

# Sortno i tkivno-specifični učinak kadmija na oksidacijski i antioksidacijski status tri kultivara soje (*Glycine max*)

---

Dugić, Milica

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:181:797261>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-12**



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

Milica Dugić

**Sortno i tkivno-specifični učinak kadmija na oksidacijski i  
antioksidacijski status tri kultivara soje (*Glycine max*)**

Diplomski rad

Osijek, 2019.

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

**Diplomski rad**

Znanstveno područje: Prirodne znanosti  
Znanstveno polje: Biologija

**SORTNO I TKIVNO-SPECIFIČNI UČINAK KADMIJA NA OKSIDACIJSKI I  
ANTIOKSIDACIJSKI STATUS TRI KULTIVARA SOJE (*GLYCINE MAX*)**

**Milica Dugić**

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

**Mentor:** Dr.sc. Rosemary Vuković, docent

**Komentor:** Dr.sc. Ivna Štolfa Čamagajevac, docent

**Kratak sažetak diplomskog rada:**

Kadmij (Cd) je teški metal toksičan za biljke, a u višim koncentracijama i letalan. Povišena koncentracija Cd u tlu uzrokuje promjenu u fiziološkim i biokemijskim procesima biljaka što za posljedicu ima smanjeni rast i prinos usjeva. Različite biljne vrste, ali i različiti kultivari istih vrsta pokazuju različit stupanj akumulacije Cd u biljnom tkivu. Cilj ovog istraživanja bio je odrediti utjecaj različitih koncentracija Cd na oksidacijski i antioksidacijski status u izdanku i korijenu tri hrvatska kultivara soje (Korana, Lucija i Ika) koji se međusobno razlikuju u stupnju akumulacije Cd u zrnu. Kao pokazatelji oksidacijskog statusa mjereni su količina vodikova peroksida i razina lipidne peroksidacije, dok su kao pokazatelji antioksidacijskog statusa mjerene aktivnosti različitih antioksidacijskih enzima (katalaza, superoksid-dismutaza, gvajakol-peroksidaza). Utjecaj Cd na pojavu oksidacijskog stresa kao značajnog mehanizma toksičnosti u biljkama, te na antioksidacijski obrambeni odgovor ovisio je o primijenjenoj koncentraciji Cd, tipu biljnog tkiva, te o kultivaru. Kultivar Lucija pokazao je najučinkovitiji antioksidacijski odgovor, te se time izdvojio kao najtolerantniji kultivar. Smanjena koncentracija klorofila u tri kultivara upućuje na veliku osjetljivost fotosintetskog aparata na Cd. Nove spoznaje o mehanizmima toksičnosti i detoksikacije daju bolji uvid u istraživanu problematiku, te razvijanje strategija za povećanje tolerancije na Cd.

**Ključne riječi:** kadmij, soja, oksidacijski stres, antioksidacijski enzimi, klorofil, karotenoidi

**Broj stranica:** 53

**Broj slika:** 15

**Broj tablica:** 2

**Broj literaturnih navoda:** 106

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Datum obrane:** 27. 9. 2019.

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

Dr. sc. Zorana Katanić, doc.

Dr. sc. Rosemary Vuković, doc.

Dr. sc. Selma Mlinarić, doc.

Dr. sc. Dubravka Špoljarić Maronić, 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**

**Josip Juraj Strossmayer University 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 CADMIUM EFFECT ON OXIDATIVE AND  
ANTIOXIDATIVE STATUS IN THREE SOYBEAN CULTIVARS (*GLYCINE MAX*)**

**Milica Dugić**

**Thesis performed at:** Subdepartment of Biochemistry and Plant Ecophysiology, Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

**Supervisor:** Rosemary Vuković, PhD, Assistant Professor

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

**Short abstract:**

Cadmium (Cd) is a heavy metal toxic for plants and, in higher concentrations, lethal. Elevated Cd concentration in soil causes a change in physiological and biochemical processes in the plants, resulting in reduced crop growth and yield. Different plant species, but also different cultivars of the same species show different levels of Cd accumulation in plant tissue. The aim of this study was to determine the effect of different Cd concentrations on the oxidative and antioxidative status in both, shoots and roots of three Croatian soybean cultivars (Korana, Lucija and Ika) that differ in levels of Cd accumulation in the grain. Hydrogen peroxide content and lipid peroxidation levels were measured as indicators of oxidative status, while activities of various antioxidant enzymes (catalase, superoxide dismutase, guaiacol peroxidase) were measured as indicators of antioxidative status. Cd influence on oxidative stress occurrence, as a significant mechanism of toxicity in plants, and on the antioxidative response depended on Cd concentration, type of plant tissue and cultivar. Cultivar Lucija showed the most effective antioxidant response and was pointed out as the most tolerant cultivar. Reduced chlorophyll concentration in all three cultivars indicates a high sensitivity of photosynthetic apparatus to Cd. New findings related to mechanisms of toxicity and detoxification give a better insight into the study issue, and developing strategies to increase Cd tolerance.

**Keywords:** cadmium, soybean, oxidative stress, antioxidant enzymes, chlorophyll, carotenoids

**Number of pages:** 53

**Number of figures:** 15

**Number of tables:** 2

**Number of references:** 106

**Original in:** Croatian

**Date of the thesis defence:** 27. 9. 2019.

**Reviewers:**

Zorana Katanić, PhD, Assist. Prof.

Rosemary Vuković, PhD, Assist. Prof.

Selma Mlinarić, PhD, Assist. Prof.

Dubravka Špoljarić Maronić, 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.

*Od srca se zahvaljujem mentorici, doc. dr. sc. Rosemary Vuković i komentorici doc. dr. sc. Ivni Štolfa Čamagajevac na stručnim savjetima, strpljenju, vodstvu te nesebičnoj pomoći tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Hvala mag. biol. Ani Vuković za pomoć u eksperimentalnom provođenju ovog rada, hvala na motivaciji, strpljenju i riječima podrške.*

*Veliko HVALA mojoj Josi – kolegici, prijateljici i najboljem laboratorijskom partneru kojeg sam mogla poželjeti. Hvala što si bila uz mene od prvog dana studentskog života i što si znatno doprinijela eksperimentalnom dijelu ovoga rada.*

*Posebne zahvale idu Nati i Marici za sve zajedničke trenutke provedene na nastavi, pauzama i svim druženjima izvan zidova fakulteta. Hvala vam na podršci, osmjesima, bilješkama s predavanja i najvažnije od svega – što ste studentske dane učinile nezaboravnima!*

*Neizmjerne sam zahvalna svojim roditeljima i bratu na razumijevanju, ljubavi i pomoći. Hvala što ste uvijek uz mene i što ste mi bili najveća podrška tijekom cijelog obrazovanja.*

*Također se zahvaljujem svim ostalim kolegama, prijateljima i članovima obitelji koji su na bilo koji način doprinijeli mom uspješnom završetku studija.*

## Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Kadmij u tlu .....	1
1.2. Unos, transport i metabolizam kadmija u biljkama .....	1
1.3. Oksidacijski stres u biljkama .....	3
1.3.1. Lipidna peroksidacija - pokazatelj oksidacijskog stresa .....	5
1.3.2. Antioksidacijski enzimi .....	6
1.3.3. Oksidacijski stres i biljni pigmenti .....	8
1.4. Kadmij u ljudskom organizmu .....	9
1.5. Cilj diplomskog rada.....	11
2. MATERIJALI I METODE.....	13
2.1. Biljni materijal .....	13
2.2. Sterilizacija sjemena i naklijavanje soje .....	13
2.3. Postavljanje hidroponskog uzgoja i eksperimenta.....	14
2.4. Određivanje količine vodikovog peroksida .....	16
2.5. Određivanje razine lipidne peroksidacije .....	16
2.6. Priprema proteinskih ekstrakata.....	17
2.7. Mjerenje aktivnosti enzima katalaze.....	17
2.8. Mjerenje aktivnosti enzima gvajakol-peroksidaze.....	17
2.9. Mjerenje aktivnosti enzima superoksid-dismutaze.....	18
2.10. Određivanje koncentracije proteina .....	18
2.11. Određivanje koncentracije pigmenata .....	18
2.12. Statistička obrada podataka .....	19
3. REZULTATI .....	20
3.1. Utjecaj kadmija na količinu H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> u izdanku i korijenu tri kultivara soje .....	20
3.2. Utjecaj kadmija na količinu TBARS-a u izdanku i korijenu tri kultivara soje.....	21
3.3. Utjecaj kadmija na aktivnost superoksid-dismutaze u izdanku i korijenu tri kultivara soje .....	23
3.4. Utjecaj kadmija na aktivnost katalaze u izdanku i korijenu tri kultivara soje .....	24
3.5. Utjecaj kadmija na aktivnost gvajakol-peroksidaza u izdanku i korijenu tri kultivara soje .....	26
3.6. Utjecaj kadmija na koncentraciju klorofila u tri kultivara soje.....	27
3.7. Utjecaj kadmija na koncentraciju karotenoida u tri kultivara soje .....	29
3.8. Sažetak rezultata .....	31
4. RASPRAVA.....	34
5. ZAKLJUČAK.....	42
6. LITERATURA .....	43

# 1. UVOD

## 1.1. Kadmij u tlu

Kadmij (Cd) je teški metal koji u tlo dospijeva iz prirodnih izvora ili antropogenim utjecajem. Prirodni izvori Cd uglavnom se odnose na vulkanske erupcije, fizičko i kemijsko trošenje matičnih stijena i spaljivanje vegetacije. No, temeljeno na dosadašnjim istraživanjima može se tvrditi da su prirodni izvori Cd u biosferi zasjenjeni antropogenim utjecajem, s obzirom da je u posljednjih ~130 godina industrijalizacija znatno doprinijela akumulaciji Cd u tlu (Cullen i Maldonado 2013). Na mobilizaciju Cd u biosferi indirektno utječe rudarstvo, izgaranje fosilnih goriva i spaljivanje otpada, a direktno proizvodnja, uporaba i odlaganje proizvoda koji sadrže Cd (Andresen i Küpper 2013; Cullen i Maldonado 2013). Prema Andresen i Küpperu (2013) antropogenim utjecajem smatra se primjena mineralnih gnojiva često bogatih Cd, promet automobila (Cd se oslobađa iz automobilskih guma) te prema Liu i sur. (2014) primjena herbicida i pesticida. Cd se u atmosferi javlja uglavnom u obliku aerosola i malih čestica (promjera ~ 1 µm) koje se lako mogu raspršiti vjetrom i na kraju se istaložiti. S obzirom da se materijal obogaćen Cd može raspršiti tisućama kilometara kroz atmosferu, ovaj teški metal može zagađivati čak i udaljene i inače netaknute sredine. Osim vjetra, na unos Cd u tlo utječu i oborine (kiša i snijeg) koje Cd iz atmosfere u vodenim kapljicama donose do tla (Cullen i Maldonado 2013). Prema navedenom, jasno je da je zagađenje teškim metalima jedna je od najtežih ekoloških prijetnji u sadašnjoj eri koja neizbježno raste (Liu i sur. 2014), ali i izaziva veliku zabrinutost s obzirom da su teški metali trajni toksični zagađivači koji nisu biorazgradivi (Wu i sur. 2010). Povišena koncentracija Cd u tlu uzrokuje promjenu u fiziološkim i biokemijskim procesima biljaka što za posljedicu ima smanjeni rast i prinos usjeva. Osim toga, uzgojem poljoprivrednih kultura na kontaminiranom tlu, Cd se često akumulira u jestivim dijelovima biljke te na taj način ulazi u hranidbeni lanac uzrokujući brojna patološka stanja konzumenata. Zbog toga su provedene brojne studije u kojima su različite biljne vrste (npr. pšenica, ječam, salata, pamuk) i kultivari iste vrste pokazali različite rezultate s obzirom na stupanj osjetljivosti, tolerancije i hiperakumulacije teških metala (Anjum i sur. 2015).

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

Cd je teški metal, neesencijalan za biljke, toksičan, a u većim koncentracijama i letalan s obzirom na to da se vrlo lako apsorbira iz tla korijenskim sustavom te preko ksilema dospijeva u listove biljke (Pérez-Chaca i sur. 2014). Osim iz tla, biljke Cd mogu apsorbirati

i iz vode te ga akumulirati u korijenu i izdanku (Andresen i Küpper 2013). Apsorpcija Cd u biljkama varira od vrste do vrste, ali i unutar različitih kultivara iste vrste (Arao i sur. 2003). Također, prema nekoliko izvora (Liu i sur. 2015; Naidu i sur. 1994; Eriksson 1990) unos Cd u biljku znatno ovisi o pH tla na kojem biljka raste, a što je pH niži to je stopa apsorpcije Cd viša (Wu i Zhang 2002). Prema Mullins i sur. (1986) unos Cd u biljke ovisi o njegovoj koncentraciji u tlu (veća koncentracija-veći stupanj apsorpcije), veličini korijena i karakteristikama korijena koje utječu na apsorpciju. Nakon unosa ovog metala u biljku posljedice su različite. Cd može uzrokovati inhibiciju rasta biljke što je posljedica smanjene učinkovitosti apsorpcije vode, makronutrijenata (N, P, K, Ca, Mg) i mikronutrijenata (Fe, Zn, Cu, Mn). Također, Cd uzrokuje oksidacijski stres, genotoksičnost, inhibiciju metabolizma korijena te smanjuje prinos usjeva (Pérez-Chaca i sur. 2014; Andresen i Küpper 2013; Benavides i sur. 2005; Dražić i sur. 2004). U istraživanjima je zabilježeno da Cd interferira i s biosintezom klorofila, inhibira fotosintetski aparat i enzime fotosintetskog Calvinovog ciklusa što dovodi do promjene u stopi fotosinteze (Pérez-Chaca i sur. 2014; Ferreira i sur. 2002). Mogući mehanizam nastanka ovih poremećaja je zamjena esencijalnih kofaktora, kao što su Zn, Fe i Mn s neesencijalnim metalima u mnogim enzimima (Felici i sur. 2014).

Kao što je već navedeno, biljke Cd apsorbiraju korijenskim sustavom no, specifični transporter namijenjeni isključivo za Cd nisu pronađeni. Smatra se da Cd dospjeva u korijen putem transportera sa sličnim afinitetom za Zn i Cd te preko  $\text{Ca}^{2+}$ -kanala što može dovesti do kompeticije iona Ca i Cd za transportne kanale (Andresen i Küpper 2013). Osim Ca, apsorpciju Cd u korijen i prijenos iz korijena u izdanak mogu smanjiti ili inhibirati kationi kao što su  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$  što upućuje na slične procese apsorpcije i transporta (Khan i sur. 2017; Cataldo i sur. 1983). Kod kopnenih biljaka korijen je najvažniji organ za unos svih metala, uključujući i Cd. Nakon što se nespecifično vežu za stanični zid, metalni ioni se aktivno transportiraju preko plazma membrane i dospjevaju u korijen. Zbog toga je korijenski sustav prvi izložen negativnom utjecaju Cd, a oštećenjem i narušavanjem metabolizma korijenskog sustava Cd negativno djeluje i na metabolizam ostatka biljke (Andresen i Küpper 2013), a samim time i na morfologiju biljke (Khan i sur. 2017). Iz tog razloga učinci Cd na izdanak kopnenih biljaka mogu biti posljedica oštećenja korijena, što je važno imati na umu prilikom istraživanja (Andresen i Küpper 2013). No, jednom kada Cd dospje u biljku, hranidbenim lancem se prenosi u druge organizme što za krajnju posljedicu



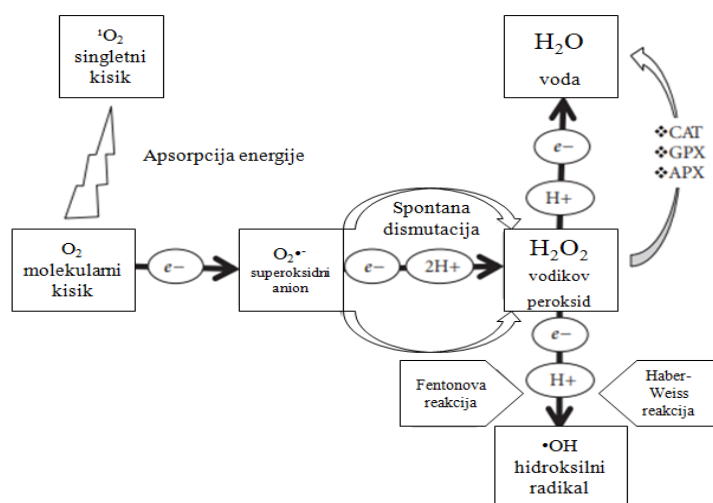
ima opasnost za ljudsko zdravlje, a to je i glavni motiv za sve veći broj istraživanja ovog teškog metala (Pérez-Chaca i sur. 2014).

### 1.3. Oksidacijski stres u biljkama

Evolucija aerobnih metaboličkih procesa kao što su disanje i fotosinteza neizbježno je dovela do stvaranja reaktivnih kisikovih tvari (ROS, od engl. *Reactive Oxygen Species*) u mitohondrijima, kloroplastima i peroksisomima (Apel i Hirt 2004). Kao posljedica prekomjerne proizvodnje i nakupljanja ROS-a razvija se oksidacijski stres u biljkama (Demidchik 2015). Tako je oksidacijski stres induciran reaktivnim tvarima kao što su singletni kisik ( $^1\text{O}_2$ ), hidroksilni radikal ( $^{\bullet}\text{OH}$ ), vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), superoksidni radikal ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), dušikov oksid (NO) i dr. Budući da su ROS nusprodukti različitih metaboličkih procesa, njihovo je stvaranje u stanicama neizbježno. ROS u malim koncentracijama imaju ulogu signalnih molekula u biljkama (Apel i Hirt 2004), te je u normalnim uvjetima (bez stresa) produkcija ROS-a pod kontrolom obrambenog antioksidacijskog sustava biljke. Međutim, u uvjetima stresa normalna funkcija transportnog lanca elektrona je narušena što za posljedicu ima preveliku produkciju ROS-a koji uzrokuju oksidacijsko oštećenje proteina, nukleinskih kiselina, pigmentata i lipida pri čemu dolazi do lipidne peroksidacije (LPO), oštećenja membrana i inaktivacije enzima (Lin i sur. 2011). ROS su produkti djelomične redukcije molekularnog kisika ( $\text{O}_2$ ).  $\text{O}_2$  se obično reducira putem četveroelektronskog mehanizma preko mitohondrijskog transportnog lanca elektrona što rezultira stvaranjem vode. Dodavanjem jednog elektrona  $\text{O}_2$  nastaje  $\text{O}_2^{\bullet-}$  koji se dalje reducira u  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a zatim u  $^{\bullet}\text{OH}$  i hidroksilni anion.  $^{\bullet}\text{OH}$  nastaje Haber-Weiss reakcijom iz  $\text{H}_2\text{O}_2$  i  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Sharma i sur. 2012). Lanac je završen formiranjem vode nakon dodavanja elektrona i protona  $^{\bullet}\text{OH}$  (Slika 1). Slobodni radikali su atomi, molekule ili ioni s nesparenim elektronima koji su obično visoko reaktivni i sudjeluju u kemijskim reakcijama. Iako  $\text{H}_2\text{O}_2$  nije radikal, on pripada ROS-u jer ima veću aktivnost od  $\text{O}_2$  (Lushchak 2011).  $\text{H}_2\text{O}_2$  je relativno stabilna molekula u usporedbi s  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $^{\bullet}\text{OH}$  i  $^1\text{O}_2$  (Demidchik 2015), a Fentonovom reakcijom uz prisutnost nekog dvovalentnog iona (npr.  $\text{Fe}^{2+}$ )  $\text{H}_2\text{O}_2$  tvori najreaktivniji  $^{\bullet}\text{OH}$  (Blokhina i sur. 2003). Ove citotoksične osobine ROS-a objašnjavaju evoluciju složenih enzimskih i neenzimskih mehanizama detoksikacije u biljkama (Apel i Hirt 2004).

Poznato je da postoji niz abiotičkih čimbenika uključujući sušu, salinitet, ekstremne temperature, UV zračenje, nedostatak hranjivih tvari, onečišćujuće tvari u zraku i tlu koje uzrokuju molekularno oštećenje biljaka izravno ili neizravno stvaranjem ROS-a (Shah i sur. 2001). Osim same koncentracije ROS-a u stanicama ili tkivima, mjerljivi pokazatelji

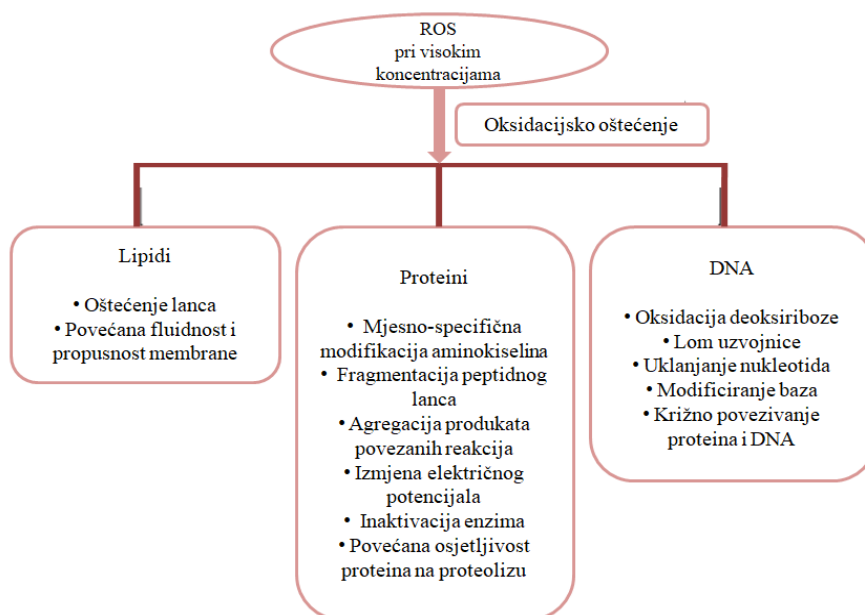
oksidacijskog stresa u istraživanjima su i posljedice djelovanja ROS-a kao što je LPO, kao i aktivnosti antioksidacijskih enzima. Tako npr. u biljnom tkivu izloženom Cd dolazi do povećanja produkcije ROS-a što rezultira povećanom aktivnošću pojedinih detoksikacijskih enzima, a uočava se i LPO i razgradnja klorofila (Fornazier i sur. 2002). Nastali  $\text{H}_2\text{O}_2$  metabolizira se peroksidazama u staničnom zidu ili katalazom (CAT) u peroksisomima i glioksisomima (Polidoros i Scandalios 1999; Azevedo i sur. 1998), dok se  $\text{O}_2^{\cdot-}$  u kloroplastu pretvara u  $\text{H}_2\text{O}_2$  enzimom superoksid-dismutazom (SOD; Fornazier i sur. 2002). Osim SOD-a i CAT, za detoksikaciju ROS-a u biljnom tkivu važan je i enzim gvajakol-peroksidaza (GPOD; Sharma i sur. 2012) koja unutar stanice regulira koncentraciju  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Tayefi-Nasrabdi i sur. 2010). Ovaj „enzim stresa“ oksidira aromatske elektron donore kao što su gvajakol i pirogalol uz trošak  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Sharma i sur. 2012), a u odnosu na CAT, GPOD imaju važniju ulogu u uklanjanju  $\text{H}_2\text{O}_2$  zahvaljujući većem afinitetu za ovu molekulu (Gill i Tuteja 2010).



**Slika 1.** Shematski prikaz stvaranja reaktivnih kisikovih tvari (ROS) u biljkama. Aktivacija  $\text{O}_2$  događa se preko dva različita mehanizma. Postupna jednovalentna redukcija  $\text{O}_2$  dovodi do stvaranja  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  i  $\cdot\text{OH}$ , dok prijenos energije na  $\text{O}_2$  dovodi do formiranja  $^1\text{O}_2$ .  $\text{O}_2^{\cdot-}$  se spontano dismutira u  $\text{H}_2\text{O}_2$  neenzimski ili uz pomoć enzima superoksid-dismutaze (SOD) koji katalizira reakciju dismutacije.  $\text{H}_2\text{O}_2$  se pretvara u vodu uz pomoć katalaze (CAT), glutation-peroksidaze (GPX) i askorbat-peroksidaze (APX). Preuzeto i prilagođeno prema Sharma i sur. (2012).

### 1.3.1. Lipidna peroksidacija - pokazatelj oksidacijskog stresa

Nakupljanje ROS-a može potaknuti neprekidan, lančani proces LPO i oštetiti nukleinske kiseline i proteine (Shah i sur. 2001). Prema Andresen i Küpperu (2013) ROS reaguju s lipidima, proteinima i nukleinskim kiselinama uzrokujući njihovu promjenu ili gubitak strukture i funkcije što vodi do procesa LPO, povećane propusnosti membrane, inaktivacije enzima, kidanja DNA i mutacija (Slika 2).



**Slika 2.** Reaktivne kisikove tvari (ROS) kao induktori oksidacijskog oštećenja lipida, proteina i DNA. Preuzeto i prilagođeno prema Sharma i sur. (2012).

Kada razina ROS-a dosegne najvišu dopuštenu razinu, pojačana LPO počinje se odvijati u staničnoj membrani te membranama organela što posljedično utječe na normalnu staničnu funkciju (Sharma i sur. 2012). Prema Smirnoffu (1995) polinezasićene masne kiseline (PUFA, od engl. *Polyunsaturated Fatty Acids*) su osnovne komponente membranskih lipida osjetljive na peroksidaciju. Inicijacijska faza LPO odnosi se na aktivaciju  $O_2$  te nastali  $O_2^{\cdot-}$  i  $\cdot OH$  reaguju s metilenskim skupinama PUFA-e formirajući konjugirane diene, lipidne peroksi radikale i hidroperokside (Smirnoff 1995). Hidroperoksilni radikal ( $HO_2^{\cdot}$ ) pretvara masne kiseline u toksične lipidne perokside na taj način uništavajući biološke membrane (Panda i sur. 2003). Tijekom LPO nastaju različiti aldehidi kao sekundarni produkti (malondialdehid- MDA, propanal, heksanal i 4-hidroksinonenal (4-HNE)), a oni predstavljaju biomarkere oksidacijskog stresa (Ayala i sur. 2014). Mjerenje razine MDA koristi se kao indeks LPO u stresnim uvjetima (Shah i sur.

2001). MDA je citotoksični produkt peroksidacije lipida, pokazatelj proizvodnje slobodnih radikala i posljedičnog oštećenja tkiva (Ohkawa i sur. 1979).

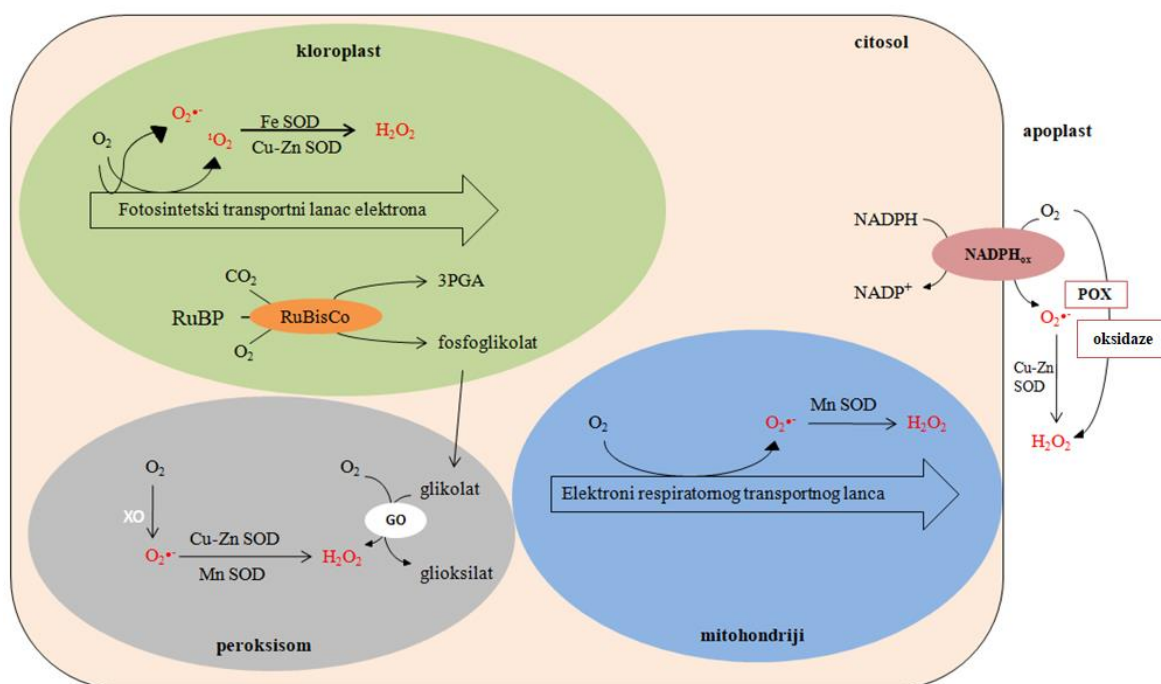
### 1.3.2. Antioksidacijski enzimi

U uvjetima bez stresa procesi stvaranja i uklanjanja ROS-a su u balansu, a balans može biti narušen različitim stresnim čimbenicima koji vode do akumulacije ROS-a i oksidacijskog stresa. Biljke sadrže nekoliko antioksidacijskih enzima sa svrhom uklanjanja prekomjerne količine ROS-a nastalih nakon stresnih reakcija. Neki od njih su SOD, CAT i GPOD (Andresen i Küpper 2013).

Unutar stanice SOD čini prvu liniju obrane protiv ROS-a (Gratão i sur. 2005; Alscher i sur. 2002). SOD dismutira  $O_2^{\cdot-}$  u  $H_2O_2$  i kisik (Zhang i sur. 2007; Shah i sur. 2001).  $O_2^{\cdot-}$  nastaje na svim lokacijama u kojima je prisutan transportni lanac elektrona uključujući mitohondrije, kloroplaste, mikrosome, glioksisome, peroksisome, apoplast i citosol pa nije čudno da se SOD može pronaći u svim tim subcelularnim prostorima (Alscher i sur. 2002; Slika 3). Prema nekoliko izvora (Alscher i sur. 2002; Fornazier i sur. 2002; del Rio i sur. 1998; Bowler i sur. 1992) tri su različita izooblika SOD-a prisutna u biljkama, a klasificirana su prema svom metalnom kofaktoru: MnSOD (lokaliziran u mitohondrijima i peroksisomima), FeSOD (vezan za kloroplaste) i Cu/ZnSOD (lokaliziran u citosolu, kloroplastima i peroksisomima; Slika 3). Odgovor SOD-a na prisutnost teških metala ovisi o vrsti biljke, tkivu, stadiju razvoja biljke, vrsti teškog metala i duljini izloženosti tom metalu. Tako je u nekim biljnim vrstama zabilježen je porast aktivnosti SOD-a nakon izlaganja Cd (Gratão i sur. 2005), kod nekih je zabilježen pad aktivnosti (León i sur. 2002; Schützendübel i Polle, 2002), dok kod nekih biljnih vrsta nije bilo zabilježenih promjena u aktivnosti ovog enzima (Ferreira i sur. 2002).

Unutarstanična razina  $H_2O_2$  regulirana je velikim brojem enzima od kojih se ističu CAT i POX (Blokina i sur. 2003). CAT je enzim koji metabolizira dvije molekule  $H_2O_2$ , oslobođene u peroksisomima nakon konverzije glikolata u glioksilat tijekom fotorespiracije, na  $O_2$  i vodu (Igamberdiev i Lea 2002) prema jednadžbi  $2H_2O_2 \leftrightarrow 2H_2O + O_2$  (Berg i sur. 2013). CAT također može razložiti  $H_2O_2$  formiran tijekom  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina u glioksisomima tkiva za skladištenje lipida (Gratão i sur. 2005). CAT ne zahtijeva redukcijsko sredstvo prilikom kataliziranja reakcije dismutacije, zbog čega se razlikuje od ostalih enzima (Mhamdi i sur. 2010). Ima visoku specifičnost za  $H_2O_2$  (Mhamdi i sur. 2010), a jedna molekula CAT može reducirati oko 6 milijuna molekula  $H_2O_2$  u  $H_2O$  i  $O_2$  u minuti

(Gill i Tuteja 2010). Isto kao i u slučaju SOD-a, aktivnost CAT varira u ovisnosti o teškom metalu (Gratão i sur. 2005). Tako je npr. tretman s Cd uzrokovao smanjenje aktivnosti CAT u graha (*Phaseolus vulgaris*), vodene leće (*Lemna minor*) i u paprike (*Capsicum annuum*). Povećanje aktivnosti CAT uslijed izlaganja Cd zabilježeno je u rotkvi (*Raphanus sativus*), pirici (*Agropyron repens*) i šećernoj trsci (*Saccharum* sp.; Gratão i sur. 2005), dok je aktivnost CAT u soje nakon izlaganja Cd ostala nepromijenjena (Ferreira i sur. 2002).



**Slika 3.** Glavna mjesta produkcije  $H_2O_2$  i lokacija pojedinih izooblika superoksid-dismutaze (SOD) u fotosintetskim stanicama. Glikolat-oksidadza (GO), 3-fosfoglicerat (3PGA), peroksidaze (POX), ribuloza 1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza (RuBisCO), ksantin-oksidadza (XO). Preuzeto i prilagođeno prema Alscher i sur. (2002) i Mhamdi i sur. (2010).

GPOD enzim je koji sudjeluje u nekoliko metaboličkih reakcija kao što su raspad indol-3-octene kiseline, biosinteza lignina i obrana od patogena koristeći  $H_2O_2$ . Različiti stresni uvjeti okoliša, uključujući različite onečišćujuće tvari kao što su teški metali, herbicidi, ozon i policiklički aromatski ugljikovodici induciraju aktivnost GPOD-a (Erofeeva 2015). Odgovor GPOD-a na stres uzrokovan teškim metalima ovisi o biljnoj vrsti i vrsti teškog metala. Tako je izlaganje Cd uzokovalo povećanje aktivnosti ovog enzima u uročnjaku (*Arabidopsis thaliana*) i kod krute vošćike (*Ceratophyllum demersum*), a smanjenje aktivnosti u grahu (*P. vulgaris*; Gratão i sur. 2005).

### 1.3.3. Oksidacijski stres i biljni pigmenti

Mineralni profil biljke (odnos mikroelemenata i makroelemenata) može biti povezan i s drugim markerima oksidacijskog stresa kao što je sadržaj klorofila ili propuštanje iona (Felici i sur. 2014). U uvjetima bez stresa elektroni protječu od pobuđenih centara fotosustava do  $\text{NADP}^+$  koji se reducira u NADPH. NADPH zatim ulazi u Calvinov ciklus i reducira krajnji akceptor elektrona ( $\text{CO}_2$ ). U slučaju preopterećenja transportnog lanca elektrona i uslijed smanjenja dostupnosti  $\text{NADP}^+$ , što je posljedica stresa, dolazi do curenja elektrona iz feredoksina. Elektroni dolaze u kontakt s  $\text{O}_2$  i nastaje  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , iz kojeg se dalje stvaraju agresivniji oblici ROS-a. Transportni lanac elektrona u PSI i PSII je glavni izvor ROS-a u kloroplastima, a kao što je ranije navedeno, nakupljanje prevelike količine ROS-a vodi biljku u oksidacijski stres (Sharma i sur. 2012). Proces fotosinteze je dakle vrlo osjetljiv u biljaka, a ovisi o koncentraciji i duljini izloženosti biljaka djelovanju Cd. Ukupna koncentracija klorofila ( $\text{tChl} = \text{Chl } a + \text{Chl } b$ ) je parametar koji pokazuje kakav je učinak oksidacijskog stresa na biosintezu klorofila pa je stoga važno zabilježiti promjene u koncentraciji tChl. Brojne studije pokazale su da smanjena stopa fotosintetskih procesa može biti posljedica degradacije klorofila (Bazzaz i sur. 1974) ili inhibicije biosinteze klorofila zbog oštećenja kloroplasta. Inhibicija biosinteze klorofila rezultat je inhibicije enzima protoklorofilid-reduktaze pod djelovanjem Cd, a posljedično se može javljati i kloroza (Slika 4; Felici i sur. 2014). Smanjenje stope fotosinteze također je rezultat fotokemijskih reakcija, kao i poremećene aktivnosti enzima uključenih u fiksiranje  $\text{CO}_2$  (Xue i sur. 2013). Teško je točno odrediti primarnu metu Cd u fotosintetskom aparatu no, Krupa i sur. (1993) smatraju da to može biti inhibicija transporta elektrona povratnom spregom ograničavanjem potrošnje ATP-a i NADPH zbog oštećenja mehanizma Calvinovog ciklusa. Kada se  $\text{H}_2\text{O}_2$  akumulira (u koncentracijama od  $10 \mu\text{M}$  ili više), enzimi Calvinovog ciklusa (fruktoza-1,6-bisfosfataza, sedoheptuloza-1,7-bisfosfataza i fosforibulokinaza) gube 50% svoje aktivnosti (Sharma i sur. 2012). Međutim, da bi se dobiveni rezultati mogli ispravno interpretirati, važno je u obzir uzeti razvojni stadij odnosu na koncentraciju u kontrolnim biljkama (Felici i sur. 2014).



**Slika 4.** List soje nakon tretmana kadmijem (fotografirala: Milica Dugić).

Karotenoidi (Car) pripadaju skupini lipofilnih antioksidansa (Sharma i sur. 2012) i esencijalne su komponente tilakoidne membrane. Mogu učinkovito gasiti pobuđeno tripletno stanje klorofila (Gratão i sur. 2005) te detoksicirati različite oblike ROS-a (Sharma i sur. 2012). U biljkama Car apsorbiraju svjetlost u području 400-550 nm vidljivog spektra i prenose apsorbiranu energiju na klorofil. Kao antioksidansi, Car uklanjaju  $^1\text{O}_2$  kako bi spriječili oksidacijsko oštećenje i gase pobuđene molekule klorofila kako bi prevenirali stvaranje  $^1\text{O}_2$  i zaštitili fotosintetski aparat (Sharma i sur. 2012). Prema Li i sur. (2008) Car također služe i kao prekursori signalnih molekula koje utječu na razvoj biljaka te na odgovor biljke na biotički i abiotički stres.

#### **1.4. Kadmij u ljudskom organizmu**

Cd je potencijalna prijetnja širokom rasponu biota prvenstveno zato što nije metabolički esencijalan. Osim toga, izuzetno je mobilan, toksičan je za ljude u koncentracijama nižim od koncentracija toksičnosti za biljke, a poznato je i da se Cd akumulira u ljudskom organizmu (McLaughlin i Singh 1999). Prema Bernardu (2008) jednom apsorbiran Cd nepovratno se nakuplja u ljudskom tijelu. Cd je primarno toksičan za bubrege, posebno za proksimalne tubule koji su glavno mjesto akumulacije. Cd također može uzrokovati demineralizaciju kostiju izravnim oštećenjem kosti ili indirektno kao rezultat disfunkcije bubrega. Osim u bubrezima, akumulacija je zabilježena u jetri i plućima. U industrijskoj proizvodnji prekomjerna izloženost zraku zagađenom Cd može ugroziti

funkciju pluća i povećati rizik od raka pluća. Cd može poremetiti organske sustave u dozama mnogo nižim u odnosu na većinu drugih toksičnih metala (Bernard 2008). No, zanimljivo je naglasiti da posteljica ne propušta Cd nego ga akumulira i predstavlja izuzetno učinkovitu barijeru za Cd i štiti fetus. Zbog toga se kod novorođenčadi koncentracija Cd u organizmu ne može izmjeriti (Varga i sur. 1993).

Najviše koncentracije Cd do sada pronađene u unutaršnjim organima sisavaca, a iznose od 10-100 ppm, uglavnom u bubrezima i jetri. Također Cd je pronađen i u nekim vrstama riba, dagnjama i kamenicama, posebice onim iz onečišćenih mora. Primarni izvori Cd kojima su ljudi izloženi uključuju hranu (biljnu i životinjsku) te pušenje duhana. Potrošnja osnovnih namirnica kao što su pšenica i riža značajno doprinosi izloženosti ljudi (Bernard 2008). U preglednom radu Grant i sur. (2008) navode da su, na temelju izmjerene koncentracije Cd u komercijalno uzgojenim kulturama, usjevi kao što su suncokret, ječam, zob, kukuruz, lan, riža i pšenica identificirani su kao akumulatori Cd, a često sadrže i više od 0.10 mg Cd/kg suhe tvari. Koncentracija Cd u kikirikiju, krumpiru i soji također može biti zabrinjavajuća (Grant i sur. 2008), budući da se iz soje se dobiva mast i ulje kojim se opskrbljuje  $\frac{1}{4}$  svjetskih potreba. Također iz soje se dobiva i  $\frac{2}{3}$  proteinima bogate stočne hrane te  $\frac{3}{4}$  obroka bogatih proteinima u svijetu (Slika 5; Hasanuzzaman i sur. 2016). Sve navedene kulture proizvedene su uglavnom u svrhu prehrambene industrije i samim time predstavljaju opasnost za zdravlje ljudi. Zbog toga se sve više prilikom uzgoja nastoji selektirati i uzgajati one kultivare s minimalnom stopom akumulacije Cd kako bi se smanjila ili izbjegla akumulacija Cd u ljudskom organizmu (Grant i sur. 2008). Osim odabira odgovarajućih kultivara, treba imati na umu i da potencijal prijenosa Cd iz tla preko hranidbenog lanca ovisi ne ovisi samo o stupnju akumulacije Cd u biljku i o procesima koji se odvijaju u biljkama, nego i o svojstvima samog tla te procesima u životinjskom i ljudskom organizmu. Svi ti procesi mogu utjecati na manji ili veći stupanj transporta Cd iz tla do čovjeka i na razinu akumulacije teškog metala u organizmu (McLaughlin i Singh 1999).





**Slika 5.** Raznolikost uporabe soje. Preuzeto i prilagođeno prema Hasanuzzaman i sur. (2016).

### 1.5. Cilj diplomskog rada

Kao jedan od najtoksičnijih teških metala u tlima, Cd predstavlja prijetnju za konzumaciju i uzgoj soje uzrokujući promjene u fiziološkim i biokemijskim procesima smanjujući rast i prinos ove značajne poljoprivredne kulture. Preliminarna istraživanja na hrvatskim kultivarima soje pokazala su razliku u akumulaciji Cd u sjemenu. Stoga je primarni cilj ovog istraživanja bio odrediti razlike u biokemijskim mehanizmima toksičnosti i tolerancije na stres uzrokovan Cd u tri hrvatska kultivara soje (Korana, Lucija i Ika), koji se razlikuju prema stupnju akumulacije Cd u zrnu. Cd uzrokuje prekomjerno stvaranje ROS-a u stanicama čije nakupljanje u konačnici može uzrokovati oksidacijski stres. Kako bi umanjile štetne učinke teških metala, odnosno oksidacijskog stresa, biljke koriste različite detoksikacijske mehanizme kao što je i antioksidacijski obrambeni mehanizam. Stoga su ciljevi ovog istraživanja bili:

- odrediti utjecaj različitih koncentracija Cd na oksidacijski stres i antioksidacijski odgovor u tri hrvatska kultivara soje (Korana, Lucija i Ika)
- utvrditi postoje li razlike u oksidacijskom statusu i antioksidacijskom odgovoru između tri kultivara soje, te na temelju dobivenih rezultata izdvojiti najotporniji kultivar soje
- utvrditi postoje li tkivno-specifične razlike u oksidacijskom i antioksidacijskom statusu korijena i izdanka tri istraživana kultivara soje

Kao pokazatelji oksidacijskog statusa mjereni su količina  $H_2O_2$  i razina LPO, dok su kao pokazatelji antioksidacijskog statusa mjerene aktivnosti različitih antioksidacijskih enzima (CAT, SOD, GPOD). Osim toga mjereno je i utjecaj stresa uzrokovanog Cd na koncentraciju biljnih pigmenata, odnosno na stopu fotosinteze.

## 2. MATERIJALI I METODE

### 2.1. Biljni materijal

U istraživanju je korišteno sjeme tri hrvatska kultivara soje (Korana, Lucija i Ika) izabrana na temelju preliminarnih istraživanja provedenih na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti u Osijeku. Preliminarna istraživanja pokazala su razliku kod ova tri kultivara u sposobnosti akumulacije Cd u zrnu soje, pri čemu je kultivar Korana pokazao najveću sposobnost akumulacije Cd dok je za kultivar Ika zabilježen najmanji akumulacijski potencijal za Cd u odnosu na druga dva kultivara.

### 2.2. Sterilizacija sjemena i naklijavanje soje

Za potrebe eksperimenta sjemenke soje su prvo očišćene od grubih nečistoća ispiranjem u dH<sub>2</sub>O nekoliko puta, nakon čega je uslijedila sterilizacija. Sterilizacija sjemena provedena je u 75%-tnom etanolu uz stalno miješanje tijekom 5 min. Sjemenke su zatim isprane dH<sub>2</sub>O te dodatno sterilizirane 10 min u 1%-tnoj otopini Izosana s dodatkom Tweena u konačnoj koncentraciji od 0.001%, uz neprestano miješanje. Nakon toga sjemenke su ponovno isprane u sterilnoj dH<sub>2</sub>O. Po završetku sterilizacije sjeme je zbog procesa bubrenja preko noći ostavljeno u sterilnoj dH<sub>2</sub>O u hladnjaku na +4°C. Idućeg dana, nakon bubrenja, sjemenke su postavljene na naklijavanje u plastične posude (dimenzije 10×20 cm, 40 sjemenki/posudi) sa sterilnim kvarcnim pijeskom koji je natopljen sa 100 mL hranjive otopine po Hoaglandu (<sup>1</sup>/<sub>4</sub> jakosti, pH 6; Tablica 1; Hoagland i Arnon 1950). Klijanje se provodilo 7 dana u tami na 23°C (Slika 6). Nakon klijanja, klijanci soje podjednake veličine postavljani su dalje na hidroponski uzgoj.



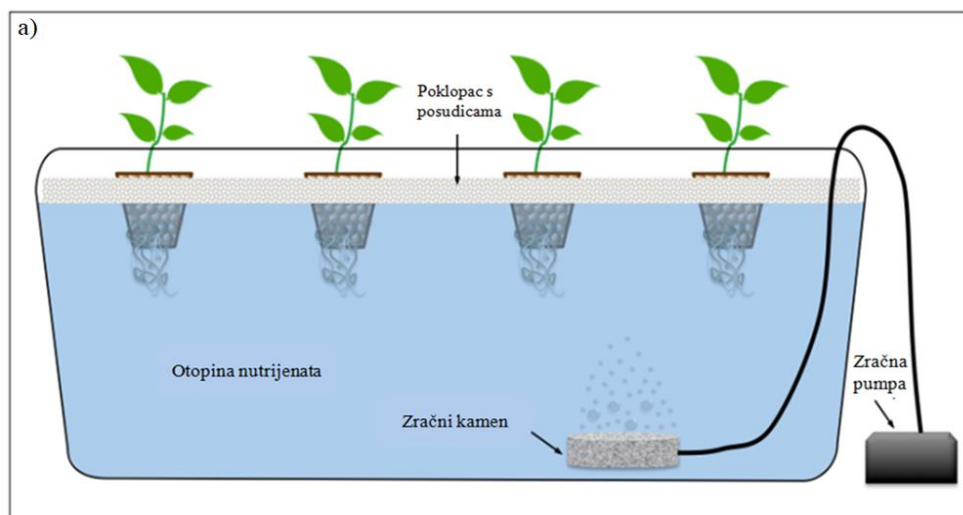
**Slika 6.** Klijanci soje naklijavani na kvarcnom pijesku natopljenim hranjivom otopinom po Hoaglandu, u klima-sobi 7 dana u tami na 23 °C (fotografirala Milica Dugić).

Tablica 1. Sastav hranjive otopine po Hoaglandu.

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

### 2.3. Postavljanje hidroponskog uzgoja i eksperimenta

Soja je uzgajana hidroponski u najjednostavnijem tipu sustava zvanom vodena kultura (Slika 7a). Hidroponski se sustav sastojao od plastičnih posuda (4 L) s poklopcem u koji su postavljene plastične čašice mrežaste strukture ( $\varnothing$  5 cm). Čašice za hidropon su punjene sterilnom ekspanziranom glinom kao supstratom u koji je postavljen po jedan klijanac soje (Slika 7b).



**Slika 7.** Hidroponski uzgoj soje: a) Shematski prikaz hidroponskog sustava – vodena kultura (preuzeto s Web1); b) Klijanci soje u hidroponskom sustavu (fotografirala: Milica Dugić).

Plastične su posude punjene hranjivom otopinom po Hoaglandu, ( $\frac{1}{3}$  jakosti, 3.5 L). U svakoj se posudi nalazio zračni kamen povezan sa zračnom pumpom, pri čemu je osigurano snabdjevanje korijena kisikom kao i miješanje hranjive otopine. Soja je u hidroponskom sustavu uzgajana u klima-sobi na 23°C, s fotoperiodom 16h dan/8h noć. Hranjiva je otopina tijekom hidroponskog uzgoja izmjenjivana svakih 7 dana, uz postupno povećanje jakosti korištene otopine. Dva tjedna nakon hidroponskog uzgoja, nakon što su dovoljno porasle, biljke su tretirane različitim koncentracijama Cd. Kontrolne biljke su tretirane vodom, dok su ostale biljke tretirane 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 $\mu\text{M}$ , 50 $\mu\text{M}$  i 100 $\mu\text{M}$ . Izlaganje biljaka Cd trajalo je 7 dana, nakon čega je provedeno uzorkovanje korijena i izdanka te priprema uzoraka za daljnje analize.

## 2.4. Određivanje količine vodikovog peroksida

Koncentracija  $H_2O_2$  u tkivu korijena i izdanka soje određena je metodom koju su opisali Mukherjee i Choudhuri (1983). Tkivo je usitnjavano u tekućem dušiku pomoću tarionika i tučka. Iz alikvota usitnjenog tkiva (0.2 g)  $H_2O_2$  je ekstrahirano na ledu 15 min u 1 mL hladnog acetona. Homogenat je zatim centrifugiran 5 min pri 6000 g na temperaturi  $+4^\circ C$ . Usporedno s probama rađena je i slijepa proba s 1 mL hladnog acetona, ali bez biljnog tkiva te su dalje sa slijepom probom provedeni identični postupci kao i s probama. Dobiveni supernatant pipetom je prebačen u drugu tubicu te mu je dodano 400  $\mu L$  otopine titanovog sulfata i 500  $\mu L$  koncentriranog amonijevog hidroksida ( $NH_4OH$ ) pri čemu nastaje kompleks titanovog peroksida. Reakcija nastanka ovog kompleksa je egzotermna reakcija pa je ovaj postupak proveden na ledu. Istaloženi kompleks titanovog peroksida je od matične otopine odvojen centrifugiranjem 10 min na 15 000 g pri temperaturi od  $+4^\circ C$ , te je nakon toga otapan u 1 mL 2M otopine  $H_2SO_4$  uz miješanje na vibracijskoj miješalici. Nakon otapanja taloga otopina je još jednom centrifugirana 10 min na 15 000 g i  $+4^\circ C$ . Apsorbancija dobivene otopine mjerena pri valnoj duljini od 415 nm. Koncentracija  $H_2O_2$  u korijenu i izdanku soje izračunata je iz standardne krivulje otopina poznate koncentracije  $H_2O_2$ , a izražena je u nmol po gramu svježe tvari (nmol/g<sub>svježe tvari</sub>).

## 2.5. Određivanje razine lipidne peroksidacije

Razina LPO određena je metodom koju su opisali Verma i Dubey (2003), mjerenjem količine reaktivnih supstanci tiobarbituratne kiseline (TBARS), uglavnom MDA. Tkivo korijena i izdanka usitnjeno je u tekućem dušiku pomoću tarionika i tučka te je alikvotu praha (0.2 g) dodan 1 mL 0.1%-tne otopine trikloroctene kiseline (TCA). Nakon 15 min ekstrakcije na ledu, homogenat je centrifugiran 5 min pri 6 000 g na temperaturi  $+4^\circ C$ . U 0.5 mL dobivenog supernatanta dodan je 1 mL otopine 0.5%-tne tiobarbituratne kiseline (TBA) u 20%-tnoj otopini TCA. Reakcijska smjesa je promiješana na vibracijskoj miješalici te inkubirana 30 min u vodenoj kupelji na  $+95^\circ C$ . Prilikom inkubacije dolazi do raspada lipidnih peroksida te nastaju produkti (uglavnom MDA) koji reagiraju s TBA. Reakcija je potom zaustavljena hlađenjem na ledu, a reakcijska je smjesa centrifugirana 10 min na 22 000 g pri temperaturi od  $+4^\circ C$ . Apsorbancija dobivenog supernatanta mjerena je pri valnim duljinama 532 nm i 600 nm. Apsorbancija pri 600 nm oduzima se od apsorbancije pri 532 nm zbog korekcije za nespecifičnu reakciju. Količina TBARS-a, odnosno MDA određena je pomoću jednadžbe pravca standardnog dijagrama, a kao standard korišten je 1,1,3,3-tetrametoksiopropan. Rezultati su izraženi u nmol po gramu svježe tvari (nmol/g<sub>svježe tvari</sub>).

## 2.6. Priprema proteinskih ekstrakata

Korijen i izdanak soje usitnjavani su u tekućem dušiku pomoću tarionika i tučka uz dodatak polivinil-polipirolidona. Usitnjenom tkivu (0.2 g) dodan je 1 mL hladnog ekstrakcijskog pufera (100 mM kalij-fosfatni pufer, pH 7, 1 mM EDTA). Nakon homogeniziranja miješanjem na vibracijskoj miješalici proteini su ekstrahirani stajanjem 10 min na ledu te centrifugiranjem 15 min pri 22 000 g na +4°C. Proteinski ekstrakt korijena je potom odvojen od taloga i pohranjen na -80 °C do daljnjih analiza, dok je talog izdanka, nakon odvajanja supernatanta, reekstrahiran dodatkom ekstrakcijskog pufera i centrifugiranjem. Dobivene proteinske ekstrakte izdanka bilo je potrebno pročititi gel filtracijskom kromatografijom pomoću PD-10 kolonica. Na ekvilibrirane kolone dodan je proteinski ekstrakt do odgovarajućeg volumena, te je zatim 3.5 mL proteinske frakcije skupljeno, alikvotirano i pohranjeno na -80°C do daljnjih analiza. Proteinski ekstrakti su korišteni za spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima i mjerenje koncentracije proteina.

## 2.7. Mjerenje aktivnosti enzima katalaze

Aktivnost CAT određena je metodom po Aebiju (1984). Reakcijska smjesa za mjerenje CAT sastojala se od 0.036%-tne otopine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u 50 mM kalij-fosfatnom puferu (pH 7). Aktivnost enzima mjerena je spektrofotometrijski u UV-kiveti, pri čemu je u 1450 µL reakcijske smjese dodano 50 µL proteinskog ekstrakta izdanka, odnosno korijena. Pad apsorbancije praćen je spektrofotometrijski pri valnoj duljini 240 nm svakih 10 sek tijekom 3 min. Specifična aktivnost enzima izražena je kao količina (µmol) razgrađenog H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u min po mg proteina, odnosno u jedinicama aktivnosti CAT po mg proteina (U/mg<sub>proteina</sub>; U = µmol/min<sub>proteina</sub>).

## 2.8. Mjerenje aktivnosti enzima gvajakol-peroksidaze

Aktivnost GPOD-a određena je metodom po Siegelu i Galstonu (1967) koja je modificirana i prilagođena za mjerenje u mikrotitarskim pločicama s 96 jažica. Reakcijska smjesa za mjerenje GPOD-a sastojala se od 18 mM gvajakola i 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u 50 mM kalij-fosfatnom puferu (pH 7). U mikrotitarsku pločicu s 190/195 µL reakcijske smjese dodan je proteinski ekstrakt (10 µL proteinskog ekstrakta izdanka, odnosno 5 µL razrijeđenog proteinskog ekstrakta korijena). Uzorci su mjereni u triplicatu. Porast apsorbancije mjeren je pri valnoj duljini 470 nm svakih 15 sek tijekom 2.5 min. Specifična aktivnost GPOD-a izražena je kao količina nastalog tetragvajakola u µmol po min po mg proteina

( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  proteina) koristeći ekstinkcijski koeficijent ( $\epsilon = 15.83 \text{ mM}/\text{cm}$ ), odnosno u jedinicama aktivnosti GPOD-a po mg proteina ( $U \text{ GPOD}/\text{mg}_{\text{proteina}}$ ;  $U = \mu\text{mol}/\text{min}$ ).

## 2.9. Mjerenje aktivnosti enzima superoksid-dismutaze

Aktivnost SOD-a u proteinskim ekstraktima određena je prema modificiranoj metodi Beauchampa i Fridovicha (1971). Aktivnost je mjerena kao stupanj inhibicije redukcije supstrata nitro plave tetrazolijeve soli (NBT) superoksidnim radikalom. Jedna jedinica SOD-a inhibira stopu redukcije NBT-a za 50% u povezanom sustavu pomoću ksantin-oksidadze (XOD) i ksantina. Reakcijska smjesa za kinetičko mjerenje aktivnosti SOD-a sastojala se 825  $\mu\text{L}$  75  $\mu\text{M}$  NBT-a otopljenog u 50 mM kalij-fosfatnom puferu (pH 7.8) s dodatkom 0.1 mM EDTA, 75  $\mu\text{L}$  10.8 mM otopine ksantina i 50  $\mu\text{L}$  proteinskog ekstrakta. Nakon 5 min ekvibracije, reakcija je pokrenuta dodatkom XOD-a u konačnoj koncentraciji 0.0025 U/mL. Porast apsorbancije praćen je spektrofotometrijski na valnoj duljini 560 nm svakih 30 sek tijekom 4 min. Aktivnost SOD je izračunata koristeći postotak inhibicije redukcije NBT-a, a izražena je u jedinicama aktivnosti SOD po mg proteina ( $U/\text{mg}_{\text{proteina}}$ ;  $U = \mu\text{mol}/\text{min}_{\text{proteina}}$ ).

## 2.10. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u tkivnim ekstraktima određena je metodom po Bradfordu (1976), koristeći albumin govedeg seruma kao standard. Razrijeđeni i nerazrijeđeni proteinski ekstrakti (5  $\mu\text{L}$ ) pipetirani su u mikrotitarsku pločicu (96 jažica) u triplikatu, nakon čega je dodano 250  $\mu\text{L}$  komercijalnog reagensa po Bradfordu (Sigma). Nakon 5 min inkubacije na sobnoj temperaturi, apsorbancija je mjerena pri 595 nm.

## 2.11. Određivanje koncentracije pigmenta

Tkivo je usitnjavano u tekućem dušiku pomoću tarionika i tučka, a nakon toga je oko 0.1 g usitnjenog tkiva alikvotirano i homogenizirano s 1 mL acetona, miješanjem na vibracijskoj miješalici. Homogenat je potom centrifugiran 15 min na 22 000 g, supernatant je odvojen i sakupljan u epruvetu, dok je talog reekstrahiran s 1 mL acetona i ponovno centrifugiran. Postupak reekstrakcije ponavljan je nekoliko puta, sve do obezbojenja taloga, a svakim je ponavljanjem postupka supernatant prikupljan i puliran s predhodno dobivenim supernatantom. U puliranom ekstraktu mjereni su pigmenti (klorifila *a* - Chl *a*, klorofil *b* – Chl *b* i Car) spektrofotometrijski na tri valne duljine: 470 nm, 645 nm i 662 nm.



## 2.12. Statistička obrada podataka

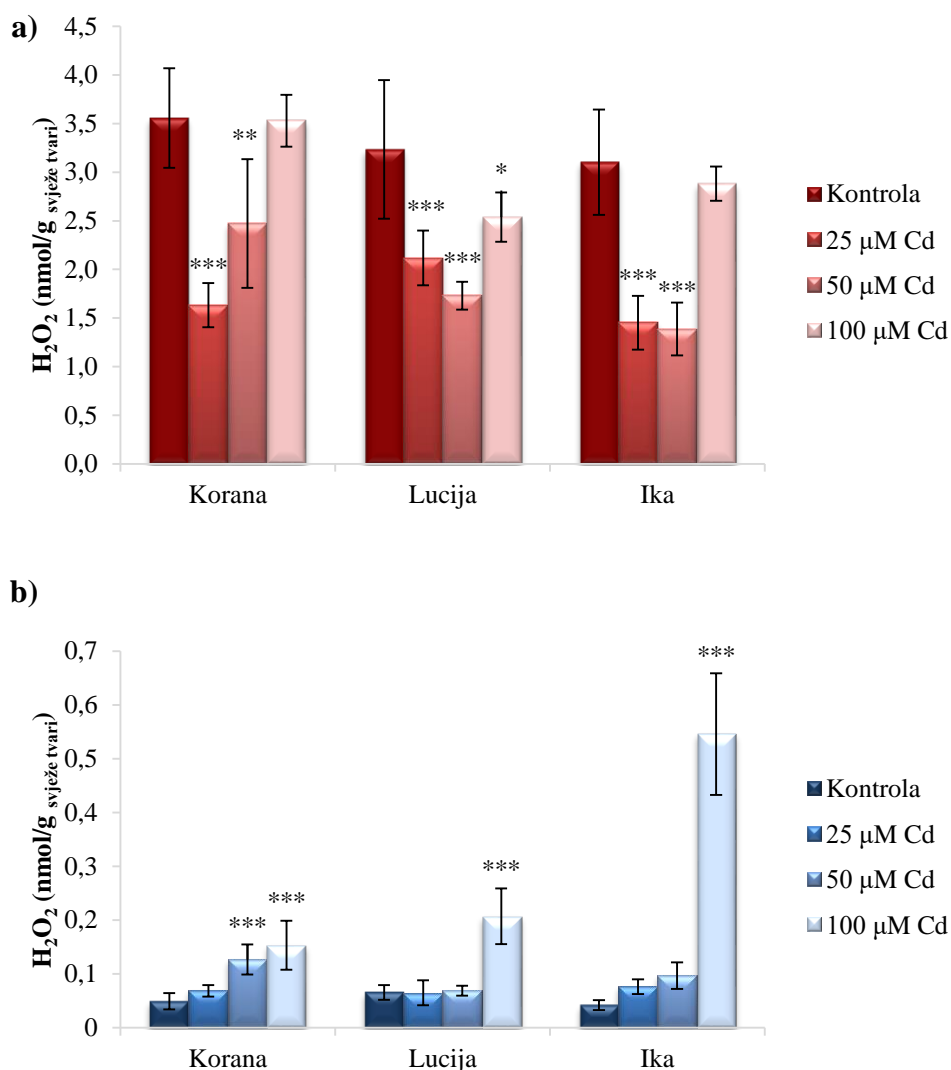
Dobiveni podaci obrađeni su u statističkom programu GraphPad Prism 5.03. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija (SD). Normalnost distribucije testirana je Shapiro-Wilksovim testom, a homogenost varijanci Levene testom. S obzirom na normalnu distribuciju i homogenost varijanci korištena je jednofaktorska analiza varijance (engl. *One-way ANOVA*), kako bi se utvrdilo postojanje razlika između različitih skupina unutar kultivara. Nakon što je utvrđeno postojanje razlika, proveden je Dunnett *post hoc* test kako bi se utvrdile statistički značajne razlike tretmana u odnosu na kontrolu. Svi testovi provedeni su na razini značajnosti od 5, 1 i 0.1% (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

### 3. REZULTATI

#### 3.1. Utjecaj kadmija na količinu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u izdanku i korijenu tri kultivara soje

U izdanku kultivara Korana i Ika tretmani s 25  $\mu\text{M}$  i 50  $\mu\text{M}$  Cd uzrokovali su statistički značajno smanjenje količine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dok su u kultivara Lucija svi tretmani Cd uzrokovali značajno smanjenje količine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u odnosu na kontrolu (Slika 8a). Količina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se u izdanku kultivara Korana, u odnosu na kontrolu, smanjila za 54% pri tretmanu s 25  $\mu\text{M}$  Cd i za 30% pri tretmanu s 50  $\mu\text{M}$  Cd. Tretman 100  $\mu\text{M}$  Cd također je uzrokovao blago smanjenje količine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ali to smanjenje nije bilo statistički značajno. Količina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se u izdanku kultivara Lucija, u odnosu na kontrolu, smanjila za 35% pri tretmanu s 25  $\mu\text{M}$  Cd, 47% pri tretmanu s 50  $\mu\text{M}$  Cd te za 22% pri tretmanu s 100  $\mu\text{M}$  Cd. U izdanku kultivara Ika, količina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se, u odnosu na kontrolu, smanjila za 53% kod tretmana s 25  $\mu\text{M}$  Cd te za 55% kod tretmana s 50  $\mu\text{M}$  Cd. Tretman sa 100  $\mu\text{M}$  Cd također je uzrokovao blago smanjenje količine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kod ovog kultivara, ali to smanjenje nije bilo statistički značajno.

Tretman najvećom koncentracijom Cd (100  $\mu\text{M}$ ) uzrokovao je statistički značajno povećanje količine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u korijenu sva tri kultivara u odnosu na kontrolu, dok je u kultivara Korana povećanje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uzrokovao i tretman 50  $\mu\text{M}$  Cd (Slika 8b). Tako se količina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u korijenu kultivara Korana, u odnosu na kontrolu, povećala redom za 159% kod tretmana s 50  $\mu\text{M}$  Cd te 213% kod tretmana s 100  $\mu\text{M}$  Cd. Tretmana 100  $\mu\text{M}$  Cd uzrokovao je povećanje količine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> za 218% u korijenu kultivara Lucija, te za 12 puta u odnosu na kontrolne biljke u korijenu kultivara Ika, što je i najveći porast količine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zabilježenu korijenu sva tri kultivara.



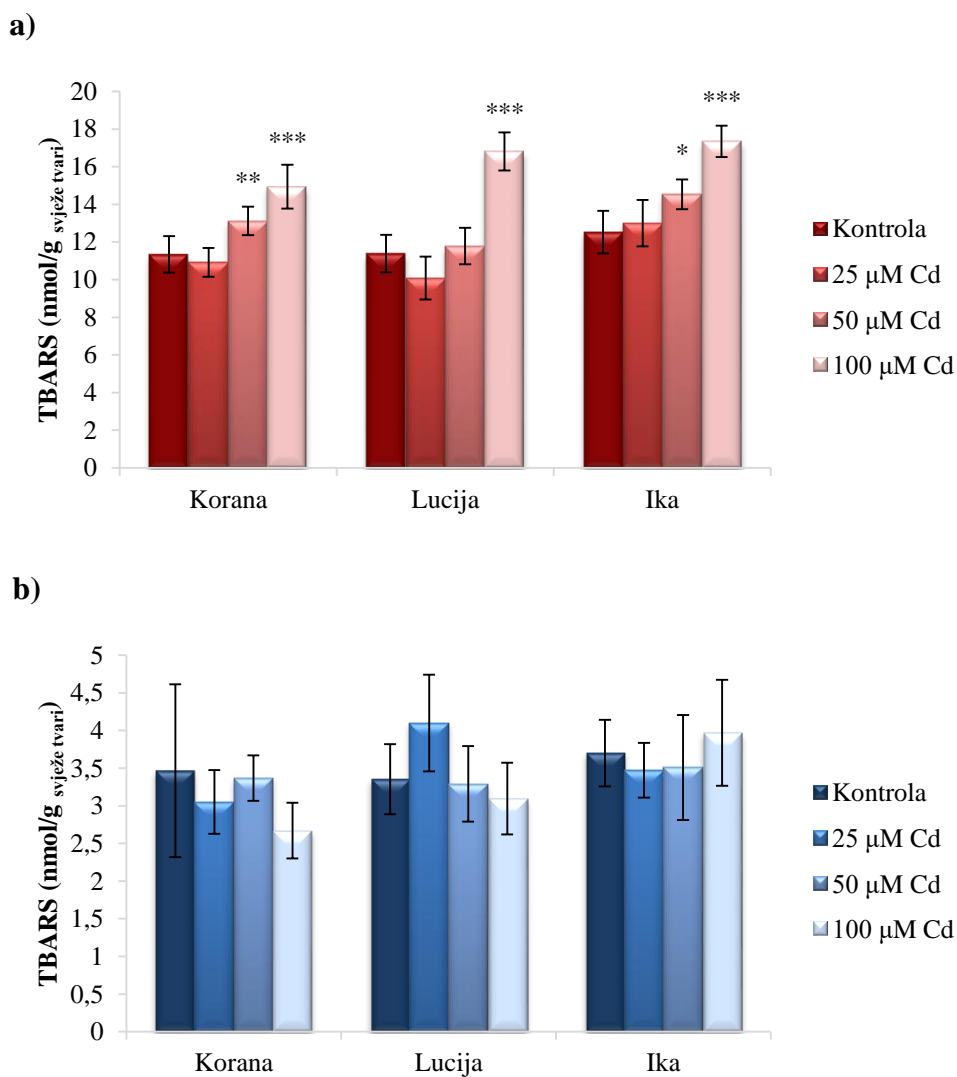
**Slika 8.** Količina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u izdanku (a) i korijenu (b) tri kultivara soje (Korana, Lucija, Ika) nakon tretmana s različitim koncentracijama Cd (25, 50 i 100 µM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su unutar kultivara *post hoc* testom Dunnett. Različit broj zvjezdica (\*) označava razinu statističke značajnosti tretiranih skupina u odnosu na kontrolu (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001).

### 3.2. Utjecaj kadmija na količinu TBARS-a u izdanku i korijenu tri kultivara soje

U izdanku soje, tretmani 50 µM i 100 µM Cd uzrokovali su statistički značajno povećanje količine TBARS-a u kultivarima Korana i Ika, dok je kod kultivara Lucija značajno povećanje TBARS-a uzrokovao samo tretman najvećom koncentracijom Cd (100 µM; Slika 9a). Količina TBARS-a se povećavala ovisno o primijenjenoj koncentraciji Cd, tako se u izdanku kultivara Korana, u odnosu na kontrolu, povećala za 16% pri tretmanu s 50 µM Cd te za 32% pri tretmanu sa 100 µM Cd. U kultivara Lucija tretman 100 µM Cd

uzrokovao je povećanje za 48% u odnosu na kontrolu. Tretmani 50  $\mu\text{M}$  i 100  $\mu\text{M}$  Cd u kultivara Ika uzrokovali su povećanje redom za 16% i 39% u odnosu na kontrolnu skupinu.

U korijenu tri istraživana kutivara soje, tretmani primijenjenim koncentracijama Cd (25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  i 100  $\mu\text{M}$ ) nisu statistički značajno utjecali na količinu TBARS-a, u odnosu na kontrolu (Slika 9b).

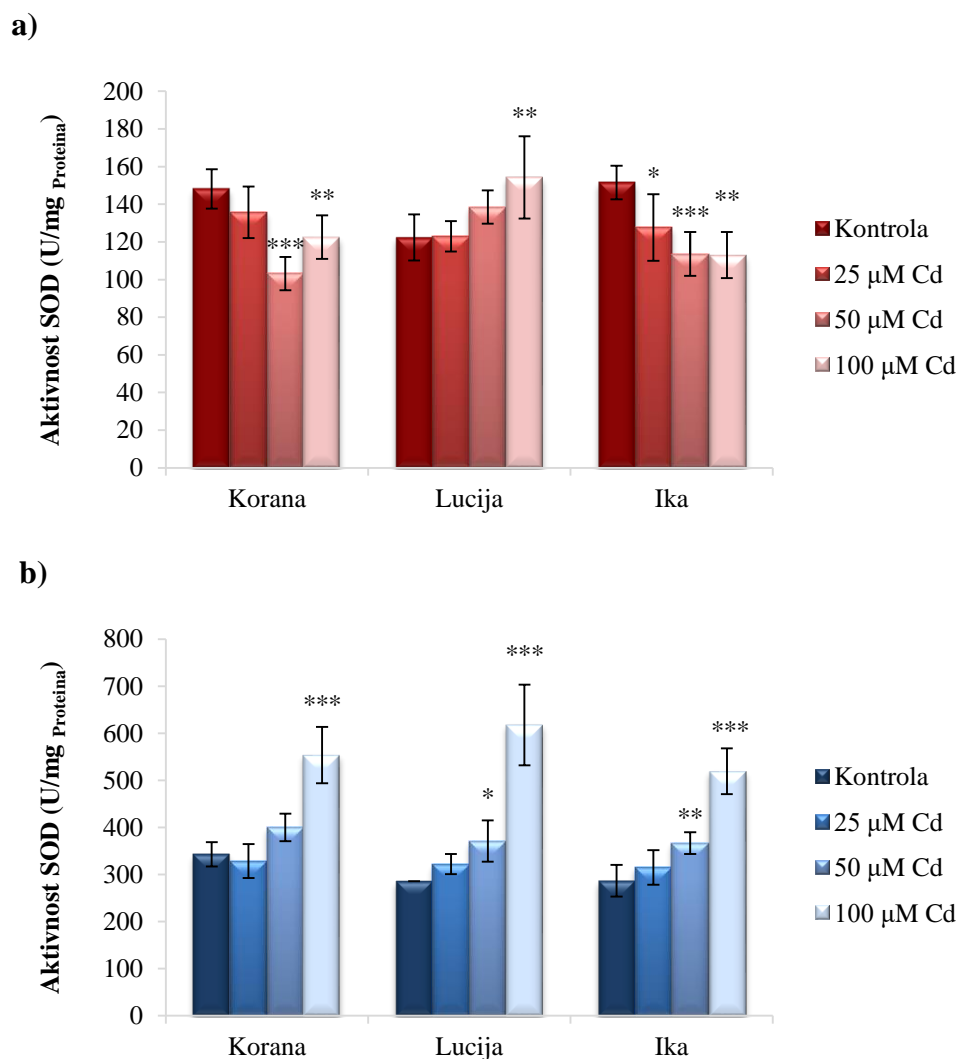


**Slika 9.** Količina TBARS-a u izdanku (a) i korijenu (b) tri kultivara soje (Korana, Lucija, Ika) nakon tretmana s različitim koncentracijama Cd (25, 50 i 100  $\mu\text{M}$ ). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su unutar kultivara *post hoc* testom Dunnett. Različiti broj zvjezdica (\*) označava razinu statističke značajnosti tretiranih skupina u odnosu na kontrolu (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

### **3.3. Utjecaj kadmija na aktivnost superoksid-dismutaze u izdanku i korijenu tri kultivara soje**

U izdanku kultivara Korana tretman 50  $\mu\text{M}$  i 100  $\mu\text{M}$  Cd uzrokovao je statistički značajno smanjenje aktivnosti SOD-a, koje je iznosilo 30% za tretman 50  $\mu\text{M}$  Cd i 17% za tretman 100  $\mu\text{M}$  Cd. U izdanku kultivara Ika svi tretmani Cd (25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  i 100  $\mu\text{M}$ ) su uzrokovali značajno smanjenje aktivnosti SOD-a ovisno o primijenjenoj koncentraciji Cd, redom za 16% (25  $\mu\text{M}$  Cd), 25% (50  $\mu\text{M}$  Cd) i 25% (100  $\mu\text{M}$  Cd). Za razliku od navedena dva kultivara, u kultivara Lucija došlo je do značajnog povećanja aktivnosti SOD-a uslijed tretmana s najvećom koncentracijom Cd (100  $\mu\text{M}$ ) za 26% u odnosu na kontrolu, dok ostali tretmani nisu uzrokovali značajnu razliku u aktivnosti SOD-a (Slika 10a).

U korijenu soje, tretmani 50  $\mu\text{M}$  i 100  $\mu\text{M}$  Cd uzrokovali su statistički značajno povećanje aktivnosti SOD-a u kultivarima Lucija i Ika, dok je u kultivara Korana značajno povećanje aktivnosti uzrokovao samo tretman najvećom koncentracijom Cd (100  $\mu\text{M}$ ; Slika 10b). U kultivara Korana tretman 100  $\mu\text{M}$  Cd uzrokovao je povećanje za 61% u odnosu na kontrolu. Aktivnost SOD-a se u izdanku kultivara Lucija, u odnosu na kontrolu, povećala ovisno o koncentraciji Cd, redom za 30% (50  $\mu\text{M}$  Cd) te za 116% (100  $\mu\text{M}$  Cd). Tretmani 50  $\mu\text{M}$  i 100  $\mu\text{M}$  Cd u kultivara Ika uzrokovali su povećanje redom za 28% i 79% u odnosu na kontrolnu skupinu.

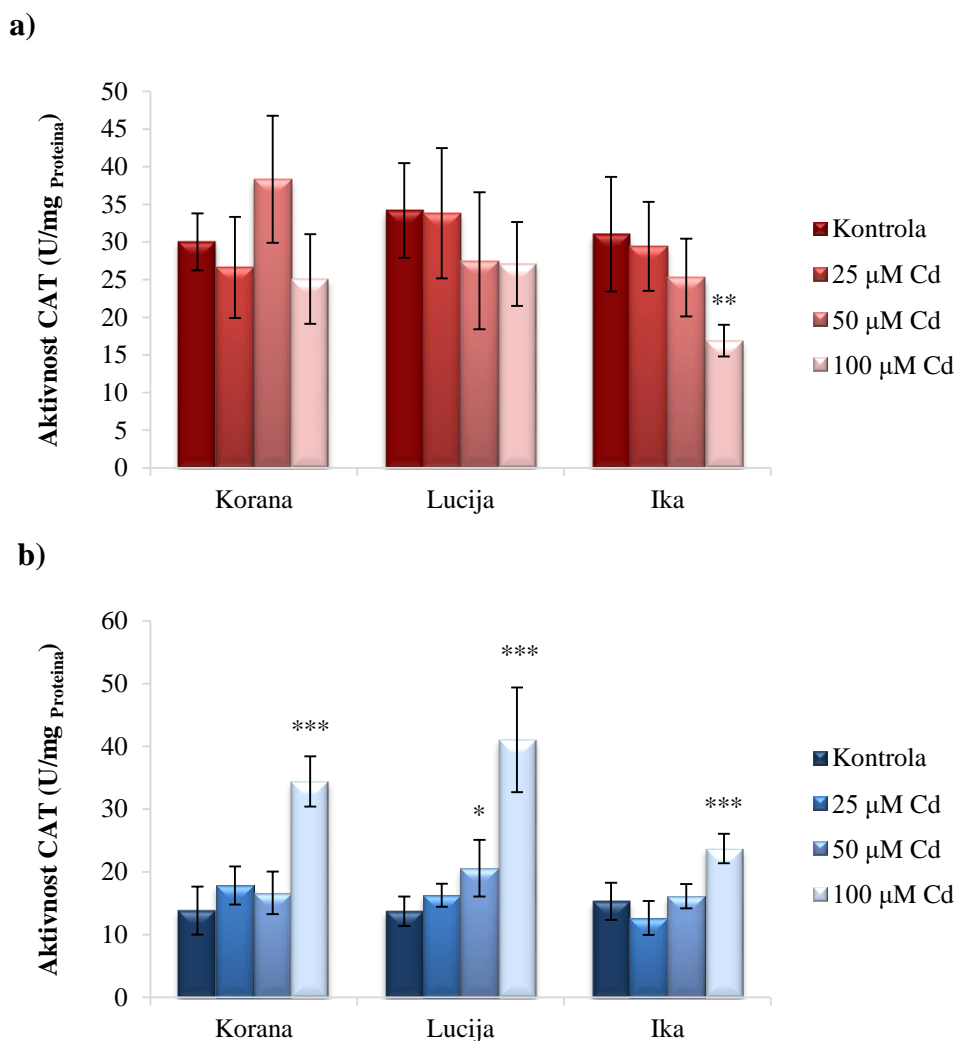


**Slika 10.** Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) u izdanku (a) i korijenu (b) tri kultivara soje (Korana, Lucija, Ika) nakon tretmana s različitim koncentracijama Cd (25, 50 i 100 µM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su unutar kultivara *post hoc* testom Dunnett. Različiti broj zvjezdica (\*) označava razinu statističke značajnosti tretiranih skupina u odnosu na kontrolu (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

### 3.4. Utjecaj kadmija na aktivnost katalaze u izdanku i korijenu tri kultivara soje

U izdanku kultivara Korana i Lucija tretman Cd nije uzrokovao značajne promjene u aktivnostima CAT u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je u kultivara Ika samo tretman najvećom koncentracijom Cd (100 µM) uzrokovao značajno smanjenje aktivnosti CAT za 46% u odnosu na kontrolu (Slika 11a).

U korijenu sva tri kultivara soje najveća je koncentracija Cd (100  $\mu$ M) uzrokovala statistički značajno povećanje aktivnosti CAT u odnosu na kontrolu, s tim da je u kultivara Lucija značajno povećanje zabilježeno i kod tretmana 50  $\mu$ M Cd (50%). Aktivnost CAT se nakon tretmana najvećom koncentracijom Cd povećala u Korani za 149%, u Luciji za 199% te u Iki za 55% (Slika 11b).



**Slika 11.** Aktivnost katalaze (CAT) u izdanku (a) i korijenu (b) tri kultivara soje (Korana, Lucija, Ika) nakon tretmana s različitim koncentracijama Cd (25, 50 i 100  $\mu$ M). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su unutar kultivara *post hoc* testom Dunnett. Različit broj zvjezdica (\*) označava razinu statističke značajnosti tretiranih skupina u odnosu na kontrolu (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

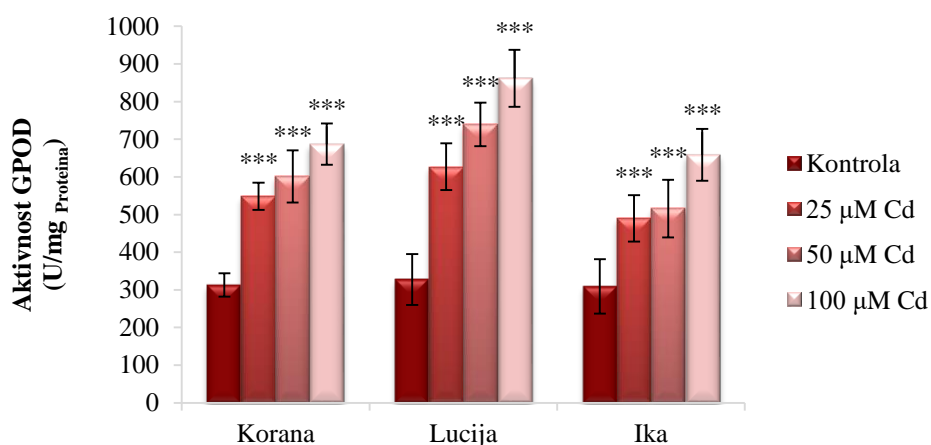
### **3.5. Utjecaj kadmija na aktivnost gvajakol-peroksidaza u izdanku i korijenu tri kultivara soje**

U izdanku sva tri istraživana kultivara soje, svi primijenjeni tretmani Cd uzrokovali su značajno povećanje aktivnosti GPOD-a. Aktivnosti enzima u izdanku kultivara se povećavala u ovisnosti o koncentraciji primijenjenog Cd (Slika 12a). Aktivnost GPOD-a se u izdanku kultivara Korana povećavala redom za 75% (25  $\mu\text{M}$  Cd), 92% (50  $\mu\text{M}$  Cd) te 120% (100  $\mu\text{M}$  Cd), u odnosu na kontrolu. Najveće povećanje aktivnosti GPOD-a prisutno je u kultivara Lucija, a iznosi redom 91% (25  $\mu\text{M}$  Cd), 125% (50  $\mu\text{M}$  Cd) te 163% (100  $\mu\text{M}$  Cd). Aktivnost GPOD-a se u izdanku kultivara Ika povećala redom za 58% pri tretmanu 25  $\mu\text{M}$  Cd, 67% pri tretmanu 50  $\mu\text{M}$  Cd, te 113% pri tretmanu 100  $\mu\text{M}$  Cd, u odnosu na kontrolu.

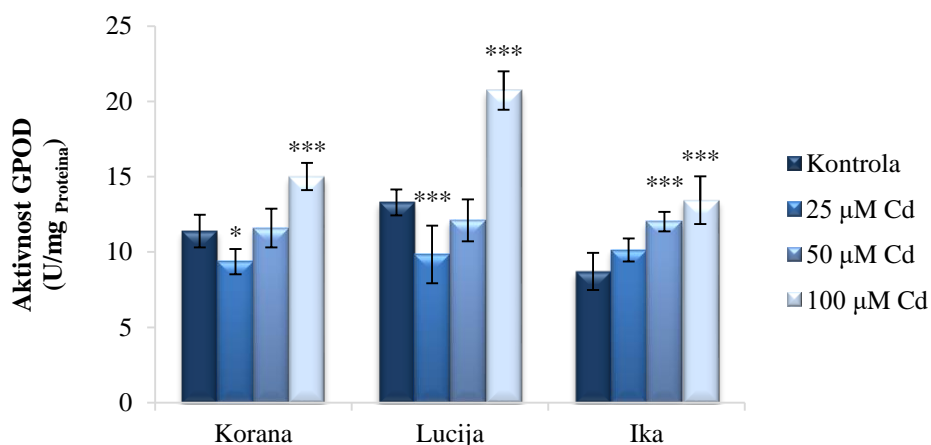
U korijenu kultivara Korana i Lucija uočen je sličan obrazac učinka različitih koncentracija Cd na aktivnosti GPOD-a, pri čemu je najmanja koncentracija Cd (25  $\mu\text{M}$ ) uzrokovala smanjenje aktivnosti ovog enzima, dok je najveća koncentracija (100  $\mu\text{M}$ ) uzrokovala značajno povećanje aktivnosti GPOD-a. U kultivara Ika značajno je povećanje uočeno kod primijene 50  $\mu\text{M}$  i 100  $\mu\text{M}$  Cd (Slika 12b). Aktivnost GPOD-a je u korijenu sva tri kultivara bila najveća pri najvećoj koncentraciji Cd, a povećanje je iznosilo 32% za kultivar Korana, 56% za kultivar Lucija te 54% za kultivar Ika. Tretman 25  $\mu\text{M}$  Cd uzrokovao je smanjenje aktivnosti, u odnosu na kontrolu, za 18% u Korane te za 26% u Lucije. U kultivara Ika tretmana 50  $\mu\text{M}$  Cd uzrokovao je povećanje aktivnosti za 38%, u odnosu na kontrolu.



a)



b)

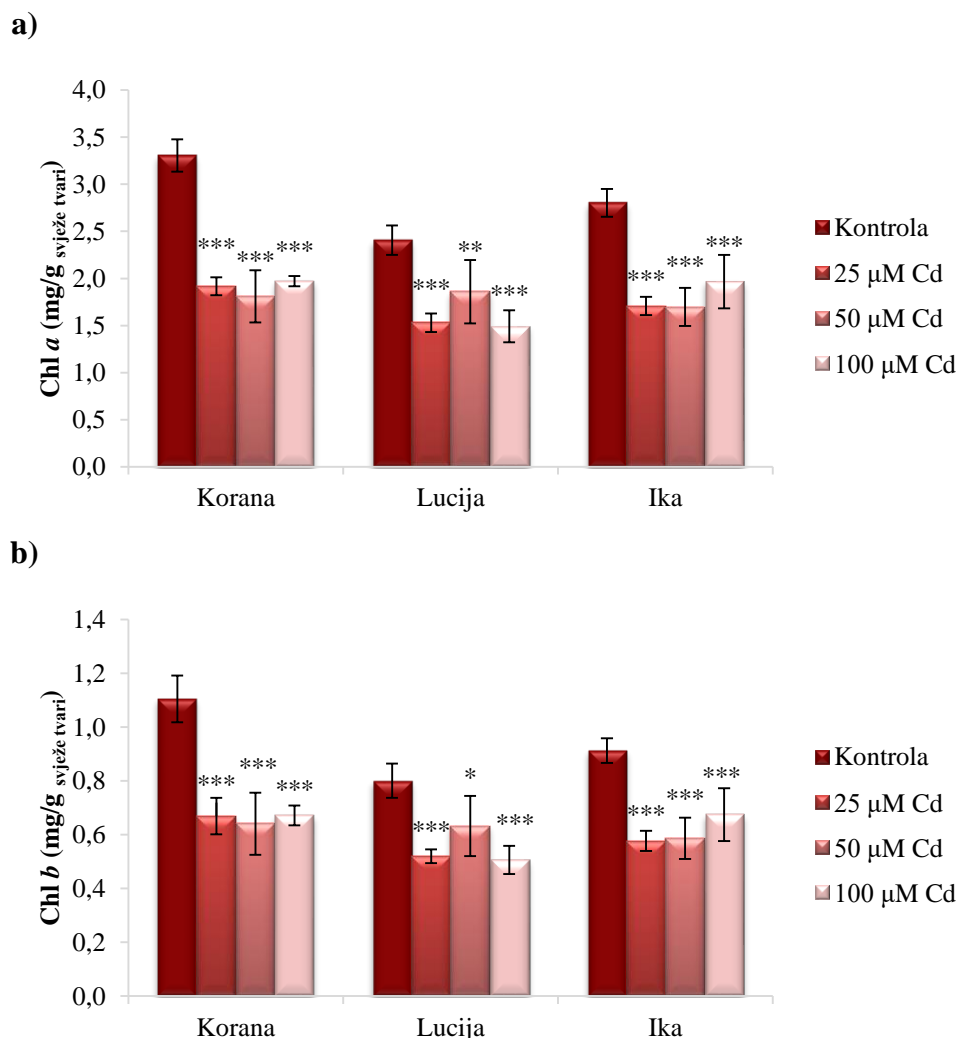


**Slika 12.** Aktivnost gvajakol-peroksidaza (GPOD) u izdanku (a) i korijenu (b) tri kultivara soje (Korana, Lucija, Ika) nakon tretmana s različitim koncentracijama Cd (25, 50 i 100 µM). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su unutar kultivara *post hoc* testom Dunnett. Različiti brojevi zvjezdica (\*) označavaju razinu statističke značajnosti tretiranih skupina u odnosu na kontrolu (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001).

### 3.6. Utjecaj kadmija na koncentraciju klorofila u tri kultivara soje

Koncentracije Chl *a* i Chl *b* značajno su se smanjile uslijed svih primijenjenih koncentracija Cd (Slika 13a i b). U sva tri kultivara smanjenje koncentracije Chl *a* nije ovisilo o primjenjenoj koncentraciji, te je u kultivara Korana zabilježeno smanjenje, u odnosu na kontrolu, u rasponu od 40% (100 µM Cd) do 45% (50 µM Cd), u kultivara Lucija od 23% (50 µM Cd) do 38% (100 µM Cd), te u kultivara Ika od 30% (100 µM Cd) do 39% (50 µM Cd). Jednako kao i u slučaju Chl *a*, smanjenje koncentracije Chl *b* u tri kultivara

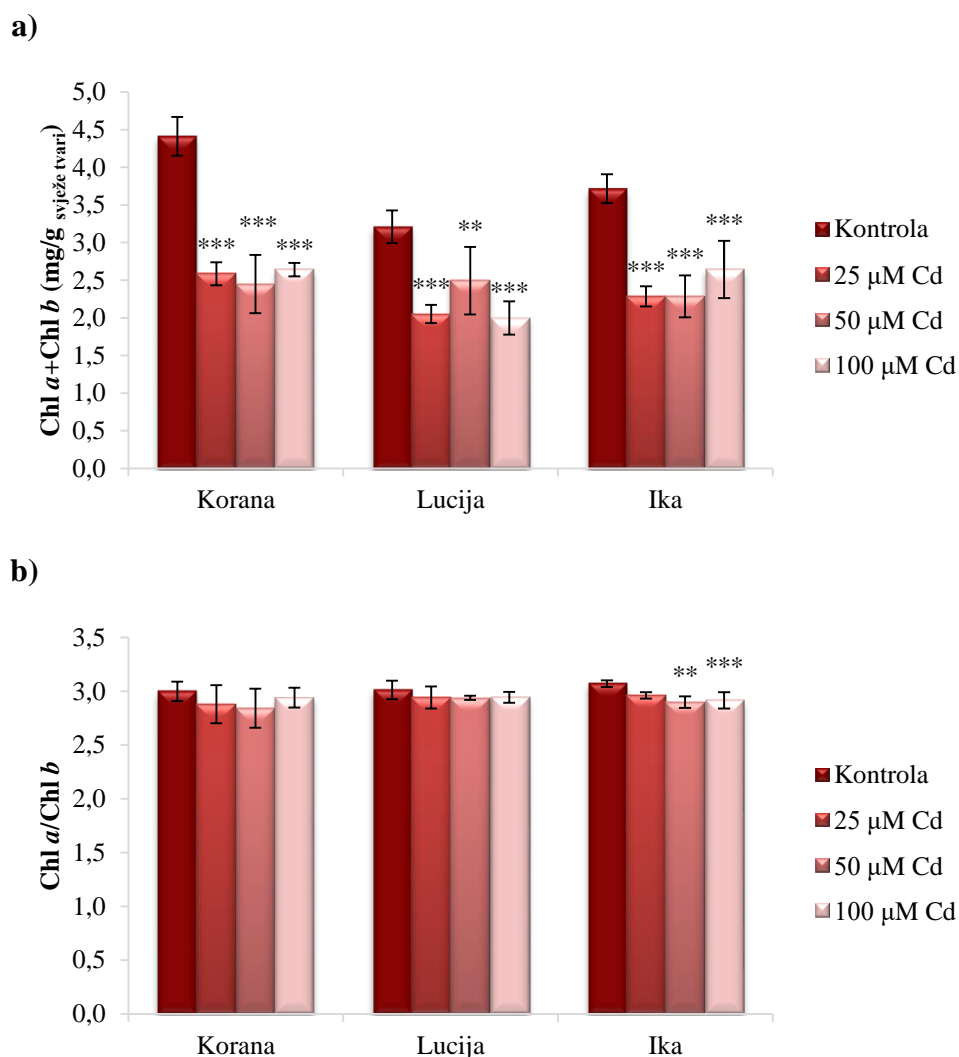
soje nije ovisilo o primjenjenoj koncentraciji te je u kultivara Korana zabilježeno smanjenje u rasponu od 39% (100  $\mu\text{M}$  Cd) do 42% (50  $\mu\text{M}$  Cd), u kultivara Lucija od 21% (50  $\mu\text{M}$  Cd) do 37% (100  $\mu\text{M}$  Cd) te u kultivara Ika od 26% (100  $\mu\text{M}$  Cd) do 37% (25  $\mu\text{M}$  Cd), u odnosu na kontrolnu skupinu.



**Slika 13.** Koncentracije (a) klorofila *a* (Chl *a*) i (b) klorofila *b* (Chl *b*) u tri kultivara soje (Korana, Lucija, Ika) nakon tretmana s različitim koncentracijama Cd (25, 50 i 100  $\mu\text{M}$ ). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su unutar kultivara *post hoc* testom Dunnett. Različiti broj zvjezdica (\*) označava razinu statističke značajnosti tretiranih skupina u odnosu na kontrolu (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

Najveće smanjenje koncentracije tChl, od 40% (100  $\mu\text{M}$  Cd) do 44% (50  $\mu\text{M}$  Cd), prisutno je u kultivara Korana, zatim slijedi kultivar Ika gdje je zabilježeno smanjenje od 29% (100  $\mu\text{M}$  Cd) do 39% (25  $\mu\text{M}$  Cd), dok je najmanje smanjenje prisutno u kultivara Lucija, u rasponu od 22% (50  $\mu\text{M}$  Cd) do 38% (100  $\mu\text{M}$  Cd), u odnosu na kontrolu (Slika

14a). Omjer koncentracije Chl *a* i Chl *b* (Chl *a*/Chl *b*) nije se značajno razlikovao u kultivara Korana i Lucija u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je u kultivara Ika omjer Chl *a*/Chl *b* bio značajno smanjen kod tretmana s 50  $\mu\text{M}$  (6%) i 100  $\mu\text{M}$  Cd (5%; Slika 14b).



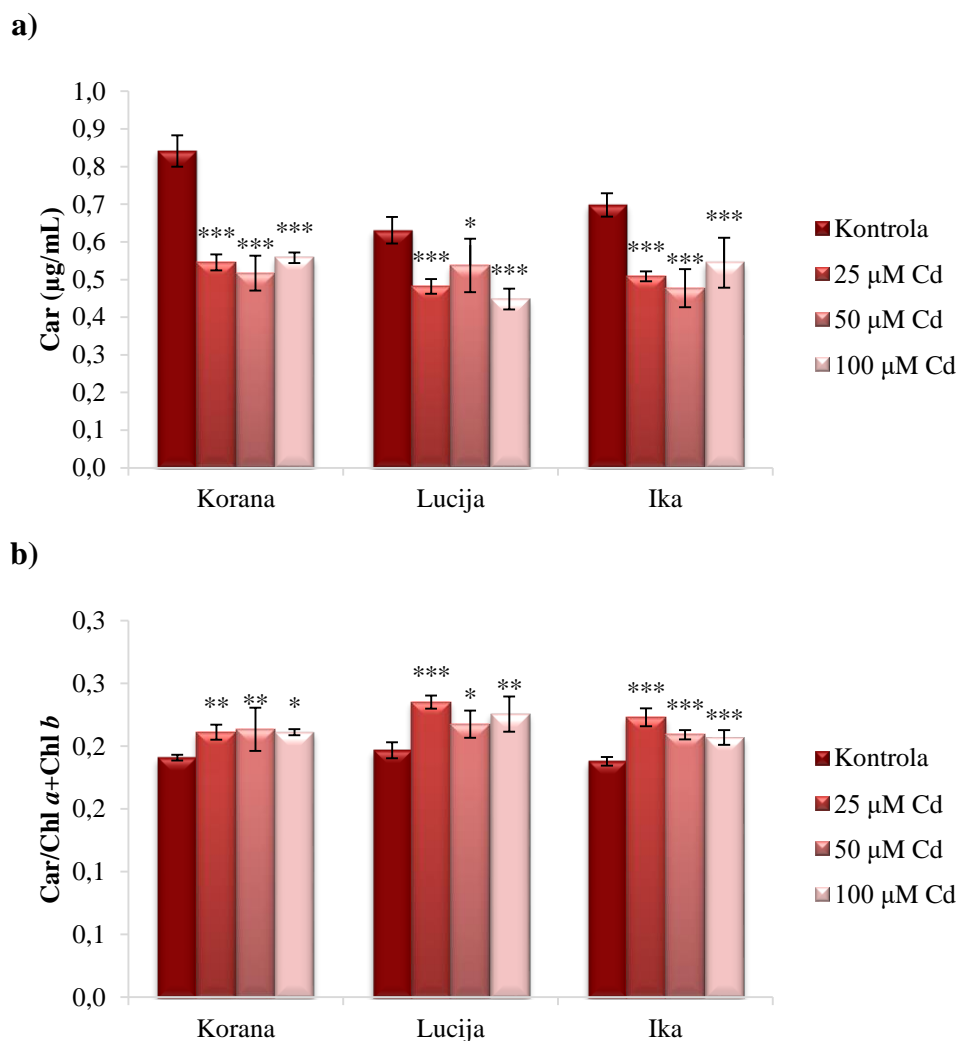
**Slika 14.** (a) Koncentracija ukupnog klorofila (tChl=Chl *a* + Chl *b*) i (b) omjer klorofila *a* i klorofila *b* (Chl *a*/Chl *b*) u tri kultivara soje (Korana, Lucija, Ika) nakon tretmana s različitim koncentracijama Cd (25, 50 i 100  $\mu\text{M}$ ). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su unutar kultivara *post hoc* testom Dunnett. Različiti broj zvjezdica (\*) označava razinu statističke značajnosti tretiranih skupina u odnosu na kontrolu (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

### 3.7. Utjecaj kadmija na koncentraciju karotenoida u tri kultivara soje

U sva tri istraživana kultivara soje koncentracija Car se značajno smanjila uslijed svih koncentracija Cd, s tim da stupanj smanjenja nije ovisio o primijenjenoj koncentraciji Cd, kao što je bio slučaj i sa smanjenjem tChl (Slika 15a). Jednako kao i u slučaju tChl,

najveće smanjenje koncentracije Car od 34% (100  $\mu\text{M}$  Cd) do 39% (50  $\mu\text{M}$  Cd), uočeno je u kultivara Korana. Najmanje smanjenje koncentracije Car, u rasponu od 15% (50  $\mu\text{M}$  Cd) do 29% (100  $\mu\text{M}$  Cd), prisutno je u kultivara Lucija, dok je u kultivara Ika zabilježeno smanjenje u rasponu od 22% (100  $\mu\text{M}$  Cd) do 32% (50  $\mu\text{M}$  Cd), u odnosu na kontrolu.

Svi tretmani Cd, u sva tri kultivara, uzrokovali su značajno povećanje omjera koncentracije tChl i Car ( $\text{Chl } a + \text{Chl } b/\text{Car}$ ; Slika 15b). Najveće povećanje omjera  $\text{Chl } a + \text{Chl } b/\text{Car}$ , u rasponu od 11% (50  $\mu\text{M}$  Cd) do 19% (25  $\mu\text{M}$  Cd) u odnosu na kontrolu, prisutno je u kultivara Lucija. U kultivara Ika omjer  $\text{Chl } a + \text{Chl } b/\text{Car}$  se povećao u rasponu od 10% (100  $\mu\text{M}$  Cd) do 19% (25  $\mu\text{M}$  Cd), dok se omjer u kultivara Korana povećao od 10% (25 i 100  $\mu\text{M}$  Cd) do 12% (50  $\mu\text{M}$  Cd), u odnosu na kontrolnu skupinu.



**Slika 15.** (a) Koncentracija karotenoida (Car) i (b) omjer ukupnog klorofila (Chl *a* + Chl *b*/Car) u tri kultivara soje (Korana, Lucija, Ika) nakon tretmana s različitim koncentracijama Cd (25, 50 i 100 µM). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su unutar kultivara *post hoc* testom Dunnett. Različiti brojevi zvjezdica (\*) označavaju razinu statističke značajnosti tretiranih skupina u odnosu na kontrolu (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

### 3.8. Sažetak rezultata

Količina  $H_2O_2$  bila je smanjena u izdanku, a povišena u korijenu pri većim koncentracijama Cd. Izmjerene vrijednosti u izdanku znatno su veće u odnosu na vrijednosti u korijenu. Zabilježeno je povećanje razine LPO u izdanku pri većim koncentracijama Cd, dok za korijen nije zabilježena promjena. Smanjena aktivnost SOD-a zabilježena je za kultivare Korana i Ika u izdanku, a povećanje aktivnosti prisutno je kod kultivara Lucija u izdanku nakon tretmana najvećom koncentracijom Cd te u korijenu sva tri kultivara nakon tretmana većim koncentracijama. Smanjenje u aktivnosti CAT u izdanku prisutno je samo u

kultivara Ika nakon tretmana najvećom koncentracijom Cd. Suprotno tome, u korijenu je aktivnost CAT povišena u sva tri kultivara nakon tretmana sa 100  $\mu\text{M}$  Cd, a u kultivara Lucija i nakon tretmana sa 50  $\mu\text{M}$ . Aktivnost GPOD-a je u izdanku sva tri kultivara soje nakon svih tretmana značajno povišena. Aktivnost u korijenu se razlikuje među kultivarima. Kultivari Korana i Lucija pokazuju smanjenje u aktivnosti GPOD-a nakon tretmana najnižom koncentracijom, a povećanje aktivnosti nakon tretmana najvišom koncentracijom. Ika pokazuje povišenu aktivnost GPOD-a nakon tretmana sa 50 i 100  $\mu\text{M}$  Cd. Izmjerene vrijednosti za klorofil *a* i *b* te karotenoide pokazuju smanjenje u sva tri kultivara nakon svih tretmana. Također su smanjene i vrijednosti za ukupni klorofil kod svih kultivara nakon svih tretmana. Omjer klorofila *a* i *b* smanjen je samo u kultivaru Ika kod tretmana sa 50 i 100  $\mu\text{M}$  Cd, dok je omjer karotenoida i ukupnog klorofila povećan za sve kultivare tretirane Cd (25, 50 i 100  $\mu\text{M}$ ; Tablica 2a i b).

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

a)

Koncentracija Cd ( $\mu\text{M}$ )	Korana			Lucija			Ika		
	25	50	100	25	50	100	25	50	100
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	$\downarrow$	$\downarrow$	-	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	-
LPO	-	$\uparrow$	$\uparrow$	-	-	$\uparrow$	-	-	$\uparrow$
SOD	-	$\downarrow$	$\downarrow$	-	-	$\uparrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$
CAT	-	-	-	-	-	-	-	-	$\downarrow$
GPOD	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$
Chl <i>a</i>	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$
Chl <i>b</i>	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$
tChl	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$
Chl <i>a</i> / Chl <i>b</i>	-	-	-	-	-	-	-	$\downarrow$	$\downarrow$
Car	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$	$\downarrow$
Car/tChl	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$

b)

Koncentracija Cd ( $\mu\text{M}$ )	Korana			Lucija			Ika		
	25	50	100	25	50	100	25	50	100
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	-	↑	↑	-	-	↑	-	-	↑
<b>LPO</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>SOD</b>	-	-	↑	-	↑	↑	-	↑	↑
<b>CAT</b>	-	-	↑	-	↑	↑	-	-	↑
<b>GPOD</b>	↓	-	↑	↓	-	↑	-	↑	↑

## 4. RASPRAVA

Do sada provedena istraživanja pokazala su da je Cd neesencijalan za rast i razvoj biljke te da u većim koncentracijama može biti letalan (Pérez-Chaca i sur. 2014). Kada dođu u kontakt s Cd, biljke ga apsorbiraju i akumuliraju u korijenu i izdanku (Andresen i Küpper 2013). Stupanj apsorpcije Cd u biljku se razlikuje kod različitih vrsta, ali i unutar različitih kultivara iste vrste (Arao i sur. 2003). S obzirom da je Cd, kao i drugi teški metali, nebiorazgradivi trajni zagađivač, i u sve većoj količini prisutan u tlima (Cullen i Maldonado 2013; Wu i sur. 2010), prilikom uzgoja nastoje se odabrati i uzgajati oni kultivari s minimalnom stopom akumulacije Cd, kako bi se smanjila ili izbjegla akumulacija tog teškog metala u ljudskom organizmu (Grant i sur. 2008). Zbog toga smo u ovom istraživanju koristili tri različita hrvatska kultivara soje (Korana, Lucija i Ika) koja su u preliminarnim istraživanjima pokazala razliku u sposobnosti akumulacije Cd u zrnu. Kultivar Korana pokazao je najveću sposobnost akumulacije, dok je kultivar Ika pokazao najmanji akumulacijski potencijal za Cd od sva tri navedena kultivara. Temeljem tih saznanja očekivane su razlike i u biokemijskim mehanizmima toksičnosti i tolerancije na Cd odnosno razlike u oksidacijskom i antioksidacijskom odgovoru kultivara. Analize su provedene na izdanku i korijenu kako bi se utvrdilo postoji li i tkivno-specifični odgovor u istraživanih kultivara. Osim toga, rezultati ovog istraživanja doprinose odabiru najtolerantnijeg kultivara soje koji je pogodan za uzgoj na tlu kontaminiranom Cd, a sa svojstvom manje akumulacije Cd u zrnu.

Kako je indukcija oksidacijskog stresa glavni mehanizam toksičnosti Cd u biljkama, kao pokazatelji oksidacijskog stresa u ovom su istraživanju određivani količina produkata LPO i koncentracija  $H_2O_2$ .  $H_2O_2$  predstavlja jedan od oblika ROS-a pronađenih u biološkim sustavima i uključenih u induciranje LPO te su povećane razine ove molekule čest pokazatelj oksidacijskog stresa (Lin i sur. 2011), a količine  $H_2O_2$  su obično u korelaciji s razinom LPO. ROS u manjoj količini aktivira signalne putove važne za pokretanje i reguliranje bioloških procesa (Schieber i Chandel 2014) kao što su rast i razvoj biljke, stanični ciklus, odgovor na abiotički stres, obrana od patogena, programirana smrt stanice i slično (Gill i sur. 2013), dok visoke razine ROS-a vode u oksidacijski stres koji uzrokuje oštećenja DNA, proteina ili lipida (Schieber i Chandel 2014). U okviru ovog istraživanja, u izdanku sva tri kultivara većinom su uočene smanjene ili nepromjenjene koncentracije  $H_2O_2$ , dok je kod primijene najvećih koncentracija Cd razina LPO uglavnom značajno povećana. Normalne količine  $H_2O_2$  se u stanicama sintetiziraju prilikom transporta elektrona u procesima poput



fotosinteze i stanične respiracije, ali se mogu znatno povećati kao odgovor na stres. U sintezi  $H_2O_2$  sudjeluju enzimi kao što su NADPH-oksidaza, peroksidaze stanične stijenke, amin-oksidaže i drugi enzimi koji sadrže flavine (Desikan i sur. 2003; Neill i sur. 2002). Razlog smanjene koncentracije  $H_2O_2$  u izdanku može biti rezultat povećane aktivnosti antioksidacijskih enzima čija je svrha uklanjanje prekomjerne količine ROS-a (Andresen i Küpper 2013). Enzimski antioksidacijski sustav jedan je od zaštitnih mehanizama koji djeluje uzastopnom i istodobnom aktivacijom većeg broja ROS-eliminirajućih enzima, uključujući SOD, CAT i POX (Hegedüs i sur. 2001). Za razliku od izdanka, u korijenu je zabilježeno značajno povećanje koncentracije  $H_2O_2$  u sva tri kultivara tretirana  $100 \mu M$  koncentracijom Cd, dok je kod kultivara Korana do značajnog povećanja  $H_2O_2$  došlo i nakon tretmana  $50 \mu M$  Cd. Iako su koncentracije  $H_2O_2$  bile znatno manje u odnosu na izdanak, u korijenu je zabilježen trend porasta s  $H_2O_2$  s porastom Cd. U istraživanju koje su proveli Alyemeni i sur. (2017) razina  $H_2O_2$  u biljkama soje raste s povećanjem koncentracije Cd te je najveće povećanje zabilježeno nakon tretmana s najvećom koncentracijom Cd ( $150 \text{ mg/L}$ ) u korijenu pet istraživanih genotipova soje. Zabilježen je štetan utjecaj Cd na integritet membrane što je dovelo do povećane koncentracije  $H_2O_2$  i LPO u svim genotipima soje u sklopu navedenog eksperimenta (Alyemeni i sur. 2017). Povećana sinteza  $H_2O_2$  može biti rezultat narušavanja membranskih struktura uzrokovano teškim metalima što može dovesti i do smanjenja sadržaja vode u biljnim stanicama (Maksymiec 2007). Prethodne studije su pokazale da se proizvodnja  $H_2O_2$  uvelike povećava nakon izlaganja stresu iz okoline (Ahmad i sur. 2016a; Ahmad i sur. 2016b; Hashem i sur. 2016), a  $H_2O_2$  je također nusprodukt različitih fizioloških i biokemijskih procesa, kao što je foto-respiracija, dismutacija superoksidnog radikala i  $\beta$ -oksidacija (Alyemeni i sur. 2017). Rezultati istraživanja Olmosa i sur. (2003) upućuju na to da je enzim NADPH-oksidaza zaslužan za povećanje proizvodnje  $H_2O_2$  izazvano Cd. Povećanje proizvodnje  $H_2O_2$  izazvane Cd prethodno su opisane i u duhanu (Olmos i sur. 2003), drugim genotipovima soje (Yang i sur. 2007) te u gorušice (Ahmad i sur. 2011).

Pokazatelj oksidacijskog stresa je i LPO, a mjerenje razine TBARS-a, odnosno MDA, koristi se kao indeks LPO u biljkama izloženim nepovoljnim uvjetima okoliša (Balestrasse i sur. 2001). U našem je istraživanju, u izdanku soje, došlo do značajnog povećanja LPO u sva tri kultivara tretirana najvećom koncentracijom Cd te u kultivara Korana i Ika tretirana s koncentracijom  $50 \mu M$ . Prema Pandi i sur. (2003) teški metali (poput Zn i Cr) induciraju povećanje razine MDA s povećanjem koncentracije metala u listu.

Povećanje LPO, odnosno MDA, uslijed viših koncentracija Zn i Cr vjerojatno je rezultat stvaranja slobodnih radikala. Slični rezultati zabilježeni su i kod drugih usjeva tretiranih različitim teškim metalima (Panda i sur. 2003). Tako je npr. povećanje LPO zabilježeno u graha (*P. vulgaris*) nakon tretmana Cd (Chaouiu i sur. 1997; Somashekaraiah i sur. 1992), suncokreta (*Helianthus annuus*) nakon tretmana sa Cu i Cd (Gallego i sur. 1996) te rajčice (*Solanum lycopersicum*) nakon tretmana s Cu (Mazhoudi i sur. 1997). Destabilizacija membrane općenito se pripisuje peroksidaciji lipida, zbog pojačane proizvodnje ROS-a. LPO mogu potaknuti redoks aktivni metali kao što je Cu, ali i lipoksigenaza (enzim koji sadrži Fe). Taj membranski vezan enzim oksidira PUFA i proizvodi slobodne radikale pa može izazvati LPO u grahu tretiranom Cd ili Zn koji nisu redoks aktivni metali (Chaoui i sur. 1997). Rezultati istraživanja Chaouija i sur. (1997) pokazuju da toksičnost Cd i Zn uzrokuje oksidacijski stres što je dokazano povećanom akumulacijom produkata LPO. Rezultati njihovog istraživanja u korelaciji su s našim rezultatima dobivenim za LPO izmjerenu u izdanku tri kultivara soje. Povećana koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> posljedično može uzrokovati povećanje LPO (Fornazier i sur. 2002; Neill i sur. 2002; Shah i sur. 2001), ali u našem istraživanju takav odnos nije uočen, odnosno u izdanku soje zabilježena je značajno smanjena koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dok je LPO je bila značajno povišena. Mogući razlog zbog kojeg koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i količina TBARS-a u našem istraživanju nisu u korelaciji je taj što i drugi oblici ROS-a (npr. <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, <sup>•</sup>OH, O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), čija koncentracija nije mjerena u ovom istraživanju, mogu uzrokovati povećanu stopu LPO (Apel i Hirt 2004). Za razliku od izdanka, tretmani Cd u korijenu soje nisu uzrokovali LPO, odnosno količina TBARS-a se nije značajno mijenjala u odnosu na kontrolu, u sva tri istraživana kultivara. Jednako tako, u istraživanju Balestrassea i sur. (2001) sadržaj TBARS-a ostao je nepromijenjen u korijenu soje tretirane s 50 μM Cd. Pérez-Chaca i sur. (2014) navode kako je razlika u dobivenim rezultatima za oštećenje lipida često posljedica korištene biljne vrste, vremenske izloženosti i primijenjene koncentracije metala. Također, povećanje LPO nije uočeno niti u soji, smeđoj gorušici (*Brassica juncea*) i u korijenu ječma (*Hordeum* sp.) nakon 24 h, 48 h i 7 dana nakon izloženosti visokoj dozi Cd (1mM) (Mohamed i sur. 2012; Piršelová i sur. 2011; Tamás i sur. 2007).

Kako bi uklonile prekomjerne količine nastalog ROS-a, biljke koriste nekoliko antioksidacijskih enzima, kao što su SOD, CAT i GPOD (Andresen i Küpper 2013) čije su aktivnosti mjerene i u našem istraživanju. Unutar stanice, SOD čini prvu liniju obrane protiv ROS-a (Gratão i sur. 2005; Alscher i sur. 2002), budući da dismutira O<sub>2</sub><sup>•-</sup> u H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i kisik

(Zhang i sur. 2007; Shah i sur. 2001). U našem istraživanju, aktivnosti SOD-a su se u izdanku soje značajno smanjile uslijed tretmana Cd u kultivara Korana (tretmani 50  $\mu\text{M}$  i 100  $\mu\text{M}$ ) i Ika (svi tretmani) te povisile u kultivara Lucija tretiranog s najvećom koncentracijom Cd (100  $\mu\text{M}$ ). Prema Bhattacharjeeu (1997) smanjenje aktivnosti SOD-a pod utjecajem Pb i Cd direktno utječe na akumulaciju  $\text{O}_2^{\cdot-}$  i doprinose oštećenju membrane. Također, minimalizira se proizvodnja  $\text{H}_2\text{O}_2$  iz  $\text{O}_2^{\cdot-}$  što može biti uzrok i smanjene aktivnosti CAT (Bhattacharjee, 1997). U istraživanju Shah i sur. (2011) proizvodnja  $\text{O}_2^{\cdot-}$  pod utjecajem Cd značajno je porasla, no povećanje aktivnosti SOD-a nije bilo u korelaciji s povećanjem proizvodnje  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Kao mogući razlog navodi se da je aktivnost SOD-a nadopunjena drugim zaštitnim mehanizmima biljaka važnih u uklanjanju slobodnih radikala proizvedenih uslijed toksičnosti Cd (Shah i sur. 2011). Sandalio i sur. (2001) u svojem istraživanju pokazali su kako svi izooblici SOD-a prisutni u listu graška (*Pisum sativum*) imaju smanjene aktivnosti nakon izlaganja različitim koncentracijama Cd u otopini nutrijenata. Zanimljivo je i to da smanjenje dostupnosti Cu, Zn, Fe i Mn u listovima, zbog prisutnosti Cd, može utjecati na sintezu izooblika SOD-a koje sadrže te metale kao kofaktore (del Rio i sur. 1998). Na povećanu brzinu stvaranja  $\text{O}_2^{\cdot-}$  u biljkama tretiranim Cd utječu i vrijeme izloženosti te koncentracija Cd u biljnim tkivima. S druge strane, u nekim istraživanjima zabilježeno je i povećanje aktivnosti SOD-a uslijed povećanja koncentracije Cd *in situ* (Shah i sur. 2001). Jednako je tako u našem istraživanju, zabilježeno povećanje aktivnosti SOD-a kod kultivara Lucija, što upućuje na sortno-specifični odgovor kod istraživanih kultivara. Osim toga, povišene su aktivnosti SOD-a zabilježene i u korijenu sva tri kultivara pri tretmanima s višim količinama Cd. Tretman najvišom koncentracijom (100  $\mu\text{M}$ ) Cd povisio je aktivnosti SOD-a u sva tri kultivara te je tretman 50  $\mu\text{M}$  Cd povisio aktivnosti u kultivara Lucija i Ika. U istraživanju Shaha i sur. (2001) također su zabilježene povećane aktivnosti SOD-a u korijenu u biljkama riže tretirane Cd. Pokazalo se da povećana aktivnost SOD-a u transgenim biljkama povećava zaštitu od oksidacijskog oštećenja (Allen i sur. 1997). Prema tome, povišena aktivnost enzima SOD je od velikog značaja biljkama u borbi protiv stresa izazvanog teškim metalima. Na taj način biljka održava svoj obrambeni sustav nakon izloženosti oksidacijskim oštećenjima (Gomes-Junior i sur. 2006; Slooten i sur. 1995). Još jedan mogući razlog povećanja aktivnosti SOD-a može se pripisati *de novo* sintezi enzima kao odgovora biljke na stres (Allen i sur. 1997; Slooten i sur. 1995). Prema Shahu i sur. (2001) dvije sorte riže tretirane Cd pokazale su višu razinu aktivnosti SOD u korijenu nego u izdanku.

Unutarstanična razina  $H_2O_2$  regulirana je velikim brojem enzima od kojih se ističu CAT i POX (Blokina i sur. 2003). CAT je enzim koji ima visoku specifičnost za  $H_2O_2$  (Mhamdi i sur. 2010) i metabolizira dvije molekule  $H_2O_2$  na  $O_2$  i  $H_2O$  (Igamberdiev i Lea, 2002) te je uključen u detoksikaciju peroksida proizvedenog u nizu metaboličkih reakcija u stanici, a u listu je bitan za metabolizam peroksida proizvedenog u peroksisomima (Kendall i sur. 1983). U našem istraživanju, u izdanku soje Cd nije utjecao na aktivnosti CAT koje su uglavnom bile nepromjenjene, osim što se u kultivara Ika aktivnost CAT smanjila uslijed tretmana najvećom koncentracijom Cd (100  $\mu M$ ). S tim da se u kultivara Korana i Lucija može uočiti trend smanjenja aktivnosti u odnosu na kontrolu, koji ipak nije statistički značajan. Rezultati istraživanja koja su proveli Ferreira i sur. (2002) te Mazhoudi i sur. (1997) također su pokazali kako CAT ne reagira na oksidacijski stres uzrokovan Cd. Međutim, u literaturi se mogu uočiti različiti rezultati dobiveni za aktivnost CAT uslijed djelovanja Cd, što ukazuje na to kako aktivnost ovog enzima ovisi o biljnoj vrsti, o trajanju tretmana Cd i drugim parametrima (Ferreira i sur. 2002). Budući da je aktivnost CAT ostala nepromijenjena u izdanku kultivara Korana i Lucija postoji mogućnost da ova dva kultivara nisu bila dovoljno dugo izložena tretmanu ili koncentracija nije bila dovoljno visoka da bi utjecala na aktivnost enzima. Suprotno tome, aktivnost CAT u izdanku kultivara Ika je bila značajno smanjena pri tretmanu najvišom koncentracijom Cd što ukazuje na veću osjetljivost ovog kultivara u odnosu na druga dva kultivara. Prema Pandi i sur. (2003) aktivnost CAT je bila snižena i u pšenici pri visokim koncentracijama teških metala kao i u graha (*P. vulgaris*; Somashekaraiyah i sur. 1992). Nedostatak aktivnosti CAT, ali i SOD-a može rezultirati povećanom stopom LPO posredovane slobodnim radikalima (Manohar i Balasubramanian, 1986) što je slučaj i u našem istraživanju. Za razliku od izdanka, u korijenu je Cd uzrokovao povišene aktivnosti CAT u tri kultivara soje nakon tretmana najvišim koncentracijama Cd. U biljkama, povećana antioksidacijska aktivnost je opća strategija koja se koristi za suzbijanje oksidacijskog stresa uzrokovanog ROS-om i ima funkciju povećanja tolerancije biljke na stres. Pojačana aktivnost CAT može biti posredovana povećanom regulacijom CAT-kodirajućih gena koji su inducirani povišenim razinama  $H_2O_2$  (Dixit i sur. 2001). U našem istraživanju uočeno je da povećanje aktivnosti SOD-a u korijenu (Zhang i sur. 2007; Shah i sur. 2001) direktno djeluje na povećanje aktivnosti CAT koja metabolizira nastali  $H_2O_2$ . Koordiniranje aktivnosti SOD-a i CAT ima centralnu zaštitnu ulogu u biljkama (Zhang i sur. 2007; Mittova i sur. 2002). Genotipovi koji imaju niže vrijednosti aktivnosti CAT pokazuju povećanu razinu  $H_2O_2$  (Alyemeni i sur. 2017). Takav rezultat je zabilježen i u korijenu soje u ovom eksperimentu. Kultivari Korana i Lucija pokazali su znatno višu

aktivnost CAT u odnosu na kultivar Ika pa je samim time i izmjerena koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bila znatno niža za ta dva kultivara, dok je za kultivar Ika izmjerena izrazito visoka koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u odnosu na kontrolu. Prema Alyemeniu i sur. (2017) povećana aktivnost CAT u nekim genotipovima soje ukazuje na to da su ti genotipovi pokazali bolju sposobnosti vezanja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u usporedbi s drugim genotipovima. Prema našim rezultatima genotipovi s boljom sposobnošću vezanja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> su kultivari Korana i Lucija.

Osim dva navedena enzima, za detoksikaciju ROS-a u biljnom tkivu važan je i enzim GPOD (Sharma i sur. 2012) koji unutar stanice regulira koncentraciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tayefi-Nasrabdi i sur. 2010). GPOD ima veći afinitet za H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u odnosu na CAT pa samim time i važniju ulogu u uklanjanju ROS-a (Gill i Tuteja, 2010). U našem istraživanju, u izdanku sva tri kultivara soje zabilježen je trend povišenja aktivnosti GPOD-a u ovisnosti o povišenju koncentracije Cd. Visoka aktivnost GPOD-a u odnosu na CAT upućuje na to da ovi enzimi mogu poslužiti kao bolji unutarnji obrambeni mehanizam koji štiti od ROS-a u biljkama riže (Shah i sur. 2001). S obzirom da je i u našem istraživanju aktivnost GPOD-a u odnosu na aktivnost CAT u izdanku soje viša, možemo pretpostaviti da se biljke koriste GPOD-om kao dominantnim mehanizmom u zaštiti od ROS-a. Prema Malkezadehu i sur. (2007) povišena aktivnost GPOD-a upućuje na znatno povećanje produkcije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u biljkama nakon izlaganja stresnim uvjetima. Utjecaj Cd na biljku dovodi do povećanja aktivnosti GPOD-a, a povišena aktivnost smatra se indirektnim dokazom povišene produkcije slobodnih radikala u stresnim uvjetima. Prekomjerna ekspresija gena antioksidacijskih enzima u transgenim biljnim vrstama utječe na bolju zaštitu biljaka od slobodnih radikala (Malkezadeh i sur. 2007). Za razliku od izdanka, u korijenu soje aktivnost GPOD-a povećala se samo pri tretmanu s najvećom koncentracijom Cd te u kultivara Ika i pri tretmanu s 50 μM Cd, dok su tretmani najmanjom koncentracijom Cd (25 μM) uzrokovali smanjenje aktivnosti ovog enzima u kultivara Korana i Lucija. Prema tome možemo reći da postoji značajna razlika u aktivnosti GPOD-a u korijenu u odnosu na izdanak, kao i među kultivarima.

Uz spomenute pokazatelje, kao pokazatelji oksidacijskog i antioksidacijskog statusa mjereni su i sadržaj klorofila, te sadržaj Car, lipofilnih antioksidansa koji mogu gasiti pobuđeno tripletno stanje klorofila te detoksificirati različite oblike ROS-a (Sharma i sur. 2012; Gratão i sur. 2005). Klorofil i Car imaju središnju ulogu u fotosintezi svake zelene biljke. Prema tome, svaka značajna promjena u sadržaju fotosintetskih pigmenata odrazit će se na cjelokupni metabolizam biljaka (Ulus i sur. 2016). Koncentracija tChl jedinstveni je parametar koji pokazuje učinak oksidacijskog stresa na biosintezu klorofila (Felici i sur. 2014). Rezultati našeg istraživanja pokazali su značajno smanjenje koncentracije pigmenata

Chl *a* i Chl *b* te tChl i Car u odnosu na kontrolu kod tri kultivara soje nakon tretmana s tri različite koncentracije Cd (25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100 $\mu$ M). U do sada provedenim istraživanjima zabilježeno je da Cd uzrokuje degradaciju klorofila ili inhibira biosintezu klorofila oštećenjem kloroplasta, zatim inhibira fotosintetski aparat i enzime fotosintetskog Calvinovog ciklusa što dovodi do promjene u stopi fotosinteze (Pérez-Chaca i sur. 2014; Wan i sur. 2012; Ferreira i sur. 2002; Bazzaz i sur. 1974). Inhibicija biosinteze klorofila rezultat je inhibicije enzima protoklorofilid-reduktaze pod djelovanjem Cd, a posljedično se može javljati i kloroza (Felici i sur. 2014). Naši rezultati su u korelaciji s rezultatima dosadašnjih studija što ukazuje na to da je Cd uzrokovao degradaciju klorofila u sva tri kultivara soje. U istraživanju koje su proveli Felici i sur. (2014), smanjenje sadržaja Chl *a*, Chl *b* i tChl bilo je značajno u listovima biljaka soje tretiranih Cd što ukazuje na oštećenje kloroplasta i smanjenje stope apsorpcije Mg korijenom. Također, Qiushuang i sur. (2013) pratili su utjecaj Cd na soju, a rezultati su pokazali smanjenje koncentracije pigmenta kao i u našem istraživanju. Poznato je da Cd pokazuje učinke koji izravno ili neizravno inhibiraju proces fotosinteze kao što je razgradnja klorofila i oštećenje aktivnosti fotosustava II, što su Bazzaz i Govindjee (1974) i zabilježili u svom istraživanju. Zbog svog afiniteta prema sulfhidrilnim skupinama, Cd može blokirati esencijalne funkcionalne skupine biomolekula što dovodi do manje efikasnosti u aktivnosti enzima različitih metaboličkih procesa kao što su fotosinteza, respiracija, asimilacija nutrijenata i transport (Lee i sur. 2006; Dražić i sur. 2004; Ferreira i sur. 2002). Smanjena stopa fotosinteze, ali i drugi učinci Cd na biljke, uključujući njegovu interferenciju s mitohondrijalnim disanjem (Koepe i Miller 1973) dovode do smanjenja rasta biljke i moguće smrti biljaka kontaminiranih s Cd (Bazzaz i sur. 1974).

Omjer Chl *a*/Chl *b* u našem istraživanju nije bio značajno promjenjen u odnosu na kontrolne biljke, dok se u kultivara Ika značajano smanjio nakon tretmana većim koncentracijama Cd (50 $\mu$ M i 100  $\mu$ M). Prema Hou i sur. (2007) omjer Chl *a*/Chl *b* se kod vodene leće (*L. minor*) nakon izlaganja Cd smanjivao s povećanjem koncentracije metala, što je u korelaciji i s našim rezultatima dobivenim za kultivar Ika. Smanjenje omjera Chl *a*/Chl *b* u biljkama tretiranim teškim metalima Co<sup>2+</sup> i Ni<sup>2+</sup> pokazatelj je veće osjetljivosti Chl *a* u odnosu na Chl *b* na onečišćujuće tvari okoliša (Pandey i Sharma 2002). Manios i sur. (2002) su zabilježili bržu hidrolizu Chl *a* u usporedbi s Chl *b* kada su biljke pod stresom. Također, prema Hou i sur. (2007) brzina razgradnje Chl *b* pod utjecajem teških metala bila je sporija od razgradnje Chl *a*. Rezultati sugeriraju kako teški metali uzrokuju više štete na Chl *a* nego na Chl *b*, a poznato je kako je Chl *a* jedan od najvažniji pigmenta u fotosintezi,

te stoga smanjenje Chl *a* može znatno inhibirati fotosintezu (Hou i sur. 2007). Kako Cd u našem istraživanju, nije utjecao na omjer Chl *a*/Chl *b* u kultivara Korana i Lucija, možemo pretpostaviti da je učinak Cd na uništavanje i/ili inhibiciju stvaranja klorofila bio je identičan za oba tipa pa se zbog toga omjer Chl *a*/Chl *b* samo neznatno promijenio kao odgovor na prisutnost Cd (Gadallah, 1995).

Car su neophodni za zaštitu fotosintetskog aparata te imaju važnu ulogu kao prekursori u signalizaciji tijekom razvoja biljke koja se nalazi u biotičkom ili abiotičkom stresu te imaju značajan potencijal za poboljšanje kvalitete i prinosa biljaka (Ashraf i Harris 2013). U našem je istraživanju Cd u svim koncentracijama uzrokovao značajno smanjenje koncentracije Car u sva tri kultivara. U istraživanju Saikachout i sur. (2015) koncentracija Car u biljkama (*Atriplex hortensis* i *A. rosea*) tretiranim teškim metalim (Cu, Ni, Pb i Zn) je također bila smanjena. Smanjenje razine fotosintetskih pigmenata, uključujući Car, zabilježeno je i u drugim brojnim biljnim vrstama nakon izlaganja biotičkim i abiotičkim stresorima. U ovisnosti o teškom metalu proizvodnja Car se može povećati ili smanjiti (Saikachout i sur. 2015). Učinci Cd i Pb na smeđu gorušicu (*B. juncea*) doveli su do smanjenja sadržaja tChl i Car, a time i do smanjenja rasta ovih biljaka. Također, prema studiji koju su provodili Hattab i sur. (2009), Cd i Cu na grašak (*P. sativum*) utječu tako da smanjuju brzinu fotosinteze i koncentraciju fotosintetskih pigmenata uključujući i Car. Smanjenja su zabilježena za sve koncentracije Cd (0.35, 0.7, 1.4 i 7 mg/kg) (Hattab i sur. 2009).

## 5. ZAKLJUČAK

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

- Utjecaj Cd na pojavu oksidacijskog stresa kao značajnog mehanizma toksičnosti u biljkama, te na antioksidacijski obrambeni odgovor ovisio je o primijenjenoj koncentraciji Cd, tipu biljnog tkiva te o kultivaru.
- Tri kultivara soje, koji se razlikuju po svojem akumulacijskom potencijalu za Cd u zrnu, na tretman različitim koncentracijama Cd pokazala su i razlike u mjernim pokazateljima oksidacijskog i antioksidacijskog statusa.
- Prema biokemijskim pokazateljima oksidacijskog i antioksidacijskog statusa, kultivar Lucija izdvaja se kao najtolerantniji kultivar u odnosu na izloženost Cd što ga, uz srednji akumulacijski potencijal za Cd u zrnu, čini najpogodnijim za uzgoj na tlima kontaminiranim Cd.
- Utvrđene su i razlike u oksidacijskom i antioksidacijskom statusu između izdanka i korijena tri kultivara soje. Veći antioksidacijski odgovor prisutan je u korijenu, iako nije poznato je li tkivno-specifični odgovor posljedica različite akumulacije Cd u ovim tkivima ili posljedica različitih biokemijskih mehanizama.
- Smanjene koncentracije biljnih pigmenata, Chl i Car, u sva tri kultivara pri svim primijenjenim koncentracijama Cd upućuju na veliku osjetljivost fotosintetskog aparata na Cd i utječe na uspješnost rasta i klorotičan izgled biljaka.
- Nove spoznaje o mehanizmima toksičnosti i detoksikacije daju bolji uvid u istraživanu problematiku, te razvijanje strategija za povećanje tolerancije na Cd.



## 6. LITERATURA

- Aebi, H. (1984) Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology* 105: 121-126.
- Ahmad, P., Abdel Latef, A. A., AbdAllah, E. F., Hashem, A., Sarwat, M., Anjum, N. A., Gucel, S. (2016a) Calcium and potassium supplementation enhanced growth, osmolyte secondary metabolite production, and enzymatic antioxidant machinery in cadmium-exposed chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Frontiers in plant science* 7: 513.
- Ahmad, P., Allah, E. A., Hashem, A., Sarwat, M., & Gucel, S. (2016b) Exogenous application of selenium mitigates cadmium toxicity in *Brassica juncea* L. (Czern i Cross) by up-regulating antioxidative system and secondary metabolites. *Journal of plant growth regulation* 35: 936-950.
- Ahmad, P., Nabi, G., Ashraf, M. (2011) Cadmium-induced oxidative damage in mustard [*Brassica juncea* (L.) Czern. i Coss.] plants can be alleviated by salicylic acid. *South African Journal of Botany* 77: 36-44.
- Allen, R. D., Webb, R. P., Schake, S. A. (1997) Use of transgenic plants to study antioxidant defenses. *Free Radical Biology and Medicine* 23: 473-479.
- Alscher, R. G., Erturk, N., Heath, L. S. (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of experimental botany* 53: 1331-1341.
- 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: 903-911.
- Andresen, E., Küpper, H. (2013) Cadmium toxicity in plants. U: Sigel A. i Sigel H. (ur.) *Cadmium: from toxicity to essentiality*. Springer, Dordrecht, str. 395-413.
- 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. U: Garrigues P. (ur.) *Environmental Science and Pollution Research*. Springer, str. 17022-17030.
- Apel, K., Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399.
- Arao, T., Ae, N., Sugiyama, M., Takahashi, M. (2003) Genotypic differences in cadmium uptake and distribution in soybeans. *Plant and Soil* 251: 247-253.

- Ashraf, M. H. P. J. C., Harris, P. J. (2013) Photosynthesis under stressful environments: an overview. *Photosynthetica* 51: 163-190.
- Azevedo, R. A., Alas, R. M., Smith, R. J., Lea, P. J. (1998) Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiologia Plantarum* 104: 280-292.
- Ayala, A., Muñoz, M. F., Argüelles, S. (2014) Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2014: 1-31.
- Balestrasse, K. B., Gardey, L., Gallego, S. M., Tomaro, M. L. (2001) Response of antioxidant defence system in soybean nodules and roots subjected to cadmium stress. *Functional Plant Biology* 28: 497-504.
- Bazzaz, F. A., Rolfe, G. L., Carlson, R. W. (1974). Effect of Cd on photosynthesis and transpiration of excised leaves of corn and sunflower. *Physiologia Plantarum* 32: 373-376.
- Bazzaz, M. B., Govindjee. (1974) Effects of cadmium nitrate on spectral characteristics and light reactions of chloroplasts. *Environmental letters* 6: 1-12.
- Beauchamp, C., Fridovich, I. (1971) Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels. *Analytical Biochemistry* 44: 276-287.
- Benavides, M. P., Gallego, S. M., Tomaro, M. L. (2005) Cadmium toxicity in plants. *Brazilian journal of plant physiology* 17: 21-34.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. (2013) *Biokemija*. Školska knjiga, Zagreb.
- Bernard, A. (2008) Cadmium and its adverse effects on human health. *Indian Journal of Medical Research* 128: 4-557.
- Bhattacharjee, S. (1997) Membrane lipid peroxidation, free radical scavengers and ethylene evolution in *Amaranthus* as affected by lead and cadmium. *Biologia plantarum* 40: 131-135.
- Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K. V. (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of botany* 91: 179-194.
- Bowler, C., Montagu, M. V., Inze, D. (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual review of plant biology* 43: 83-116.

- 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.
- Cataldo, D. A., Garland, T. R., Wildung, R. E. (1983) Cadmium uptake kinetics in intact soybean plants. *Plant physiology* 73: 844-848.
- Chance, B., Maehly, A. C. (1955). [136] Assay of catalases and peroxidases.
- Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghorbal, M. H., El Ferjani, E. (1997) Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science* 127: 139-147.
- Cullen, J. T., Maldonado, M. T. (2013) Biogeochemistry of cadmium and its release to the environment. U: Sigel A. i Sigel H. (ur.) Cadmium: from toxicity to essentiality. Springer, Dordrecht, str. 31-62.
- Demidchik, V. (2015) Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany* 109: 212-228.
- Desikan R, Hancock J. T., Neill S. J. (2003) Oxidative stress signalling. U: Hirt H. i Shinozaki K. (ur.) Topics in current genetics. Springer, Verlag, str. 121-150.
- Dixit, V., Pandey, V., Shyam, R. (2001) Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *Journal of Experimental Botany* 52: 1101-1109.
- Dražić, G., Mihailović, N., Stojanović, Z. (2004) Cadmium toxicity: the effect on macro- and micro-nutrient contents in soybean seedlings. *Biologia Plantarum* 48: 605-607.
- Eriksson, J. E. (1990) A field study on factors influencing Cd levels in soils and in grain of oats and winter wheat. *Water, Air, and Soil Pollution* 53: 69-81.
- Erofeeva, E. A. (2015) Dependence of guaiacol peroxidase activity and lipid peroxidation rate in drooping birch (*Betula pendula* Roth) and Tillet (*Tilia cordata* Mill) leaf on motor traffic pollution intensity. *Dose-Response* 13: 1-6.
- Felici, E., Almeida, C., Fernández, B., Martínez, L. D., Zirulnik, F., Gomez, M. R. (2014) Analysis of metal profile in soybean after cadmium-induced oxidative damage. *Journal of Coastal Life Medicine* 2: 458-464.

- 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: 327-342.
- Flohé L, Otting F. (1984) Superoxide dismutase assays. *Methods in Enzymology* 105: 93-104.
- Fornazier, R. F., Ferreira, R. R., Vitoria, A. P., Molina, S. M. G., Lea, P. J., Azevedo, R. A. (2002) Effects of cadmium on antioxidant enzyme activities in sugar cane. *Biologia Plantarum* 45: 91-97.
- Gadallah, M. A. A. (1995) Effects of cadmium and kinetin on chlorophyll content, saccharides and dry matter accumulation in sunflower plants. *Biologia Plantarum* 37: 233.
- Gallego, S. M., Benavides, M. P., Tomaro, M. L. (1996) Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Science* 121: 151-159.
- Gill, S. S., Anjum, N. A., Hasanuzzaman, M., Gill, R., Trivedi, D. K., Ahmad, I., Tuteja, N. (2013) Glutathione and glutathione reductase: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiology and Biochemistry* 70: 204-212.
- 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.
- Gomes-Junior, R. A., Moldes, C. A., Delite, F. S., Pompeu, G. B., Gratao, P. L., Mazzafera, P., Azevedo, R. A. (2006) Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. *Chemosphere* 65: 1330-1337.
- Grant, C. A., Clarke, J. M., Duguid, S., Chaney, R. L. (2008) Selection and breeding of plant cultivars to minimize cadmium accumulation. *Science of the total environment* 390: 301-310.
- 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.
- 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*. Academic Press, Isfahan, str. 61-102.

- Hashem, A., Abdallah, E. F., Alqarawi, A. A., Al Huqail, A. A., Egamberdieva, D., Wirth, S. (2016) Alleviation of cadmium stress in *Solanum lycopersicum* L. by arbuscular mycorrhizal fungi via induction of acquired systemic tolerance. Saudi journal of biological sciences 23: 272-281.
- Hattab, S., Dridi, B., Chouba, L., Kheder, M. B., Bousetta, H. (2009) Photosynthesis and growth responses of pea *Pisum sativum* L. under heavy metals stress. Journal of Environmental Sciences 21: 1552-1556.
- Hegedüs, A., Erdei, S., Horváth, G. (2001) Comparative studies of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. Plant Science 160: 1085-1093.
- Hoagland, D. R., Arnon, D. I. (1950) The water-culture method of growing plants without soil. California Agricultural Experiment station 347.
- Hou, W., Chen, X., Song, G., Wang, Q., Chang, C. C. (2007) Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*). Plant physiology and biochemistry 45: 62-69.
- Igamberdiev, A. U., Lea, P. J. (2002) The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organisms. Phytochemistry 60: 651-674.
- Kendall, A. C., Keys, A. J., Turner, J. C., Lea, P. J., Miflin, B. J. (1983) The isolation and characterisation of a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.). Planta 159: 505-511.
- 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: 1591-1605.
- Krupa, Z., Siedlecka, A., Maksymiec, W., Baszyński, T. (1993) In vivo response of photosynthetic apparatus of *Phaseolus vulgaris* L. to nickel toxicity. Journal of Plant Physiology 142: 664-668.
- Lee, K. C., Cunningham, B. A., Paulsen, G. M., Liang, G. H., Moore, R. B. (1976) Effects of cadmium on respiration rate and activities of several enzymes in soybean seedlings. Physiologia Plantarum 36: 4-6.

- León, A. M., Palma, J. M., Corpas, F. J., Gómez, M., Romero-Puertas, M. C., Chatterjee, D., Sandalio, L. M. (2002) Antioxidative enzymes in cultivars of pepper plants with different sensitivity to cadmium. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 813-820.
- Li, F., Vallabhaneni, R., Yu, J., Rocheford, T., Wurtzel, E. T. (2008) The maize phytoene synthase gene family: overlapping roles for carotenogenesis in endosperm, photomorphogenesis, and thermal stress tolerance. *Plant physiology* 147: 1334-1346.
- Lin, Y. L., Chao, Y. Y., Huang, W. D., Kao, C. H. (2011) Effect of nitrogen deficiency on antioxidant status and Cd toxicity in rice seedlings. *Plant Growth Regulation* 64: 263-273.
- Liu, K., Lv, J., He, W., Zhang, H., Cao, Y., Dai, Y. (2015) Major factors influencing cadmium uptake from the soil into wheat plants. *Ecotoxicology and environmental safety* 113: 207-213.
- Liu, H., Hussain, S., Peng, S., Huang, J., Cui, K., Nie, L. (2014) Potentially toxic elements concentration in milled rice differ among various planting patterns. *Field Crops Research* 168: 19-26.
- Lushchak, V. I. (2011) Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic toxicology* 101: 13-30.
- Maksymiec, W. (2007) Signaling responses in plants to heavy metal stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 29: 177.
- Malekzadeh, P., Khara, J., Farshian, S., Jamal-Abad, A. Z. K., Rahmatzadeh, S. (2007) Cadmium toxicity in maize seedlings: Changes in antioxidant enzyme activities and root growth. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10: 127-131.
- Manios, T., Stentiford, E. I., Millner, P. A. (2003) The effect of heavy metals accumulation on the chlorophyll concentration of *Typha latifolia* plants, growing in a substrate containing sewage sludge compost and watered with metaliferous water. *Ecological Engineering* 20: 65-74.
- Manohar, M., Balasubramanian, K. A. (1986) Antioxidant enzymes in rat gastrointestinal tract. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 23: 276-278.
- Mazhoudi, S., Chaoui, A., Ghorbal, M. H., El Ferjani, E. (1997) Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill.). *Plant Science* 127: 129-137.

- McLaughlin, M. J., Singh, B. R. (1999) Cadmium in soils and plants. U: McLaughlin, M. J. i Singh, B. R. (ur.) Cadmium in soils and plants. Springer, Dordrecht, str. 1-9.
- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F., Noctor, G. (2010) Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis mutants* as stress-mimic models. *Journal of experimental botany* 61: 4197-4220.
- Miller, R. J., Bittell, J. E., Koeppe, D. E. (1973) The effect of cadmium on electron and energy transfer reactions in corn mitochondria. *Physiologia Plantarum* 28: 166-171.
- Mittova, V., Tal, M., Volokita, M., Guy, M. (2002) Salt stress induces up-regulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species. *Physiologia Plantarum* 115: 393-400.
- Mohamed, A. A., Castagna, A., Ranieri, A., di Toppi, L. S. (2012) Cadmium tolerance in *Brassica juncea* roots and shoots is affected by antioxidant status and phytochelatin biosynthesis. *Plant Physiology and Biochemistry* 57: 15-22.
- Mukherjee, S. P., Choudhuri, M. A. (1983) Implications of water stress-induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in *Vigna* seedlings. *Physiologia Plantarum* 58: 166-170.
- Mullins, G. L., Sommers, L. E., Barber, S. A. (1986) Modeling the Plant Uptake of Cadmium and Zinc from Soils Treated with Sewage Sludge 1. *Soil Science Society of America Journal* 50: 1245-1250.
- Naidu, R., Bolan, N. S., Kookana, R. S., Tiller, K. G. (1994) Ionic-strength and pH effects on the sorption of cadmium and the surface charge of soils. *European journal of soil science* 45: 419-429.
- Neill S. J., Desikan R., Clarke A., Hurst R. D., Hancock J. T. (2002) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 1237-1242.
- Neill, S., Desikan, R., Hancock, J. (2002) Hydrogen peroxide signalling. *Current opinion in plant biology* 5: 388-395.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry* 95: 351-358.

- Olmos, E., Martínez-Solano, J. R., Piqueras, A., Hellín, E. (2003) Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line). *Journal of Experimental Botany* 54: 291-301.
- Panda, S. K., Chaudhury, I., Khan, M. H. (2003) Heavy metals induce lipid peroxidation and affect antioxidants in wheat leaves. *Biologia Plantarum* 46: 289-294.
- Pandey, N., Sharma, C. P. (2002) Effect of heavy metals  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$  on growth and metabolism of cabbage. *Plant Science* 163: 753-758.
- Pérez-Chaca, M. V., Rodríguez-Serrano, M. A. R. Í. A., Molina, A. S., Pedranzani, H. E., Zirulnik, F., Sandalio, L. M., Romero-Puertas, M. C. (2014) Cadmium induces two waves of reactive oxygen species in *Glycine max* (L.) roots. *Plant, Cell and Environment* 37: 1672-1687.
- Piršelová, B., Kuna, R., Libantová, J., Moravčíková, J., Matušíková, I. (2011) Biochemical and physiological comparison of heavy metal-triggered defense responses in the monocot maize and dicot soybean roots. *Molecular biology reports* 38: 3437-3446.
- Polidoros, A. N., Scandalios, J. G. (1999) Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.). *Physiologia Plantarum* 106: 112-120.
- del Rio, L. A., Pastori, G. M., Palma, J. M., Sandalio, L. M., Sevilla, F., Corpas, F. J., Hernández, J. A. (1998) The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiology* 116: 1195-1200.
- Saikachout, S., Benmansoura, A., Ennajah, A., Leclerc, J. C., Ouerghi, Z., Karray Bouraoui, N. (2015) Effects of Metal Toxicity on Growth and Pigment Contents of Annual Halophyte (*A. hortensis* and *A. rosea*). *International Journal of Environmental Research* 9: 613-620.
- Sandalio, L. M., Dalurzo, H. C., Gomez, M., Romero-Puertas, M. C., Del Rio, L. A. (2001) Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of experimental botany* 52: 2115-2126.
- Schieber, M., Chandel, N. S. (2014) ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology* 24: 453-462.
- Schutzendubel, A., Polle, A. (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of experimental botany* 53: 1351-1365.



- Shah, K., Kumar, R. G., Verma, S., Dubey, R. S. (2001) Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Science* 161: 1135-1144.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., Pessarakli, M. (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany* 2012: 1-26.
- Siegel B. Z., Galston W. (1967) The peroxidase of *Pisum sativum*. *Plant Physiology* 42: 221–226.
- Slooten, L., Capiou, K., Van Camp, W., Van Montagu, M., Sybesma, C., Inze, D. (1995) Factors affecting the enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco overexpressing manganese superoxide dismutase in the chloroplasts. *Plant physiology* 107: 737-750.
- Smirnoff, H. (1995) Antioxidant systems and plant response to the environment. *Environment and plant metabolism* 1995: 243-317.
- Somashekaraiah, B. V., Padmaja, K., Prasad, A. R. K. (1992) Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): Involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. *Physiologia Plantarum* 85: 85-89.
- Tamás, L., Ďurčėková, K., Haluřková, L. U., Huttová, J., Mistrík, I., Ollé, M. (2007) Rhizosphere localized cationic peroxidase from barley roots is strongly activated by cadmium and correlated with root growth inhibition. *Chemosphere* 66: 1292-1300.
- Tayefi-Nasrabadi, H., Dehghan, G., Daeihassani, B., Movafegi, A., Samadi, A. (2011) Some biochemical properties of guaiacol peroxidases as modified by salt stress in leaves of salt-tolerant and salt-sensitive safflower (*Carthamus tinctorius* L. cv.) cultivars. *African Journal of Biotechnology* 10: 751-763.
- Ulusu, Y., Öztürk, L., Elmastař, M. (2017) Antioxidant capacity and cadmium accumulation in parsley seedlings exposed to cadmium stress. *Russian journal of plant physiology* 64: 883-888.
- Verma, S., Dubey, R. S. (2003) Leads toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science* 164: 645-655.

Wan, Y., Luo, S., Chen, J., Xiao, X., Chen, L., Zeng, G., He, Y. (2012) Effect of endophyte-infection on growth parameters and Cd-induced phytotoxicity of Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. *Chemosphere* 89: 743-750.

Wu, F., & Zhang, G. (2002) Genotypic variation in kernel heavy metal concentrations in barley and as affected by soil factors. *Journal of Plant Nutrition* 25: 1163-1173.

Wu, G., Kang, H., Zhang, X., Shao, H., Chu, L., Ruan, C. (2010) A critical review on the bio-removal of hazardous heavy metals from contaminated soils: issues, progress, eco-environmental concerns and opportunities. *Journal of Hazardous Materials* 174: 1-8.

Xue, Z. C., Gao, H. Y., Zhang, L. T. (2013) Effects of cadmium on growth, photosynthetic rate and chlorophyll content in leaves of soybean seedlings. *Biologia Plantarum* 57: 587-590.

Yang, Y. J., Cheng, L. M., Liu, Z. H. (2007) Rapid effect of cadmium on lignin biosynthesis in soybean roots. *Plant Science* 172: 632-639.

Zhang, F. Q., Wang, Y. S., Lou, Z. P., Dong, J. D. (2007) Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorhiza*). *Chemosphere* 67: 44-50.

Mrežne stranice

Web1. <https://www.greenandvibrant.com/deep-water-culture> (1.09.2019.)