpornosti biljaka na stres uzrokovan nedostatkom vode (Kuznetsov i sur. 2003).

Primanje Se i njegov metabolizam se razlikuje s obzirom na genetska svojstva biljnih vrsta, stadij razvoja i vrstu biljnog organa. Većina biljaka najveći dio Se akumulira u lišću i izdancima. (Zayed i sur., 1998). Turakainen i sur. (2007) su utvrdili da se koncentracija Se, u listovima, gomolju, izdancima i korijenju krumpira, povećala s povećanjem koncentracije dodanog Se. Najveća koncentracija Se utvrđena je u mladom gornjem lišću, izdancima i korijenju, što ukazuje na učinkovito primanje i iskorištavanje selenata u ranim razvojnim stadijima biljke. Za razliku od nižih biljaka, više biljke imaju različiti kapacitet za akumulaciju i toleranciju Se te se dijele na akumulatore, neakumulatore i indikatore (Rosenfeld i Beath, 1964; Terry i sur., 2000; Dhillon i Dhillon 2003; White i sur., 2004). U akumulatore spada približno 25 vrsta biljaka kao što su biljne vrste *Allium sativum* L., *Allium cepa* L. i *Brassica oleracea* L. (Neuhriel i sur., 1999, Whanger 2002). Postoji posebna skupina biljaka koje nazivamo hiperakumulatori. U tu grupu spadaju rodovi *Stanleya* i *Astragalus* (Rosenfeld i Beath, 1964; Neuhriel i sur., 1999; Terry i sur., 2000). Takve biljke imaju sposobnost akumuliranja i tolerancije velikih koncentracija Se te se mogu koristiti u fitoremedijaciji. No, većina biljaka je osjetljiva na Se i nije u mogućnosti akumulirati velike količine Se (Germ i sur., 2007).

Kao što je već spomenuto, biljke Se primaju u dva oblika, selenit i selenat. Primanje selenata i njegov prijenos unutar biljke puno je brži od selenita (Arvy, 1993; De Souza i sur., 1998; Pilon-Smits i sur., 1998; Cartes i sur., 2005. Što se tiče mobilnosti, selenat se lako transportira iz korijenja u nadzemne dijelove biljaka dok se selenit primarno zadržava u korijenju (Zayed i sur., 1998). Dumont i sur. (2006) su razjasnili metabolizam Se u biljkama (Slika 1). Dakle, biljka iz okoliša akumulira selenit i selenat koji se reducira u selenit. Selenit se zatim reducira u selenid. Selenid prelazi u selenocisten (Se-Cys) koji se dalje pretvara u selenometionin (Se-Met), ugrađuje se u Se-proteine ili nastaje Se-metilselenocistein (Se-MetSeCys). Se-Met se povratno pretvara u Se-MetSeCys ili nastaje dimetilselenid (DMSe) koji volatilizira u okoliš.



Slika 1. Shematski prikaz metabolizma Se u biljkama (preuzeto i modificirano prema Dumont i sur., 2006).

1.3. Uloga selena u rastu i razvoju biljaka

Kao što je već rečeno, Se još uvijek nije klasificiran kao esencijalan element za biljke, iako se smatra da ima pozitivne učinke na biljke pri čemu njegov učinak ovisi o njegovoj koncentraciji (Shanker, 2006). Prema Hamiltonu (2004), postoje tri razine biološkog djelovanja Se: male koncentracije su potrebne za normalan razvoj i rast, umjerene koncentracije se mogu skladištiti za održavanje homeostatskih funkcija, a prekomjerne mogu imati toksično djelovanje.

Singh i sur. (1980) su uočili pozitivan utjecaj 0,5mg/kg Se u obliku selenita na stimulaciju rasta i količinu suhe tvari kod vrste *Brassica juncea* L. Dokazano je da Se ima utjecaja i na klijanje. Dodavanjem više od 29 mg/kg Se u tlo inhibira rast i klijanje rotkvice, zelene salate i rajčice (Carvalho i sur. 2003). Selenit potiče klijanje sjemena vrste *Momordica charantia* L. pri optimalnim temperaturama pri čemu je pozitivan utjecaj na klijanje povezan s njegovom antioksidacijskom aktivnošću (Chen and Sung, 2001).

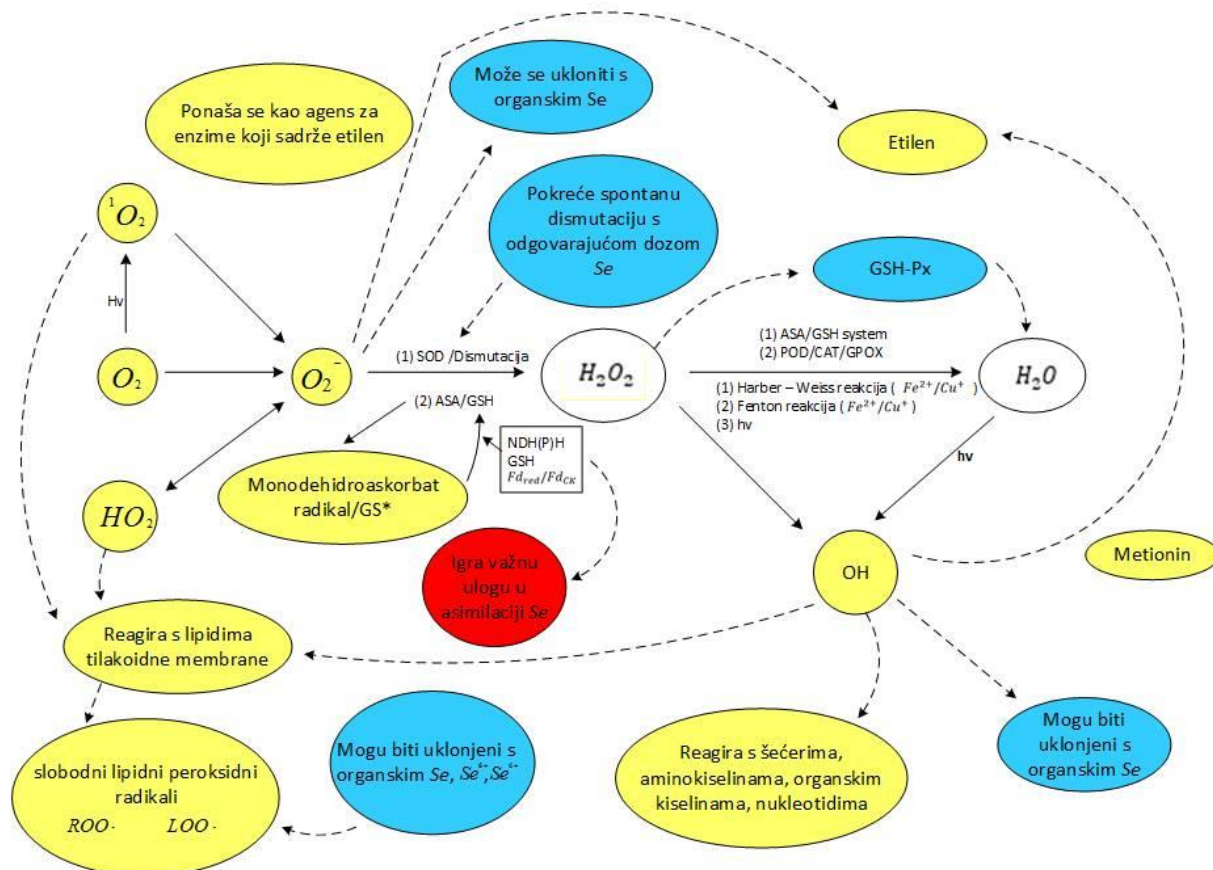
1.4. Antioksidacijska uloga selena

Oksidacijski stres je stanje u kojem organizam nije u mogućnosti neutralizirati i eliminirati nastale reaktivne kisikove spojeve (*engl. Reactive Oxygen Species – ROS*) (Sies,

1985,1986; Sies i Cadenas, 1985). U ROS spadaju superoksidni anion ($O_2^{\cdot-}$), vodikov peroksid (H_2O_2), hidroksilni radikal ($OH\cdot$), singletni kisik i slobodni lipidni peroksilni radikali ($LOO\cdot$, $ROO\cdot$). ROS mogu oštetiti proteine i DNA, stanične lipide, inhibirati prijenos staničnog signala u signalnim putevima i u konačnici negativno utjecati na normalno funkcioniranje stanice (Hasanuzzaman i sur., 2010). Do pojave i razvoja oksidativnog stresa mogu dovesti različiti abiotički faktori kao što su suša, povećani salinitet, niske i visoke temperature, teški metali, UV (Hasanuzzaman i sur., 2010).

Postoji dva tipa antioksidansa, jedna su tvari male molekularne mase, kao što su askorbat (Asa), tokoferol, glutation (GSH), dok su drugi tip antioksidativni enzimi kao superoksid-dismutaza (SOD), katalaza (CAT), askorbat-peroksidaza (APX), gvajakol-peroksidaza (GPOD), glutation-peroksidaza (GSH-Px), glutation-reduktaza (GR) i dr. (Thompson i sur., 1987; Lu, 1999; Hartikainen i sur., 2000; Meharg i Hartley-Whitaker, 2002; Cao i sur., 2004; Asada, 2006).

Dodatak Se može imati različite antioksidativne mehanizme: regulacija aktivnosti antioksidativnih enzima, sudjelovanje pri spontanoj reakciji prevođenja $O_2^{\cdot-}$ u H_2O_2 (bez prisutnosti SOD) (Hartikainen i sur., 2000; Cartes i sur., 2010) te direktno uklanjanje $OH\cdot$ i $O_2^{\cdot-}$ (Slika 2).



Slika 2. Mehanizmi kojima Se regulira razinu ROS-a (preuzeto i modificirano prema Feng i sur., 2013).

Nedavna su istraživanja pokazala da uz pozitivan utjecaj na rast i razvoj biljaka Se povećava otpornost i antioksidativni kapacitet biljaka (Hartikainen i Xue, 1999; Djanaguiraman i sur., 2005; Peng i sur., 2002). Ríosi sur. (2009) su proveli istraživanje s različitim koncentracijama (5, 10, 20, 40, 60, 80 i 120 μ M) selenata i selenita kako bi utvrdili utjecaj oblika Se i koncentracije na stvaranje i detoksifikaciju H_2O_2 u zelenoj salati. Rezultati su pokazali da je selenat manje toksičan oblik, dok selenit potiče stvaranje veće koncentracije H_2O_2 i veći intenzitet peroksidacije lipida u listovima. Biljke tretirane selenatom potiču aktivnost enzima koji detoksificiraju H_2O_2 , APX i GSH-Px, no potiču i akumulaciju neenzimskih antioksidansa AsA i GSH. Dakle, male koncentracije selenata mogu pomoći biljkama u povećanju otpornosti na stres. Nowak i sur. (2004) su radili istraživanje o utjecaju koncentracije Se na antioksidacijski odgovor pšenice i došli do zaključka kako niske koncentracije Se utječu pozitivno na antioksidacijski odgovor, dok visoke koncentracije izazivaju stresni odgovor. Slične su rezultate dobili i drugi znanstvenici.

1.5. Cilj rada

Cilj rada bio je utvrditi kako različiti oblici i koncentracije Se utječu na antioksidacijski sustav, odnosno aktivnosti glutatijon-reduktaze i katalaze u izdancima pšenice (*Triticum aestivum* L.) sorte Divana.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Biljni materijal i opis eksperimenta

Kao materijal koristio se izdanak pšenice (*Triticum aestivum*L.) sorte Divana, odnosno nadzemni dio klijanca.

Za svrhe ovog istraživanja koristilo se tlo s nezagađenog mjesta s područja Baranje, (Osječko-baranjska županija) na sjeverno-istočnom dijelu Republike Hrvatske. Uzorkovano tlo je prosijano i skladišteno u plastične kutije dimenzija 19,5×17,5×11cm (1,6kg suhog tla po kutiji). Se je primijenjen u obliku selenata i selenita u koncentracijama od 0.01, 0.1 i 1mg/kg (što otprilike odgovara 5, 50, 500 g/ha). Kontrole nisu sadržavale Se. Svi tretmani su se ponovili tri puta, za svaki tretman i kontrolu, bile su priređene tri kutije. Neposredno prije primjene Se, 100 zrna pšenice je postavljeno na površinu zemlje svake kutije. Izlaganje je trajalo 15 dana na 20 °C i ciklusu od 16/8 sati svjetlosti odnosno tame.

2.2. Aktivnosti antioksidativnih enzima

2.2.1. Priprema enzimskih ekstrakata

Izdanci pšenice (oko 200mg) usitnjeni su u tarioniku pomoću tekućeg dušika uz dodatak polivinilpolipirrolidina (PVP). Enzimi su ekstrahirani 15 minuta na ledu uz dodatak 1mL hladnog 100mM kalij fosfatnog pufera (pH 7.0) koji sadrži etilendiamintetraoctenu kiselinu (EDTA). Homogenati su zatim centrifugirani 15 minuta na 20 000 g i 4 °C. Dobiveni supernatantisu skladišteni na -80 °C i upotrijebljeni za spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima katalaze (CAT) i glutation-reduktaze (GR).

2.2.2. Određivanje aktivnosti katalaze

Ukupna aktivnost CAT je izmjerena prateći pad absorbancije na 240 nm tijekom 2 minute koristeći H₂O₂ kao supstrat (Aebi, 1984). Enzimska reakcija započinje dodatkom 50μL enzimskog ekstrakta u 1950 μL 50mM kalij fosfatnog pufera (pH 7.0) s 10 mM H₂O₂. CAT je izražena u enzimskim jedinicama (U) predstavljajući količinu enzima koji katalizira oksidaciju H₂O₂ po mg proteina na 25 °C i pH 7.0.

2.2.3. Određivanje aktivnosti glutation-reduktaze

Aktivnost glutation-reduktaze (GR) u enzimskim ekstraktima određena je prema metodi koju su opisali Halliwell i Foyer (1978). Reakcijska smjesa sadržavala je 400 μ L 100 mM kalij fosfatnog pufera (pH 7.5) koji je sadržavao 1 mM otopinu EDTA, 500 μ L 2 mM otopine GSSG, 50 μ L enzimskog ekstrakta te 50 μ L 2 mM otopine NADPH. Smanjenje apsorbancije, uslijed oksidacije NADPH, praćeno je pri valnoj duljini od 340 nm svakih 10 sekundi tijekom 2 minute. GR je izražena u enzimskim jedinicama (U) koje predstavljaju količinu enzima koji katalizira oksidaciju 1 μ mola NADPH po g proteina pri 25 °C i pH.

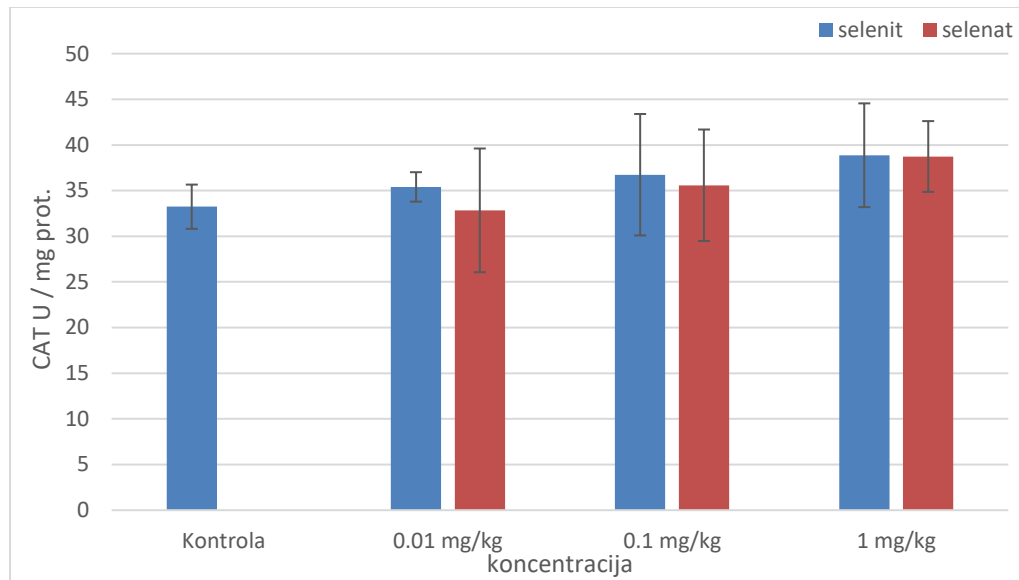
2.3. Statistička obrada podataka

Podaci dobiveni u ovom radu obrađeni su pomoću statističkog programa STATISTICA 12.0 (Statsoft, Inc, Tulsa, SAD). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija (SD). Razlike između srednjih vrijednosti skupina (kontrola i različiti tretmani) utvrđene pomoću monofaktorijske analize varijance (one-way ANOVA). Nakon što je utvrđeno postojanje razlika, provedeno je post hoc testiranje pomoću LSD testa. Svi testovi provedeni su uz razinu značajnosti od 5%.

3. REZULTATI

3.1. Utjecaj tretmana Se na aktivnost katalaze u izdancima pšenice

Tretmani različitim koncentracijama selenita i selenata (0.01 mg/kg, 0.1 mg/kg, 1 mg/kg) nisu uzrokovali značajne statističke razlike u aktivnosti katalaze (CAT) u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 3).

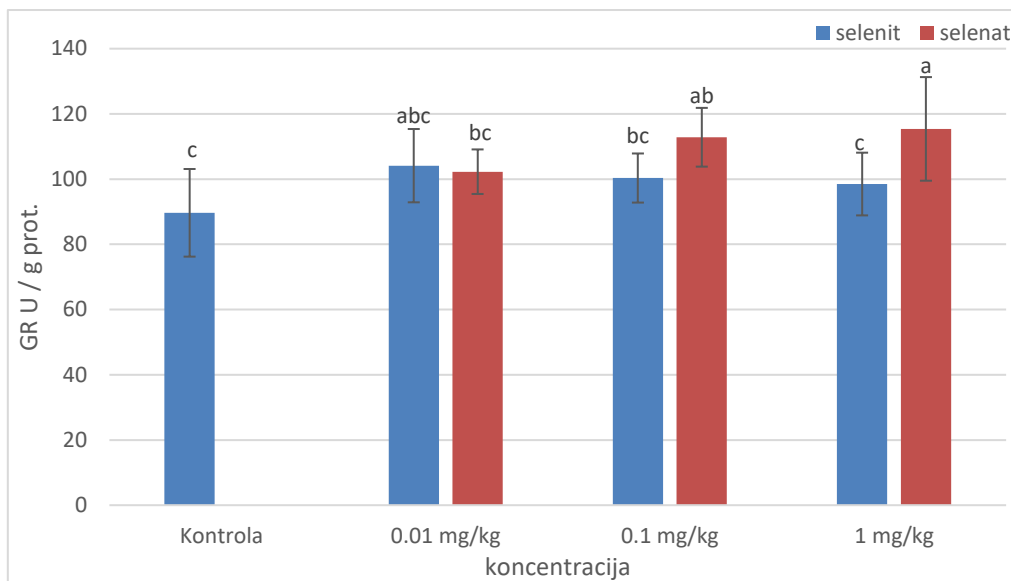


Slika 3. Specifična aktivnost katalaze (CAT) u izdancima pšenice tretiranim različitim koncentracijama selenita i selenata. Rezultati (n=6) su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SD.

Analiza varijance (ANOVA) nije pokazala statistički značajne razlike među skupinama.

3.2. Utjecaj tretmana Se na aktivnost glutation-reduktaze u izdancima pšenice

Tretman svim koncentracijama selenita nije uzrokovao značajne promjene aktivnosti GR u izdancima pšenice dok su samo veće koncentracije selenata (0.1 mg/kg i 1 mg/kg) uzrokovale porast aktivnosti GR u odnosu na kontrolu (Slika 4). Pri tretmanu nižim koncentracijama selenita i selenata nije bilo razlike u aktivnosti GR u izdancima pšenice, dok je pri najvišoj koncentraciji aktivnost GR bila značajno veća kod tretmana selenatom (Slika 4).



Slika 4. Specifična aktivnost glutation-reduktaze (GR) u izdancima pšenice tretiranim različitim koncentracijama selenita i selenata. Rezultati (n=6) su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SD. Razlike između skupina testirane su LSD *post hoc* testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

4. RASPRAVA

Enzim CAT je odgovoran za uklanjanje i kontrolu visokih koncentracija H_2O_2 u stresnim uvjetima, ali je manje pogodan za fino podešavanje niskih koncentracija H_2O_2 koje mogu biti važne za regulatorne mehanizme. Dosadašnja istraživanja o učinku Se na antioksidativni odgovor u biljkama uglavnom su pokazala da tretman Se primarno inducira aktivnost GSH-Px koja vrlo efikasno uklanja H_2O_2 u citosolu koristeći reducirani GSH kao supstrat, stoga stanica nema potrebu aktivacije CAT i ostalih antioksidacijskih enzima (Xue i Hartikainen, 2000). Iako još nije dokazano postojanje esencijalnih proteina ovisnih o Se u višim biljkama, postoji velik broj istraživanja (Hartikainen i sur., 1997, 2000; Cartes i sur., 2011) koja su pokazala pozitivne korelacije između koncentracije Se i aktivnosti GSH-Px. Štoviše, Takeda i sur. (1997) su utvrdili da se kod vrste *Chlamydomonas* koja nije bila izložena Se, 40% nastalog H_2O_2 uklanja pomoću enzima APX, a preostali H_2O_2 uz pomoć enzima CAT. S druge strane stanice koje su tretirane Se, nastali H_2O_2 prvenstveno se uklanja pomoću enzima GSH-Px. Taj podatak također se može povezati s nepromijenjenim aktivnostima CAT nakon tretmana pšenice Se u našem eksperimentu (Slika 3). Vrlo slične rezultate dobili su Xue i Hartikainen (2000) u istraživanju na engleskom ljužu (*Lolium perenne* L.) pri čemu koncentracije Se od 0.1 i 1 mg/kg također nisu uzrokovale značajne promjene aktivnosti CAT. Izostanak povećanja aktivnosti CAT u prisutnosti niskih koncentracija Se, također je dokazana u istraživanju Kong i sur. (2005) u kiselici (*Rumex patientia* × *R. tianshanicus*). Tretman selenitom je kod vrste *Trigonella foenum-graecum* uzrokovao smanjenje aktivnosti CAT (Sreekala i sur. 1999). S druge strane, Yao i sur. (2010) su utvrdili kako visoke koncentracije Se (1,2 i 3 mg/kg) povećavaju aktivnost CAT uz dodatno djelovanje UV-B zračenja kod pšenice (*Triticum aestivum* L.). U pšenici je odgovor na tretman Se ovisio o njegovoj koncentraciji, velike koncentracije selenita (0.45mmol/kg) (38.37mg/kg) uzrokovale su smanjenje aktivnosti, niske koncentracije selenita (0.05mmol/kg i 0.15mmol/kg) (18.27 mg/kg i 33.20 mg/kg) uzrokovale su povećanje aktivnosti CAT za 10% u odnosu na kontrolnu skupinu (Nowak i sur., 2004). Rios i sur. (2008) su istraživali utjecaj Se na produkciju i detoksikaciju H_2O_2 u vrsti *Lactuca sativa* cv. Philipus. Biljku su tretirali različitim koncentracijama selenita i selenata (5, 10, 20, 40, 60, 80 i 120 μ M). Rezultati su pokazali kako je selenat manje toksičan od selenita i kako potiče veće stvaranje

enzima koji pomažu u detoksikaciji H_2O_2 . Što se tiče aktivnosti CAT, istraživanja nisu pokazala značajnije statističke promjene u odnosu na razinu Se.

Glutation-reduktaza je flavoprotein koji je pronađen i kod prokariota i kod eukariota (Romero-Puertas i sur., 2006). Pretežno je smješten u kloroplastima, ali se male količine mogu pronaći u mitohondrijima i citosolu (Edwards i sur., 1990; Creissen i sur., 1994). U višim biljkama, GR je uključena u obranu biljaka od oksidacijskog stresa, reducira GSH koji ima važnu ulogu u staničnom sustavu, odnosno sudjeluje u askorbat-glutationskom ciklusu (Noctor i sur., 2002). GR i GSH imaju presudnu ulogu u određivanju otpornosti biljaka na različite tipove stresnih uvjeta (Chalapathi Rao i Reddy, 2008). Kako bi se održala dovoljna zaliha reduciranog GSH za enzim GSH-Px, enzim GR mora ga obnoviti iz oksidiranog oblika uz utrošak NADPH (Noctor i Foyer, 1998). U ovom istraživanju samo su dvije najviše koncentracije selenata uzrokovale značajnije povećanje aktivnosti GR u odnosu na kontrolnu skupinu, dok tretmani selenitom nisu imali takav učinak. Istraživanje Kaklewskog i sur. (2008) na uljanoj repici i pšenici je pokazalo da se povećanjem koncentracije Se, u obliku selenita, u biljkama povećava se i aktivnost GR (u zelenim dijelovima 5mg/kg) u uljanoj repici i u (zelenim dijelovima 8mg/kg) u pšenici. U tkivu vrste *Trigonella foenum-graecum* L. tretiranim Se utvrđen je pad aktivnosti GR za 50-60% u obje frakcije, u mitohondrijskoj i topljivoj (Santosh i sur., 1999). Pukacka i sur. (2011) su proveli istraživanje na vrsti *Acer saccharium* L. u kojem su dio sjemenki natapali u vodi, a dio u Na_2SeO_4 (10mg/L). Nakon 6 sati, sjemenke su izvađene iz otopina i stavljene na sušenje. Došlo je do povećanja aktivnosti GR u sjemenkama tretiranim Se. Łabanowska i sur. (2012) istraživali utjecaj Se u obliku selenata na odgovor dva tipa pšenice na kratkotrajni stres. U poljskom tipu pšenice, došlo je do povećanja aktivnosti GR za 60%, ali smanjenja aktivnosti CAT za 20%. Dok je u finskom tipu pšenice došlo do smanjenja aktivnosti svih enzima i to GR za 20%, a CAT za 30% što autori povezuju s povećanim kapacitetom zaštite biljaka od oksidacijskih oštećenja uzrokovanih kratkotrajnim stresom kod poljskog tipa pšenice. Hasanuzzaman i sur. (2012) su istraživali ulogu Se u odgovoru biljaka na oksidacijski stres uzrokovan kadmijem te su utvrdili da predtretman s 50 μ M Se povećava aktivnosti antioksidacijskih enzima, između ostalih i GR, i na taj način povećava otpornost biljaka na oksidacijski stres uzrokovan kadmijem. Wang (2011) je također utvrdio pozitivno djelovanje selenata na aktivnost GR u kombinaciji s nedostatkom vode koji je izazvan dodatkom polietilen-glikola kod biljke *Trifolium repens* L. Tretman Se može različito djelovati na

enzime antioksidacijskog sustava, pri čemu odgovor biljke ovisi o obliku primijenjenog Se, genetskim karakteristikama biljne vrste i samim uvjetima eksperimenta.

5. GLAVNI REZULTATI I ZAKLJUČCI

Povećanje aktivnosti glutathion-reduktaze uzrokovale su samo dvije veće koncentracije selenata, dok je taj efekt izostao kod tretmana selenitom što se može povezati s učinkovitijom mobilnošću selenata u nadzemne dijelove biljke.

Tretman s oba oblika selena nije značajno utjecao na aktivnost katalaze u izdancima pšenice što ukazuje na to da oba oblika selena u koncentracijama korištenim u ovom istraživanju nisu izazvala izraženiji oksidacijski stres u izdancima pšenice.

Rezultati ovog istraživanja mogu poslužiti kao osnova za daljnja istraživanja o učincima viših koncentracija selena na različite komponente antioksidativnog sustava.

6. LITERATURA

- Arvy, M. P. 1993. Selenate and selenite uptake and translocation in bean plants (*Phaseolus vulgaris*). *J Exp Bot* 44: 1083-1087.
- Asada, K. 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol* 141: 391-396.
- Birringer, M., Pilawa, S., Flohe, L. 2002. Trend sin selenium biochemistry. *Nat Prod Rep* 19: 693-718.
- Cao, X.D., Ma, L.Q., Tu, C. 2004. Antioxidative responses to arsenic-hyperaccumulator. *Environ Pollut* 128: 317-325.
- Cartes, P., Gianfreda, L., Mora, M.L. 2005. Uptake of selenium and its antioxidant activity in ryegrass when applied as selenate and selenite forms. *Plant Soil* 276: 359-367.
- Cartes, P., Jara, A., Pinilla, L., Rosas, A., Mora, M. 2010. Selenium improves the antioxidant ability against aluminium-induced oxidative stress in ryegrass roots. *Ann Appl Biol* 156: 297-307.
- Cartes, P., Gianfreda, L., Paredes, C., Mora, M.L. 2011. Selenium uptake and its antioxidant role in ryegrass cultivars as affected by selenite seed pelletization. *J Soil Sci Plant Nutr* 11: 1-14.
- Carvalho, K.M., Gallardo-Wilhams, M.T., Benson, R.F., Martin, D.F. 2003. Effects of selenium supplementation on four agricultural crops. *J Agric Food Chem* 51: 704-709.
- Chalapathi Rao, A.S.V., Reddx, A.R. 2008. Glutathione reductase: a putative redox regulatory system in a plant cells. N.A. Khan, S. Singh, S.Umar (Eds.) *Sulfur Assimilation and Abiotic Stresses in Plants*. Springer, The Netherlands pp. 111-147
- Chen, C.C., Sung, JM. 2001. Priming bitter gourd seeds with selenium solution enhances germinability and antioxidative responses under sub-optimal temperature. *Plant Physiol* 111: 9-16.
- Chu, J., Yao, X., Yue, Z., Li, J., Zhao, J. 2013. The effects of selenium on physiological traits, grain selenium content and yield of winter wheat at different development stages. *Biol Trace Elem Res* 151: 434-440.

- Creissen, G.P., Broadbent, P., Kular, B., Reynolds, H., Wellburn, A.R., Mullineaux, P.M. 1994. Manipulation of glutathione reductase in transgenic plants: implications for plant responses to environmental stress. *Proc R Soc Edinb* 102B: 167-175.
- Curtin, D., Hanson, R., Lindley, T.N., Butler RC. 2006. Selenium concentration in wheat (*Triticum aestivum*) grain as influenced by method, rate, and timing of sodium selenite application. *New Zealand J Crop Hor Sci* 34:329-339.
- De Souza, M. P., Pilon-Smits, E.A.H., Lytle, C.M., Hwang S., Tai J., Honma, T.S.U., Yeh, L., Norman, T. 1998. Rate-limiting steps in selenium assimilation and volatilization by Indian mustard. *Plant Physiol* 117: 1487- 1494.
- Dhilon, K.S., Dhilon, S.K. 2003. Distribution and management of seleniferous soils. *Adv Argon* 79: 119-185.
- Djanaguiraman, M., Devi, D.D., Shanker, A.K., Sheeba, A., Bangarusamy, U. 2005. Selenium-an antioxidative protectant in soybean during senescence. *Plant Soil* 272: 77-86.
- Dumont, E., Vanhaecke, F., Crnelis, R. 2006. Selenium speciation from food source to metabolites: A critical review. *Anal Bioanal Chem* 385: 1304-1323.
- Edwards, E.A., Rawsthorne, S., Mullineaux, P.M. 1990. Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum L.*). *Planta* 180:278-284.
- Feng, R., Wei C., Tu, S. 2013. The roles of selenium in protecting plants against abiotic stresses. *EnvironExp Bot* 87: 58-68.
- Germ, M., Stibilj, V., Kreft, I. 2007. Metabolic Importance of Selenium for Plants. *Eur J Plant Sci Biotechnol* 1: 91-97.
- Grieve, C.M., Poss, J.A., Suarez, D.L., Dierig, DA. 2001. Lesquerella growth and selenium uptake affected by saline irrigation water composition. *Industrial Crops and Products* 13: 57-65.
- Hamilton, S.J. 2004. Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. *Sci Tot Environ* 326: 1-31.
- Hartikainen, H., Ekholm, P., Piironen, V., Xue, T., Koivu, T. i Yli-Halla, M. 1997. Quality of the ryegrass and lettuce yields as affected by selenium fertilization. *Agric Food Sci Finland* 6: 381-327.
- Hartikainen, H., Xue, T. 1999. The promotive effect of selenium on plant growth as triggered by ultraviolet irradiation. *J Environ Qual* 28: 1272-1275.

- Hartikainen, H., Xue, T., Piironen, V. 2000. Selenium as an anti-oxidant and pro-oxidant in ryegrass. *Plant Soil* 225: 193-200.
- Hasanuzzaman, M., Hossain, M.A., Fujita, M. 2010. Selenium in higher plants: Physiological Role, antioxidant metabolism and abiotic stress tolerance. *J Plant Sci* 5: 354-375.
- Hasanuzzaman, M., Hossain, M.A., Fujita, M. 2012. Exogenous Selenium Pretreatment Protects Rapeseed Seedlings from Cadmium-Induced Oxidative Stress by Upregulating Antioxidant Defense and Methylglyoxal Detoxification Systems. *Biol Trace Elem Res* 149: 248-261.
- Kong, L., Wang, M., Bi, D. 2005. Selenium modulates the activities of antioxidant enzymes, osmotic homeostasis and promotes the growth of sorrel seedlings under salt stress. *Plant Growth Regul* 45:155-163.
- Kopsell, D.A., Kopsell, D.E. 2007. Selenium. In BARKER, A.W., PILBEAM, D. J. *Handbook of plant nutrition*. CRC p. 515-549.
- Kuznetsov, V.V., Kholodova, V.P., Kuznetsov, V.I., Yagodin B.A. 2003. Selenium regulates the water status of plants exposed to drought. *Dokl Biol Sci* 390: 266-268.
- Łabanowska, M., Filek, M., Kościelniak, J., Kurdziel, M., Kuliś, E. 2012. The effects of short-term selenium stress on Polish and Finnish wheat seedlings- EPR, enzymatic and fluorescence studies. *J Plant Physiol* 169: 275-284.
- Lauchli, A. 1993. Selenium in plants: uptake, functions, and environmental toxicity. *Bot Acta* 106: 455-468.
- Lu, S.C. 1999. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB Journal* 13: 1169-1183.
- Mayland, H.F. 1994. Selenium in plant and animal nutrition. Selenium in the Environment, Frankenberger, Jr. W.T. and S. Benson (Eds.) Marcel Dekker, Inc. NY, USA, PP: 29-45
- Meharg, A.A., Hartley-Whitaker, J. 2002. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. *New Phytol* 154: 29-43.
- Neuhriel, B., Thanbichler, M., Lottspeich, F., Bock, A. 1999. A family of S-ethylmethionine-dependent thiol/selenol methyltransferases. Role in selenium tolerance and evolutionary relation. *J Biol Chem* 274: 5407-5414.
- Noctor, G., Foyer, C. 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Plant Biol* 49: 249-279.
- Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H., Foyer, C. 2002. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *J Exp Bot* 53: 1283-1304.

- Nowak, J., Kaklewski, K., Ligocki, M. 2004. Influence of selenium on oxidoreductive enzymes activity in soil and in plants. *Soil Biol Biochem* 36:1553-1558.
- Pallud, S., Lennon, A.M., Ramauge, M., Gavaret, J.M., Croteau, W., Pierre, M., Courtin, F., St. Germain, D.L. 1997. Expression of the type II iodothyronine deiodinase in culture rat astrocytes is selenium-dependent. *J Biol Chem* 272: 18104-18110
- Peng, X.L., Liu, Y.Y., Luo, S. G. 2002. Effects of selenium in lipid peroxidation and oxidizing ability of rice roots under ferrous stress. *J Northeast Agric Univ* 19: 9-15.
- Pennanen, A., Xue, T., Hartikainen, H. 2002. Protective role of selenium in plant subjected to severe UV irradiation stress. *J Appl Bot* 76: 66-76.
- Pilon-Smits, E.A.H., de Souza, M.P., Lytle, C.M., Shang, C., Lugo T., Terry, N. 1998. Short communication. Selenium volatilization and assimilation by hybrid poplar (*Populus tremula alba*). *J Exp Bot* 49: 1889- 1892.
- Pukacka, S., Ratajczak, E., Kalemba, E. 2011. The protective role of selenium in recalcitrant *Acer saccharium* L. seeds subjected to desiccation. *J Plant Physiol* 168: 220-225.
- Ríos, J.J., Blasco, B., Cervilla, L.M. 2009. Production and detoxification of H₂O₂ in lettuce plants exposed to selenium. *Ann Appl Biol* 154:107-116.
- Romero-Puertas, M.C., Corpas, F.J., Sandalio, L.M., Leterrier, M., Rodriguez- Serrano, M., del Rio, L.A., Palma, J.M. 2006. Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme. *New Phytol* 170: 43-52.
- Rosenfeld, I., Beath, O. A. 1964. Selenium. Geobotany, Biochemistry, Toxicity and Nutrition. *Academic Press*, New York, USA, pp: 411.
- Santosh, T.R., Sreekala, M., Lalitha, K. 1999. Oxidative stress during selenium deficiency in seedlings of *Trigonella foenum-graecum* and mitigation by mimosine – Part II. Glutathione metabolism. *Biol Trace Elem Res* 70: 209-222.
- Shanker, A.K. 2006. Countering UV-B stress in plants: does selenium have a role? *Plant Soil* 282: 21-26.
- Sies, H. 1985. Oxidative stress: Introductory remarks. In: Oxidative stress, Sies, H. (Ed.), Academic Press, San Diego, New York, London, pp: 1-8.
- Sies, H., Cadenas, E. 1985. Oxidative stress: Damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond Biol Sci* 311: 617-631.
- Sies, H. 1986. Biochemistry of oxidative stress. *Angew Chem Int Edn Eng* 25: 1058-1071.
- Singh, M., Singh, H., Bhandari, D.K. 1980. Interaction of selenium and sulphur on the growth and chemical composition of raya. *Soil Sci* 129: 238-244.

- Sreekala, M., Santosh T.R., Lalith, K. 1999. Oxidative stress during selenium deficiency in seedlings of *Trigonella foenum-graecum* and mitigation by mimosine. Part I. hydroperoxide metabolism. *Biol Trace Elem Res*70: 193-207.
- Takeda, T., Ishikawa, T., Shigeoka, S. 1997. Metabolism of hydrogen peroxide by scavenging system in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Physiol Plant* 99: 49-55.
- Terry, N., Zayed, A. M., de Souza, M. P., Tarun, A. S. 2000. Selenium in higher plants. *Annu Rev Plant Biol Plant Mol Biol*51: 401-432.
- Turkainen, M.2007. Selenium and its effects on growth,yield and tuber quality in potato. University of Helsinki, Helsinki. ISBN: 9521034661, pp: 50.
- Wang, C.-Q. 2011. Water-stress mitigation by selenium in *Trifolium repens* L. *J Plant Nutr Soil Sci*174: 276-282.
- Whanger, PD. 2002. Selenocompounds in plants and animals and their biological significance.*J American College of Nutrition* 21: 223-232.
- White, P.J., Bowen,H.C., Parmaguru, P., Fritz, M., Spracklen, W.P., Spiby, R.E., Meacham, M.C., Mead, A., Harriman, M., Trueman, L.J., Smith, B.M., Thomas, B., Broadley, M.R. 2004. Interactions between selenium and sulphur nutrition in *Astragalus thaliana*. *J Exp Bot* 55: 1927-1937.
- Xue, T., Hartikainen, H., Piironen, V. 2000. Selenium as an anti-oxidant and pro-oxidant in ryegrass. *Plant Soil* 225: 193-200.
- Xue, T.L., Hartikainen, H., Piironen, V. 2001. Antioxidative and growth-promoting effects of selenium on senescing lettuce. *Plant Soil* 237: 55-61.
- Yao, X.O., Chu, J.Z., Ba, C.J. 2010 Antioxidant responses of wheat seedlings to exogenous selenium supply under enhanced ultraviolet-B. *Biol Trace Elem Res* 136:96-105.
- Zayed, A., Lytle C. M., Terry, N. 1998. Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants. *Planta*. 206: 284-292.