

# Učinak selena na ekspresiju gena askorbat-glutationskog ciklusa kod pšenice (*Triticum aestivum* L.)

---

Sekulić, Ramona

Undergraduate thesis / Završni 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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:181:805147>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-31**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Ramona Sekulić

**Učinak selena na ekspresiju gena askorbat-glutationskog ciklusa kod pšenice (*Triticum aestivum* L.)**

Završni rad

Osijek, 2019.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

Učinak selena na ekspresiju gena askorbat-glutationskog ciklusa kod pšenice (*Triticum aestivum* L.)

Ramona Sekulić

**Rad je izrađen:** Laboratorij za biokemiju, Odjel za biologiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

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

**Neposredni voditelj:** Ana Vuković

**Kratak sažetak završnog rada:**

Selen je mikronutrijent esencijalan za ljude i životinje, dok kod biljaka u malim koncentracijama djeluje u obrani protiv nepovoljnih ekoloških abiotičkih i biotičkih čimbenika. Pri većim koncentracijama selen može imati prooksidacijsko djelovanje i uzrokovati pojavu oksidacijskog stresa u stanicama. Važnu ulogu u smanjenju negativnih posljedica uzrokovanih oksidacijskim stresom ima askorbat-glutationski ciklusi te enzimi monodehidroaskorbat-reduktaza (MDHAR) i dehidroaskorbat-reduktaza (DHAR) koji čine njegov važan dio. U ovom istraživanju ispitivao se utjecaj tretmana različitih koncentracija i oblika selena (selenat i selenit) na razinu ekspresije gena *mdhar* i *dhar* u korijenu i izdanku pšenice (*Triticum aestivum* L., cv. Kraljica). Tretman selenom je značajno utjecao na ekspresiju gena *mdhar* i *dhar* pri čemu je razina ekspresije ovisila o kemijskom obliku i koncentraciji primijenjenog selna te o samom biljnom organu. Kako bi se detaljnije razjasnio mehanizam djelovanja selena na antioksidacijski odgovor u biljaka, potrebno je ispitati i ostale komponente antioksidacijskog sustava.

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** selenat, selenit, monodehidroaskorbat-reduktaza, dehidroaskorbat-reduktaza, *Triticum aestivum*

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

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**  
**Department of Biology**

**Undergraduate university study programme in Biology**  
**Scientific Area: Natural sciences**  
**Scientific Field: Biology**

**The effect of selenium on the ascorbate-glutathione cycle genes expression in wheat (*Triticum aestivum* L.)**

**Ramona Sekulić**

**Thesis performed at:** Laboratory of Biochemistry, Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

**Supervisor:** Ivna Štolfa Čamagajevac, PhD, Assistant Professor  
**Assistant Supervisor:** Ana Vuković

**Short abstract:**

Selenium is a micronutrient essential for humans and animals, while in plants low concentrations of selenium help in protection against adverse ecological abiotic and biotic factors. At higher concentrations, selenium can have prooxidative activity and induce oxidative stress in cells. An important role in reducing the negative effects caused by oxidative stress has ascorbate-glutathione cycle and enzymes monodehydroascorbate reductase (MDHAR) and dehydroascorbate reductase (DHAR) that make its important part. In this study, the effect of various concentrations of selenium (selenate and selenium) on the expression of *mdhar* and *dhar* genes in the roots and shoots of wheat (*Triticum aestivum* L., cv. Kraljica) was studied. Treatment with selenium had a significant effect on the expression of *mdhar* and *dhar* genes, where the level of expression depended on the chemical form and concentration of the applied selenium and on the type of plant organ itself. In order to further clarify the mechanism of selenium on the antioxidant response in plants, other components of the antioxidant system need to be investigated.

**Original in:** Croatian

**Key words:** selenate, selenite, monodehydroascorbate reductase, dehydroascorbate reductase, *Triticum aestivum*

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

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Selen.....	1
1.1.1. Uloga, pozitivan i negativan utjecaj.....	1
1.1.2. Toksičnost selena .....	1
1.1.3. Selen u okolišu i njegovi oblici .....	2
1.1.4. Unos, translokacija i metabolizam u biljkama .....	3
1.1.5. Akumulacija u biljkama .....	4
1.2. Biofortifikacija.....	5
1.3. Oksidacijski stres, proizvodnja ROS-a u biljkama i njihovo uklanjanje antioksidansima .....	5
1.3.1. Oksidacijski stres.....	5
1.3.2. Antioksidansi.....	6
1.4. Cilj završnog rada .....	8
2. MATERIJALI I METODE.....	9
2.1. Biljni materijal .....	9
2.2. Opis eksperimenta.....	9
2.3. Izolacija RNA .....	11
2.4. Određivanje količine i kakvoće DNA.....	12
2.5. Izolacija genomske DNA.....	13
2.6. Provjera oligonukleotidnih početnica .....	13
2.7. Tretman DNazom i obrnuto prepisivanje RNA u komplementarnu DNA.....	15

2.8. Kvantitativni PCR.....	16
2.9. Statistička obrada podataka .....	17
3. REZULTATI .....	18
3.1. Kvaliteta izolirane ukupne RNA iz korijena i izdanka pšenice .....	18
3.2. Specifičnost početnica za gene <i>mdhar</i> i <i>dhar</i> .....	19
3.3. Utjecaj različitih koncentracija selenata i selenita na ekspresiju gena <i>mdhar</i> u izdanku i korijenu pšenice .....	20
3.4. Utjecaj različitih koncentracija selenata i selenita na ekspresiju gena <i>dhar</i> u izdanku i korijenu pšenice .....	23
4. RASPRAVA.....	26
5. ZAKLJUČAK.....	29
6. LITERATURA .....	30

# 1. UVOD

## 1.1. Selen

### 1.1.1. Uloga, pozitivan i negativan utjecaj

Mikronutrijenti su tvari koje su ljudskom organizmu potrebni u malim količinama, a uključuju vitamine i elemente u tragovima (Hotz, 2013). Selen je mikronutrijent esencijalan za životinje i ljude, no nije i za biljke, koje inače predstavljaju glavni izvor selena u prehrani čovjeka i životinja (Pilon-Smits i Quinn, 2010). U malim koncentracijama selen ima pozitivan učinak na biljke jer štiti od negativnih učinaka abiotičkog stresa kao što su hladnoća (Chu i sur., 2010), suša (Hasanuzzaman i Fujita, 2011) i stres uzrokovan djelovanjem teških metala (Kumar i sur., 2012; Pandey i Gupta, 2015), istovremeno povećava nutritivnu vrijednost (Germ i sur., 2005) i produktivnost (Germ i sur., 2005) te štiti biljke od patogena i insekata (Freeman i sur., 2006; Quinn i sur., 2010). Kod životinja, pozitivan utjecaj selena se očituje u njegovim antikancerogenim i antioksidacijskim svojstvima, ujedno pozitivno djeluje i na reproduktivni sustav, metabolizam tiroidnih hormona kao i na imunološki odgovor (Gupta i Gupta, 2017). Za čovjeka je najvažnija antioksidacijska i antikancerogena uloga selena (Reid i sur., 2008), a nedostatak ovog elementa uzrokuje kardiovaskularna oboljenja i različite vrste tumora, kao i poremećaje u rastu i radu štitne žlijezde (Reeves i Hoff man, 2009).

### 1.1.2. Toksičnost selena

Pri velikim koncentracijama selena dolazi do pojave njegovog toksičnog djelovanja (selenoze) i tada selen djeluje kao prooksidant, odnosno uzrokuje oksidacijski stres u biljkama, povećava akumulaciju reaktivnih kisikovih jedinki (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) i smanjuje vitalnost stanica (Gupta i Gupta, 2017). Zbog velike kemijske sličnosti sa sumporom, biljke koriste iste puteve za asimilaciju i metabolizam selena i sumpora, a do toksičnosti dolazi kada se sumpor zamjeni selenom čime se narušava struktura te sama funkcija molekula u kojima je došlo do zamjene (Gupta i Gupta, 2017). Velike i toksične koncentracije selena mogu uzrokovati oštećenje membrana stanica, nepravilnosti u metaboličkim putevima i negativno djeluju na funkciju fotosintetskog sustava (Wang i sur., 2012). Selen je važan za katalitičko djelovanje nekih selenoproteina kao što su glutation-

peroksidaza i tioredoksin-reduktaza čije je djelovanje antioksidacijsko i usmjereno na jačanje imunološkog sustava (Kaur i sur., 2014). Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) preporučuje optimalnu količinu selena od 50-55 µg dnevno (WHO, 2009).

Poznata su dva mehanizma putem kojih selen toksično djeluje na biljke. Prvi mehanizam se odnosi na zamjenu cisteina i metionina sa selenocisteinom i selenometioninom. Taj mehanizam uzrokuje oštećenje proteina i promjene u njihovoj strukturi i funkciji. Drugi mehanizam se odnosi na induciranje oksidacijskog stresa što obuhvaća generiranje ROS-a koje će dovesti do pojave oksidacijskog stresa i povećanja aktivnosti enzima glutation-peroksidaze (Gupta i Gupta, 2017).

### **1.1.3. Selen u okolišu i njegovi oblici**

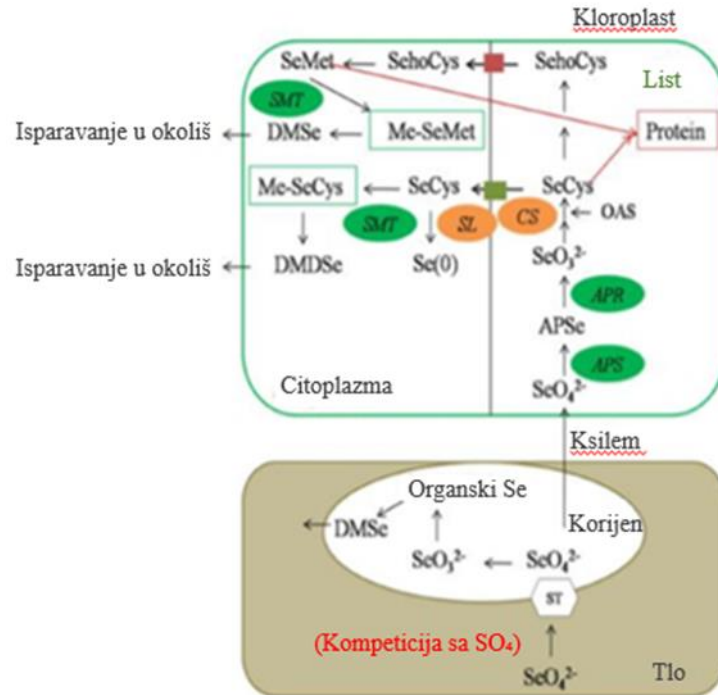
Selen u okolišu pronalazimo u sedimentnim stijinama (White i sur., 2004)., a danas ga u sve većim koncentracijama možemo naći u podzemnim vodama zbog prekomjerne upotrebe gnojiva koja su bogata selenom. Koncentracija selena u većini tala se nalazi u rasponu od 0,01 do 2 mgxkg<sup>-1</sup>, a u okolišu ga možemo naći u organskom i anorganskom obliku. Organski oblici selena su selenocistein (SeCys) i selenometionin (SeMet), dok u anorganske oblike ubrajamo selenid ( $Se^{2-}$ ), selenit ( $SeO_3^{2-}$ ), selenat ( $SeO_4^{2-}$ ), i elementarni selen ( $Se^0$ ) (Sors i sur., 2005; Bodnar i sur., 2012). Raspoloživost organskih oblika selena je veća od raspoloživosti anorganskih oblika (Hawkesford i Zhao, 2007), a smanjuje se smanjenjem pH vrijednosti, povećanjem sadržaja gline, organskih tvari i željeznih oksida i hidroksida (Gissel-Nielsen i sur., 1984). Selenat i selenit se razlikuju u mobilnosti i apsorpciji, kao i u pH vrijednosti tla u kojem se nalaze. Tako se selenat može pronaći u alkalnim tlima i tlima koja su dobro opskrbljena vlagom, dok je selenit prisutan u kiselim i neutralnim mineralnim tlima koja nisu bogata vlagom (Elrashidi i sur., 1987). Najzastupljeniji oblik selena na poljoprivrednim površinama je selenat kojeg karakterizira veća topljivost u usporedbi sa selenitom (Sors i sur., 2005). Selenit pokazuje veću toksičnost od selenata, ali selenat ima veću topivost (Masscheleyn i sur., 1990). Selenat se ne adsorbira na čestice tla i zbog toga se lako ispiri, dok se selenit brzo adsorbira i otporan je na ispiranje te predstavlja dugotrajan izvor selena za biljke (Fio i sur., 1991).



#### 1.1.4. Unos, translokacija i metabolizam u biljkama

Asimilacija, translokacija i metabolizam selena ovise o nekoliko čimbenika: o razvojnom stadiju biljne vrste i samoj biljnoj vrsti, o fiziološkim uvjetima tla (pH i salinitet), o obliku i koncentraciji selena te o aktivnosti membranskih prijenosnika i transportnih puteva (Li i sur., 2008). Selen u biljku ulazi putem transportera u membrani korijena i to u obliku selenata, selenita i organskih spojeva (SeCys i SeMet). S obzirom na veliku sličnost između selena i sumpora (Bodnar i sur., 2012), postoji kompeticija za transportere koji se nalaze na membrani korijena (Sors i sur., 2005). Unos selenata odvija se pomoću transportera za sulfate koji kod različitih biljnih vrsta imaju različit afinitet za sulfate i selenat, dok se unos selenita odvija putem transportera za fosfate.

Prvi korak u metabolizmu selena, ako je on u biljku unesen u obliku selenata, je redukcija selenata u selenit pomoću dva enzima: ATP-sulfurilaze (APS) i APS-reduktaze (APR). APS katalizira hidrolizu ATP-a kako bi nastao adenzin-fosfoselenat koji će se pomoću APR-a reducirati u selenit (Sors i sur., 2005). Idući korak u metabolizmu je pretvaranje selenita u selenid djelovanjem enzima sulfit-reduktaze, a taj korak u biljkama može biti reduciran glutathionom ili glutaredoksinima (Wallenberg i sur., 2010). Nakon toga se nastali selenid povezuje sa O-acetilserinom (OAS) pri čemu nastaje selenocistein (SeCys) djelovanjem enzima cistein-sintaze (CS). Daljnji koraci ovise o biljnoj vrsti i uvjetima okoliša. Može doći do pretvorbe SeCys u elementarni selen djelovanjem enzima SeCys-liaze (SL), do metilacije u metil-SeCys (Me-SeCys) djelovanjem enzima SeCys-metiltransferaze (SMT) ili se nizom enzima može pretvoriti u selenometionin (SeMet). Metilirani oblici kao što su metil-selenometionin (Me-SeMet) i metil-selenocistein (Me-SeCys) pretvaraju se u hlapljive i netoksične spojeve koji isparavaju u atmosferu: DMSe (dimetilselenid) kod neakumulatora i DMDS (dimetildiselenid) kod hiperakumulatora (Pilon-Smits i Quinn, 2010) (Slika 1).



**Slika 1.** Shematski prikaz metabolizma selena u biljnim stanicama. APS, ATP-sulfurilaza; APR, APS-reduktaza; CS, cistein-sintaza; SL, selenocistein-liaza; SMT, selenocistein-metil-transferaza; DMDSe, dimetil-diselenid; DMSe, dimetil-selenid; MeSeCys, metil-selenocistein; Me-SeMet, metil-selenometionin; OAS, O-acetilserin; SeCys, selenocistein; SehoCys, Se-homocistein; SeMet, selenometionin;  $\text{SeO}_3^{2-}$ , selenit (anion);  $\text{SeO}_4^{2-}$ , selenat (anion); (preuzeto i prilagođeno prema Gupta i Gupta, 2017).

### 1.1.5. Akumulacija u biljkama

Koncentracija selena je veća u mladim listovima u usporedbi sa starijim (Cappa i sur., 2014). Biljke se s obzirom na stupanj akumulacije selena mogu podijeliti na: hiperakumulatore, sekundarne akumulatore i neakumulatore (Bodnar i sur., 2012). Hiperakumulatori imaju sposobnost akumulacije velike količine selena ( $> 1000 \text{ mgxkg}^{-1}$  suhe biljne tvari), selen akumuliraju u metiliranim oblicima cisteina i metionina (SeCys i SeMet) i u njih se ubrajaju rodovi koje obitavaju na tlima koja su bogata selenom kao što su: *Stanleya*, *Astragalus*, *Neptunia* i *Conopsis*. Sekundarni akumulatori mogu akumulirati količine selena u rasponu od 100 do  $1000 \text{ mgxkg}^{-1}$  suhe biljne tvari pri čemu selen neće pokazivati toksične učinke i u njih se ubrajaju vrste roda *Brassica*, *Helianthus* i *Aster*. Kod

neakumulatora selen akumulira u malim količinama ( $< 100 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$  suhe biljne tvari) i u neakumulatore se ubrajaju trave i žitarice. U biljnim stanicama selen se najčešće akumulira u vakuolama (Mazej i sur., 2008) i biva izlučen sulfatnim transporterima prisutnim u tonoplastu (Gigolashvili i Kopriva, 2014).

## **1.2. Biofortifikacija**

Biofortifikacija predstavlja postupak ili strategiju koja za cilj ima povećanje koncentracije hranjivih tvari u jestivim dijelovima biljaka i samim time dovodi do povećanja prehrambene vrijednosti biljaka koje su značajne za ishranu ljudi (kukuruz, pšenica, riža, grašak, krumpir i dr.). Agronomske strategije za povećanje koncentracije mineralnih elemenata u jestivim tkivima uglavnom se oslanjaju na primjenu mineralnih gnojiva i/ili povećanju topljivosti i mobilizacije mineralnih elemenata u tlu. U situacijama gdje se mineralni elementi ne translociraju lako u tkiva koja se koriste za ishranu, vrši se folijarna primjena topljivih anorganskih gnojiva (White i Broadley, 2008). Ovaj način ograničen je na nekoliko mikronutrijenata kao što su jod, selen i cink (Hotz, 2013) i kulture koje se u velikoj mjeri koriste u prehrani kako bi biofortifikacija bila što uspješnija (Boldrin i sur., 2013). Biljke sintetiziraju selenoproteine iz selena koji se nalazi u tlu pa tako sadržaj selena u usjevima ovisi o tome koliko je tlo bogato selenom. Žitarice nisu bogate mineralnim hranjivim tvarima, a kako su one uobičajena prehrana u siromašnim krajevima, nastoji ih se obogatiti potrebnim tvarima za fiziološke funkcije u ljudskim organizmima. Žitarica koja se najčešće koristi za biofortifikaciju je pšenica (*Triticum aestivum* L.) jer predstavlja važan izvor selena u ljudskoj ishrani (Lyons i sur., 2003). Pšenica je neakumulator, a prag toksičnosti ovisi o obliku kojeg akumulira (Terry i sur., 2000).

## **1.3. Oksidacijski stres, proizvodnja ROS-a u biljkama i njihovo uklanjanje antioksidansima**

### **1.3.1. Oksidacijski stres**

Do oksidacijskog stresa u biljkama dolazi zbog nakupljanja ROS-a koji se kontinuirano proizvodi kao posljedica aerobnog metabolizma (respiracija, fotosinteza) (Apel i Hirt, 2004). U ROS se ubrajaju superoksidni anion ( $O_2^{\bullet-}$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), hidroksilni radikal ( $OH^{\bullet}$ ), singletni kisik ( $^1O_2$ ), metilni radikal ( $CH_3^{\bullet}$ ) i slobodni radikali

lipidne peroksidacije (LOO•, ROO•) (Feng i sur., 2012). U fiziološkim uvjetima, sinteza ROS-a je ograničena, dok pri stresnim uvjetima dolazi do pojačane sinteze (Feng i sur., 2012). Za uklanjanje ROS-a biljke koriste enzimske (superoksid-dismutaza, askorbat-peroksidaza, glutation-peroksidaza, katalaza i dr.) i neenzimske mehanizme u kojima sudjeluju askorbat (Asc), glutation (GSH), flavonoidi, karotenoidi, koenzim Q10 i vitamin E (Apel i Hirt, 2004).

### **1.3.2. Antioksidansi**

Askorbat (Asc) i glutation (GSH,  $\gamma$ -glutamil-cisteinil-glicin) ubrajaju se u neenzimske antioksidanse i sudjeluju u važnim procesima u biljnim stanicama. Nalaze se u većini staničnih odjeljaka i važni su pri stresnim uvjetima kojima se biljka izlaže jer štite od pojave oksidacijskog stresa na dva načina: izravno i neizravno aktivacijom obrambenih mehanizama. U aktivaciji različitih obrambenih mehanizama važnu ulogu ima omjer između oksidiranog i reduciranog oblika određenog antioksidansa, a ne samo njihova ukupna količina (Latowski i sur., 2010).

Glutation je tripeptid male molekularne mase izgrađen od glutamata, cisteina i glicina (Mullick i sur., 1986), a njegova visoka koncentracija i velik redoks potencijal predstavljaju prvu obrambenu liniju protiv slobodnih radikala te ga čine snažnim antioksidansom (Ashtiani, 2011). Glutation postoji u dva oblika. Prvi oblik je monomer i naziva se reducirani glutation (GSH) kojeg karakterizira jaka nukleofilnost centralnog cisteina koji zapravo predstavlja njegovo aktivno mjesto, što omogućuje njegovo djelovanje kao reducensa, dok je drugi oblik dimer koji se sastoji od dvije molekule povezane disulfidnom vezom i predstavlja oksidirani oblik (GSSG) (Mullick i sur., 1986). Više od 90% glutaciona u stanicama i tkivima nalazi se u reduciranom obliku (Mullick i sur., 1986). Nizom istraživanja potvrđeno je da GSH može reagirati sa selenom unesenim u biljku te na taj način stvarati SeCys i SeMet koji se ugrađuju u selenoproteine (Terry i sur., 2000). Glutation je važan u ekspresiji obrambenih gena (Dron i sur., 1988), redoks kontroli stanične diobe (Shaul i sur., 1996), transportu sulfata, prijenosu signala, detoksifikaciji ksenobiotika, senescenciji i obrani od patogena (Noctor i Foyer, 1998). Askorbat (askorbinska kiselina, vitamin C) je topiv u vodi, u biljkama se akumulira u malim koncentracijama u fotosintetskim i nefotosintetskim tkivima te predstavlja glavni primarni antioksidans koji direktno reagira s

ROS-om (Buettner i Jurkiewicz, 1996). Također, važna je njegova uloga u regulaciji fotosinteze (Forti i Elli, 1995) i regulaciji staničnog ciklusa (Kerk i Feldman, 1995), a može djelovati i kao kofaktor nekih enzima (Latowski i sur., 2010). Smanjena količina askorbata u meristemima zaustavlja stanicu u G1 fazi (Noctor i Foyer 1998), te na taj način ima ulogu u regulaciji staničnog ciklusa. Kako je prethodno navedeno, askorbat i glutacion imaju važne funkcije u različitim procesima u biljkama, a jedan od njih je askorbat-glutacion ciklus ili Halliwell-Asada ciklus. U ovom ciklusu cilj je ukloniti vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) i to se postiže uz pomoć enzima askorbat-peroksidaze (APX) koja koristi dvije molekule askorbata za redukciju vodikovog peroksida u vodu, pri čemu askorbat služi kao reducens i oksidira se u dvije molekule monodehidroaskorbata (MDHA). MDHA je radikal koji ima kratki vijek trajanja koji će se, ako ne dođe do njegove brze redukcije, disproporcionirati u askorbat i dehidroaskorbat (DHA). Direktnom redukcijom MDHA u askorbat djelovanjem enzima MDHA-reduktaze uz NAD(P)H kao elektron-donor dolazi do spontane proizvodnje dehidroaskorbata (DHA). DHA se istovremeno reducira u askorbat djelovanjem DHA-reduktaze koja koristi GSH kao redukcijski supstrat koji se reducira u GSSG. Osim NAD(P)H, elektron-donor može biti feredoksin i citokrom b. Ciklus je završen kada enzim glutacion-reduktaza (GR) katalizira pretvorbu GSSG u GSH uz pomoću NAD(P)H kao reducensa (Apel i Hirt, 2004).

#### **1.4. Cilj završnog rada**

S obzirom da je poznato da tretman selenom ima značajan utjecaj na aktivnosti enzima askorbat-glutationskog ciklusa, cilj ovog završnog rada je bio utvrditi kakav utjecaj ima tretman selenom na ekspresiju gena dva enzima askorbat-glutationskog ciklusa, *dhar* i *mdhar*, u klijancima pšenice. Također, važan cilj je bio utvrditi da li kemijski oblik selena, selenat i selenit te tip biljnog organa, izdanak i korijen, ima značajan utjecaj na ekspresiju navedenih gena.

## 2. MATERIJALI I METODE

### 2.1. Biljni materijal

U ovom eksperimentu korišteno je sjeme ozime pšenice (*Triticum aestivum* L.), sorte Kraljica, proizvedena na Poljoprivrednom institutu u Osijeku. Ova sorta je najraširenija sorta u proizvodnji u Hrvatskoj zbog brojnih odlika kao što je visoka rodnost i otpornost na niske temperature i polijeganje.

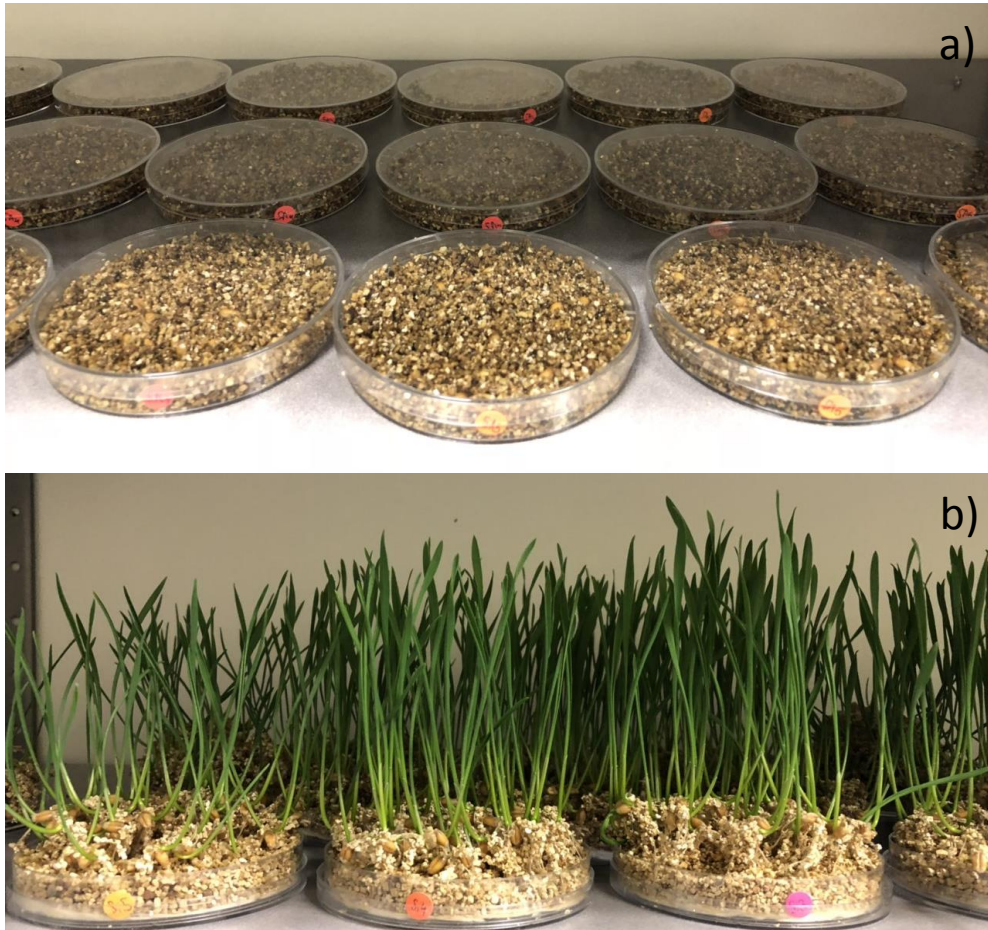
### 2.2. Opis eksperimenta

Prije naklijavanja, sjeme pšenice je sterilizirano tako što je, nakon pranja vodovodnom vodom, kratko držano u 96%-tnom etanolu uz miješanje. Nakon sterilizacije alkoholom sjeme je isprano sterilnom dH<sub>2</sub>O, te je dodatno sterilizirano 8 min u 1%-noj otopini Izosana uz dodatak Tween-a (u konačnoj koncentraciji od 0,001%) uz stalno miješanje. Tween smanjuje površinsku napetost vode i poboljšava dopiranje Izosana do sjemenki. Sjeme je potom nekoliko puta dobro isprano u sterilnoj dH<sub>2</sub>O, u kojoj je i ostavljeno preko noći u hladnjaku na temperaturi od +4°C kako bi sjemenke nabubrile. Nakon bubrenja sjeme je postavljeno na klijanje u Petrijeve zdjelice (Ø 90 mm, 50 sjemenki/Petrijevci) sa sterilnim vermikulitom (5 g) koji je prethodno natopljen s 20 mL hranjive otopine po Hoaglandu (pH 6,00; Tablica 1; Hoagland i Arnon 1950). Pšenica je uzgajana na hranjivim podlogama s rastućim koncentracijama selena, koji je bio primjenjivan u dva različita oblika, u obliku selenita i selenata. Stock otopine natrijeva selenata (Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub>) i natrijeva selenita (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) dodane su u hranjivu otopinu do konačne koncentracije od 0,1, 5 i 100 mg×L<sup>-1</sup> selenata, te 0,1, 5 i 50 mg×L<sup>-1</sup> selenita. Kontrolna skupina pšenice rasla je na hranjivoj podlozi bez dodatka selena. Pšenica je uzgajana u klima-sobi na temperaturi od 25°C pod umjetnom rasvjetom led lampi, pri svjetlosnom režimu 16 sati dan/8 sati noć tijekom 7 dana, uz redovito zalijevanje s 10-15 mL hranjive otopine bez dodatka selena (Slika 2). Nakon tjedan dana rasta izdanci i korijenje je uzorkovano za potrebe izolacije RNA.

**Tablica 1.** Sastav hranjive otopine po Hoaglandu.

<i>Makronutrijenti – stock otopine</i>	Mr (g/mol)	c (M)	$\gamma$ (g/L)	Volumen za 1L (mL)	Element	Koncentracija elementa u 1L otopine (mM)
<i>NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i>	115,03	1	115,03	1	P	1
<i>KNO<sub>3</sub></i>	101,11	1	101,11	6	K	6
<i>Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub></i>	236,16	1	236,16	4	Ca	4
<i>MgSO<sub>4</sub>*7H<sub>2</sub>O</i>	246,47	1	246,47	2	Mg	2
<i>Mikronutrijenti – stock otopine</i>	Mr (g/mol)	c (mM)	$\gamma$ (g/L)	Volumen za 1L (mL)	Element	Koncentracija elementa u 1L otopine ( $\mu$ M)
<i>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></i>	61,84	46,25	2,86		B	46,25
<i>MnCl<sub>2</sub>*4H<sub>2</sub>O</i>	197,91	9,15	1,81		Mn, Cl	9,15
<i>ZnSO<sub>4</sub>*7H<sub>2</sub>O</i>	289,55	0,77	0,22	1	Zn	0,77
<i>CuSO<sub>4</sub>*5H<sub>2</sub>O</i>	249,71	3,20	0,8		Cu	3,20
<i>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>*2H<sub>2</sub>O</i>	241,97	1,03	0,25		Mo	1,03
<i>Fe-EDTA</i>	346,08	20	6,92	0,25	Fe	5





**Slika 2.** Postavljeni eksperiment: a) sjeme ozime pšenice (*Triticum aestivum* L.) na vermikulitu s hranjivom otopinom po Hoaglandu s dodatkom selenata i selenita u različitim koncentracijama. b) Pšenica nakon 7 dana rasta.

### 2.3. Izolacija RNA

Prije same izolacije RNA, radne površine i pribor koji se koristi potrebno je očistiti otopinom za dekontaminaciju (*RNase AWAY*) koja uklanja DNA i RNaze s tretiranih površina. Sav korišten pribor (tipsevi, mikroeprevete, mikropistile i dr.) i otopine bili su sterilni i adekvatno dekontaminirani.

Ukupna RNA izolirana je iz svježeg biljnog tkiva, iz korijena i izdanka posebno, pomoću komercijalnog reagensa *TRI Reagent (Applied Biosystems)* koji sadrži fenol i gvanidintiocijanat u monofaznoj otopini. Oko 50 mg tkiva smrznuto je u tekućem dušiku, te usitnjavano drobljenjem mikropistilom u mikroepreveti (1,5 mL). Usitnjeni smrznuti prah je zatim homogeniziranu 1 mL reagensa *TRI*, pomoću mikropistile. Nakon 5 min inkubacije, dodatkom 100  $\mu$ L bromokloropropana (BCP) i inkubacijom 10 min pri sobnoj temperaturi, homogenat se razdvaja u dvije faze (vodenu i organsku), nakon čega slijedi centrifugiranje (15 min, 12000 $\times$ g, 4°C). Centrifugiranjem se homogenat razdvoji u 3 sloja: gornji (vodeni) sloj koji sadrži RNA, međusloj sadrži DNA i donji (organski) sloj sadrži denaturirane proteine. Vodeni sloj u kojem se nalazi RNA (oko 400  $\mu$ L) prenesen je u novu označenu mikroeprevetu uz dodatak 500  $\mu$ L izopropanola za precipitaciju RNA. Sadržaj mikroeprevete je promiješan inverznim okretanjem 10 sekundi i inkubiran na sobnoj temperaturi 5-10 minuta. Nakon centrifugiranja (12000 $\times$ g, 8 min, 4°C) supernatant je uklonjen, a bijeli talog RNA ispiran od nečistoća s pomoću 1 mL 75%-tnog etanola, pri čemu se sadržaj mikroeprevete miješa inverznim okretanjem. Etanol je uklonjen centrifugiranjem (7500 $\times$ g, 5 min), dekantiranjem supernatanta, te držanjem taloga u otvorenim mikroeprevetama na sobnoj temperaturi kako bi zaostali etanol ispario, pri čemu treba voditi računa da se talog RNA ne presuši. RNA je resuspendirana u deioniziranoj vodi (*RNAse-free Water*), RNA izdanka u 50  $\mu$ L, a RNA korijena u 30  $\mu$ L. RNA je pohranjena na -80 °C do korištenja.

#### **2.4. Određivanje količine i kakvoće DNA**

Koncentracija RNA mjerena je spektrofotometrijski na 260 nm pomoću instrumenta NanoPhotometer N60-Touch (Implen). Osim koncentracije, mjereno je i omjer A260/A280 (pokazatelj kontaminacije proteinima) i A260/A230 (pokazatelj kontaminacije fenolima) čime je dobivena informacija o čistoći RNA (čista RNA ima omjer od 1,8 do 2,0).

Ukupna RNA i PCR produkti analizirani su i horizontalnom elektroforezom na agaroznom gelu. Agarozni gelovi (1% i 1,5%) pripremljeni su u 0,5 $\times$ TBE puferu (45 mM Tris-borat, 1 mM EDTA, pH 8,3) uz dodatak boje za vizualizaciju nukleinskih kiselina *SYBR® Safe DNA Gel Stain*. Uzorci RNA su prije nanošenja na gel pomiješani s puferom za nanošenje uzoraka (*Blue/Orange Loading dye*, 6 $\times$ ) u konačnoj koncentraciji 1 $\times$ . Na gel

je nanošeno 5  $\mu$ L uzorka ukupne RNA, odnosno 10 $\mu$ L PCR produkata. Uz uzorke, na gel se nanosi i standard (3  $\mu$ L) za određivanje duljine odsječaka *100 bp DNA Ladder* (Invitrogen TM). Elektroforeza je provođena u kadici s 0.5 $\times$ TBE puferom, pri jakosti struje od 50 V dok uzorci ne uđu u gel, nakon čega se uzorci razdvajaju pri 100 V. Elektroforezom se uzorci RNA i DNA razdvajaju na vrpce koje su vizualizirane pomoću UV transiluminatora te dokumentirane fotografiranjem pomoću kamere Kodak EDAS 290 (Eastman Kodak).

## 2.5. Izolacija genomske DNA

Izolacija genomske DNA provođena je sa svrhom provjere specifičnosti i kvalitete sintetiziranih oligonukleotidnih početnica. Za izolaciju ukupne DNA korišten je pufer s cetiltrimetilamonijevim bromidom (CTAB). Tkivo (oko 0,1 g) je usitnjavano u mikroepreveti (1,5 mL) s mikropistilom, pomoću tekućeg dušika, nakon čega je homogenizirano s 0,5 mL 3%-tnog CTAB pufera (2% CTAB, 1,4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,00, 20 mM EDTA, 0,2% 2-merkaptoetanol). Homogenat je nakon vorteksiranja inkubiran 20 min na 65°C. Nakon inkubacije homogenatu je dodano 0,5 mL kloroforma, pri čemu je smjesa vorteksirana centrifugirana (10 min, 4°C, 13000 $\times$ g). Homogenat je nakon centrifugiranja razdvojen u dva sloja pri čemu je gornji vodeni sloj s DNA pažljivo prebačen u novu mikroeprevetu, a DNA je zatim precipitirana dodatkom jednakog volumena ledeno hladnog izopropanola uz miješanje inverznim okretanjem. Nakon centrifugiranja (15 min, 4°C, 13000 $\times$ g) izopropanol je dekantiran, a talog DNA ispran od zaostalih soli dodatkom 0,5 mL ledeno hladnog 70%-tnog etanola. Nakon ponovnog centrifugiranja (10 min, 4°C, 13000 $\times$ g) etanol je uklonjen dekantiranjem, a talog osušen na zraku pri čemu treba paziti da se ne presuši. Talog je resuspendiran u 50  $\mu$ L deionizirane vode (*RNAse-free Water*), te je DNA pohranjena na +4 °C do analize.

## 2.6. Provjera oligonukleotidnih početnica

Sljedovi oligonukleotidnih početnica za umnažanje odsječaka referentnog gena za aktin (*actin; Ta54825*) preuzete su od Paolacci i sur. (2009), dok su sljedovi početnica za gen *mdhar (TaMDHAR4)*, NCBI pristupni broj: JX034702) koji kodira enzim MDHAR, i gen *dhar* (NCBI pristupni broj: GQ494009) koji kodira enzim DHAR, dizajnirani pomoću

softverskog alata Primer3Plus. U tablici 2. navedene su korištene početnice s oligonukleotidnim slijedom i očekivanom veličinom PCR produkata.

Provjera početnica za umnažanje gena *mdhar* i *dhar* provedena je metodom lančane reakcije polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR). Za provedbu PCR-a korištena je komercijalna reakcijska smjesa (*EmeraldAmp® GT PCR Master Mix*, Takara) koja sadrži DNA polimerazu, četiri dNTP-a, reagens za gustoću i zelenu boju u odgovarajućem reakcijskom puferu. Reakcijska smjesa za PCR ukupnog volumena 25 µL sastojala se od 1× reakcijske smjese *Emerald*, 0.2 µM svake početnice, kalupa (< 500 ng) i vode do konačnog volumena. Kao kalup korištena je cDNA (1 µL) dobivena obrnutim prepisivanjem mRNA, te genomska DNA pšenice (1 µL), dok je negativna kontrola (N) sadržavala dH<sub>2</sub>O. PCR se odvijao u 35 ciklusa u uređaju za PCR (Applied Biosystems) a uvjeti PCR-a navedeni su u Tablici 3.

**Tablica 2.** Slijedovi oligonukleotidnih početnica korišteni za umnažanje odsječaka gena *actin*, *mdhar* i *dhar*, lančanom reakcijom polimerazom, te očekivanom veličinom PCR produkata.

Početnica/Gen	Oligonukleotidni slijed	Veličina PCR produkta
FW: <i>actin</i> ( <i>Ta54825</i> )	TGACCGTATGAGCAAGGAG	215 bp
REV: <i>actin</i> ( <i>Ta54825</i> )	CCAGACAACCTCGCAACTTAG	
FW: <i>TaMDHAR4</i>	AGGCGTTATCGATGGTTGTC	105 bp
REV: <i>TaMDHAR4</i>	GCACGTCTTTCTTGCTTTCC	
FW: <i>dhar</i>	CTGTGTATAACGGTGGTGATGG	153 bp
REV: <i>dhar</i>	TCAAGAACGTGACGAAGGTG	

**Tablica 3.** Uvjeti reakcije PCR za umnažanje gena *actin*, *mdhar* i *dhar*.

Uvjeti PCR-a	Temperatura	Vrijeme
Početna denaturacija	95 °C	3 min
35 ciklusa:		
Denaturacija	95 °C	30 s
Sparivanje početnica	60 °C	30 s

<i>Produljivanje lanca DNA</i>	72 °C	45sec
<i>Završno produljivanje lanca DNA</i>	72 °C	4 min

## 2.7. Tretman DNazom i obrnuto prepisivanje RNA u komplementarnu DNA

Neposredno prije obrnutog prepisivanja (engl. *Reverse Transcription*) ukupne RNA u komplementarnu DNA (cDNA), alikvot RNA tretiran je DNazom I (*RNase-Free DNase*, Promega) kako bi se uklonila moguća kontaminacija genomskom DNA, do koje je moglo doći prilikom izolacije RNA. Reakcijska smjesa sastojala se od 1× reakcijskog pufera (1 µL), DNaze (1 U×µg<sup>-1</sup> RNA), uzorka ukupne RNA (2 µg), i vode do konačnog volumena od 10 µL (zajedno s otopinom za zaustavljanje reakcije). Reakcijska je smjesa inkubirana 30 min na 37°C, nakon čega je reakcija zaustavljena dodatkom 1 µL otopine za zaustavljanje reakcije (*DNase Stop Solution*) i ponovnom inkubacijom 10 min na 65 °C kako bi se u potpunosti inaktivirale DNaze. Cjelokupni volumen reakcijske smjese (10 µL) dodaje se u reakciju za provođenje obrnutog prepisivanja.

Obrnuto prepisivanje u cDNA provedeno je pomoću paketa reagensa za kvantitativnu analizu RNA obrnutim prepisivanjem i kvantitativnim PCR-om (qPCR; *GoTaq 2-Step RT-qPCR*, Promega) prema uputama proizvođača. Dio reakcijske smjese za obrnuto prepisivanje RNA (11 µL), koji se sastojao od izdvojene RNA (odnosno smjese dobivene tretmanom DNazom) i 0.5 µg oligo d(T)<sub>18</sub> početnica (1 µL) inkubirano je 5 minuta na +70 °C sa svrhom denaturacije početnica i sekundarnih struktura unutar molekule RNA. Nakon denaturacije smjesa je hlađena 5 min na 4 °C. Ohlađenoj je smjesi zatim dodan drugi dio reakcijske smjese za obrnuto prepisivanje koji se sastojao od 1× reakcijskog pufera *GoScript*, 0,5 mM smjese četiri nukleotida, 20 U inhibitora nukleaza (*Recombinant RNasin*), 1 U reverzne transkriptaze *GoScript* i vode do konačnog volumena od 20 µL. Reakcijska je smjesa inkubirana u PCR uređaju prema temperaturnom režimu koji je prikazan u Tablici 4. Nastala cDNA pohranjena je na -20°C do upotrebe za QPCR.

**Tablica 4.** Uvjeti reakcije za obrnuto prepisivanje.

Uvjeti PCR-a	Temperatura	Vrijeme
Sparivanje početnica	25 °C	5 min
Sinteza cDNA	42 °C	1 sat
Inaktivacija reverzne transkriptaze	70 °C	15 min
Hlađenje	4 °C	∞

## 2.8. Kvantitativni PCR

Razina ekspresije gena *actin*, *mdhar* i *dhar* određena je qPCR-om pomoću paketa reagensa za kvantitativnu analizu RNA obrnutim prepisivanjem i qPCR-om (*GoTaq 2-Step RT-qPCR*, Promega) prema uputama proizvođača. Komercijalna reakcijska smjesa za qPCR (2×, *GoTaq qPCR Master Mix*) sadrži *hot-start* DNA polimerazu, smjesu četiri dNTP-a, ione  $Mg^{2+}$  u odgovarajućem puferu, te fluorescentnu boju *SYBR Green I* koja se veže na dvolančanu DNA pri čemu emitira fluorescencu. Uzorci cDNA su za potrebe kvantitativne analize razrijeđeni 5× u deioniziranoj vodi (*nuclease-free*) te je 5 μL cDNA pipetirano u jažice mikrotitarske pločice (96 jažica). Na mikrotitarsku su pločicu uz cDNA pipetirani serijski razrijeđeni referentni standardi (3× serijska razrijeđenja cDNA kontrolne skupine pšenice). Na pločicu je nakon cDNA u jažice dodana i reakcijska smjesa za qPCR do konačnog volumena od 25 μL. Reakcijska smjesa za qPCR sastojala se od *GoTaq qPCR* reakcijske smjese (1×), 200 nM svake specifične početnice, 0,25 μL CXR referentne boje i vode (*nuclease-free*) do konačnog volumena od 20 μL. Pripremljena mikrotitarska pločica je kratko centrifugirana kako bi se uklonili mjehurići zraka koji interferiraju s detekcijom. Pločica je potom stavljena u instrument za *real-time* PCR (StepOnePlus, Applied Biosystems). Standardna qPCR reakcija provedena je prema programu prikazanom u Tablici 5. Sva mjerenja su provedena u tri tehničke replike. Analiza standardne krivulje, krivulja disocijacija, te podataka dobivenih umnažanjem gena provedena je pomoću softverskog paketa StepOne v2.1.

**Tablica 5.** Program standardne qPCR reakcije za umnažanje i kvantifikaciju gena *actin*, *mdhar* i *dhar*.

<i>Uvjeti PCR-a</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Vrijeme</i>
<i>Aktivacija Hot-Start GoTaq polimeraze</i>	95 °C	10 min
<i>40 ciklusa:</i>		
<i>Denaturacija</i>	95 °C	15 s
<i>Sparivanje početnica i sinteza DNA</i>	60 °C	1min
<i>Disocijacija</i>	60-95 °C	

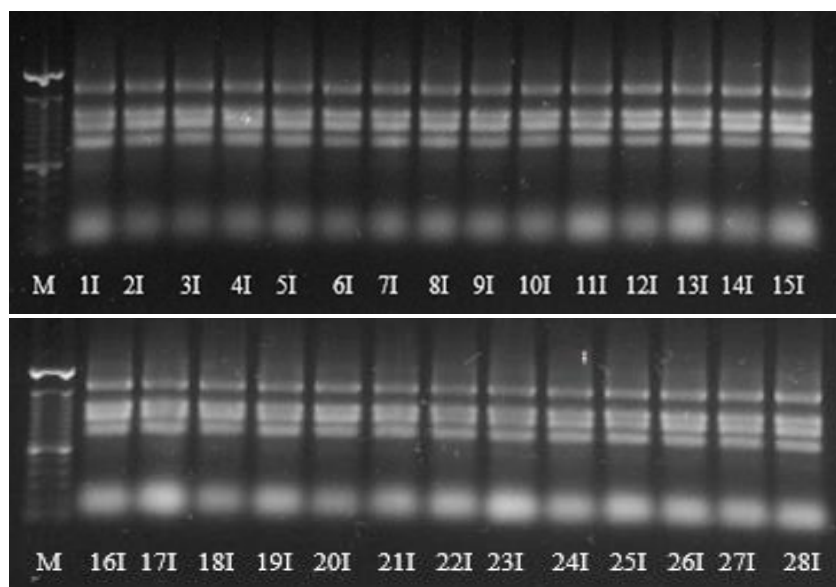
## 2.9. Statistička obrada podataka

Dobiveni podaci obrađeni su u statističkom softverskom paketu STATISTICA ver 13.3 (StatSoft Inc). Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti ( $n=4$ )  $\pm$  standardna devijacija. Jednofaktorska analiza varijance (engl. *one-way ANOVA*) korištena je kako bi se odredilo postoji li razlika između skupina pšenice tretiranih različitim koncentracijama selenata odnosno selenita. Nakon što je utvrđeno postojanje razlike korišten je post *hoc test* Tukey kako bi se odredilo između kojih skupina postoji razlika. Svi testovi provedeni su na razini značajnosti od 5% ( $p < 0,05$ ).

### 3. REZULTATI

#### 3.1. Kvaliteta izolirane ukupne RNA iz korijena i izdanka pšenice

S ciljem određivanja utjecaja tretmana rastućim koncentracijama različitih oblika selena na ekspresiju gena *mdhar* i *dhar* u korijenu i izdanku pšenice izolirana je ukupna RNA iz navedenih tkiva (Slika 4 i 5). Rezultati spektrofotometrijskog mjerenja omjera A260/A280 koji je uglavnom bio između 1,8 i 2,1 pokazatelj su čistoće izolirane RNA, odnosno ukazuju na odsutnost proteina u uzorku RNA. Omjer A260/A230, koji je pokazatelj kontaminacije fenolima, varirao je u manjoj ili većoj mjeri između pojedinih uzoraka, ali to nije utjecalo na daljnje analize. Budući da je RNA izrazito sklona degradaciji, elektroforezom je provjerena cjelovitost izolirane RNA. Ukupna RNA izdanka razdvojila se na četiri oštre vrpce koje predstavljaju redom 25S, 23S, 18S i 16S rRNA, te jednu širu i manje oštru vrpca koju čine molekule tRNA (Slika 4). Oštre vrpce kao i njihov intenzitet ukazuju na cjelovitost izolirane ukupne RNA. Osim toga, na gelu nije uočena kontaminacija s genomskom DNA.

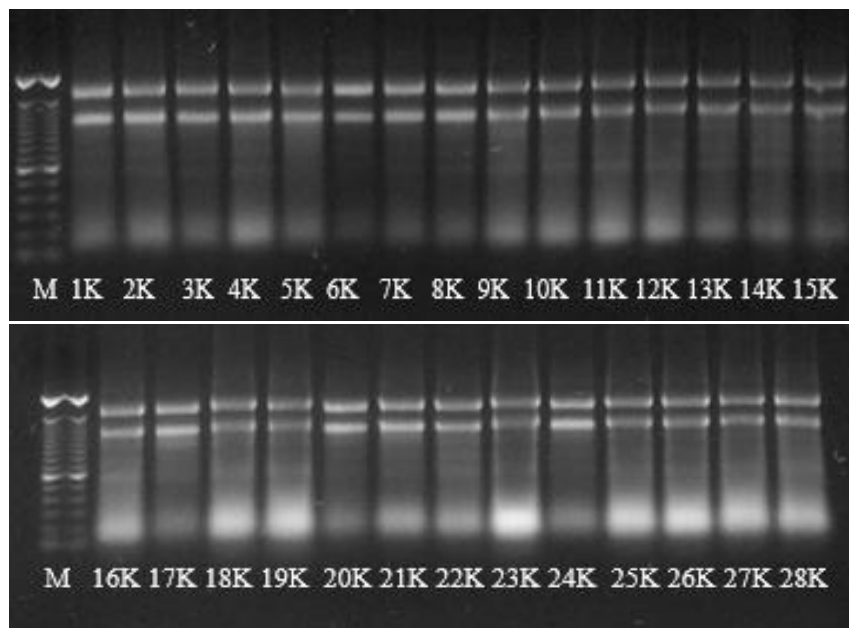


**Slika 4.** Kvaliteta ukupne RNA izolirane iz izdanka pšenice tretirane različitim koncentracijama selenita i selenata. M: standard duljine odsječaka DNA (*100 bp DNA Ladder*); 1I-4I: kontrolna skupina, 5I-8I: tretman s  $0,1 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$  selenata; 9I-12I: tretman s 5



mg×L<sup>-1</sup> selenata; 13I-16I: tretman s 100 mg×L<sup>-1</sup> selenata; 17I-20I: tretman s 0,1 mg×L<sup>-1</sup> selenita; 21I-24I tretman s 5 mg×L<sup>-1</sup> selenita; 25I-28I: tretman s 100 mg×L<sup>-1</sup> selenita.

Ukupna RNA korijena razdvojila se na dvije oštre vrpce koje predstavljaju redom 25S i 18S rRNA, te jednu širu i manje oštru vrpca koju čine molekule tRNA (Slika 5). Oštre vrpce kao i njihov intenzitet ukazuju na cjelovitost izolirane ukupne RNA. Također, na gelu nije uočena kontaminacija s genomskom DNA.

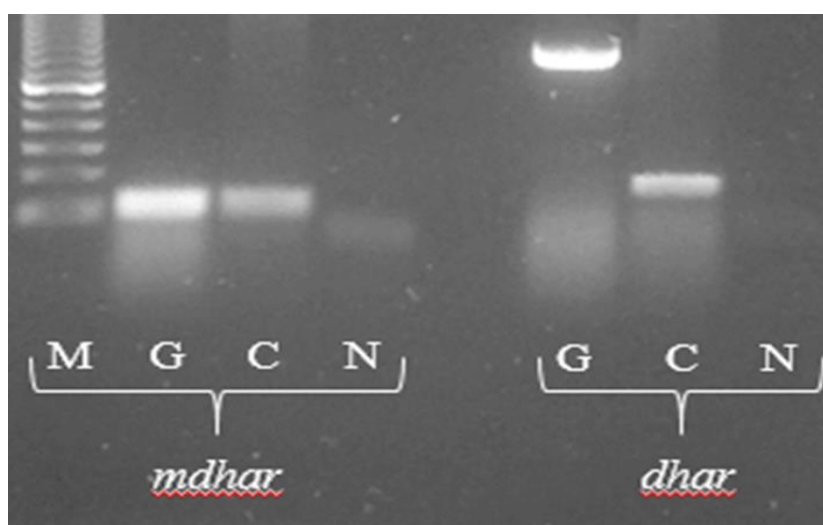


**Slika 5.** Kvaliteta ukupne RNA izolirane iz korijena pšenice tretirane različitim koncentracijama selenita i selenata. M: standard duljine odsječaka DNA (*100 bp DNA Ladder*); 1K-4K: kontrolna skupina, 5K-8K: tretman s 0,1 mg×L<sup>-1</sup> selenata; 9K-12K: tretman s 5 mg×L<sup>-1</sup> selenata; 13K-16K: tretman s 100 mg×L<sup>-1</sup> selenata; 17K-20K: tretman s 0,1 mg×L<sup>-1</sup> selenita; 21K-24K tretman s 5 mg×L<sup>-1</sup> selenita; 25K-28K: tretman s 100 mg×L<sup>-1</sup> selenita.

### 3.2. Specifičnost početnica za gene *mdhar* i *dhar*

Specifičnost i kvaliteta početnica za gene *mdhar* i *dhar* provjerena je PCR reakcijom u kojoj je kalup bila genomaska DNA i cDNA, te vizualizacijom amplikona na gelu. PCR reakcijom gena *mdhar* na kalupu genomaska DNA i cDNA dobivene su jednake vrpce veličine oko 105 bp koje odgovaraju veličini odsječka umnažanog gena. U negativnoj

kontrolni (N) se nadzire šmirasta vrpca manja od 100 bp, koja odgovara veličini *primer-dimera*. Odsutnost dimera u jažicama G i C upućuje na dominantnost umnažanja specifičnog fragmenta gena *mdhar*. Umnažanjem gena *dhar* na kalupu cDNA dobivena je vrpca veličine oko 150 bp što odgovara teoretskoj veličini fragmenta umnažanog gena (153 bp), dok je umnažanjem gena *dhar* na kalupu genomske DNA dobivena znatno veća vrpca veličine oko 800 bp zbog prisutnog introna u umnažanoj regiji. Razlika u veličini odsječka umnažanih fragmenata gena *dhar* (s prisutnim intronom, oko 800 bp) i njegove cDNA (153 bp) poslužila je i za dokazivanje odsutnosti kontaminacije genomskom DNA. Osim toga u negativnoj kontrolni nije uočena prisutnost *primer-dimera*.

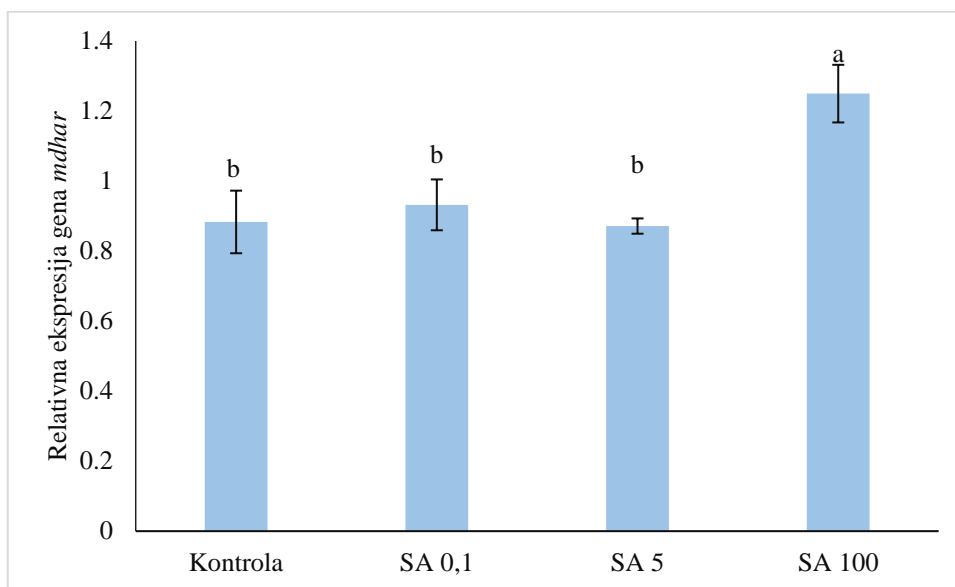


**Slika 6.** Provjere početnica za gene *mdhar* i *dhar* na kalupu genomske DNA (G) i cDNA (C). N: - negativna kontrola PCR reakcije; M: standard duljine odsječaka DNA (100 bp DNA Ladder).

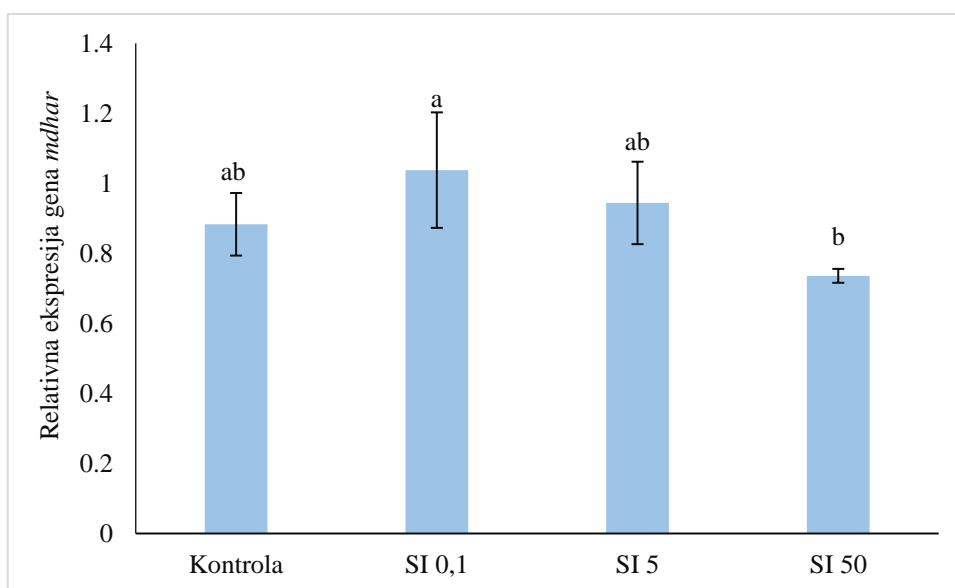
### 3.3. Utjecaj različitih koncentracija selenata i selenita na ekspresiju gena *mdhar* u izdanku i korijenu pšenice

U izdanku pšenice je, kao i kod ekspresije gena *dhar*, tretman rastućim koncentracijama selenata uzrokovao trend povećanja ekspresije gena *mdhar*, a statistički značajno povećanje u odnosu na kontrolu (41,50%) prisutno je jedino pri najvećoj koncentraciji primijenjenog selenata (100 mgxL<sup>-1</sup>; Slika 7). Tretman pšenice selenitom uzrokovao je statistički značajno smanjenje ekspresije gena *mdhar* u izdanku (16,68%) u

odnosu na kontrolnu skupinu jedino pri najvećoj primijenjenoj koncentraciji selenita ( $50\text{mg}\times\text{L}^{-1}$ ; Slika 8).

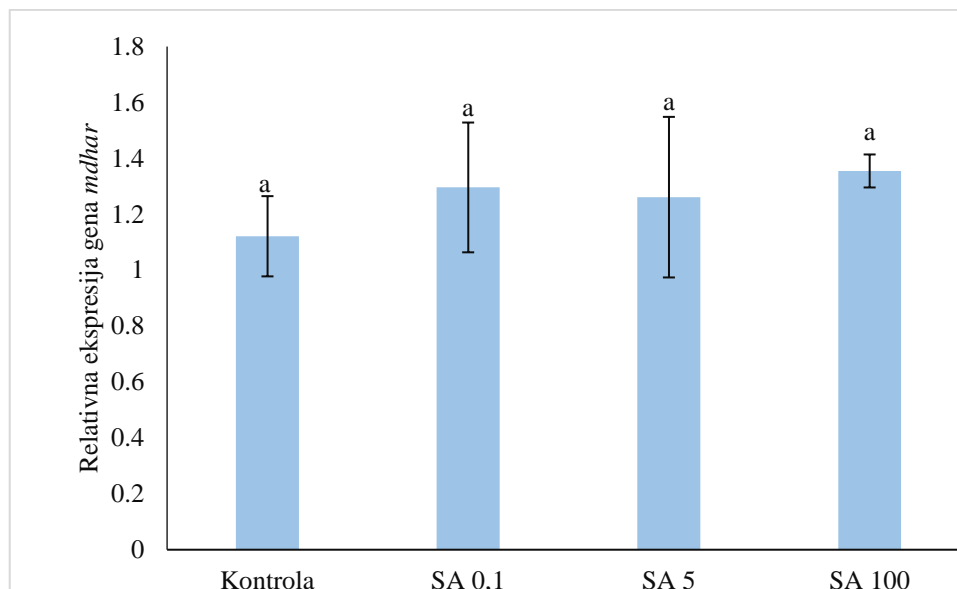


**Slika 7.** Relativna ekspresija gena *mdhar* u izdanku nakon tretmana selenatom (SA 0,1:  $0,1\text{ mg}\times\text{L}^{-1}$ ; SA 5:  $5\text{ mg}\times\text{L}^{-1}$ ; SA 100:  $100\text{ mg}\times\text{L}^{-1}$ ).



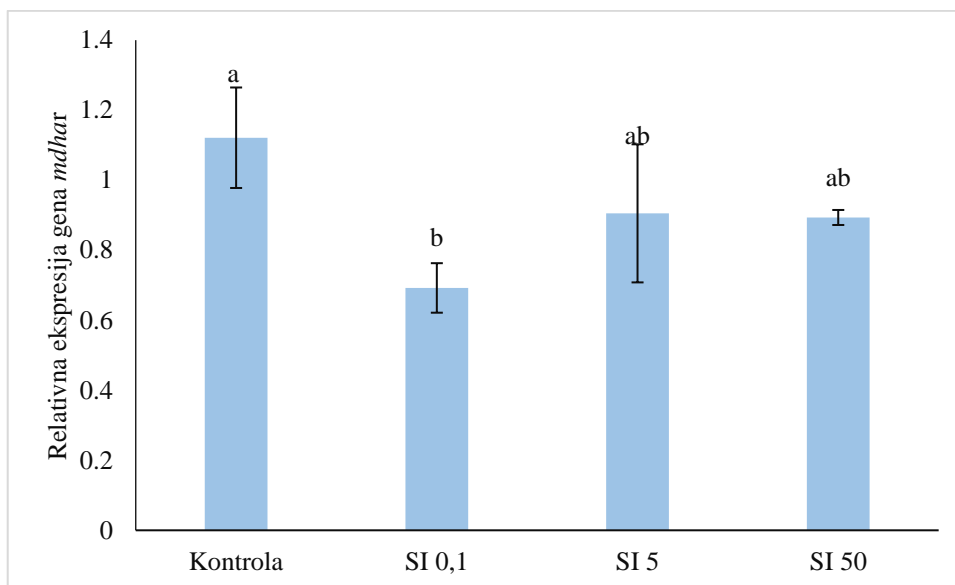
**Slika 8.** Relativna ekspresija gena *mdhar* u izdanku nakon tretmana selenitom (SI 0,1:  $0,1\text{ mg}\times\text{L}^{-1}$ ; SI 5:  $5\text{ mg}\times\text{L}^{-1}$ ; SI 50:  $50\text{ mg}\times\text{L}^{-1}$ ).

U korijenu pšenice, kao i kod ekspresije gena *dhar*, tretman rastućim koncentracijama selenata nije uzrokovao značajne promjene u ekspresiji gena *mdhar*, kako u odnosu na kontrolu tako i između pojedinih skupina (Slika 9).



**Slika 9.** Relativna ekspresija gena *mdhar* u korijenu nakon tretmana selenatom (SA 0,1: 0,1 mg×L<sup>-1</sup>; SA 5: 5 mg×L<sup>-1</sup>; SA 100: 100 mg×L<sup>-1</sup>).

Kao što je bio slučaj i kod ekspresije gena *dhar*, tako je u korijenu pšenice tretman najmanjom koncentracijom selenita (0,1 mg×L<sup>-1</sup>) uzrokovao smanjenje ekspresije gena *mdhar* za 38,26% u odnosu na kontrolu, dok ostale koncentracije nisu značajno utjecale na ekspresiju gena (Slika 10).

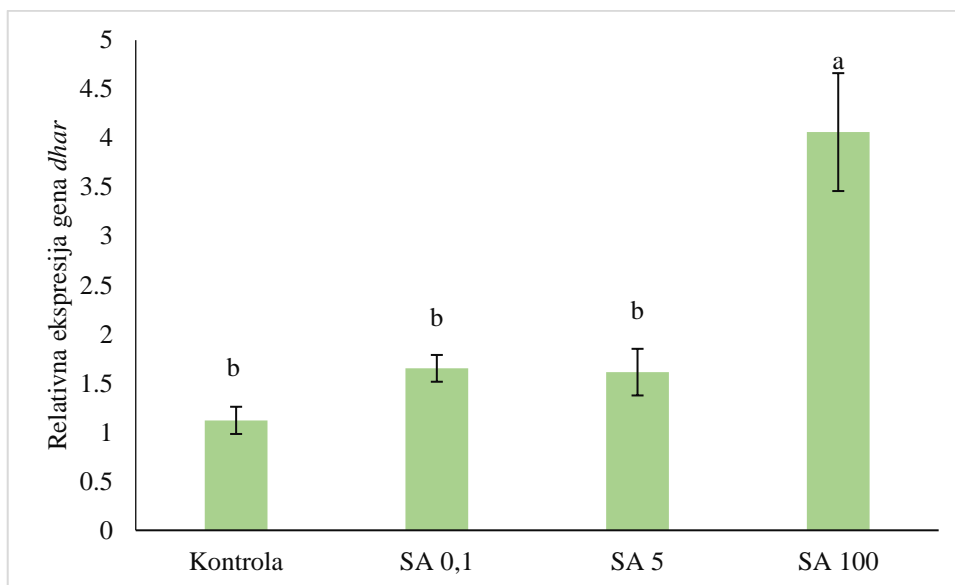


**Slika 10.** Relativna ekspresija gena *mdhar* u korijenu nakon tretmana selenitom (SI 0,1: 0,1 mg×L<sup>-1</sup>; SI 5: 5 mg×L<sup>-1</sup>; SI 50: 50 mg×L<sup>-1</sup>).

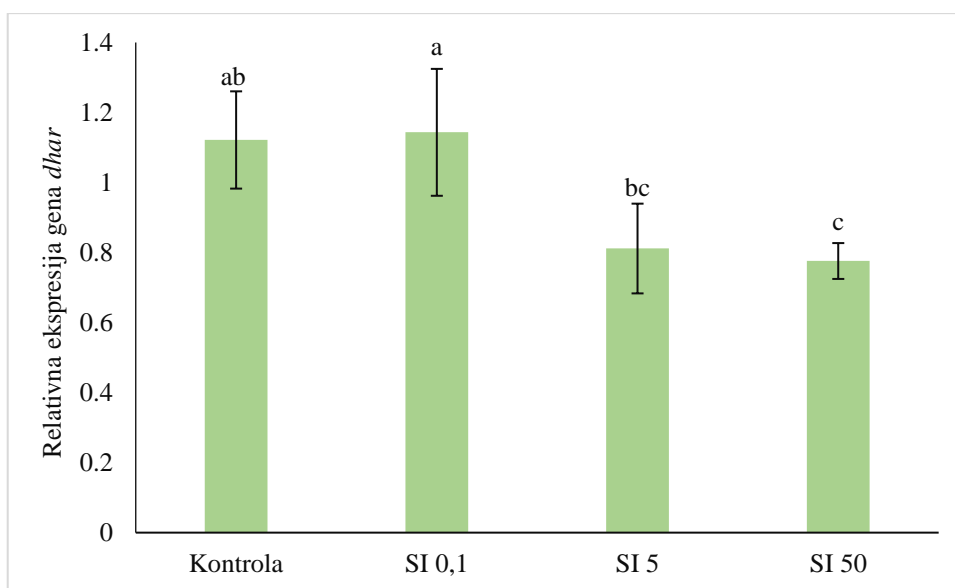
### 3.4. Utjecaj različitih koncentracija selenata i selenita na ekspresiju gena *dhar* u izdanku i korijenu pšenice

Iz dobivenih rezultata može se uočiti postojanje trenda povećanja ekspresije gena *dhar* u izdanku pšenice tretirane rastućim koncentracijama selenata, dok je statistički značajno povećanje ekspresije gena od 262,20% u odnosu na kontrolu, uočeno pri tretmanu najvećom koncentracijom selenata (100 mg×L<sup>-1</sup>; Slika 11).

Za razliku od učinka selenata na relativnu ekspresiju gena *dhar* u izdanku, tretman pšenice rastućim koncentracijama selenita uzrokuje smanjenje ekspresije gena *dhar*. Tako je statistički značajno smanjenje ekspresije gena od 30,83% u odnosu na kontrolu, prisutno pri najvećoj primijenjenoj koncentraciji selenita (50 mg×L<sup>-1</sup>; Slika 12).

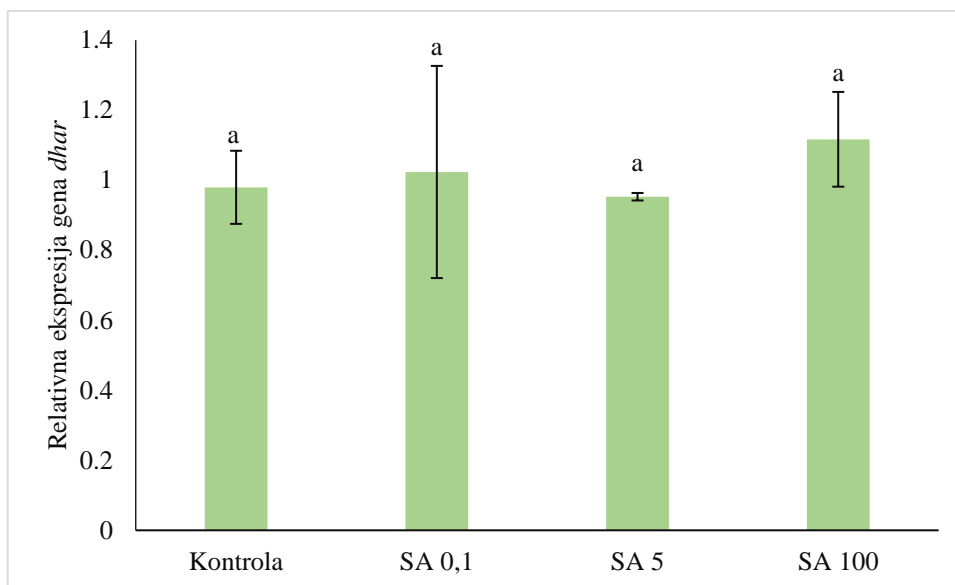


**Slika 11.** Relativna ekspresija gena *dhar* u izdanku nakon tretmana selenatom (SA 0,1: 0,1 mg×L<sup>-1</sup>; SA 5: 5 mg×L<sup>-1</sup>; SA 100: 100 mg×L<sup>-1</sup>).



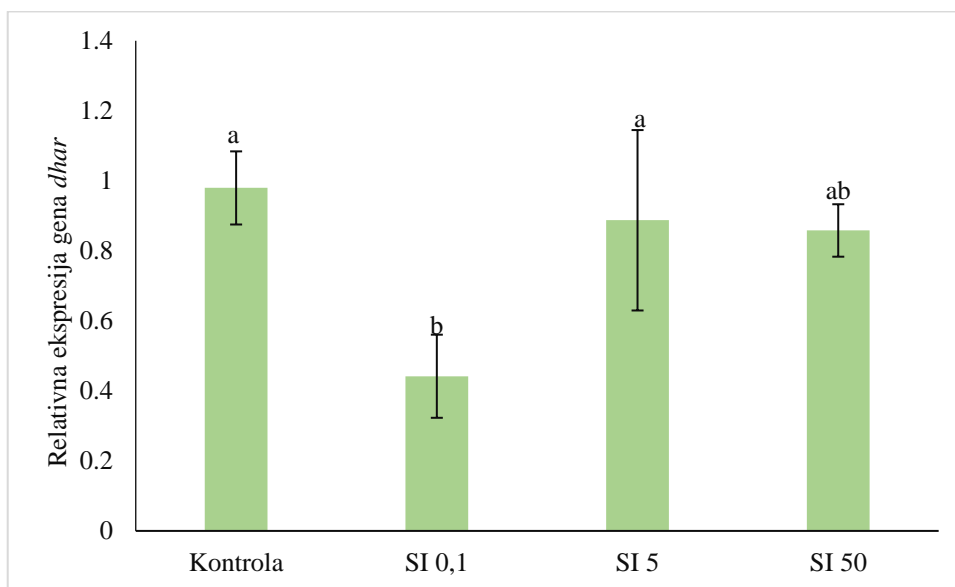
**Slika 12.** Relativna ekspresija gena *dhar* u izdanku nakon tretmana selenitom (SI 0,1: 0,1 mg×L<sup>-1</sup>; SI 5: 5 mg×L<sup>-1</sup>; SI 50:50 mg×L<sup>-1</sup>).

U korijenu pšenice tretirane različitim koncentracijama selenata nije došlo do značajne promjene u ekspresiji gena *dhar*, kako u odnosu na kontrolu tako i između pojedinih skupina (Slika 13).



**Slika 13.** Relativna ekspresija gena *dhar* u korijenu nakon tretmana selenatom (SA 0,1: 0,1 mg×L<sup>-1</sup>; SA 5: 5 mg×L<sup>-1</sup>; SA 100: 100 mg×L<sup>-1</sup>).

Tretman pšenice najmanjom koncentracijom selenita (0,1mg×L<sup>-1</sup>) uzrokovao je statistički značajno smanjenje ekspresije gena *dhar* u korijenu za 54,90%, dok ostale primijenjene koncentracije nisu uzrokovale značajnu razliku u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 14).



**Slika 14.** Relativna ekspresija gena *dhar* u korijenu nakon tretmana selenitom (SI 0,1: 0,1 mg×L<sup>-1</sup>; SI 5: 5 mg×L<sup>-1</sup>; SI 50: 50 mg×L<sup>-1</sup>).

## 4. RASPRAVA

Prema Pilon-Smits i Quinn (2010), selen je esencijalni mikronutrijent za ljude i životinje. U biljkama male koncentracije selen imaju pozitivan učinak jer štite od negativnih učinaka abiotičkih i biotičkih faktora (Chu i sur., 2010; Hasanuzzaman i Fujita, 2011; Kumar i sur., 2012; Pandey i Gupta, 2015; Freeman i sur., 2006; Quinn i sur., 2010), a istovremeno povećavaju nutritivnu vrijednost (Germ i sur., 2005) i produktivnost biljaka (Germ i sur., 2005). Pri visokim koncentracijama selen u biljkama može imati prooksidacijsko djelovanje i uzrokovati pojavu oksidacijskog stresa. Dvostruki učinak selen ovisan o njegovoj primijenjenoj koncentraciji na rast biljaka utvrđen je u salati (Ramos i sur. 2010) i drugim biljnim vrstama (White i sur. 2004). Osim o koncentraciji selen, odgovor na tretman selenom ovisi i o obliku primijenjenog selen, biljnoj vrsti i biljnom organu na kojem se vrši tretman (Gupta i Gupta, 2017). U velikim količinama selen može imati prooksidacijsko djelovanje uzrokujući nakupljanje ROS i smanjenje vitalnosti stanica (Gupta i Gupta, 2017). Važnu ulogu u smanjenju posljedica oksidacijskog stresa u biljkama koji za posljedicu ima nakupljanje ROS-a sudjeluju enzimi monodehidroaskorbat-reduktaza (MDHAR) i dehidroaskorbat-reduktaza (DHAR) koji su sastavni dio askorbat-glutationskog ciklusa koji ima važnu ulogu u uklanjanju nakupljenog H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> iz biljnih stanica (Apel i Hirt, 2004; Feng i sur., 2012; Chang i sur., 2017). Huang i sur. (2018) navode upravu važnu ulogu enzima MDHAR u odgovoru sadnica jagoda na niske temperature pri čemu je tretman selenitom (5 mg×L<sup>-1</sup> natrijevog selenita) uzrokovao povećanje ekspresije *mdhar* gena u listovima koji je potreban za održavanje ravnoteže između potrošnje askorbata i njegove regeneracije koji može pridonijeti borbi protiv stresa koji je uzrokovan niskom temperaturom. Kao razlog što niska koncentracija natrijevog selenita ima najbolji učinak na sadnice jagoda izložene niskoj temperaturi navode translaciju cisteina u selenocistein nakon egzogene primjene selen i zamjenom sumpora selenom.

U ovom istraživanju selenat i selenit su pokazali različit utjecaj na ekspresiju gena *mdhar* i *dhar* u izdancima pšenice. Nakon tretmana različitim koncentracijama selenata, u izdanku pšenice je prisutan trend povećanja ekspresije gena *mdhar* i *dhar* (Slika 7 i Slika 11). Do značajnog porasta ekspresije gena *mdhar* i *dhar* došlo je tek kod tretmana najvećom koncentracijom selenata (100 mg×L<sup>-1</sup>) (Slika 7 i Slika 11). Ekspresija gena *mdhar* se povećala za 41,50% u odnosu na kontrolu (Slika 7), a gena *dhar* za 262,20% u odnosu na



kontrolu (Slika 11). Tretman selenitom pokazuje trend smanjenja ekspresije *mdhar* i *dhar* gena (Slika 8 i Slika 12). Statistički značajno smanjenje ekspresije *mdhar* gena je uzrokovala koncentracija od  $50 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$  (smanjenje za 16,68% u odnosu na kontrolu) (Slika 8) te također i ekspresije gena *dhar* (smanjenje za 30,83% u odnosu na kontrolu) (Slika 12). Sasvim različit utjecaj na ekspresiju navedenih gena je tretman selenitom i selenatom pokazao u korijenu klijanaca pšenice. Tretman selenatom nije pokazivao značajan učinak na ekspresiju *mdhar* i *dhar* gena (Slika 9 i Slika 13), dok je kod tretmana selenitom uočljiv trend smanjenja ekspresije navedenih gena (Slika 10 i Slika 14). Značajno smanjenje ekspresije *mdhar* i *dhar* gena uzrokovala je jedino najmanja koncentracija selenita od  $0,1 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$  (Slika 10 i Slika 14).

Razlike u odgovoru biljke s obzirom na primijenjeni oblik selena i različit tip organa mogu biti posljedica različitog stupnja akumulacije ova dva oblika selena u izdanku i korijenu biljke. Prema Li i sur. (2008 ) utvrđeno je da se selenit primarno akumulira u korijenu dok se selenat lako transportira do vršnih dijelova biljke čime se može objasniti izostanak učinka tretmana selenatom u korijenu pšenice. Selenat se stoga lakše transportira iz korijena i akumulira u izdancima, dok se selenit u korijenu pretvara u organske oblike, osobito SeMet (Zayed i sur. 1998). S druge strane, Ramos i sur. (2010) primjenom nižih koncentracija oba oblika selena ( $2, 4$  i  $8 \text{ } \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$ ) kod biljne vrste *Lactuca sativa* L. cv. Vera oko 70% elementa koji se primjenjuje kao selenat i 50% kao selenit dopiye do izdanaka. Kada su biljke tretirane s višom koncentracijom selena, došlo je do smanjenja translokacije u oba oblika selena u odnosu na kontrolu.

Rezultati ovog istraživanja jasno pokazuju kako selenit smanjuje ekspresiju ispitivanih gena i u izdanku i u korijenu, ali pri različitim koncentracijama ( $50 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$  i  $0,1 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ ). S obzirom na navedene rezultate, može se pretpostaviti da selenit ima veću toksičnost na komponente antioksidacijskog odgovora što je dokazano u istraživanju Masscheleyn i sur. (1990). Guererro i sur. (2014) navode kako kombinacija selenata i selenita pokazuje manju toksičnost od samog selenita, što navodi na zaključak da selenat u smjesi reducira toksičnost selenita.

Prema Mittler (2002) navedeno je kako održavanje visoke redukcijske snage Asc i GSH ima važnu ulogu u uklanjanju suviška ROS u biljkama i kako su u tu svrhu potrebne

visoke razine ekspresije *mdhar* i *dhar* gena. Osim spomenutog askorbat-glutationskog ciklusa u kojem sudjeluju neenzimski antioksidansi askorbat (Asc) i glutacion (GSH), postoje i ostali enzimski antioksidansi i mehanizmi borbe protiv oksidacijskog stresa, a uključuju superoksid-dismutazu (SOD), askorbat-peroksidazu (APX), glutacion-peroksidazu (GPX) i katalazu (CAT) (Apel i Hirt, 2004) koje je potrebno istražiti kako bi razjasnili mogući mehanizam djelovanja selena na biljke.

## 5. ZAKLJUČCI

- najveća koncentracija selenata ( $100 \text{ mgxL}^{-1}$ ) značajno je povećala ekspresiju *mdhar* i *dhar* gena u izdanku pšenice, dok u korijenu selenat nije imao značajan učinak na ekspresiju navedenih gena.
- selenit je uzrokovao značajno smanjenje ekspresije gena *mdhar* i *dhar* u korijenu i izdanku pšenice, ali je taj odgovor ovisio o primijenjenoj koncentraciji selena u korijenu ( $0,1 \text{ mgxL}^{-1}$ ) i izdanku ( $50 \text{ mgxL}^{-1}$ ).
- selen značajno utječe na ekspresiju gena *mdhar* i *dhar*, važnih komponenti askorbat-glutacionskog ciklusa pri čemu odgovor biljke ovisi o kemijskom obliku i koncentraciji primijenjenog selena i o samom biljnom organu.
- kako bi se dobio detaljniji uvid u mehanizam djelovanja selena, potrebno je ispitati i ostale komponente antioksidacijskog odgovora u korijenu i izdanku pšenice.

## 6. LITERATURA

Apel, K., Hirt, H. (2004) Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-9.

Ashtiani, H.R.A., Bakhshandi, A.K., Rahbar, M., Mirzaei, A., Malekpour, A., Rastegar, H. (2011) Glutathione, cell proliferation and differentiation. *African Journal of Biotechnology* 10 (34): 6348-6363.

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

Boldrin, P.F., Faquin, V., Ramos, S.J., Boldrin, K.V.F., Avila, F.W., Guilherme, L.R.G. (2013) Soil and foliar application of selenium in rice biofortification. *Journal of Food Composition and Analysis* 31: 238-244.

Buettner, G.R., Jurkiewicz, B.A. (1996). Chemistry and biochemistry of ascorbic acid. In *Handbook of Antioxidants*, New York: Dekker, 91-115.

Cappa, J. J., Cappa, P. J., El Mehdawi, A. F., McAleer, J. M., Simmons, M. P., and Pilon-Smits, E. A. (2014). Characterization of selenium and sulfur accumulation across the genus *Stanleya* (Brassicaceae): a field survey and common-garden experiment. *American Journal of Botany* 101: 830-839.

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

Dominko, K., Đikić, D. (2018) Glutathionylation: a regulatory role of glutathione in physiological processes. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 69: 1-24.

Dron, M., Clouse, S. D., Dixon, R. A., Lawton, M. A., Lamb, C. J. (1988). Glutathione and fungal elicitor regulation of a plant defense promoter in electroporated protoplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 85: 6738-42.

Elrashidi, M.A., Adriano, D.C., Workman, S.M., Lindsay, W.L. (1987). Chemical equilibria of selenium in soils: a theoretical development. *Soil Science* 144: 141-152.

Feng, R., Wei, C., Tu, S. (2012) The roles of selenium in protecting plants against abiotic stresses. *Environmental and Experimental Botany* (2013) 87: 58-68.

Fio, J.L., Fuji, R., Deverel, S.J. (1991). Selenium mobility and distribution in irrigated and nonirrigated alluvial soils. *Soil Science Society of America Journal* 55: 1313-1320.

- Forti G, Elli G. (1995). The function of ascorbic acid in photosynthetic phosphorylation. *Plant Physiology* 109: 1207-11.
- Foyer C., Noctor G. (2005) Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell & Environment* 28:1056-1071.
- Freeman, J. L., Quinn, C. F., Marcus, M. A., Fakra, S., and Pilon-Smits, E. A. (2006). Selenium-tolerant diamondback moth disarms hyperaccumulator plant defense. *Current Biology* 16: 2181-2192.
- Germ, M., Kreft, I., Osvald, J. (2005) Influence of UV-B exclusion and selenium treatment on photochemical efficiency of photosystem II, yield and respiratory potential in pumpkins (*Cucurbita pepo* L.). *Plant Physiology and Biochemistry* 43: 445-448.
- Gigolashvili, T., Kopriva, S. (2014) Transporters in plant sulphur metabolism. *Frontiers in Plant Science* 5:422.
- Gissel-Nielsen, G., Gupta, U.C., Lamand, M., Westermarck, T. (1984). Selenium in soils and plants and its importance in livestock and human nutrition. *Advances in Agronomy* 37: 397-460.
- Guerrero, B., Llugany, M., Palacios, O., Valiente, M. (2014) Dual effects of different selenium species on wheat. *Plant Physiology and Biochemistry* 83: 300-307.
- Gupta, M., Gupta, S. (2017) An Overview of Selenium Uptake, Metabolism, and Toxicity in Plants. *Frontiers in Plant Science* 7: 2074.
- Handa, N., Kohli, S.K., Sharma, A., Thukral, A.K., Bhardwaj, R., Abd Allah, E.F., Alqarawi, A. A., Ahmad, P. (2018) Selenium Modulates Dynamics of Antioxidative Defence Expression, Photosynthetic Attributes and Secondary Metabolites to Mitigate Toxicity in *Brassica juncea* L. Plants. *Environmental and Experimental Botany* 161: 180-19.
- Hasanuzzaman, M., Fujita, M. (2011) Selenium pretreatment upregulates the antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system and confers enhanced tolerance to drought stress in rapeseed seedlings. *Biological Trace Element Research* 143: 1758-1776.
- Hasanuzzaman, M., Hossain, M.A., Fujita, M. (2012) Exogenous selenium pretreatment protects rapeseed seedlings from cadmium-induced oxidative stress by upregulating antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems. *Biological Trace Element Research* 149(2): 248-261.
- Hawkesford, M., Zhao, F. (2007) Strategies for increasing the selenium content of wheat. *Journal of Cereal Science*, 46: 282-292.

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

Hotz, C. (2013.) Biofortification. U: Allen, L. H., Prentice, A., Caballero, B. (ur.) Encyclopedia of Human Nutrition, Third Edition. Academic Press, Kanada, 75-181.

Huang, C., Qin, N., Sun, L., Yu, M., Hu, W., Qi, Z. (2018) Selenium Improves Physiological Parameters and Alleviates Oxidative Stress in Strawberry Seedlings under Low-Temperature Stress. International Journal of Molecular Sciences, 19:1913.

Kaur, N., Sharma, S., and Kaur, S. (2014). Selenium in agriculture: a nutrient or contaminant for crops? Archives of Agronomy and Soil Science 60: 1593-1624.

Kerk, N. M., Feldman, L. J. (1995). A biochemical model for initiation and maintenance of the quiescent center: implications for organisation of root meristems. Plant Development 121: 2825-33.

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

Latowski, D., Surowka, E. (2010.) Regulatory Role of Components of Ascorbate–Glutathione Pathway in Plant Stress Tolerance. U: Anjum, N. A., Chan, M., Umar, S. (ur.) Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants, Springer Netherlands, 1-53.

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

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

Masscheleyn, P. H., Delaune, R. D., Patrick Jr., W. H. (1990). Transformations of selenium as affected by sediment oxidation-reduction potential and pH. Environmental Science & Technology 24: 91-96.

Mazej, D., Osvald, J., and Stibilj, V. (2008). Selenium species in leaves of chicory, dandelion, lamb's lettuce and parsley. Food Chemistry 107: 75-83.

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

Mullick, J., Allameh, A., Raj, H. (1986). Metabolism of glutathione in microorganisms. Frontiers in applied microbiology: Rastogy and Company, 118-32.

Noctor, G. and Foyer, C. (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 49: 249-279.

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

Paolacci, A. R., Tanzarella, O. A., Porceddu, E., Ciaffi, M. (2009) Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. *BMC molecular biology* 10: 11.

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

Quinn, C. F., Freeman, J. L., Reynolds, R. J., Cappa, J. J., Fakra, S. C., Marcus, M. A. (2010). Selenium hyperaccumulation offers protection from cell disruptor herbivores. *BMC Ecology* 10:19.

Ramos, S.J., Faquin, V., Guilherme, L.R.G., Castro, E.M., A´vila, F.W., Carvalho, G.S., Bastos, C.E.A., Oliveira, C. (2010) Selenium biofortification and antioxidant activity in lettuce plants fed with selenate and selenite. *Plant Soil and Environment* 56: 584-588.

Reeves, M. A., and Hoffmann, P. R. (2009). The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66: 2457-2478.

Reid, M. E., Duffield-Lillico, A. J., Slate, E., Natarajan, N., Turnbull, B., Jacobs, E., Combs, G.F. Jr, Alberts, D.S., Clark, L.C., Marshall, J.R. (2008). The nutritional prevention of cancer: 400 mcg per day Se treatment. *Nutrition and Cancer* 60: 155-163.

Shaul, O., Mironov, V., Burssens, S., Van Montagu, M., Inze, D. (1996). Two Arabidopsis cyclin promoters mediate distinctive transcriptional oscillation on synchronised tobacco 3Y-2 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 93: 4868-72.

Smith, G. S., Watkinson, J. H. (1984) Selenium toxicity in perennial ryegrass and white clover. *New Phytologist* 97:557-564.

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

Terry, N., Zayed, A.M., de Souza, M.P., Tarun, A.S. (2000). Selenium in higher plants. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 51: 401-432.

Wang, Y. D., Wang, X., and Wong, Y. S. (2012). Proteomics analysis reveals multiple regulatory mechanisms in response to selenium in rice. *Journal of Proteomics* 75: 184-1866.

White, P. J., Bowen, H. C., Parmaguru, P., Fritz, M., Spracklen, W. P., Spiby, R. E., Meacham, M. C., Mead, A., Harriman, M., Trueman, L. J., Smith, B. M., Thomas, B., Broadley, M.R. (2004). Interactions between selenium and sulphur nutrition in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 55: 1927-1937.

White, P., Broadley, M. (2008) Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets- iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytologist* 182: 49-84.

WHO (2009). *Global Health Risks: Mortality and Burden of Disease Attributable to Selected Major Risks*.

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