

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski sveučilišni studij Biologija

Lorena Zubaj

**Sortno-specifični učinak kadmija na glioksalazni sustav kod  
soje (*Glycine max*)**

Završni rad

Osijek, 2019.

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**  
**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**  
**Odjel za biologiju**  
**Preddiplomski sveučilišni studij Biologija**  
**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti  
**Znanstveno polje:** Biologija

**Završni rad**

## **SORTNO-SPECIFIČNI UČINAK KADMIJA NA GLIOKSALAZNI SUSTAV KOD SOJE**

*(Glycine max)*

**Lorena Zubaj**

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

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

**Kratak sažetak završnog rada:** Za obranu od stresa uzrokovanog teškim metalima biljke su razvile različite antioksidacijske i detoksikacijske mehanizme u kojima glioksalazni sustav ima važnu ulogu. Budući da je soja značajna poljoprivredna kultura vrlo je važno poznavati detoksikacijske mehanizme koji mogu doprinijeti zaštiti od teških metala kao što je kadmij, čija sve veća prisutnost u okolišu ugrožava razvoj i prinos biljaka. Cilj ovoga istraživanja bio je odrediti učinak različitih koncentracija kadmija na glioksalazni sustav, odnosno aktivnost enzima glioksalaza 1 (GLO1), u korijenu i izdanku tri kultivara soje koji se međusobno razlikuju u stupnju akumulacije kadmija u zrnu. Utjecaj kadmija na aktivnosti enzima glioksalaznog sustava ovisio je o primijenjenoj koncentraciji kadmija i tipu tkiva, ali ne i o kultivaru. Aktivnost enzima GLO1 u izdanku sva tri kultivara soje povećana je pri svim primijenjenim količinama kadmija, dok u korijenu soje postoji trend povećanja koji nije značajan kod svih koncentracija, ali je u korelaciji s količinom primijenjenog kadmija. Uvid u biokemijske mehanizme detoksikacije u kojima važnu ulogu ima i glioksalazni sustav omogućava razvijanje strategija za povećanje tolerancije na kadmij.

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Ključne riječi:** glioksalazni ciklus, glikozilaza 1, kadmij, oksidacijski stres, soja

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

**BASIC DOCUMENTATION CARD**  
**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**  
**Department of Biology**  
**Undergraduate university study programme in Biology**  
**Scientific Area:** Natural sciences  
**Scientific Field:** Biology

**Bachelor thesis**

**CULTIVAR-SPECIFIC EFFECT OF CADMIUM ON THE GLYOXALASE SYSTEM IN  
SOYBEAN (*Glycine max*)**

**Lorena Zubaj**

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

**Supervisor:** Rosemary Vuković, PhD, Assist. Prof.

**Short abstract:** To protect from stress caused by heavy metals, plants have evolved different antioxidative and detoxification mechanism in which glyoxalase system has an important role. Because soybean crops are agriculturally very important, it is also important to know detoxification mechanisms that may contribute to the protection against heavy metals such as cadmium, which presence in the environment threatens the development and yield of plants. The aim of this study was to determine the effect of different concentrations of cadmium on glyoxalase system and activity of enzyme glyoxalase I (GLO1) in roots and shoots of three soybean cultivars, which differ from each other in degree of Cd accumulation in the grain. The influence of cadmium on the enzymes activity depends on applied concentration of cadmium and on the type of tissue, but not on cultivar. The activities of enzyme GLO1 in shoots of all three varieties of soybean were increased with all applied concentration of cadmium, while in soybean roots the activity has a tendency to increase, although not significant at lower concentrations, but there is a correlation between applied concentration of cadmium and the activity of enzyme GLO1. Understanding biochemical mechanisms of detoxification, in which glyoxalase system has an important role, enables the development of strategies for increasing tolerance to Cd.

**Original in:** Croatian

**Key words:** glyoxalase system, glyoxalase 1, cadmium, soybean, oxidative stress

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

## **SADRŽAJ :**

<b>1.UVOD</b> .....	1
1.1. Kadmij u okolišu .....	1
1.2. Toksičnost kadmija .....	2
1.3. Utjecaj kadmija na biljke .....	2
1.4. Biljni detoksikacijski mehanizmi .....	4
1.5. Glioksalazni ciklus .....	5
1.6. Soja .....	7
1.7. Cilj istraživanja .....	8
<b>2. MATERIJALI I METODE</b> .....	9
2.1. Biljni materijal .....	9
2.2. Sterilizacija sjemena soje i postavljanje eksperimenta .....	9
2.3. Priprema proteinskih ekstrakata .....	11
2.4. Mjerenje aktivnosti enzima glioksalaze I .....	12
2.4. Mjerenje koncentracije topljivih proteina .....	12
2.5. Obrada statističkih rezultata .....	12
<b>3. REZULTATI</b> .....	14
3.1. Utjecaj kadmija na enzim GLO 1 u izdanku soje .....	14
3.2. Utjecaj kadmija na enzim GLO I u korijenu soje.....	16
<b>4. RASPRAVA</b> .....	20
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	22
<b>6. LITERATURA</b> .....	23

# 1. UVOD

## 1.1. Kadmij u okolišu

Kadmij (Cd) je srebrnasti metal koji se u okolišu vrlo rijetko pronalazi kao samostalna ruda. Otkriven je 1817. godine u Njemačkoj, kada ga je njemački profesor Friedrich Stromeyer otkrio kao nečistoću u cinkovom karbonatu. U periodnom sustavu elemenata kadmij nosi simbol Cd te se nalazi u sredini periodnog sustava, između cinka i žive, s kojima pokazuje velike sličnosti (Friberg 1971). Također kadmij ubrajamo u skupinu teških metala te je on ujedno i jedan od najotrovnijih elemenata i jedan od najvećih onečišćivača okoliša (Kubota i sur. 2001). Prisutnost teških metala u tlu posljedica je različitih prirodnih ali i antropogenih procesa. U prirodi se kadmij rijetko može naći kao samostalna ruda te se najčešće pojavljuje kao primjesa u sulfidnim rudama cinka i olova (sfaleritu i galenitu), koje ga u prosjeku sadrže oko 0.3% (Friberg 1971). U tlo kadmij dolazi uglavnom putem industrijskog otpada ili iz rudnika (Cordero i sur. 2004). Od svih teških metala, kadmij izaziva najveće zanimanje stručnjaka koji se bave tлом. Razlog tome je njegova velika toksičnost za žive organizme. Prvi znanstvenici, koji su iskazali zabrinutost zbog akumulacije kadmija u hranidbenom lancu, bili su Schroeder and Balassa (1963). Ciklus kruženja kadmija u tlu vrlo je složen, te većinu procesa može kontrolirati čovjek kako bi smanjio njegovu akumulaciju u hranidbenim lancima. Koncentracija kadmija u tlu iznosi između 0.06 -1.1 mg/kg, dok je najveća zabilježena vrijednost iznosila 2.7 mg/kg (Holmgren i sur. 1993). Povećanjem koncentracije kadmija u tlu, povećava se i koncentracija kadmija u biljkama uslijed čega dolazi do njegove akumulacije u biljojedima pa se kadmij prenosi hranidbenim lancem (Kubota i sur. 2001). Kadmij oponaša metale, koji u živim organizmima imaju vrlo važnu biološku funkciju, stoga se vrlo lako prenosi kroz staničnu membranu. Teški metali poput kadmija otpuštaju se u zrak kada se otpad, iz domaćinstva ili industrijski, spali. Zagađenje zraka podrazumijeva i zagađenje vode i tla, pa tako i hrane koju jedemo, te vode koju pijemo. Maksimalna dopuštena koncentracija kadmija u vodi za piće je 0.005 mg/L.

## 1.2. Toksičnost kadmija

Kadmij se smatra sedmom najopasnijom tvari za ljudsko zdravlje. Posljednjih godina onečišćenje kadmijem ubrzano raste. Biološka funkcija kadmija u organizmu još nije potvrđena te se smatra da u organizmu ima samo štetno djelovanje (Jarup 2003). Brojna istraživanja ukazuju na toksični učinak kadmija na biološke sustave te je, upravo iz toga razloga, onečišćenje okoliša ovim metalom svjetski problem (Hutton 1983). U zraku je prisutan u obliku malih čestica koje su pogodne za lak ulazak u respiratorni sustav. Respiratornim se putevima puno veća količina kadmija apsorbira, u odnosu na apsorpciju probavnim sustavom, no istraživanja su pokazala da sam učinak i toksičnost ovoga metala ne ovisi o načinu unosa u organizam (Friberg i sur. 1975). Naročito su otrovne pare kadmijevog oksida, koje, nakon kratkog vremena i u malim koncentracijama ( $\sim 1\text{mg}/\text{m}^3$ ), uzrokuju smetnje poput povišene tjelesne temperature, mučnine a već nakon dvanaest sati može doći i do smrti (Fassett i sur. 1975). Kadmijev oksid, u obliku prašine, nešto je manje otrovan, no njegovo udisanje može dovesti do gubitka osjeta za miris. Maksimalna dozvoljena koncentracija para kadmijevog oksida u radnim prostorijama je  $0.15\text{ mg}/\text{m}^3$  za maksimalnu izloženost od 15 minuta (Friberger i sur. 1975). Ljudska koža ne apsorbira kadmij, no u organizam može ući na različite načine, najčešće kroz probavni i respiratorni sustav. Neposredno nakon ulaska u krvotok, kadmij se krvlju raznosi po organizmu i zatim raspodjeli po tkivima i organima. Za samu raspodjelu kadmija vrlo su važni metalotioneini (Pan i sur. 1994). Metalotioneini su proteini koji na sebe vežu kadmij u mnogim tkivima. Najveća zastupljenost ovih proteina je u nefronima koji su osnovna gradivna jedinica bubrega. Upravo se u bubrezima akumulira najveća količina kadmija (Friberg i sur. 1975) koji se iz organizma vrlo sporo izlučuje. Jedan od razloga sporog izlučivanja je vezanje za proteine, ali i činjenica da se kadmij prirodno ne nalazi u organizmu te ga tijelo ne troši uslijed čega dolazi do njegove akumulacije. U slučaju kratkotrajnog izlaganja kadmiju pojavljuju se blagi simptomi, ali duljim izlaganjem posljedice mogu biti smrtonosne.

## 1.3. Utjecaj kadmija na biljke

Biljke su svojim korijenom vezane za tlo te su vrlo podložne toksičnom djelovanju kadmija ali i drugih teških metala, stoga se moraju prilagoditi njihovim povišenim količinama

u tlu kako bi preživjele. Prema Corderu i sur. (2004) kadmij u tlo dolazi iz antropogenih izvora kao što su industrijski otpad, Ni-kadmijevih baterija, korištenjem fungicida, iz rudnika itd. Biljke korijenom apsorbiraju kadmij iz tla, pri čemu kadmij u biljku ulazi putem transmembranskih nosača zaduženih za unos  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , and  $\text{Cu}^{2+}$  iona. Njegova apsorpcija, može dovesti do genetičkih, biokemijskih i fizioloških promjena koje rezultiraju inhibicijom rasta (Gallego i sur. 2012). Česti simptom trovanja kadmijem je kloroza, najizraženija u području lisnih žila (Das i sur. 1997). Ostali simptomi uključuju skraćenje internodija, stanjivanje stabljike te izbjeljivanje listova. Istraživanja Kahlea (1993) pokazala su da povećane koncentracije kadmija dovode do inhibicije rasta izdanka i korijena, promjena u aktivnosti enzima, narušavanja homeostaze što, u konačnici, može dovesti do uvenuća biljke. Kadmij oštećuje fotosustave I i II uslijed čega dolazi do inhibicije fotosinteze i do redukcije količine klorofila (Khan i sur.2006). Također, inhibira otvaranje stanica zapornica u puči te dovodi do promjena u sintezi RNA. Osim toga može doći do nekontrolirane oksidacije, što za posljedicu ima smanjenje aktivnosti antioksidacijskih obrambenih mehanizama (Hippler i sur. 2015).

Toksičnost teških metala očituje se i u prekomjernom nastanku reaktivnih kisikovih tvari (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) i metilglioksala (MG) autooksidacijom ili modifikacijom antioksidacijskog i glioksalaznog sustava (Hossain i sur. 2012). Teški metali vežu se za tiolne, histidilne i karboksilne skupine proteina, uslijed čega može doći do oštećenja strukture enzima. Kadmij ima vrlo veliki afinitet za tiolne skupine te se veže za strukturne proteine i enzime, koji ih sadrže, smanjujući njihovu katalitičku aktivnost (Furini 2012). Kod biljaka česti uzrok oksidacijskog stresa je apsorpcija kadmija koji nije esencijalan za rast i razvoj biljke. Ulaskom u stanicu povećava količinu ROS-a i reaktivnih dušikovih tvari (RNS) u stanici (Mittler 2002). Kadmij je nereducirajući metal koji nije u mogućnosti izvesti reakciju prijenosa elektrona i ne sudjeluje direktno u sintezi ROS-a, međutim izaziva oksidacijski stres zbog modifikacije antioksidacijskog odgovora. Njegova apsorpcija uzrokuje brzu akumulaciju peroksida i trošenje glutaciona (GSH) te narušava redoks ravnotežu. Iz navedenih razloga dolazi do pojave oksidacijskog stresa. Oksidacijski stres javlja se kao posljedica prekomjerne proizvodnje i akumulacije ROS-a, odnosno dolazi do narušavanja ravnoteže između oksidansa i antioksidansa (Inzé i Montagu, 2003). ROS se uglavnom oslobađaju svakom biokemijskom redoks reakcijom koja uključuje kisik te se može raditi o slobodnim radikalima poput hidroksilnog ( $\text{OH}^{\cdot}$ ),

peroksilnog ( $RO_2^-$ ), superoksidnog ( $O_2^{\cdot-}$ ) ili reaktivnim neradikalima poput singletnog kisika ( $^1O_2$ ) ili vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ; Sies, 1997). Kada u stanicama ne nastaje dovoljna količina antioksidacijskih enzima, nespareni elektroni ROS-a putuju organizmom u potrazi za drugim nesparenim elektronom. Njihovo spajanje pokreće niz lančanih kemijskih reakcija koje dovode do oštećenja DNA, lipida, proteina, te u konačnici uzrokuju oštećenje stanica (Arora i sur. 2002). Napadnute i oštećene stanične strukture više ne mogu izvršavati svoju funkciju, a ukoliko se oštećenja ne poprave dolazi do razvoja bolesti.

#### **1.4. Biljni detoksikacijski mehanizmi**

Biljke su razvile brojne prilagodbe kojima se nastoje oduprijeti promjenama u okolišu. Jedna od prilagodbi su i antioksidacijski obrambeni mehanizmi koji se sastoje od antioksidacijskih enzima te neenzimskih antioksidansa. Porastom količine ROS-a aktiviraju se antioksidacijski enzimi, kao što su katalaza (CAT), superoksid-dismutaza (SOD), askorbat-peroksidaza (APX), pirogalol-peroksidaza (PPX) i dr. koji smanjuju štetne učinke oksidacijskog stresa (Mittler 2002). Osim navedenih antioksidacijskih enzima, ulogu u zaštiti imaju i neenzimski antioksidansi kao što su prolin, GSH, askorbinska kiselina, tokoferol, karotenoidi, flavonoidi i brojni drugi. Antioksidansi su kemijske tvari koje imaju sposobnost donirati elektrone slobodnim radikalima. Oksidiraju se i tako neutraliziraju ROS bez utjecaja na fiziološke funkcije organizma. Djelotvornost antioksidansa ovisi o njihovoj koncentraciji, afinitetu prema reaktivnim tvarima ali i prisutnosti drugih antioksidansa.

U uvjetima stresa uzrokovanim teškim metalima vrlo važnu detoksikacijsku ulogu imaju i fitokelatini i metalotioneini. Fitokelatini su enzimski sintetizirani peptidi bogati cisteinom (Merlos i sur. 2014). Oni su oligomeri GSH koje sintetizira fitokelatin-sintaza (PCS), cisteinska proteaza koja se aktivira u prisutnosti teških metala (Grill i sur. 1989). Fitokelatini imaju sposobnost na sebe vezati teške metale, poput kadmija, te tako sudjeluju u detoksikaciji i smanjenju štetnog učinka kadmija (Olena i sur. 2001). Na biosintezu fitokelatina utječu različite vrste teških metala, no ne mogu sa svima formirati stabilni kompleksni spoj. Liu i sur. (2015) utvrdili su da brzina sinteze fitokelatina ovisi o vrsti metala koji uzrokuje stres. Također su utvrdili da se kod stresa, induciranim kadmijem i živom, sintetiziraju najveće količine fitokelatina. Prvotno su, fitokelatini, otkriveni kod kvasca (*Schizosaccharomyces pombe*) te se



smatralo da su analozi metalotioneinima u biljaka. Metalotioneini su također peptidi bogati cisteinom, ali čija je sinteza kodirana genima. Široko su rasprostranjeni kod biljaka i životinja. U biljkama se većinom nalaze u membrani Golgijevog aparata. Metalotioneini također imaju sposobnost vezanja teških metala pomoću tiolnih skupina cisteinskih ostataka te se njihova sinteza inducira prisutnošću teških metala koje vežu (Sigel i sur. 2009).

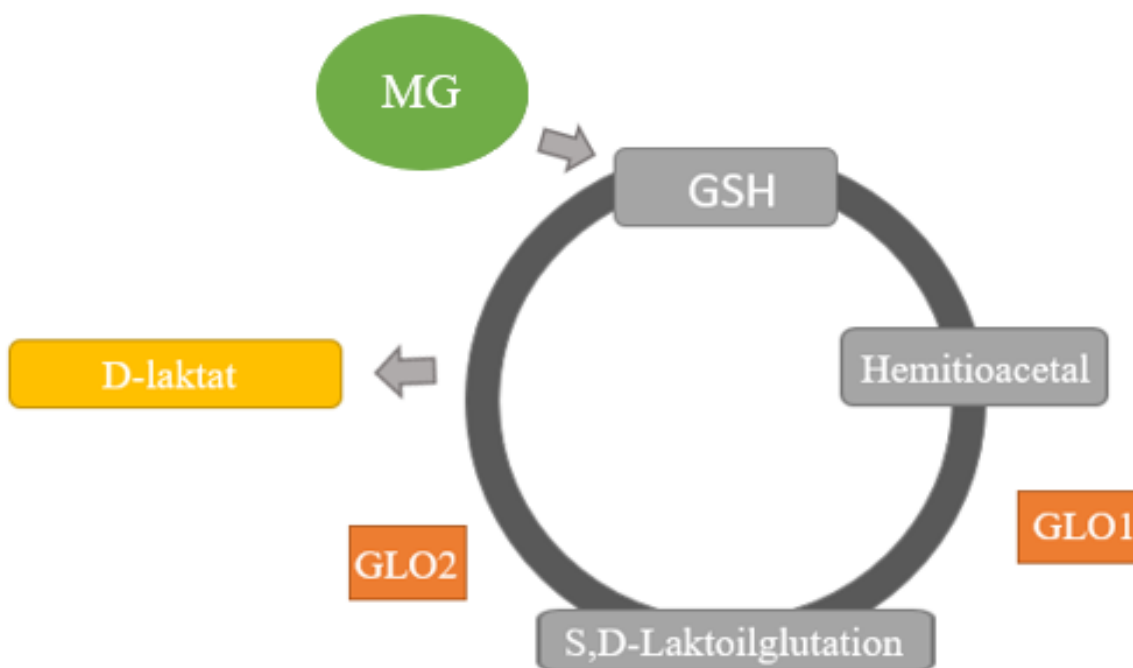
Evolucijom razvili su se i brojni drugi detoksikacijski mehanizmi među kojima se izdvaja i gliksalazni sustav, koji je jedan oblik antioksidacijskog obrambenog sustava.

### **1.5. Gliksalazni sustav**

Gliksalazni sustav je antioksidacijski obrambeni sustav koji se sastoji od nekoliko enzima koji provode detoksikaciju metilgliksala (MG) ali i ostalih reaktivnih aldehida koji nastaju u reakcijama metabolizma. MG je reaktivna molekula  $\alpha,\beta$ -dikarbonil ketoaldehida, koja nastaje u nekoliko metaboličkih puteva poput glikolize. Osim toga MG može nastati iz 3-aminoacetona, koji je intermedijer katabolizma treonina ili lipidnom peroksidacijom (Inoue i sur. 1995). Uslijed povećane sinteze MG-a, uzrokovane abiotičkim stresom (Yadav i sur. 2005), dolazi do narušavanja različitih staničnih funkcija, ali i integriteta i funkcije biomembrane (Chaplen 1998). Osim toga, uzokuje povećanje produkcije ROS-a, inhibira otvaranje puči, narušava homeostazu, dovodi do zatvaranja  $Ca^{2+}$  kanala. U normalnim uvjetima, biljne stanice sadrže male koncentracije MG-a. Pri niskim koncentracijama, MG-a ima bitnu ulogu kao signalna i regulatorna molekula (Hossain i sur. 2009). Veliki dio MG-a iz organizma odstranjuje se gliksalaznim sustavom prisutnom kod sisavaca, plijesni, bakterija i biljaka. Enzimi gliksalaznog sustava djeluju koordinirano kako bi MG pretvorili u netoksične produkte koristeći GSH kao kofaktor. Zbog ovisnosti gliksalaznog sustava o GSH naziva se još i GSH-ovisni gliksalazni sustav (Kaur i sur. 2014). Ovaj obrambeni sustav sastoji se od dva enzima, gliksilaze 1 (GLO1) te gliksilaze 2 (GLO2; Thornalley i sur. 1993).

GLO1 katalizira reakciju izomerizacije hemitioacetala prilikom koje dolazi do nastanka S-D-laktoilglutaciona (SLG). Hemitioacetal nastaje kao produkt reduciranog GSH i MG-a, spontanom reakcijom (Mannervik i sur. 2008). GLO2 zatim hidrolizira nastali SLG u D-laktatnu kiselinu te regenerira reducirani GSH za sljedeći ciklus reakcija ((Slika 1; Thornalley i Paul

1990). Glioksalzni sustav prisutan je u citosolu svih stanica i staničnih organela, posebice u mitohondrijima što upućuje na važnost ovoga obrambenog sustava za normalno odvijanje osnovnih staničnih funkcija. Stoga, povećana ekspresija gena za enzime glioksalznog sustava (posljedično i porast aktivnosti glioksalznih enzima) dovode do smanjivanja štetnog učinka MG-a ali i do povećane tolerancije na stres (Kaur i sur. 2004). Mnoga istraživanja potvrdila su da, u većini slučajeva, prilikom duljeg trajanja i većeg intenziteta stresa dolazi do smanjenja aktivnosti enzima glioksalznog sustava. Stoga, aktivnost samih enzima ovisi o intenzitetu i duljini trajanja stresa na biljku (Hossain i sur. 2004).



**Slika 1.** Shema glioksalznog sustava. Metilglioksal (MG) reagira sa reduciranim glutationom (GSH) kako bi nastao hemitioacetal. GLO1 koristi hemitioacetal kao supstrat za nastanak S-D-laktoilglutationa. GLO2 katalizira reakciju u kojoj iz S-D-laktoilglutationa nastaje D-laktat. U ovom se koraku također reducira GSH te se on reciklira za novi krug reakcija.

Uz glioksalazni sustav, detoksikacija MG može se odvijati i uz pomoć aldoza/aldehid-reduktaze (ALR) ili aldo-keto-reduktaze (ARK). Ghosh i sur. (1998) govore o još jednom načinu detoksikacije MG-a uz pomoć glioksalaze 3 (GLO3) koja pretvara MG u D-laktat bez GSH kao kofaktora. Hegedüs i sur. (2004) primjetili su da transgeni duhan s povećanom ekspresijom ALR-a reducira količinu nastalog MG te da dolazi do povećanja tolerancije na hladnoću i stres uzrokovan kadmijem.

### **1.6. Soja (*Glycine max* L.)**

Soja (*Glycine max* L.) pripada biljkama porodice mahunarki (lat. Fabaceae). Ova porodica bogata je vrstama velike ekonomske važnosti. Soja, točnije njezin korijen, živi u simbiozi sa baterijama roda *Rhizobium* koje na korijenu mahunarki razvijaju čvoriće - kvržice u kojima žive bakterije koje fiksiraju dušik. Simbioza korijena soje sa bakterijama povećava otpornost biljaka na niske i visoke temperature, bolesti i patogene, utječe na metabolizam biljke od koje ovisi ishrana uzročnika bolesti odnosno patogena.

Soja potječe iz Azije te je njezino zrno vrlo bogato uljima i bjelančevinama, te je ujedno i jedna od značajnih poljoprivrednih kultura u svijetu. Sojino zrno sadrži više od 50% bjelančevina i nešto manji postotak ulja, ovisno o vrsti soje ali i uvjetima uzgoja (Barać i sur. 2005). Bogata je vitaminima te može nadomjestiti meso zbog velike hranjive vrijednosti. Zrno je bogato i elementima poput kalcija, željeza, magnezija, fosfora, kalija, natrija, cinka, bakra, mangana i selena a sadrži i velike količine masnih kiselina, posebice linolne kiseline (Enders 2001). Linolna i linolenska kiselina su esencijalne masne kiseline koje imaju važnu ulogu u pravilnom rastu i razvoju. Osim toga soja je bogata spojevima, za koje se smatra da mogu smanjiti rizik od raka dojke i prostate (Diers i sur. 1992). Bogata je i lektinom koji posjeduje antitumorska svojstva jer smanjuje diobu stanica te povećava količinu makrofaga koji uništavaju tumorske stanice. Osim lektina, saponini i fitosteroli iz soje također posjeduju antitumorska svojstva (Barać i sur. 2005). Prehrana bogata sojom smanjuje učestalost upalnih procesa zbog bogatstva spojeva poput kolina i njegovih metabolita (Calder 2002). Soja ima veliku važnost i u industriji proizvodnje biodizela, koji se najčešće se dobiva transesterifikacijom triglicerida iz biljnih ulja (Thomas i sur. 2004). Tako je, ulje soje jedna od osnovnih sirovina za proizvodnju

biodizela u Europi. Soja je vrlo bitna i u prehrani stoke jer sadrži bjelančevine najsličnije životinjskima što nije slučaj kod ostalih biljaka.

### **1.7. Cilj istraživanja**

Za obranu od stresa uzrokovanog teškim metalima biljke su razvile različite antioksidacijske i detoksikacijske mehanizme u kojima glioksalazni sustav ima važnu ulogu. Budući da je soja značajna poljoprivredna kultura vrlo je važno poznavati detoksikacijske mehanizme koji mogu doprinijeti zaštiti od teških metala kao što je kadmij, čija sve veća prisutnost u okolišu ugrožava razvoj i prinos biljaka. Cilj je ovog istraživanja bio odrediti učinak različitih koncentracija kadmija na glioksalazni sustav, odnosno na aktivnost enzima GLO1 u izdanku i korijenu tri kultivara soje koji se međusobno razlikuju u stupnju akumulacije kadmija u zrnu (Korana > Lucija > Ika). Potrebno je utvrditi postoje li sortno i tkivno specifične razlike u biokemijskom odgovoru na tretman različitim količinama kadmija.

## **MATERIJALI I METODE**

### **2.1. Biljni materijal**

U istraživanju je korišteno sjeme tri hrvatska kultivara soje, Korana, Lucija i Ika, proizvedena na Poljoprivrednom institutu u Osijeku. Navedeni su kultivari odabrani na temelju preliminarnih istraživanja kojima je utvrđeno kako se ova tri kultivara razlikuju po stupnju akumulacije kadmija u zrnu. Tako je Korana akumulirala najviše kadmija u zrnu, zatim Lucija s nešto manje, te je Ika pokazala najmanji akumulacijski kapacitet.

### **2.2. Sterilizacija sjemena soje i postavljanje eksperimenta**

Prije naklijavanja, sjeme soje je dobro isprano u dH<sub>2</sub>O te potom sterilizirano 5 minuta u 75%-tnom etanolu uz miješanje. Nakon etanola, postupak sterilizacije je nastavljen držanjem sjemena 10 minuta u 1%-tnoj otopini Izosana s dodatkom Tweena (u konačnoj koncentraciji od 0.001%), uz stalno miješanje. Tween je deterdžent koji smanjuje površinsku napetost te omogućava bolji sterilizacijski učinak Izosana na sjeme soje. Nakon sterilizacije, sjeme je temeljito isprano u sterilnoj dH<sub>2</sub>O, u kojoj je i ostavljeno preko noći u hladnjaku, na temperaturi od +4 °C, zbog procesa bubrenja. Sjeme triju sorti soje naklijavano je u plastičnim posudama s sterilnim kvarcnim pijeskom natopljenim s 100 mL hranjive otopine po Hoaglandu, jakosti 1/4 (pH 6.0, Tablica 1; Hoagland i Arnon 1950). Hoaglandova otopina sadrži sve mikro i makro nutrijente koje su biljci potrebni za rast. Sjemenke su klijale 7 dana u tami, u klima-sobi na temperaturi od 23 °C (Slika 2a).

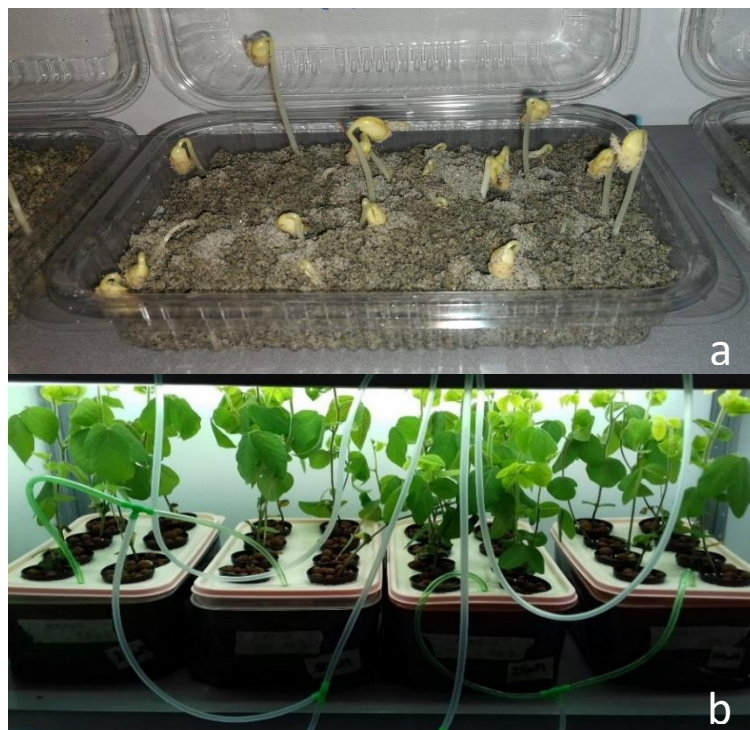
Nakon klijanja, klijanci soje su postavljeni na hidroponski uzgoj. Hidroponskim uzgojem smanjuje se dodir između štetnika i biljke, a time i sama oboljenja biljke, jer je hranjiva otopina za uzgoj sterilna. Biljke uzgajane na ovaj način pokazuju bolji prinos te vrlo skraćeno vrijeme uzgoja. Hidroponski se sustav za uzgoj soje sastojao od plastičnih posuda sa stalkom u koji su postavljene čaše mrežaste strukture za hidropon (Ø 5 cm), punjene sterilnom ekspandiranom glinom u koju je postavljen po jedan klijanac soje. Plastične su posude punjene hranjivom otopinom po Hoaglandu (3.5 L), te je u svaku posudu postavljen zračni kamen povezan sa zračnom pumpom koja raspršuje zrak i tako korijenu koji je uronjen u hranjivu otopinu

osigurava dostupnost kisika. Hidroponski sustav sa sojom postavljen je u klima-sobu na temperaturu od 23 °C, s fotoperiodom 16h dan/8h noć (Slika 2b).

Tijekom uzgoja soje u trajanju 3 tjedna, hranjiva otopina po Hoaglandu redovito je mijenjana svaki tjedan, pri tome je prvi tjedan korištena otopina jakosti 1/3, drugi tjedan 1/2 i treći tjedan otopina pune jakosti. Nakon 2. tjedna klijanci soje tretirani su kadmijem. Tretman je vršen sa stock otopinom kadmijeva acetata ( $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ), pri čemu su konačne koncentracije kadmija u hranjivoj otopini bile 25, 50 i 100  $\mu\text{M}$ , dok su kontrolne biljke tretirane istim volumenom  $\text{dH}_2\text{O}$  u trajanju od 7 dana.

**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 1 L 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
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246,47	1	246,47	2	Mg	2
<i>Mikronutrijenti – stock otopine</i>	Mr (g/mol)	c (mM)	$\gamma$ (g/L)	Volumen za 1 L (mL)	Element	Koncentracija elementa u 1 L otopine ( $\mu\text{M}$ )
$\text{H}_3\text{BO}_3$	61,84	46,25	2,86	1	B	46,25
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	197,91	9,15	1,81		Mn, Cl	9,15
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	289,55	0,77	0,22		Zn	0,77
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	249,71	3,2	0,8		Cu	3,2
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	241,97	1,03	0,25		Mo	1,03
<i>Fe-EDTA</i>	346,08	20	6,92	0,25	Fe	5



**Slika 2.** a) Naklijavanje soje na kvarcnom pijesku natopljenom otopinom po Hoaglandu.  
b) Hidroponski uzgoj soje (Fotografirala Josipa Ćosić).

### 2.3. Priprema proteinskih ekstrakata

Korijen i izdanak soje usitnjavani su tekućim dušikom uz pomoć tarionika i tučka uz dodatak polivinil-polipirolidona. Usitnjenom tkivu (oko 0.2 g) dodan je hladni ekstrakcijski pufer (100 mM kalij-fosfatni pufer, pH 7.0, 1 mM EDTA) nakon čega su uzorci homogenizirani vorteksiranjem. Proteini su ekstrahirani stajanjem 10 min na ledu te centrifugiranjem 15 min pri 20 000 g i na +4 °C. Talog izdanka je nakon odvajanja dobivenog supernatanta, reekstrahiran ponovnim dodatkom ekstrakcijskog pufera i centrifugiranjem. Pulirani proteinski ekstrakti izdanka pročišćavani su gel-filtracijskom kromatografijom pomoću PD-10 kolonica punjenih sa Sephadex G-25 medijem. Prije upotrebe kolona je ekvilibrirana s 25 mL ekstrakcijskog pufera, nakon čega je na kolonu dodano 2 mL proteinskog ekstrakta i 0.5 mL ekstrakcijskog pufera. Proteinska frakcija skupljena je u 3.5 mL eluensa.

Dobiveni proteinski ekstrakti korijena i izdanka pohranjeni su na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  do daljnjih analiza, a korišteni su za spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima GLO1, te određivanje koncentracije proteina.

#### **2.4. Mjerenje aktivnosti enzima glioksalaze 1**

Aktivnost enzima GLO1 određena je spektrofotometrijski mjerenjem porasta apsorbancije pri 240 nm. GLO1 katalizira izomerizaciju hemitioacetala u SLG. Hemitioacetal se za potrebe mjerenja enzimske aktivnosti dobiva neenzimski inkubacijom 2 mM MG-a i 2 mM reduciranog GSH u 50 mM kalij-fosfatnom puferu (pH 6.6), 10 minuta na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nakon inkubacije reakcijskoj je smjesi dodan proteinski ekstrakt čime je započela reakcija pri kojoj je porast apsorbancije praćen na 240 nm tijekom 3.5 minuta. Specifična aktivnost GLO1 računata je koristeći molarni ekstinkcijski koeficijent ( $\epsilon = 2.86\text{ mM/cm}$ ) a izražena je u jedinicama aktivnosti GLO1 po gramu proteina (U/g proteina,  $U = \mu\text{mol/min}$ ).

#### **2.5. Mjerenje koncentracije topljivih proteina**

Koncentracija topljivih proteina određena je metodom po Bradfordu (1976). U mikrotitarsku pločicu s 96 jažica pipetirano je 10  $\mu\text{L}$  proteinskog ekstrakta u triplikatu, kojem je dodano 200  $\mu\text{L}$  komercionalnog Bradfordova reagensa (Sigma). Nakon miješanja smjese, inkubacija se odvijala pri sobnoj temperaturi oko 5 minuta. Apsorbancija je mjerena pomoću čitača mikrotitarskih pločica Tecan pri valnoj duljini 595 nm. Kao standard upotrijebljen je albumin goveđeg seruma (BSA) te je na temelju vrijednosti apsorbancije poznatih koncentracija BSA dobivena standardna krivulja iz koje se ekstrapolira koncentracija proteina u uzorku.

#### **2.6. Statistička obrada podataka**

Dobiveni podaci obrađeni su u statističkom softverskom paketu STATISTICA ver 13.3 (StatSoft Inc). Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija. Jednofaktorska analiza varijance (eng. *one-way ANOVA*) korištena je kako bi se odredilo postoji li razlika između različitih skupina istog kultivara. Nakon što je utvrđeno postojanje razlike

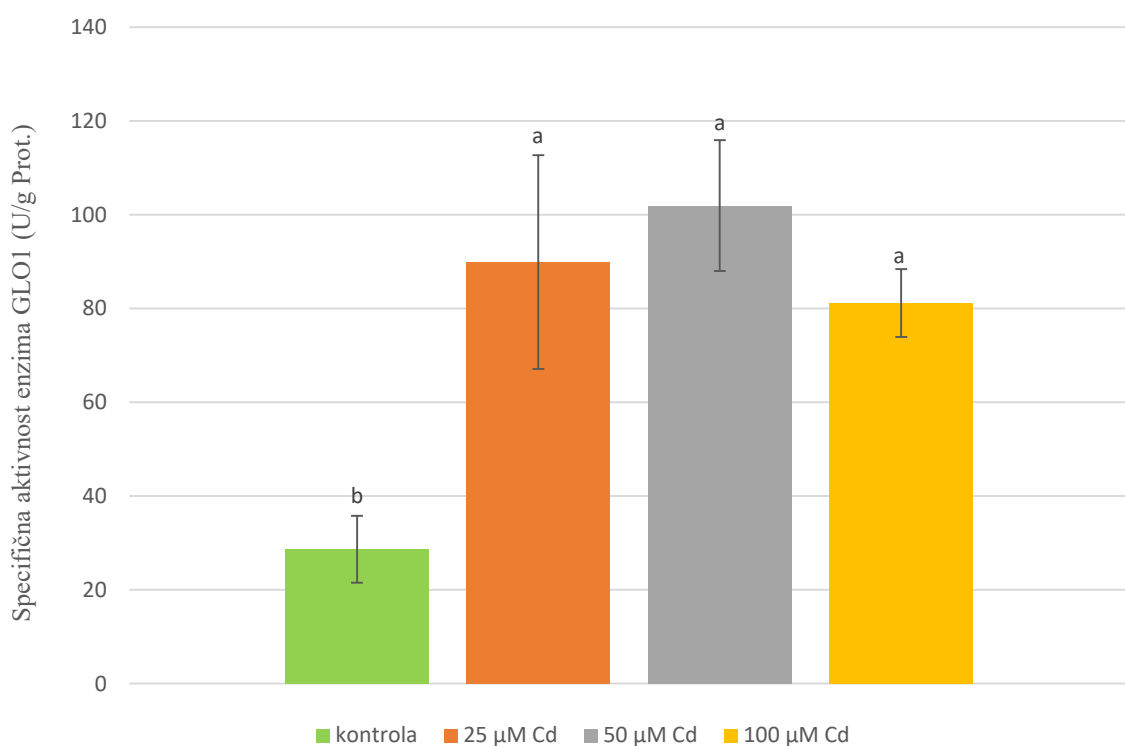


korišten je *post hoc* test Tukey kako bi se utvrdila značajna razlika između pojedinih skupina unutar određenog kultivara. Svi testovi provedeni su na razini značajnosti od 5% ( $p < 0,05$ ).

### 3. REZULTATI

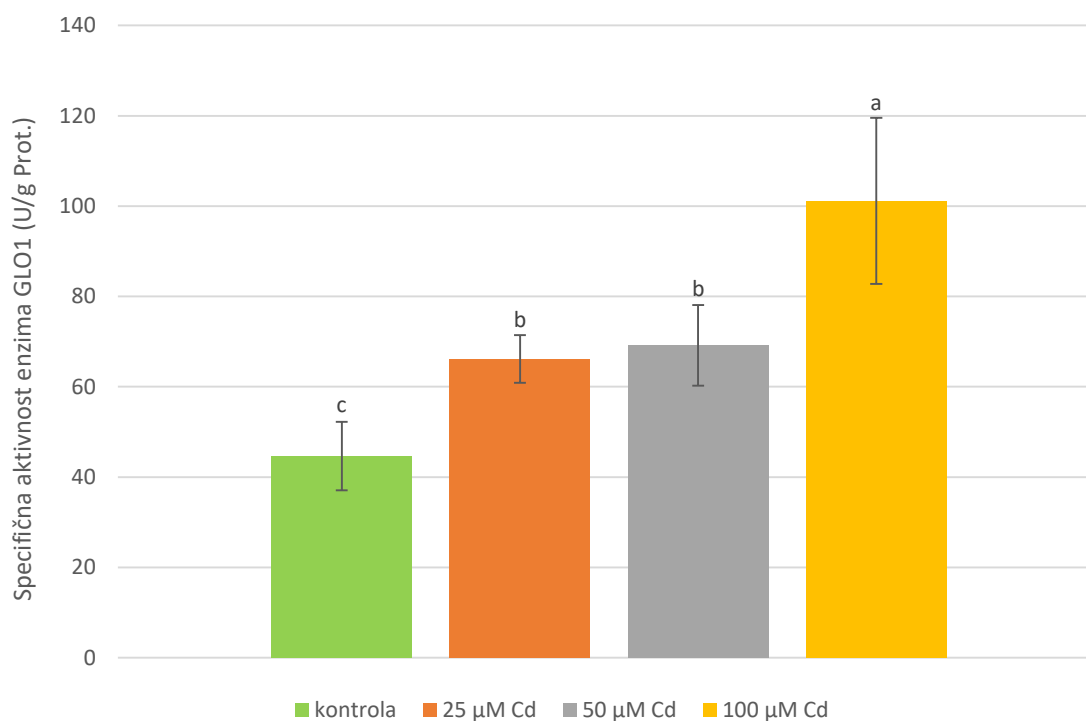
#### 3.1. Utjecaj kadmija na aktivnost glioksalaze 1 u izdanku tri kultivara soje

U izdanku kultivara Korana tretman svim koncentracijama kadmija uzrokovao je statistički značajno povećanje aktivnosti enzima GLO1, u odnosu na kontrolnu skupinu. Tako su tretmani s 25, 50 i 100  $\mu\text{M}$  kadmijem uzrokovali porast aktivnosti enzima GLO1 redom za 213.71%, 255.65% i 183.22% u odnosu na kontrolu (Slika 3).



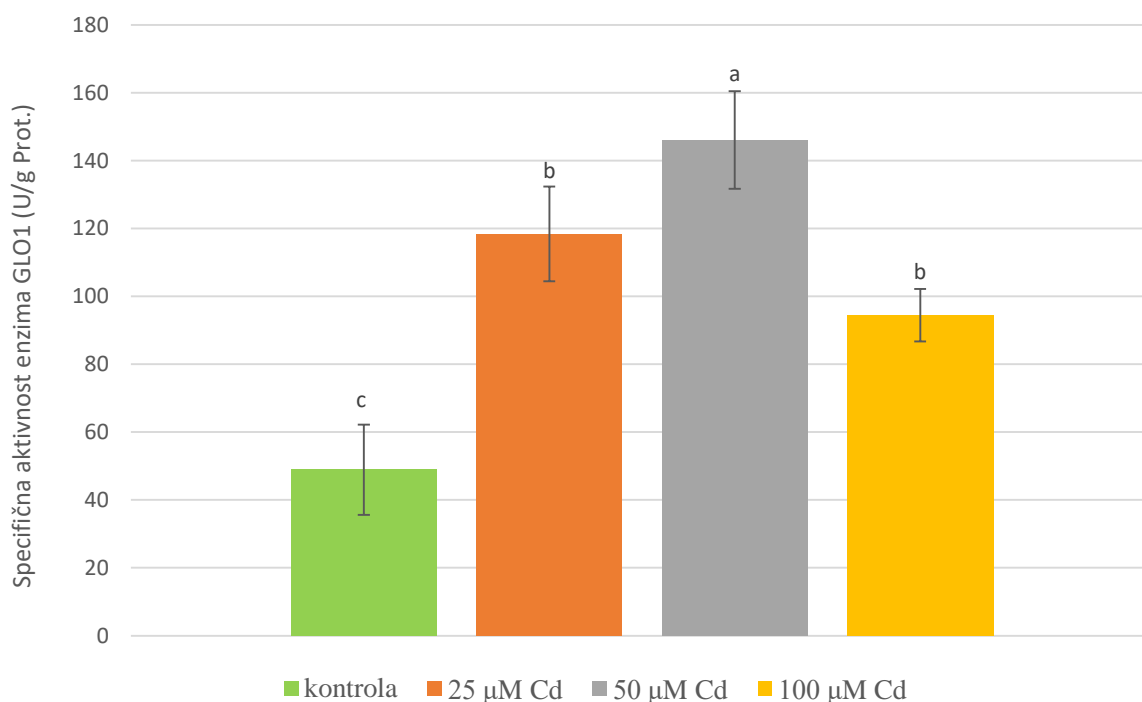
**Slika 3.** Specifična aktivnost glioksalaze 1 (GLO1) u izdanku kutivara Korana nakon tretmana s različitim koncentracijama kadmija (25, 50 i 100  $\mu\text{M}$ ). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina.

U izdanku kultivara Lucija, do statistički značajnog povećanja aktivnosti enzima GLO1 došlo je kod tretmana sa svim primijenjenim koncentracijama kadmija, s tim da je povećanje aktivnosti enzima bilo u korelaciji s količinom primijenjenog kadmija. Tako je tretman 25  $\mu\text{M}$  kadmijem uzrokovao povećanje aktivnosti enzima za 48%, tretman 50  $\mu\text{M}$  kadmijem povećanje za 54.92%, te je najveća količina kadmija (100  $\mu\text{M}$ ) povećala aktivnost enzima za 126.47% u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 4).



**Slika 4.** Specifična aktivnost glioksalaze 1 (GLO1) u izdanku kutivara Lucija nakon tretmana s različitim koncentracijama kadmija (25, 50 i 100  $\mu\text{M}$ ). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina.

U izdanku kultivara Ika tretman kadmijem je uzrokovao sličan trend kao i u kutivara Korana. Svi tretmani kadmijem su uzrokovali statistički značajno povećanje aktivnosti GLO1, u odnosu na kontrolnu skupinu. Tako su tretmani s 25, 50 i 100  $\mu\text{M}$  kadmijem uzrokovali porast aktivnosti enzima GLO1 redom za 142.03%, 198.68% i 93.15% u odnosu na kontrolu (Slika 5).

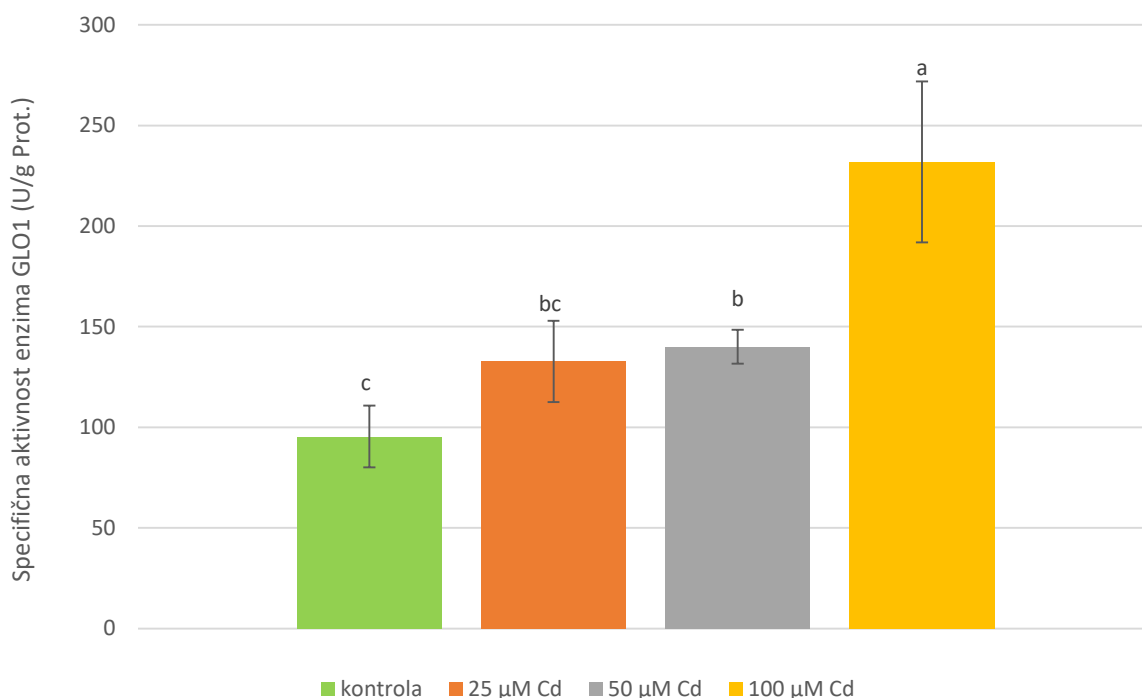


**Slika 5.** Specifična aktivnost glioksalaze 1 (GLO1) u izdanku kutivara Ika nakon tretmana s različitim koncentracijama kadmija (25, 50 i 100  $\mu\text{M}$ ). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina.

### 3.2. Utjecaj kadmija na aktivnost glioksalaze 1 u korijenu tri kultivara soje

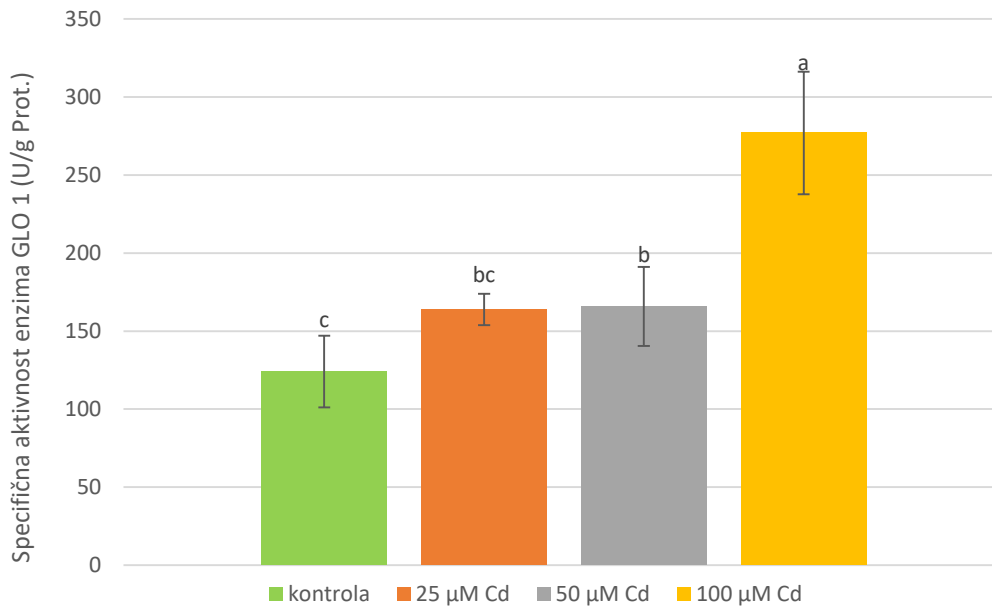
U korijenu kultivara Korana tretmani rastućim količinama kadmija uzrokovali su i rastući trend povećanja aktivnosti GLO1, s tim da je statistički značajno povećanje aktivnosti prisutno kod tretmana s 50 i 100  $\mu\text{M}$  kadmijem. Tretman s 50  $\mu\text{M}$  kadmijem uzrokovao je povećanje

aktivnosti enzima za 46.81% u odnosu na kontrolu. Najveće je povećanje aktivnosti GLO1 prisutno kod tretmana s najvećom količinom kadmija, pri čemu se aktivnost povećala za 143.12% u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 6).



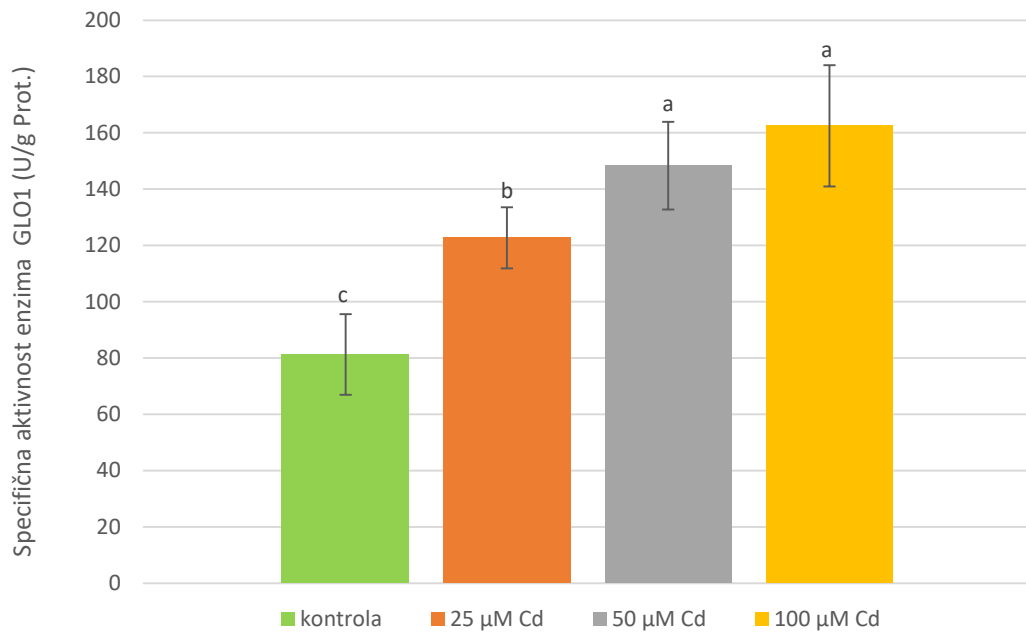
**Slika 6.** Specifična aktivnost glioksalaze 1 (GLO1) u korijenu kutivara Korana nakon tretmana s različitim koncentracijama kadmija (25, 50 i 100 µM). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina.

Kao i u kultivara Korana, tretman rastućim količinama kadmija uzrokovao je rastuće aktivnosti GLO1 u korijenu kultivara Lucija, s tim da je statistički značajno povećanje aktivnosti enzima, u odnosu na kontrolu, prisutno kod primjene 50 i 100 µM kadmija. Nakon tretmana s 50 µM kadmijem došlo je do porasta aktivnosti od 32.04 % u odnosu na kontrolu, dok je najveće povećanje aktivnosti zabilježeno kod tretmana najvećom količinom kadmija, gdje se aktivnost GLO1 povećala za 129.10 % u odnosu na kontrolu (Slika 7).



**Slika 7.** Specifična aktivnost glioksilaze 1 (GLO1) u korijenu kutivara Lucija nakon tretmana s različitim koncentracijama kadmija (25, 50 i 100 µM). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina.

U korijenu kultivara Ika, do statistički značajnog povećanja aktivnosti enzima GLO1 došlo je kod tretmana sa svim primijenjenim koncentracijama kadmija, s tim da je povećanje aktivnosti enzima bilo u korelaciji s količinom primijenjenog kadmija. Tako je tretman 25 µM kadmijem uzrokovao povećanje aktivnosti enzima za 50.99%, tretman 50 µM kadmijem povećanje za 82.47%, te je najveća količina kadmija (100 µM) povećala aktivnost enzima za 99.89 % u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 8).



**Slika 8.** Specifična aktivnost glioksalaze 1 (GLO1) u korijenu kutivara Ika nakon tretmana s različitim koncentracijama kadmija (25, 50 i 100  $\mu\text{M}$ ). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina.

## 4. RASPRAVA

Teški metali su jedan od čimbenika abiotičkog stresa koji imaju štetan utjecaj na rast i razvoj biljaka, i time uzrokuju jako velike gubitke u poljoprivrednoj proizvodnji. S druge strane, putem hranjivih dijelova biljke ulaze u hranidbeni lanac i time uzrokuju brojna patološka stanja konzumenata. Jedan od najštetnijih teških metala je kadmij, čijem su povećanju u poljoprivrednim tlima doprinijele razne antropogene aktivnosti (Sarma 2011; Nouairi i sur. 2009).

Biljke koje rastu na tlu kontaminiranom velikim količinama kadmija pokazuju različite fenotipske, fiziološke i biokemijske promjene kao što su kloroza, nekroza, kovranje lista, inhibicija rasta korijena, promijenjena aktivnost puči, smanjen vodni potencijal, efluks kationa, promjene u funkciji membrane, inhibicija fotosinteze, promijenjen metabolizam, promijenjene aktivnosti važnih enzima i dr (Hasanuzzaman i Fujita M 2011). Budući da je zajednička posljedica toksičnosti uzrokovane teškim metalima prekomjerna akumulacija ROS-a i MG-a, biljke su razvile različite antioksidacijske i detoksikacijske mehanizme kako bi uklanjale ROS i MG, budući da ovi spojevi mogu uzrokovati peroksidaciju lipida, oksidaciju proteina, inaktivaciju enzima i oštećenje DNA (Hossain i sur. 2012). Glavni put detoksikacije MG-a je glioksalazni sustav koji se sastoji od dva enzima GLO1 i GLO2, a koji za detoksikaciju koristi GSH (Rabbani i sur. 2014). Kako je proizvodnja soje kao vodeće uljne i proteinske kulture često ugrožena uslijed abiotičkog stresa uzrokovanog kadmijem, vrlo je važno poznavati detoksikacijske mehanizme koji mogu doprinijeti zaštiti od teških metala, čija sve veća prisutnost u okolišu ugrožava prinos ove kulture. Kako različite biljne vrste, ali i kultivari iste vrste pokazuju razlike u akumulaciji i toleranciji na kadmij cilj je ovog istraživanja bio odrediti razlike u biokemijskim mehanizmima detoksikacije u tri hrvatska kultivara soje, koji se razlikuju prema sposobnosti akumulacije kadmija u zrnu. Istraživani kultivari su odabrani na temelju preliminarnih istraživanja kojima je utvrđeno kako kultivar Korana akumulira najviše kadmija u zrnu, zatim Lucija nešto manje, te je Ika pokazala najmanji akumulacijskim kapacitet (neobjavljeno istraživanje). U ovom je istraživanju određivan učinak različitih koncentracija kadmija na glioksalazni sustav, odnosno na aktivnost enzima GLO1, posebno u korijenu i izdanku tri kultivara soje. Utjecaj kadmija na aktivnosti enzima glioksalaznog sustava ovisio je o primijenjenoj koncentraciji kadmija i tipu tkiva, ali ne i o kultivaru.



Razlike u genotipovima omogućavaju nastanak vrsta s povećanom tolerancijom na teške metale te njihovu smanjenu akumulaciju. Nekolicina znanstvenika (Hinsley i sur.1978; Foy 1995) istraživanjem je utvrdila da različiti genotipovi jedne vrste reagiraju različito na teške metale u tlu. U našem slučaju je glioksalazni je sustav kao detoksikacijski mehanizam pokazao jednak odgovor na tretman kadmijem u sva tri kultivara. Bez obzira što je u slučaju ovog mehanizma izostao sortno-specifični odgovor, naša istraživanja drugih detoksikacijskih mehanizama pokazala su kako se tri istraživana kultivara razlikuju u drugim istraživanim biokemijskim mehanizmima detoksikacije (neobjavljeno istraživanje). Aktivnost enzima GLO1 u izdanku sva tri kultivara soje povećana je pri svim primijenjenim količinama kadmija, dok u korijenu soje postoji trend povećanja koji nije značajan kod svih koncentracija, ali je u korelaciji s količinom primijenjenog kadmija. Istraživanja provedena na rajčici i gorušici pokazala su povećane aktivnosti GLO1 uslijed izlaganja ovih vrsta različitim abiotičkim stresovima, uključujući i teške metale (Espartero i sur. 1995; Veena i sur. 1999). Hossain i sur. (2009) u svojem su istraživanju na klijancima bundeve pokazali kako su količina nastalog MG-a uslijed stresa i aktivnost enzima GLO1 u korelaciji. Dobivena korelacija ukazuje na važnost enzima GLO1 u porastu tolerancije na stres uzrokovan teškim metalima, te također izdvaja glioksalazni sustav kao glavni detoksikacijski mehanizam uklanjanja MG-a u biljaka (Hossain i sur. 2009). Osim detoksikacije MG-a, glioksalazni sustav doprinosi toleranciji na stres reciklirajući GSH, te održavajući na taj način homeostazu GSH (Creighton i sur. 1988; Thornalley 1990). Nasuprot ovim istraživanjima, mnoga su istraživanja potvrdila da, u većini slučajeva, prilikom duljeg trajanja i većeg intenziteta stresa dolazi do smanjenja aktivnosti enzima glioksalaznog sustava. Stoga aktivnost samih enzima ovisi o intenzitetu i duljini trajanja stresa (Hossain i sur. 2004). Povećana aktivnost enzima GLO1 pri tretmanu kadmijem, u našem istraživanju, očito ima važnu ulogu u detoksikaciji i toleranciji istraživanih kultivara na kadmij. Uvid u biokemijske mehanizme detoksikacije u kojima važnu ulogu ima i glioksalazni sustav omogućava razvijanje strategija za povećanje tolerancije na Cd.

## 5. ZAKLJUČAK

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

- Utjecaj kadmija na aktivnosti enzima glioksalaznog sustava ovisi o primjenjenoj koncentraciji kadmija i tipu tkiva, ali ne i o kultivaru.
- Aktivnost enzima GLO1 u izdanku sva tri kultivara soje povećana je pri svim primijenjenim količinama kadmija, dok u korijenu soje postoji trend povećanja koji nije značajan kod svih primijenjenih koncentracija. Osim toga, kod korijena postoji korelacija u povećanju aktivnosti s primijenjenom koncentracijom kadmija, dok u izdanku korelacija nije prisutna kod svih kultivara. Ove razlike u odgovoru glioksalaznog sustava na kadmij između izdanka i korijena triju kultivara soje ukazuju na tkivno-specifični odgovor.
- Uvid u biokemijske mehanizme detoksikacije u kojima važnu ulogu ima i glioksalazni sustav omogućava razvijanje strategija za povećanje tolerancije na kadmij.

## 6. LITERATURA

Apel, K.; Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Reviews of Plant Molecular Biology* 55 : 373–399.

Arora, Ajay (2002) Oxidative Stress and Antioxidative System in Plants. *Current Science* 82: 1227–1238.

Balestrasse KB, Gardey L, Gallego SM, Tomaro ML. (2001) Response of antioxidant defence system in soybean nodules and roots subjected to cadmium stress. *Aust J Plant Physiology* 28: 497-504.

Barać, M.B., Stanojević, S.P., Pešić, M.B. (2005) Biologically active components of soybeans and soy protein products – a review. *APTEFF* 36 : 1-266.

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.

Calder, P.C. (2002) Dietary modification of inflammation with lipids. *The Proceedings of the Nutrition Society* 61: 345–358.

Caurant F., Aubajj A., Lahaye V., Van Canneyt O., Rogan E., Lopez A., Addink M., Churlaud C., Robert M. And Bustamante P. (2006) Lead contamination of small cetaceans in european waters – the use of stable isotopes for identifying the sources of lead exposure. *Marine Environment Research* 62 : 131-148.

Chaplen (1998) Incidence and potential implications of the toxic metabolite methylglyoxal in cell culture: A review. *Cytotechnology* 26: 173–183.

Chhotu D., Jadia M., Fulekar H. (2008) Phytoremediation: the application of vermicompost to remove zinc, cadmium, copper, nickel and lead by sunflower plant. *Environmental engineering and management journal* 7(5):547-558.

Cordero B, Lodeiro P, Herrero R, Esteban Sastre de Vicente M. (2004) Biosorption of cadmium by *Fucus spiralis*. *Environmental Chemistry* 1: 180–18

Cordle C.T. (2004) Soy protein allergy: incidence and relative severity. *Journal of Nutrition* 134, 1213S–1219S.

Creighton DJ, Migliorini M, Pourmotabbed T and Guha MK (1988) Optimization of efficiency in the glyoxalase pathway. *Biochemical Journal* 27:7376- 7384.

Diers, Brian W., et al (1992) RFLP analysis of soybean seed protein and oil content. *Theoretical and Applied Genetics* 83.5: 608-612.

Enders, J.G. (2001) Soy protein products: characteristics, nutritional aspects, and utilization. AOCS Press. Champaign

Espartero J, Aguayo IS and Pardo JM (1995) Molecular characterization of glyoxalase I from a higher plant; upregulation by stress. *Plant Molecular Biology* 29:1223-1233

Fassett, David W. (1975). Cadmium: Biological effects and occurrence in the environment. *Annual review of pharmacology* 15: 425-435.

Foy, C.D. (1995). Differential manganese tolerances of cotton genotypes in nutrient solution. *Journal of Plant Nutrition* 18: 685-706.

Foyer CH.(1997) Oxygen metabolism and electron transport in photosynthesis, In *Oxidative Stress and the molecular biology of antioxidants defenses*. Cold Spring Harbour Laboratory Press. Cold Spring Harbour NY. 587-621.

Friberg, Lars, Magnus Piscator, and Gunnar Nordberg (1971) Cadmium in the environment: a toxicological and epidemiological appraisal.

Gallego, Susana M., et al (2012).Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: insight into regulatory mechanisms. *Environmental and Experimental Botany* 83: 33-46.

Ghosh J, Myers E. (1998) Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells. *PNAS* 95: 13-182.

Grill, E., Loffler, S., Winnacker, E. L., Zenk, M. H. (1989) Phytochelatin, the heavy-metalbinding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 6838-6842.

Gupta, D. K., Palma, J. M., Corpas, F. J. (ur.) Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Plants Under Stress. Springer, Switzerland. 191-217

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. (2011) Selenium-induced upregulation of the antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system reduces salinity-induced damage in rapeseed seedlings. *Biological Trace Element Research* 143:1704–1721

Hassan M. J., Zhang G., Wu F., Wei K., Chen Z. (2005) Zinc alleviates growth inhibition and oxidative stress caused by cadmium in rice. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 168: 255–261.

Hegedüs, A.; Erdei, S.; Janda, T.; Tóth, E.; Horváth, G.; Dudits, D. (2004) Transgenic tobacco plants overproducing alfalfa aldose/aldehydes reductase show high tolerance to low temperature and cadmium stress. *Plant Science* 166 :1329–1333.

Hinsley, T.D., Alexander, D.E., Zieger, E.C., Barrett, G.L. (1978) Zinc and cadmium accumulation by corn inbreds grown on sludge-amended soil. *Agronomical Journal* 70: 425-428.

Hippler FWR, Boaretto RM, Quaggio JA, Azevedo RA, Mattos D Jr. (2015) Towards soil management with Zn and Mn: estimates of fertilisation efficacy of Citrus trees. *Ann Appl Biol* 166: 484–495

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

Holmes, R.P., Assimos, D.G. (2004) The impact of dietary oxalate on kidney stone formation. *Urological Research*. 32: 311-316.

Holmgren G. , Meyer M. W., Daniels R. B., Kubota J. and Chaney R. L. (1993) Cadmium, lead, zinc, copper and nickel in agricultural soils in the United States. *Journal of Environmental Quality* 22 : 335–348.

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

Hossain, M. A., Hossain, M. Z., & Fujita, M. (2009) Stress-induced changes of methylglyoxal level and glyoxalase I activity in pumpkin seedlings and cDNA cloning of glyoxalase I gene. *Australian Journal of Crop Science* 3(2): 53.

Hutton, M. (1987) Sources of cadmium in the environment. *Ecotoxicology and environmental safety* 7.1: 9-24.

Inoue Y, Kimura A (1995) Methylglyoxal and regulation of its metabolism in microorganisms". *Adv. Microb. Physiol. Advances in Microbial Physiology* 37: 177–227.

Inze, Dirk, and Marc Van Montagu (2003) *Oxidative stress in plants*. CRC Press.

Jarup L: Hazards of heavy metal contamination (2003) *Br Med Bull* 68: 167–182

Kaur, C.; Singla-Pareek, S.L.; Sopory, S.K. (2014) Glyoxalase and methylglyoxal as biomarkers for plant stress tolerance. *Crit. Rev. Plant Science* 33: 429–456.

Khale, H. (1993) Response of root of trees to heavy metals. *Environmental Experimental Botany* 33 : 99–119.

Khan N, Ahmad I, Singh S, Nazar R. (2006) Variation in growth, Photosynthesis and yield of five wheat cultivars exposed to cadmium stress. *Agricultural Sciences* 9: 223-226.

Kubota, r., t. Kunito and s. Tanabe (2001) Arsenic accumulation in the liver tissue of marine mammals. *Environmental Pollution* 115: 303–312.

Liu, W., Zhang, X., Liang, L., Chen, C., Wei, S., Zhou, Q. (2015) Phytochelatin and oxidative stress under heavy metal stress tolerance in plants.

Mannervik, Bengt. (2008) Molecular enzymology of the glyoxalase system. *Drug metabolism and drug interactions* 23.1-2 :13-28.

- Merlos, M. A., Michálek, P., Kryštofová, O., Zítka, O., Adam, V., Kizek, R. (2014) The role of phytochelatins in plant and animals: A review. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies* 4: 22-2.
- Mittler, Ron.(2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science* 7.9: 405-410.
- Nouairi I, Ammar WB, Youssef NB, Miled DDB, Ghorbal MH, Zarrouk M (2009) Antioxidant defense system in leaves of Indian mustard (*Brassica juncea*) and rape (*Brassica napus*) under cadmium stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 31:237–247
- oilseed rapelings subjected to cadmium stress. *Journal of Plant Physiology* 329 : 457- 468.
- Olena K. Vatamaniuk; Elizabeth A. Bucher; James T. Ward; Philip A. Rea (2001) A new pathway for heavy metal detoxification in animals: phytochelatin synthase is required for cadmium tolerance in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry*. 276 (24): 20817–20820.
- Pan, A., Yang, M., Tie, F., Li, L., Chen, Z., & Ru, B. (1994) Expression of mouse metallothionein-I gene confers cadmium resistance in transgenic tobacco plants. *Plant molecular biology* 24: 341-351.
- Rabbani, N., Xue, M. and Thornalley, P.J. (2014) Activity, regulation, copy number and function in the glyoxalase system. *Biochemical Society Transactions*.42: 419–424
- Riaz, Mian N. (2006) *Soy Applications in Food*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Rout G. R., Das P. (2003) Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. Zinc. *Agronomie* 23: 3–11.
- Sarma H (2011) Metal hyperaccumulation in plants: a review focusing on phytoremediation technology. *Jornal of Environmental Science & Technology*. 4:118–138
- Schroeder and Balassa. (1963) Cadmium: uptake by vegetables from superphosphate and soil. *Science* 140: 819–820.
- Sies, Helmut (1997) Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Experimental physiology* 82 (2): 291–5.

Sigel H, Sigel A, yp. (2009). *Metallothioneins and Related Chelators (Metal Ions in Life Sciences)*. Metal Ions in Life Sciences. 5. Cambridge, England: Royal Society of Chemistry.

Thomas E. Carter et al.,(2004) Genetic Diversity in Soybean , dans Boerma HR, Specht JE, American Society of Agronomy, Soybeans : Improvement, Production, and Uses, Agronomy Monograph no 16.

Thornalley PJ (1990) The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochemical Journal* 269: 1-11.

Thornalley, Paul J. (1993) The glyoxalase system in health and disease. *Molecular aspects of medicine* 14.4 : 287-371.

Turóczy, Z.; Kis, P.; Török, K.; Cserhádi, M.; Lendvai, A.; Dudits, D.; Horváth, G.V. (2011) Overproduction of a rice aldo-keto reductase increases oxidative and heat stress tolerance by malondialdehyde and methylglyoxal detoxification. *Plant Molecular Biology* 75 : 399–412

Veena, Reddy VS and Sopory SK (1999) Glyoxalase I from *Brassica juncea*: molecular cloning, regulation and its over-expression confer tolerance in transgenic tobacco under stress. *Plant Journal* 17(4): 385-395.

Vistoli, G; De Maddis, D; Cipak, A; Zarkovic, N; Carini, M; Aldini, G ( 2013) Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation.

Yadav SK, Singla-Pareek SL, Ray M, Reddy MK, Sopory SK (2005) Methylglyoxal levels in plants under salinity stress are dependent on glyoxalase I and glutathione. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 337:61–67.