

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij
Molekularne bioznanosti

Ana Vuković

Biokemijski i molekularni mehanizmi odgovora klijanaca pšenice na selen

Doktorska disertacija

Osijek, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni
studij Molekularne bioznanosti

Doktorska disertacija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

BIOKEMIJSKI I MOLEKULARNI MEHANIZMI ODGOVORA KLIJANACA PŠENICE NA SELEN

Ana Vuković

Disertacija je izrađena u: Zavod za biokemiju i ekofiziologiju biljaka, Odjel za biologiju,
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Mentor/i: Dr.sc. Ivna Štolfa Čamagajevac, izvanredna profesorica
Dr.sc. Zdenko Lončarić, redoviti profesor

Kratki sažetak doktorske disertacije:

Pšenica (*Triticum aestivum* L. sorta Kraljica) izložena je različitim koncentracijama selenata i selenita s ciljem utvrđivanja utjecaja selena (Se) na oksidacijski status te antioksidacijske i druge obrambene odgovore izdanka i korijena klijanaca te utvrđivanja tkivno-specifičnih razlika u biokemijskom i molekularnom odgovoru. Prema morfo-fiziološkim analizama je utvrđeno da selenit ima niži prag toksičnosti od selenata. Mjerenjem pokazatelja oksidacijskog stresa je utvrđeno da Se ne uzrokuje oksidacijska oštećenja klijanaca jer aktivira detoksikacijske mehanizme na biokemijskoj i molekularnoj razini, ovisno o vrsti tkiva, koncentraciji i obliku primijenjenog Se. Rezultati ovog istraživanja doprinose boljem razumijevanju fiziološkog, biokemijskog i molekularnog odgovora pšenice na selen te doprinose razvoju učinkovitijih strategija biofortifikacije.

Broj stranica: 147

Broj slika: 37

Broj tablica: 5

Broj literaturnih navoda: 284

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: selen, biofortifikacija, pšenica, mehanizmi detoksikacije

Datum obrane: 13. srpnja 2022.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Dr. sc. Tomislav Vinković, izvanredni profesor
2. Dr. sc. Zorana Katanić, docent
3. Dr. sc. Vera Cesar, redovita profesorica u trajnom zvanju
4. Dr. sc. Valentina Pavić, izvanredna profesorica

Disertacija je pohranjena u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruđer Bošković Institute
University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of
Molecular biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Natural sciences
Scientific Field: Biology

BIOCHEMICAL AND MOLECULAR MECHANISMS OF WHEAT SEEDLINGS RESPONSE TO SELENIUM

Ana Vuković

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

Supervisor/s: Ivna Štolfa Čamagajevac, Associate Professor
Zdenko Lončarić, Full Professor

Short abstract:

Wheat (*Triticum aestivum* L., cv. Kraljica) was exposed to different concentrations of selenate and selenite to determine the effect of selenium (Se) on oxidative status and antioxidant and other detoxifying systems of shoots and roots and to determine biochemical and molecular tissue-specific responses. According to morpho-physiological analyses, selenite was found to have a lower toxicity threshold than selenate. Measurement of oxidative stress biomarkers showed that Se did not cause oxidative damage to wheat seedlings due to activation of detoxification mechanisms at the biochemical and molecular level, which depended on the type of tissue, concentration and form of applied Se. These results contribute to a better understanding of the physiological, biochemical, and molecular response of wheat seedlings to Se and the development of more effective biofortification strategies.

Number of pages: 147

Number of figures: 37

Number of tables: 5

Number of references: 284

Original in: Croatian

Key words: selenium, biofortification, wheat, detoxification mechanism

Date of the thesis defense: 13th July 2022.

Reviewers:

1. Ph. D. Tomislav Vinković, Associate Professor
2. Ph. D. Zorana Katanić, Assistant Professor
3. Ph. D. Vera Cesar, Full Professor
4. Ph. D. Valentina Pavić, Associate Professor

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Zahvala

- ❖ *Ovim putem bih se od sree zahvalila svojoj dragoj mentorici izv.prof.dr.sc. Ivni Štolfa Čamačajevac i mentoru prof.dr.sc. Zdenku Lončarić na stručnom vodstvu, podršci, savjetima i vremenu koje su posvetili tijekom mog znanstveno-istraživačkog rada i izradi ove disertacije. Posebno hvala Ivni koja je uložila vremena i truda u ovaj rad, a najviše zahvaljujem na podršci, razumijevanju i prijateljstvu.*

- ❖ *Hvala članovima ispitnog povjerenstva izv. prof. dr. sc. Tomislavu Vinković, doc. dr. sc. Zorani Katanić i prof. dr. sc. Veri Česar na čitanju disertacije, savjetima i sugestijama.*

- ❖ *Veliko hvala svim kolegama i prijateljima na podršci, ohrabriranju i razumijevanju, a koji su kroz svoje nesebično prijateljstvo u ovaj doktorat ugradili dio sebe. Posebno hvala dragim kolegicama koje su mi 'uskakale' kao pomoć pri eksperimentalnom radu.*

- ❖ *Najveće hvala onima bez čije ljubavi, podrške i pomoći ne bi ni bilo ovoga rada – mojoj obitelji i Danilu.*

- ... veliko hvala braći Josipu i Adamu te sestri Rosemary koji su mi bili, ali i ne prestaju biti veliki oslonac u životu. Posebno hvala Rosemary na pomoći i savjetima u eksperimentalnom radu i pisanju ovog rada, na usmjerenju, podršci, razumijevanju, ljubavi i ohrabriranju kad je bilo najteže.*

- ... hvala Lani, Noi, Karli, Sari i Jakovu jer su neprerasušani izvor inspiracije, srčce, ljubavi i smijeha.*

- ... jedno posebno, najveće hvala mojim roditeljima, Šimi i Kati, na svim odricanjima i cjelokupnom trudu koji su nesebično uložili u moje obrazovanje, a najviše hvala na bezuvjetnoj ljubavi i podršci kroz život.*

- ... za kraj, jedno veliko hvala Danilu koji je, uz svoju ljubav, podršku, razumijevanje i pomoć, uvelike olakšao pisanje ove disertacije.*

Ana Vuković

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1 Selen - 'esencijalni otrov'.....	2
1.2. Selen u tlu	3
1.3. Biofortifikacija	4
1.4. Unos i metabolizam Se u biljkama	6
1.5. Uloga Se u biljkama	10
1.6. Reaktivne kisikove tvari i detoksikacijski mehanizmi biljnih stanica	13
1.6.1. Selen kao antioksidans i prooksidans	15
1.7. Cilj istraživanja	19
2. MATERIJALI I METODE	21
2.1. Biljni materijal i opis eksperimenta	22
2.2. Određivanje koncentracije Se	24
2.3. Biomasa i klijavost.....	24
2.4. Određivanje koncentracije klorofila i karotenoida	25
2.5. Biomarkeri oksidacijskog stresa	25
2.5.1. Određivanje količine produkata lipidne peroksidacije	25
2.5.2. Određivanje količine vodikovog peroksida	26
2.6. Ekstrakcija ukupnih topljivih proteina	26
2.7. Određivanje koncentracije proteina.....	27
2.8. Određivanje aktivnosti katalaze.....	27
2.9. Određivanje aktivnosti gvajakol-peroksidaze	27
2.10. Određivanje aktivnosti askorbat-peroksidaze.....	28
2.11. Određivanje aktivnosti glutathion-reduktaze	28
2.12. Određivanje aktivnosti glutathion S-transferaze	29
2.13. Određivanje aktivnosti glutathion-peroksidaze	29
2.14. Određivanje aktivnosti glioksilaze I	30
2.15. Određivanje aktivnosti monodehidroaskorbat-reduktaze	30
2.16. Određivanje aktivnosti dehidroaskorbat-reduktaze	30
2.17. Određivanje koncentracija askorbata i dehidroaskorbata.....	31
2.18. Određivanje količine reduciranog i oksidiranog glutathiona	31
2.19. Izdvajanje ukupne RNA iz izdanka i korijena pšenice	32
2.20. Određivanje količine i kakvoće RNA	33

2.21. Tretman DNazom i obrnuto prepisivanje RNA u komplementarnu DNA	33
2.22. Kvantitativni PCR	36
2.23. Statistička obrada podataka	37
3. REZULTATI	38
3.1. Koncentracija Se u izdanku i korijenu pšenice	39
3.2. Biomasa i klijavost pšenice	40
3.3. Koncentracije ukupnog klorofila i karotenoida	42
3.4. Razina lipidne peroksidacije u izdanku i korijenu pšenice	43
3.5. Količina vodikovog peroksida u izdanku i korijenu pšenice	45
3.6. Aktivnost katalaze u izdanku i korijenu pšenice	46
3.7. Aktivnost gvajakol-peroksidaze u izdanku i korijenu pšenice	47
3.8. Aktivnost askorbat-peroksidaze u izdanku i korijenu pšenice	49
3.9. Aktivnost glutation-reduktaze u izdanku i korijenu pšenice	50
3.10. Aktivnost glutation S-trasferaze u izdanku i korijenu pšenice	52
3.11. Aktivnost glutation-peroksidaze u izdanku i korijenu pšenice	53
3.12. Aktivnost glioksilaze I u izdanku i korijenu pšenice	54
3.13. Aktivnost monodehidroaskorbat-reduktaze u izdanku i korijenu pšenice	56
3.14. Aktivnost dehidroaskorbat-reduktaze u izdanku i korijenu pšenice	57
3.15. Koncentracija askorbata u izdanku i korijenu pšenice	59
3.16. Koncentracija dehidroaskorbata u izdanku i korijenu pšenice	60
3.17. Količina reduciranog glutationa u izdanku i korijenu pšenice	62
3.18. Količina oksidiranog glutationa u izdanku i korijenu pšenice	63
3.19. Omjer reduciranog i oksidiranog glutationa u izdanku i korijenu pšenice	65
3.20. Kvaliteta izolirane ukupne RNA iz korijena i izdanka pšenice	66
3.21. Genska ekspresija	68
3.21.1. Relativna ekspresija gena <i>ATP-Sul</i> u izdanku i korijenu pšenice	68
3.21.2. Relativna ekspresija gena <i>cs</i> u izdanku i korijenu pšenice	69
3.21.3. Relativna ekspresija gena <i>gr</i> u izdanku i korijenu pšenice	70
3.21.4. Relativna ekspresija gena <i>gpx</i> u izdanku i korijenu pšenice	71
3.21.5. Relativna ekspresija gena <i>apx</i> u izdanku i korijenu pšenice	72
3.21.6. Relativna ekspresija gena <i>gst</i> u izdanku i korijenu pšenice	73
3.21.7. Relativna ekspresija gena <i>mdhar</i> u izdanku i korijenu pšenice	74
3.21.8. Relativna ekspresija gena <i>dhar</i> u izdanku i korijenu pšenice	75

4. RASPRAVA.....	77
5. ZAKLJUČCI.....	99
6. LITERATURA	103
7. SAŽETAK	135
8. SUMMARY	139
9. ŽIVOTOPIS.....	143
10. POPIS PUBLIKACIJA	145

1. UVOD

1.1 Selen - 'esencijalni otrov'

Selen (Se) je metaloid 16. skupine periodnog sustava elemenata koji je po svojim fizikalno-kemijskim svojstvima sličan sumporu (S). Otkrio ga je švedski kemičar Jons Jakob Berzelius 1817. godine., a ime je dobio po grčkoj riječi 'selene' što u prijevodu znači 'mjesec' (Boyd, 2011). Prema dosadašnjim spoznajama, prvi zapisi o teškim posljedicama trovanja selenom datiraju iz 13. stoljeća, kada je Marco Polo u pokrajini Shanxi (Kina) uočio ozbiljne posljedice kod životinja koje su se hranile biljkama bogate selenom (Hartikainen, 2005; Bodnar i sur., 2012). Sličan problem je zabilježen i u 19. stoljeću u SAD-u. Smatralo se da je Se isključivo otrovan element, dok 1957. godine nije otkriveno kako male koncentracije Se sprječavaju mišićnu distrofiju i cirozu jetre u štakora (Schwarz i Foltz, 1957). Istraživanja koja su tada uslijedila orijentirana su na značajnu biološku ulogu Se, pri čemu je utvrđeno kako je u manjim koncentracijama Se esencijalan za životinje.

Danas je poznata esencijalna uloga manjih koncentracija Se za ljude (Burk, 2002), životinje (Schomburg i sur., 2004), bakterije (Stadtman, 1974) i neke niže biljke (Abdel-Hamid i Skulberg, 1995). Selen interferira s brojnim metaboličkim putevima živih organizama što se intenzivno istražuje već desetljećima. Svoju biološku ulogu najvećim dijelom ostvaruje preko dviju selenoaminokiselina, selenometionina (SeMet) i selenocisteina (SeCys). Spomenuta dva oblika, ali i drugi oblici Se, uglavnom se unose prehranom, pri čemu su biljke glavni izvor Se (Hariharan i Dharmaraj, 2020). U humanom genomu dokazano je postojanje najmanje dvadesetak različitih selenoproteina koji su uključeni u oksidoredukcijske reakcije, antioksidacijsku obranu, metabolizam tiroidnih hormona i imunološki odgovor, no postoje i oni kojima još nije dokazana uloga (Lu i Holmgren, 2009). Tako je Se dio katalitičkog centra nekoliko selenoproteina poput glutation-peroksidaze (Rotruck i sur., 1973), tioredoksin-reduktaze (Gladyshev i sur., 1996) i jodotironin-dejodinaze (Behne i sur., 1990). Posebno je značajan i selenoprotein P koji ima ulogu u prijenosu Se iz jetre u druga tkiva (Burk i Hill, 2009). S obzirom na mnogobrojne uloge koje selenoproteini imaju kod ljudi i životinja, nedostatak Se u prehrani može uzrokovati ozbiljne zdravstvene posljedice. Tako se nedostatak Se povezuje s poremećenim djelovanjem hormona štitnjače (Ambroziak i sur., 2017), Kashin-Beckovom bolesti (Nesterov, 1964), Keshanovom bolesti (Chen i sur., 1980) i mnogim drugim bolestima povezanim s imunološkim, mišićno-koštanim, živčanim i reproduktivnim sustavom. Smatra se da od

oboljenja uzrokovanim nedostatkom Se boluje više od 500 milijuna ljudi širom svijeta (Haug i sur., 2007) te da postoji čvrsta poveznica između učestalosti oboljenja i područja gdje su tla siromašna Se (Ambroziak i sur., 2017).

Iako je Se esencijalan element, tanka je granica između njegove esencijalnosti i toksičnosti. Unos prevelikih koncentracija Se u organizam rezultira trovanjem ili selenozom koja može biti akutna i kronična. Unatoč njenim letalnim posljedicama, selenoza je puno rjeđa od posljedica koje uzrokuje nedostatak Se u prehrani. Simptomi selenoze su raznovrsni i mnogobrojni, a dijareja, hipotenzija, hipokalemija, cijanoza, plućni edem, miopatija, grčevi u trbuhu, gubitak kose, oštećenje noktiju su samo neki od njih. Vrsta i jačina simptoma ne ovise samo o koncentraciji, nego i o obliku Se (Lech, 2002; Lewis, 2007; Hadrup i Ravn-Haren, 2020).

1.2. Selen u tlu

Se se u prirodi rijetko pojavljuje u elementarnom obliku, ali se često pojavljuje u obliku sulfidnih ili ostalih minerala gdje je kombiniran s elementima poput srebra, bakra, nikla i olova (Natasha i sur., 2018). Iako su minerali najveći prirodni izvor Se (Nancharaiah i Lens, 2015), njegova prisutnost u stijinama, vulkanskoj tvari, fosilnim gnojivima, vodama i tlima govori o mnogobrojnosti i raznovrsnosti ostalih izvora. Pojava, raspodjela i koncentracija Se u tlu ovise prvenstveno o vrsti matične stijene od koje je tlo nastalo, o prirodnim procesima poput oborina te o vrsti tla i njegovim karakteristikama (Gong i sur., 2022). Osim prirodnih procesa, pojava i raspodjela Se u tlu uvelike ovise i o antropogenim utjecajima. Među prirodnim procesima, uz oborine, koji uzrokuju značajno otpuštanje Se u tlo treba spomenuti erozije tla, požare i vulkanske erupcije. Poseban naglasak treba staviti na klimatske promjene s kojima se svijet trenutno suočava jer postoje istraživanja koja predviđaju da će promjene klime i sadržaj organskog ugljika tla rezultirati smanjenjem koncentracije Se u tlu, posebno u poljoprivrednim područjima (Jones i sur., 2017). S druge strane, antropogene aktivnosti koje bi mogle utjecati na pojavu i raspodjelu Se u tlu uključuju procese sagorijevanja nafte i ugljena, procese izolacije i pročišćavanja elemenata poput srebra, bakra, nikla i olova te brojne poljoprivredne aktivnosti kao što je agronomska biofortifikacija (Johnson i sur., 2010; Fordyce, 2013).

Koncentracije Se u tlu razlikuju se ovisno o geografskom položaju i vrsti tla (Wang i Gao, 2001; Lopes i sur., 2017). Raspon koncentracija Se u većini tala iznosi od 0.01 do 2 mg × kg⁻¹ (Nancharaiah i Lens, 2015; Natasha i sur., 2018), a prosječno

oko $0.4 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ (Gupta i Gupta, 2017). No, postoje i tla koja mogu biti okarakterizirana kao selenom siromašna i selenom bogata tla (seleniferna). Seleniferna tla mogu sadržavati do $1250 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ Se, a često nastaju iz sedimentih stijena te imaju visok udio organske tvari. Tla siromašna selenom sadrže manje od $0.5 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$, a često su to tla nastala iz magmatskih stijena (Gupta i Gupta, 2000; Hartikainen, 2005).

Se se u tlu može naći u nekoliko oksidacijskih stanja kao anorganski i organski oblik. Anorganski Se se nalazi u obliku elementarnog Se (Se^0), selenida (Se^{2-}), selenata (SeO_4^{2-}) i selenita (SeO_3^{2-}), a najznačajniji organski oblici su selenocistein (SeCys) i selenometionin (SeMet) (Fordyce, 2013). Bioraspoloživost i kemijski oblici Se u tlu ovise o reakcijama kao što su sorpcije, desorpcije, precipitacije, otapanja i formiranje kompleksa Se s različitim ligandima (Alfthan i sur., 2015). Se u tlu može stvarati komplekse s različitim elementima poput kisika, vodika, željeza, halogenih elemenata te brojnih drugih što može utjecati na njegova svojstva i bioraspoloživost. Tako se primjerice slabo topivi elementarni Se često nalazi u spojevima sa S poput selenovog sulfida (Se_2S_2), dok se selenat i selenit nalaze u ionskim oblicima topljivim u vodi (Adriano, 2001). Bioraspoloživost različitih oblika Se ovisi i o fizikalno-kemijskim svojstvima tla kao što su pH i redoks potencijal. Tako je selenat karakterističan za dobro oksidirana tla, prozračena i alkalna tla semiaridnih područja. Vrlo je topljiv u vodi te se slabije adsorbira za čestice tla što ga čini jednim od najmobilnijih anorganskih oblika Se (Yamada i sur., 1998). Suprotno, selenit je zastupljen u umjereno oksidiranim tlima neutralnog pH i jače se adsorbira za čestice tla od selenata, dok selenidi dominiraju u izrazito kiselim tlima, netopivi su u vodi te kao takvi nedostupni biljkama (Yamada i sur., 1998; Zhu i sur., 2009).

1.3. Biofortifikacija

Razina Se u hrani biljnog porijekla ovisi o geološkim, geokemijskim i klimatskim čimbenicima koji utječu na njegovu prisutnost i bioraspoloživost u tlu. Kako Se u hranidbeni lanac ulazi kroz biljke, nedostatak Se u prehrani ljudi i životinja prvenstveno je posljedica niskih razina Se u tlima (Stoffaneller i Morse, 2015; Winkel i sur., 2015). Budući da je u regijama siromašnim Se potrebno prehranom povećati njegov unos kako bi se zadovoljile dnevne potrebe za istim, s vremenom su se razvile isplative i održive strategije za proizvodnju hrane bogate Se. Potencijalno rješenje uključuje agronomsku i genetičku biofortifikaciju čiji je cilj povećanje koncentracije i bioraspoloživosti Se u jestivim dijelovima biljaka (White i Broadley, 2005).

Najprikladnije kulture za biofortifikaciju predstavljaju žitarice, poput riže, kukuruza i pšenice, koje zbog velike nutritivne vrijednosti konzumira veliki dio svjetskog stanovništva (Boldrin i sur., 2013; Ducsay i sur., 2016).

Agronomska biofortifikacija Se se odnosi na aplikaciju različitih oblika Se u tlo u zonu korijena ili folijarno (Boldrin i sur., 2013). Brojna dosadašnja istraživanja govore o učinkovitosti ove strategije na povećanje koncentracije Se u riži (Boldrin i sur., 2013), salati (Ríos i sur., 2008), pšenici (Ducsay i sur., 2016), leći (Thavarajah i sur., 2008), kukuruzu (Chilimba i sur., 2012) i brojnim drugim vrstama. Učinkovitost agronomske biofortifikacije prvenstveno ovisi o obliku Se, ali i o načinu njegove primjene. Od svih postojećih kemijskih oblika Se, u biofortifikaciji se najčešće koriste selenat i selenit jer su najdostupniji biljkama te se lakše unose od ostalih oblika (Broadley i sur., 2010; Ramos i sur., 2010; Chilimba i sur., 2012; Galinha i sur., 2014; de Lima Lessa i sur., 2019). Premarathna i suradnici (2012) su utvrdili kako se biofortifikacija pospješuje ako se neki od oblika Se aplicira zajedno s hranjivim gnojivom kao što je urea. Iako većina istraživanja pokazuju kako je biofortifikacija, neovisno o načinu aplikacije Se, učinkovitija uslijed izlaganja selenatu nego selenitu (Mao i sur., 2014; Ros i sur., 2016; Li i sur., 2018), pojedina istraživanja su utvrdila suprotno (Lidon i sur., 2018). K tomu, Nothstein i suradnici (2016) su utvrdili kako je selenit u riži potaknuo akumulaciju organskog Se, koji je uglavnom bio pohranjen u korijenu, nejestivom dijelu biljke. Suprotno tome, unos selenata rezultirao je njegovom akumulacijom u višim dijelovima izdanka, što je bitan preduvjet za prijenos selenata do zrna. Uspoređujući način aplikacije Se, smatra se kako su folijarni tretmani učinkovitiji od aplikacije Se u tlo koja je znatno popularnija strategija (Mao i sur., 2014; Ros i sur., 2016). No primjerice, Boldrin i suradnici (2013) su svojim istraživanjem utvrdili kako su oba načina bila jednako uspješna u biofortifikaciji riže nakon izlaganja selenatu i selenitu. Prednost folijarne aplikacije Se, u odnosu na direktnu aplikaciju u tlo, je u tome što nema prijenosa od korijena do izdanka te je neovisna o fizikalno-kemijskim čimbenicima tla koji mogu smanjiti učinkovitost biofortifikacije. Također, folijarnom aplikacijom se postiže jednak učinak kao i aplikacijom u tlo, samo sa znatno manjim koncentracijama primijenjenog Se (Ros i sur., 2016). Međutim, treba napomenuti kako je za uspješnu folijarnu biofortifikaciju potrebna što veća površina lista za bolju adsorpciju. Folijarnu biofortifikaciju mogu ograničiti i uvjeti u okolišu koji obuhvaćaju promjene temperature i relativne vlažnosti zraka, brzinu i smjer vjetra te padaline (Szerement i sur., 2021), a ključno je primijeniti ju u odgovarajućoj fazi rasta i razvoja usjeva (Wang i sur., 2020).

Unatoč prednostima folijarne biofortifikacije, aplikacija Se direktno u tlo također ima svojih prednosti što ju čini 'popularnijom' strategijom. Aplikacija Se u tlo pozitivno utječe na količinu rizobakterija koje potiču rast biljaka (PGPR; engl. *plant growth promoting rhizobacteria*), a prilikom čega raste brojnost i raznolikost ostalih mikrobnih zajednica tla (Liu i sur., 2019). Osim toga, Liu i suradnici (2019) su utvrdili kako Se u tlu smanjuje relativnu brojnost patogenih gljiva kao što su vrste roda *Olpidium*, *Armillaria*, *Coniosporium*, *Microbotryomycetes* i *Chytridiomycetes*.

Osim agronomske, važno je spomenuti i genetičku biofortifikaciju koja se može ostvariti klasičnim oplemenjivanjem biljaka i primjenom genetičkog inženjeringa. Oplemenjivanje biljaka je prirodni put stvaranja genetičke raznolikosti biljnih kultivara umjerenog ili visokog kapaciteta za usvajanje i prijenos Se do jestivih dijelova usjeva ili kultivara koji primarno unose organski oblik Se (Broadley i sur., 2006; Wu i sur., 2015). S druge strane, razvojem tehnologije i novih metoda u molekularnoj biologiji, genetičko inženjerstvo se sve više počinje primjenjivati kao strategija u biofortifikaciji. Genetičkim inženjeringom se može povećati akumulacija i tolerancija Se od strane biljke, a pritom važnu ulogu imaju enzimi povezani s metabolizmom S, odnosno Se (Pilon-Smits i sur., 1999; White i sur., 2009). U dosadašnjim istraživanjima dobiveno je nekoliko transgenih biljaka koje bi bile pogodne za biofortifikaciju budući da imaju povećan kapacitet unosa i akumulacije Se u jestivim dijelovima biljaka. Tako su LeDuc i suradnici (2006) transformirali vrstu *Brassica juncea* s genima koji kodiraju ATP-sulfurilazu (ATP-Sul) i selenocisten-metiltransferazu (SMT) čime su dobili transgene biljke koje su akumulirale devet puta više Se, i to najviše u obliku metilselenocisteina (MetSeCys). Chen i suradnici (2019) su transformirali duhan (*Nicotiana tabacum* L.) s genom iz vrste *B. juncea* L. koji kodira SMT. Transgeni duhan je akumuliranjem većih koncentracija MetSeCys u listovima pokazao veću toleranciju na Se prilikom izlaganja selenitu nego divlji tip biljaka. Upravo su ovakva otkrića doprinijela tome da se sve više genetički inženjering spominje kao nadopuna klasičnom oplemenjivanju što bi moglo značajno doprinijeti budućim istraživanjima genetičke biofortifikacije Se. Za sada genetički inženjering nije toliko rasprostranjen i prihvaćen u praksi kao što je to slučaj s agronomskom biofortifikacijom.

1.4. Unos i metabolizam Se u biljkama

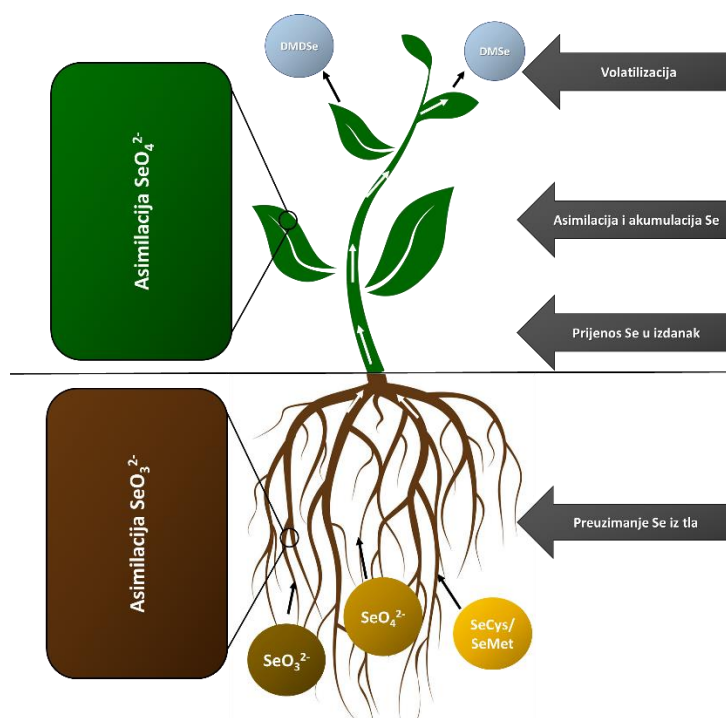
Unos Se iz tla te njegova distribucija u biljkama ovise o prvenstveno o biljnoj vrsti, koncentraciji i obliku Se, fizikalno-kemijskim svojstvima tla poput saliniteta i pH te

o prisutnosti drugih elemenata (Arvy, 1989; Zayed i sur., 1998; Wang i sur., 2005). Biljne vrste se uvelike razlikuju po svojoj sposobnosti akumuliranja Se pa tako razlikujemo hiperakumulatore, sekundarne akumulatore i neakumulatore. Hiperakumulatorne vrste, koje rastu na seleniferim tlima, mogu akumulirati > 1000 mg Se \times kg⁻¹ suhe tvari. Nadalje, sekundarni akumulatori akumuliraju 100-1000 mg Se \times kg⁻¹ suhe tvari bez da pokazuju simptome toksičnosti, a neakumulatorne vrste manje od 100 mg Se \times kg⁻¹ suhe tvari (Gupta i Gupta, 2017).

Biljke korijenom iz tla primarno preuzimaju Se u obliku selenata i selenita, ali mogu preuzimati i organske oblike poput SeMet (*Slika 1*) (Zayed i sur., 1998). Ostale oblike Se koji su prisutni u tlu, elementarni Se i selenide, biljke ne mogu preuzimati jer su netopljivi u vodi (Fernández-Martínez i Charlet, 2009). Iako biljke putem korijena preuzimaju selenat, selenit i organski Se, mehanizmi njihova unosa i prijenosa se bitno razlikuju. Smatra se da organski oblici Se iz tla u biljku ulaze putem aminokiselinskih prijenosnika (Hirner i sur., 2006), a zahvaljujući kemijskoj sličnosti Se i S, selenat se prenosi putem visoko afinitetnih sulfatnih prijenosnika prisutnih na plazma membrani epidermalnih stanica korijena (Li i sur., 2008; 2012; Schiavon i sur., 2015). S druge strane, poznata su tri načina unosa selenita pa se tako dio unosi putem fosfatnih (Zhang i sur., 2014) i silicijevih prijenosnika (Zhao i sur., 2010), a dio pasivnom difuzijom (Arvy, 1989). Kako se spomenuta dva anorganska oblika Se prenose sulfatnim, odnosno fosfatnim prijenosnicima, u literaturi je zabilježeno kako unos Se ovisi o prisutnosti S, odnosno fosfora u tlu (Arvy, 1989; Zayed i sur., 1998) te selektivnost prijenosnika ovisi o biljnoj vrsti i njezinom nutritivnom statusu (Zhu i sur., 2009).

Nakon unosa Se u biljku, slijedi njegova translokacija te asimilacija do organskih oblika koja uključuje veliki broj različitih enzima i međuprodukata (*Slika 1*). Osim što se razlikuju po mehanizmu unosa u biljku, selenat i selenit se razlikuju u raspodjeli unutar biljke te u putu asimilacije. Nakon unosa selenata, sulfatnim prijenosnicima se prenosi u ksilem kojim putuje do kloroplasta u izbojku gdje se sulfatnim asimilacijskim putem metabolizira do organskih oblika. Kaur i Sharma (2018) su utvrdili veću koncentraciju Se u listovima pšenice uslijed izlaganja selenatu u odnosu na selenit. U listovima jedne vrste graha je također zabilježen porast koncentracije Se nakon izlaganja selenatu, dok tretman selenitom nije imao nikakvog utjecaja (Silva i sur., 2020). S druge strane, selenit se primarno akumulira u korijenu gdje se odmah asimilira čime je ograničen njegov prijenos u izbojak (Souza i sur., 1998; Li i sur., 2008). U prilog tome ide

istraživanje Hawrylak-Nowaka (2013) kojim je utvrđeno da je koncentracija Se u korijenu nakon primjene selenita znatno veća u odnosu na selenat.

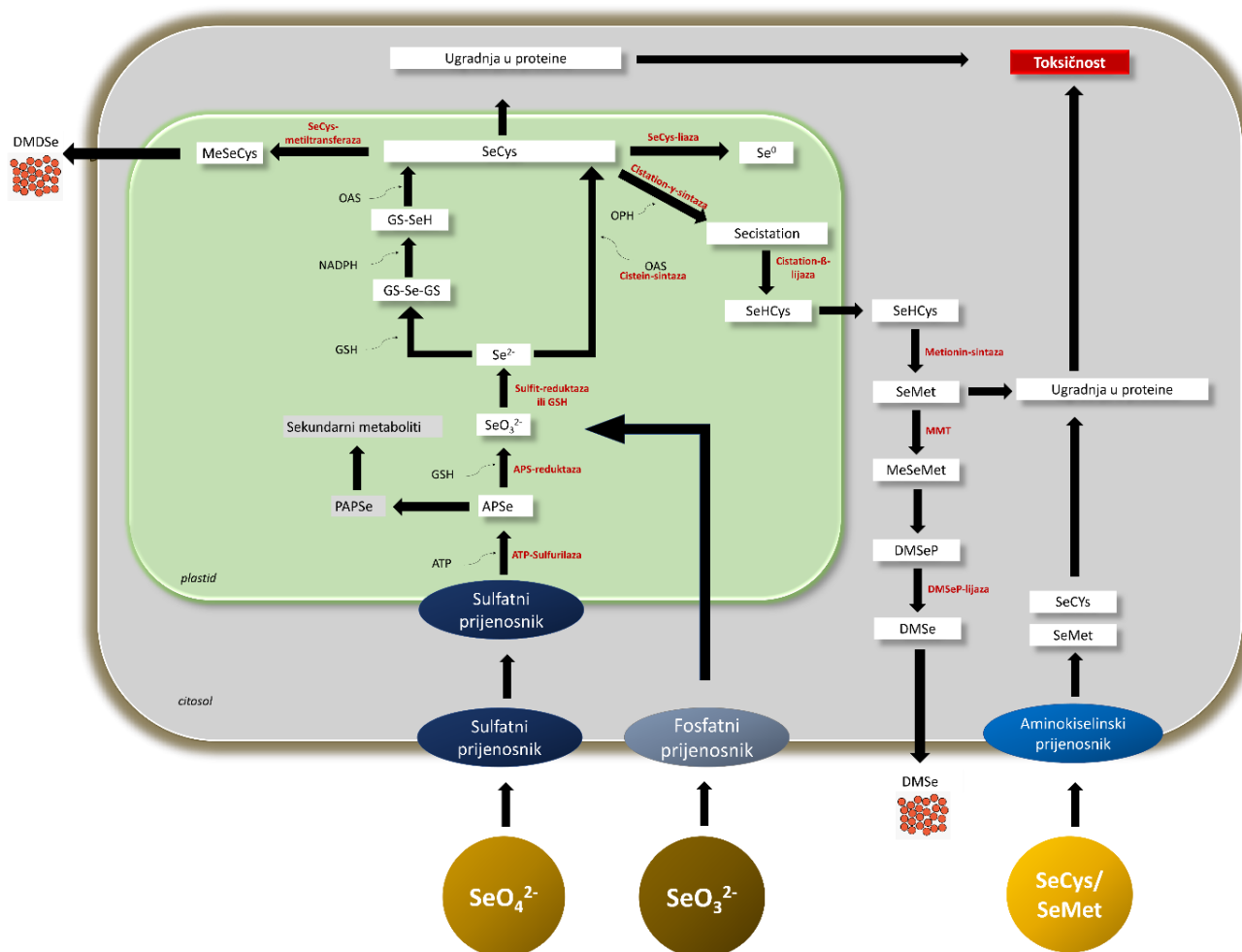


Slika 1. Shematski prikaz unosa Se u biljke iz tla. Biljka iz tla može preuzimati anorganski i organski Se. Anorganski Se se nalazi u obliku selenata (SeO_4^{2-}) i selenita (SeO_3^{2-}), a organski kao selenocistein (SeCys) i selenometionin (SeMet). Selenit se asimilira do organskih oblika odmah u korijenu čime je smanjena njegova translokacija u izdanak, dok se selenat ksilemom prenosi do plastida u izdanku gdje se i asimilira. Nakon asimilacije, različiti organski oblici Se se akumuliraju u biljkama, a dio se volatizira u atmosferu u obliku dimetilselenid (DMSse) i dimetildiselenid (DMDSse).

Prvi korak u asimilacijskom putu selenata ujedno predstavlja i osnovu razlike u putu asimilacije u usporedbi sa selenitom. U tom koraku se odvija redukcija selenata do selenita u kloroplastima izbojka uz pomoć enzima ATP-Sul i APS-reduktaze (Sors i sur., 2005) (*Slika 2*). U svojem istraživanju, Pilon-Smits i suradnici (1999) su transformirali vrstu *B. juncea* s genom *AtAPS1* iz uročnjaka koji kodira ATP-Sul te utvrdili da su transgene biljke u izdancima imale do dva puta veću aktivnost ATP-Sul u odnosu na netransformirane biljke. Također, rendgenskom apsorpcijskom spektroskopijom utvrđeno je da su netransformirane biljke nakon izlaganja selenatu akumulirale Se u obliku selenata, dok je selenat kod transgenih biljaka bio reduciran i

akumuliran u organskom obliku. Time su zaključili kako je prekomjerna ekspresija *ATP-Sul* uzrokovala povećanu redukciju selenata te je asimilacija selenata do organskih oblika ograničena upravo korakom kojeg katalizira *ATP-Sul*. Poznato je da selenat može značajno povećati kako aktivnost tako i ekspresiju *ATP-Sul* (Ramos i sur., 2011). No, pokazalo se kako i selenit može pozitivno utjecati na ekspresiju *ATP-Sul* što je utvrđeno analizom transkriptoma gena uključenih u metabolizam Se u korijenu vrste *Camellia sinensis* (Cao i sur., 2018).

Jednom nastali selenit, kao i onaj u korijenu, asimilira se do organskih oblika SeCys i SeMet od kojih mogu nastati i netoksični hlapljivi oblici, dimetilselenid (DMSe) i dimetildiselenid (DMDS₂) koji volatiziraju u atmosferu (Pilon-smits i Quinn, 2010). Selenit se može reducirati do SeCys enzimskim i neenzimskim putem, a korak koji im prethodi je redukcija selenita do selenida (Se^{2-}). U neenzimskom putu, selenid se uz prisustvo reduciranog glutationa (GSH) prvo reducira do selenodiglutationa (GS-Se-GS), a potom do selenopersulfida (GS-SeH) uz utrošak nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH). U posljednjem koraku se O-acetilserin (OAS) veže na GS-SeH pri čemu nastaje SeCys koji se može dalje prenijeti u citosol. U enzimskom putu ključnu ulogu ima cistein-sintaza (CS), kompleks koji se sastoji od serin-acetil transferaze (SAT) i O-acetilserintiolijaze (OAS-TL), a katalizira reakciju između Se^{2-} i OAS u svrhu nastajanja SeCys (Pilon-Smits i Quinn, 2010). Od nastalog SeCys može nastati velik broj raznovrsnih seleno-spojeva, a većina njih se može razvijati u nekoliko različitih metaboličkih smjerova. Tako od SeCys može nastati elementarni Se koji ne interferira sa staničnim procesima te može povećati toleranciju biljaka na Se, kao što je vidljivo u uročnjaka (Pilon i sur., 2003). Nadalje, metilacijom SeCys nastaje metil-selenocistein (MeSeCys) koji daljnjim reakcijama može prijeći u jedan od skladišnih oblika Se kod hiperakumulatora ili u plinoviti DMDS₂. Spajanjem SeCys s O-fosfohomoserinom nastaje selenohomocistein (SeHCys) kojeg također može zadesiti nekoliko metaboličkih sudbina među kojima je i nastajanje SeMet uz djelovanje enzima metionin-sintaze. Uz sve navedeno, SeCys kao i SeMet se mogu nespecifično ugraditi u proteine, uzrokovati promjene u njihovoj strukturi i funkciji te tako uzrokovati toksičnost kod biljaka (Brown i Shrift, 1981). Nastajanje različitih seleno-spojeva od kojih su neki prethodno spomenuti, omogućavaju biljkama da smanje ili izbjegnu toksičnost koju mogu uzrokovati SeCys i SeMet.



Slika 2. Shematski prikaz asimilacije i metabolizma Se u mezofilnim stanicama biljaka. Preuzeto i modificirano prema Guignardi i Schiavon (2017).

1.5. Uloga Se u biljkama

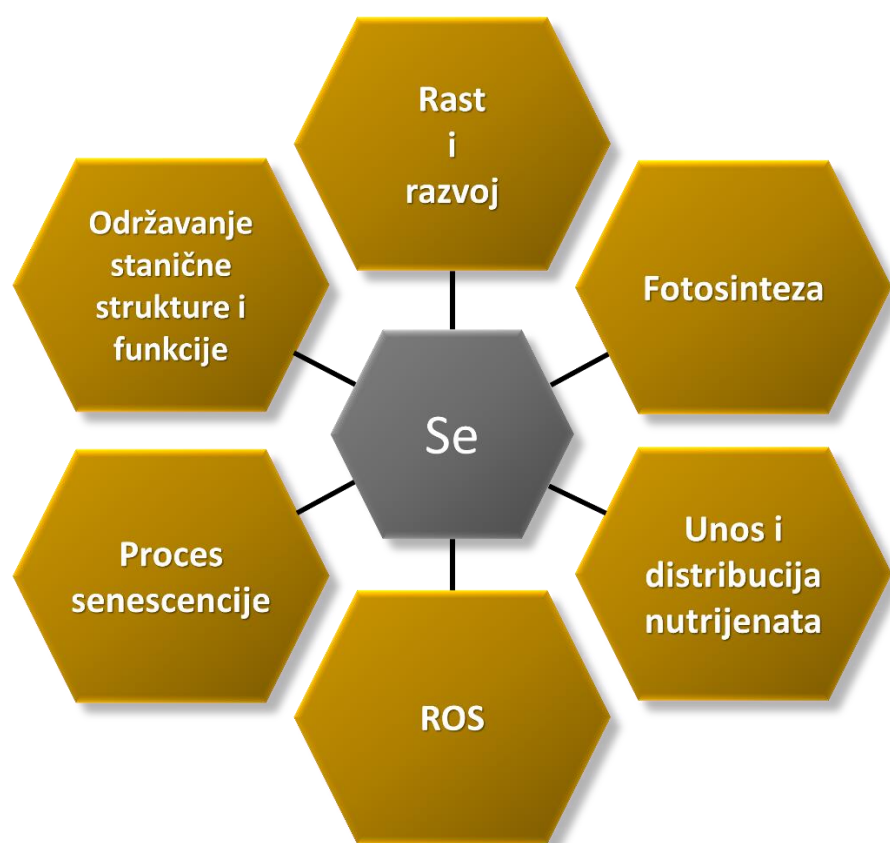
Uloga Se u biljkama ovisi prvenstveno o njegovom kemijskom obliku i koncentraciji, ali i o biljnoj vrsti, razvojnom stadiju te biljnom organu. Iako nije esencijalan za više biljke, Se pokazuje dvostruki učinak na njihov metabolizam. Pri niskim koncentracijama djeluje pozitivno na sveukupni rast i razvoj, dok je pri većim koncentracijama toksičan (Mostofa i sur., 2017; Du i sur., 2019; Ulhassan i sur., 2019). Selen interferira s brojnim metaboličkim putevima te je njegov učinak vidljiv na morfofiziološkoj, biokemijskoj i molekularnoj razini (Ulhassan i sur., 2019) (Slika 3).

Prisutnost manjih koncentracija Se u biljkama, bilo u obliku selenata ili u obliku selenita, pozitivno djeluje na njihov sveukupni rast i razvoj u stresnim ili normalnim uvjetima (Boldrin i sur., 2016; Gupta i Gupta, 2017; Wu i sur., 2017). Wu i suradnici (2017) su utvrdili da je Na_2SeO_3 primijenjen u koncentracijama od 1 i 5 $\mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$

povećao biomasu izdanaka i korijena kineskog kupusa, a povećanje biomase izdanka pšenice je zabilježeno i uslijed izlaganja selenatu (Lara i sur., 2019). Ulhassan i suradnici (2019) su ispitali utjecaj Na_2SeO_3 na nekoliko morfoloških karakteristika izdanaka i korijena uljane repice te dokazali kako je tretman 25 μM selenitom također uzrokovao povećanje biomase svježe tvari, ali i duljine lista te korijena. Iako Se u manjim koncentracijama pozitivno utječe na rast biljke, Ramos i suradnici (2010) su naglasili kako selenat i selenit ne utječu jednako na rast izdanka i korijena te da utjecaj ovisi o obliku Se, a svojim istraživanjem su pokazali povećanje biomase lista salate nakon izlaganja selenatu u odnosu na selenit. Osim na biomasu, Se utječe na porast prinosa različitih biljnih vrsta poput heljde (Jiang i sur., 2015), pšenice (Ducsay i sur., 2016), leće (Thavarajah i sur., 2015) i brojnih drugih. Istraživanja pokazuju kako je porast biomase uslijed izlaganja Se zapravo rezultat povećanog unosa minerala i povećane fotosintetske učinkovitosti koja, između ostalog, obuhvaća porast koncentracije fotosintetskih pigmenata (Ulhassan i sur., 2019). Pozitivan utjecaj Se na koncentraciju fotosintetskih pigmenata, klorofila i karotenoida, zabilježili su Azizi i suradnici (2020) kod vrste *Satureja hortensis* te Handa i suradnici (2019) kod vrste *B. juncea*. Pretpostavlja se kako Se ima ulogu u zaštiti molekula klorofila jer smanjuje njihov katabolizam (Handa i sur., 2019) te tako dijelom pomaže u održavanju strukture i funkcije kloroplasta. Osim toga, Filek i suradnici (2010) su također utvrdili značajan utjecaj Se na različite fiziološke i kemijske karakteristike kloroplasta te zaključili kako Se ima važnu ulogu u održavanju njihove strukture i fluidnosti. Nadalje, prisutnost Se u biljkama se još povezuje s odgađanjem procesa senescencije (Xue i sur., 2001; Djanaguiraman i sur., 2005) te zaštitom biljaka od različitih biotičkih (Freeman i sur., 1960) i abiotičkih stresnih čimbenika (Djanaguiraman i sur., 2010; Andrade i sur., 2018; Guo i sur., 2020).

Iako manje koncentracije Se mogu biti izuzetno korisne za više biljke, u većim koncentracijama Se postaje toksičan (Ulhassan i sur., 2019). Selen uzrokuje toksičnost putem dva mehanizma, od kojih jedan obuhvaća strukturne i fiziološke promjene proteina nastale uslijed ugradnje SeCys i SeMet umjesto Cys i Met, dok drugi obuhvaća pojavu oksidacijskog stresa. Simptomi toksičnosti kod biljaka mogu biti raznoliki te vidljivi na morfo-fiziološkoj, biokemijskoj i molekularnoj razini. Selen u većim koncentracijama, neovisno o kemijskom obliku, ima suprotan učinak na većinu gore spomenutih parametara te se općenito može reći da vodi prema smanjenju sveukupnog rasta i razvoja biljaka (Hawrylak-Nowak i sur., 2015). Tako su Ulhassan i

suradnici (2019) pokazali kako tretman s 25 μM selenitom utječe na porast biomase nekih kultivara uljane repice, dok tretman sa 100 μM selenitom ima suprotan učinak te uzrokuje smanjenje biomase izdanka i korijena, smanjenje površine lista i duljine korijena. Prins i suradnici (2011) su utvrdili kako selenat u navedenoj koncentraciji (100 μM) uzrokuje smanjenje biomase vrste *B. juncea*, ali i inhibiciju klijanja sjemena i polena. Uzrok tih simptoma je narušavanje nutritivnog statusa što dovodi do smanjenja stope fotosinteze, smanjenja koncentracije klorofila te narušavanja metabolizma ugljikohidrata što u konačnici rezultira smanjenjem sveukupnog rasta i razvoja biljke (Hawrylak-Nowak i sur., 2015). Uz smanjenje biomase, toksičnost posredovana Se očituje se i kroz pojavu simptoma poput kloroze i nekroze kod riže (Cabral Gouveia i sur., 2020), dok su Silva i suradnici (2018) u svojem istraživanju pokazali da folijarna primjena više od 50 g x ha⁻¹ natrijevog selenata smanjuje promjer floema i uzrokuju pojavu ružičastih naslaga soli kod jedne vrste graha.



Slika 3. Sažeti prikaz utjecaja Se na biljke. Preuzeto i modificirano prema Gupta i Gupta (2017).

1.6. Reaktivne kisikove tvari i detoksikacijski mehanizmi biljnih stanica

Reaktivne kisikove tvari (ROS; engl. *reactive oxygen species*) u stanicama redovno nastaju uslijed uzastopne redukcije molekule kisika, tj. kao nusprodukti procesa aerobnog metabolizma poput fotosinteze i staničnog disanja. Stoga su najvažniji izvori ROS-a u stanicama organeli kao što su kloroplasti (Dietz i sur., 2016) i mitohondriji (Huang i sur., 2016). Skupini ROS-a pripadaju ionski oblici kisika poput superoksidnog ($O_2^{\cdot-}$) i hidrosilnog radikala ($\cdot OH$) te molekularni oblici kao što su vodikov peroksid (H_2O_2) i singletni kisik (1O_2), koji se međusobno razlikuju po reaktivnosti i toksičnosti (Mittler i sur., 2004). Osim uobičajenog stvaranja ROS-a tijekom metaboličkih procesa, pojačana proizvodnja istih može se javiti uslijed izlaganja nekom biotičkom (Lamb i Dixon, 1997) ili abiotičkom stresu (Gill i Tuteja, 2010). ROS u svim biološkim sustavima, neovisno uslijed kojeg čimbenika nastao, ima dvostruku ulogu. U manjim koncentracijama djeluju kao sekundarni glasnici u procesima povezanim s rastom i razvojem biljke, a njihov utjecaj je vidljiv na razini transkripcije (Tian i sur., 2018). S druge strane, prekomjerno nakupljanje i akumulacija ROS-a u stanicama dovode do nastanka oksidacijskog stresa. Oksidacijski stres je fiziološko stanje u kojemu su oksidacijsko-redukcijski procesi u stanicama pomaknuti prema oksidaciji, a karakteriziraju ga oksidacijska oštećenja biološki važnih makromolekula kao što su DNA, proteini i lipidi (Svingen i sur., 1978; Reznick i Packer, 1994; Núñez i sur., 1999).

Kako bi spriječili prekomjerno nakupljanje ROS-a te nastanak oksidacijskog stresa, biljke su razvile endogene mehanizme kojima neutraliziraju porast različitih prooksidansa. Radi se o antioksidacijskom obrambenom sustavu koji se može podijeliti na enzimski i neenzimski (Ahmad i sur., 2010). Iako se radi o dva različita mehanizma, oba djeluju sinergistički i interaktivno s obzirom na to da imaju zajednički cilj, a to je uklanjanje ROS-a i održavanje stanične redoks ravnoteže. U enzimski antioksidacijski sustav se ubrajaju enzimi kao što su katalaza (CAT), askorbat-peroksidaza (APX), gvajakol-peroksidaza (GPOD), glutation-peroksidaza (GPX), glutation-reduktaza (GR), glutation S-transferaza (GST), monodehidroaskorbat-reduktaza (MDHAR) i dehidroaskorbat-reduktaza (DHAR), dok neenzimske antioksidanse čine reducirani glutation (GSH), askorbat (AsA), vitamin E, flavonoidi, polifenoli i karotenoidi (Ahmad i sur., 2010; Gill i Tuteja, 2010).

Održavajući stabilnost redoks stanja u stanicama, središnju ulogu u antioksidacijskom sustavu ima tiolni tripeptid glutation (GSH; γ -glutamil-cisteinil-glicin)

koji se nalazi u većini biljnih tkiva. Uz antioksidacijsku ulogu, poznato je da GSH služi kao skladišni i prijenosni oblik S u stanicama, sudjeluje kao važan elektron donor u brojnim metaboličkim reakcijama, sudjeluje u detoksikaciji ksenobiotika i konjugaciji metabolita te u prijenosu signala i ekspresiji gena koji se eksprimiraju kao odgovor na stres (Alscher, 1989; Szalai i sur., 2009; Noctor i sur., 2011). Kao antioksidans, sudjeluje u direktnom ili indirektnom uklanjanju ROS-a te održavanju drugih antioksidanasa u reduciranom stanju. GSH, zajedno s AsA-om, je dio askorbat-glutationskog ciklusa (AsA-GSH) kao jednog od značajnih detoksikacijskih mehanizama ROS-a u stanicama. Glavna uloga ciklusa je uklanjanje H_2O_2 pomoću APX-a uz AsA-u kao elektron donora te istovremena obnova AsA-e i GSH (Pang i Wang, 2010). Održavanje AsA-e i GSH u reduciranom stanju je važno za povećanje antioksidacijskog kapaciteta i zaštitu biljaka od oksidacijskih oštećenja. Brojna dosadašnja istraživanja su pokazala kako pojedini izvori stresa kao što su suša (Zhang i Kirkham, 1996), salinitet (Kaya i sur., 2020), visoke ili niske temperature (Ma i sur., 2008) te teški metali (Liu i sur., 2007) uvelike utječu na AsA-GSH ciklus. Većina navedenih istraživanja, ali i brojna druga, navode da upravo aktivacija AsA-GSH ciklusa igra važnu ulogu u ublažavanju stresa kod biljaka. Nadalje, treba spomenuti kako pojedina istraživanja govore o koordiniranoj indukciji AsA-GSH ciklusa i glioksalaznog sustava ovisnog o GSH (Wang i sur., 2019; Kamran i sur., 2020). Glavni cilj glioksalaznog sustava je uz pomoć GSH ukloniti citotoksični metilglioksal (MG) koji nastaje kao nusprodukt endogenih staničnih procesa poput glikolize i fotosinteze (Takagi i sur., 2014; Kaur i sur., 2016). Enzimi glioksalaza I (Glo1) i glioksalaza II (Glo2), koji čine glioksalazni sustav, u koordinaciji s GSH učinkovito kataliziraju pretvorbu prekomjerno proizvedenog MG u D-laktat. Upravo GSH predstavlja glavnu poveznicu između AsA-GSH i glioksalaznog sustava. Prekomjerno nakupljanje MG-a dovodi do karbonilnog stresa, a sam MG može brzo reagirati s aminokiselinama, bazama nukleinskih kiselina, fosfolipidima te tako uzrokovati ozbiljna biološka oštećenja te dovesti do pojave mutacija i stanične smrti (Hoque i sur., 2016). Zabilježeno je i kako prisutnost MG-a u stanicama može potaknuti stvaranje i akumulaciju ROS-a, ali i smanjiti aktivnost antioksidacijskih enzima (Hoque i sur., 2010; Saito i sur., 2011; Kaur i sur., 2014) što također govori o uskoj poveznici između glioksalaznog i antioksidacijskog detoksikacijskog mehanizma.

1.6.1. Selen kao antioksidans i prooksidans

Prisutnost Se u biljkama, neovisno o koncentraciji, uzrokuje stvaranje ROS-a (Valassakis i sur., 2018) te utječe na antioksidacijski obrambeni sustav. Tako pri manjim koncentracijama Se djeluje kao antioksidans, dok pri većim ima ulogu prooksidansa (Hartikainen i sur., 2000). Pozitivan utjecaj Se na sveukupni rast i razvoj biljke zasniva se upravo na njegovom antioksidacijskom djelovanju, dok je prooksidacijsko djelovanje jedan od glavnih uzročnika njegove toksičnosti jer uzrokuje prekomjerno nakupljanje ROS-a te oksidacijska oštećenja biološki važnih makromolekula.

Velik broj istraživanja koja ispituju utjecaj Se na antioksidacijski i oksidacijski status biljaka potvrđuju njegovu dvostruku ulogu koja ovisi o primijenjenom obliku, koncentraciji te biljnom tkivu. Ríos i suradnici (2008) su ispitali utjecaj različitih koncentracija selenata i selenita na antioksidacijski kapacitet lista salate (*Lactuca sativa* cv. Philipus) te utvrdili da je selenat manje toksičan oblik od selenita. Do takvog zaključka su došli nakon što je tretman selenatom uzrokovao porast aktivnosti antioksidacijskih enzima APX-a i GPX-a, porast koncentracija AsA i GSH te smanjenje količine H₂O₂ i razine lipidne peroksidacije (LPO) u odnosu na tretman selenitom. Dokazano je kako selenat i selenit mogu aktivirati drugačije mehanizme detoksikacije ROS-a. Naime, iako su Silva i suradnici (2020) utvrdili smanjenje LPO u jednoj vrsti graha (*Vigna unguiculata* (L.) walp) uslijed izlaganja selenatu i selenitu, analizom aktivnosti enzima pokazali su veći potencijal selenata u povećanju aktivnosti APX i GR, dok selenit pokazuje tendenciju povećavanja aktivnosti CAT. Poznato je i da povećani antioksidacijski kapacitet, u vidu povećanih aktivnosti antioksidacijskih enzima, pojedinim biljnim vrstama omogućava veću toleranciju na Se (Cao i sur., 2018). Osim toga, brojna istraživanja su pokazala kako manje koncentracije Se mogu zaštititi biljku te povećati otpornost na abiotičke stresne čimbenike poput povišenog saliniteta (Ashraf i sur., 2018), suše (Nawaz i sur., 2015), teških metala (Hasanuzzaman i sur., 2012), visokih temperatura (Djanaguiraman i sur., 2010) i UV-B zračenja (Yao i sur., 2011). Andrade i suradnici (2018) su istaknuli kako se povećanje otpornosti na sušu postiže kroz aktivaciju antioksidacijskog obrambenog sustava koji smanjuje nakupljanje ROS-a i oksidacijska oštećenja. Naime, oni su utvrdili porast aktivnosti superoksid-dismutaze (SOD) te smanjenje koncentracije H₂O₂ u listovima riže (*O. sativa* L. cv. IAC 202) pri 0.05 mg x kg⁻¹ selenata što je bila indikacija pozitivnog utjecaja Se na zaštitu biljaka od vodnog deficita. Sličan odgovor utvrđen je u

istraživanju Khalofaha i suradnika (2021) na kvinoji (*Chenopodium quinoa* Willd) u kojoj je tretman s 2.5 i 5 mg \times L⁻¹ selenita uzrokovao porast aktivnosti antioksidacijskih enzima kao što su CAT, APX i GR što je dovelo do smanjenja koncentracije H₂O₂ i malonildialdehida (MDA). U korijenu se također aktivira antioksidacijski odgovor te smanjuje negativan učinak određenog stresnog čimbenika na biljku. Primjerice, Cartes i suradnici (2009) su utvrdili da je tretman 2 μ M selenitom povećao aktivnost nespecifičnih peroksidaza te smanjio razinu LPO u korijenu ljujla (*Lolium perenne* cv. Aries) čime je povećao otpornost na stres uzrokovan aluminijem. Dosadašnja istraživanja pokazuju kako Se u uvjetima stresa potiče učinkovitost AsA-GSH ciklusa (Yildiztugay i sur., 2016; Wu i sur., 2017; Sharifi i sur., 2021). Tako je u izdanku i korijenu kineskog kupusa (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *utilis*) izloženog kadmiju prisutnost selenita povećala učinkovitost AsA-GSH ciklusa kroz porast koncentracije neezimskih antioksidansa GSH i AsA te porast aktivnosti enzima APX, GR i DHAR (Wu i sur., 2017). Nadalje, pojedina istraživanja pokazuju kako se pod određenim uvjetima kod različitih biljnih vrsta aktivira drugačiji detoksikacijski mehanizam unutar AsA-GSH ciklusa što dijelom može biti uvjetovano kemijskim oblikom primijenjenog Se kao što je već spomenuto u istraživanju Silve i suradnika (2020), a i samom biljnom vrstom. U bijeloj djetelini izloženoj suši, 5 μ M Na₂SeO₄ je uzrokovao povećanje aktivnosti APX, GR i DHAR, dok se aktivnost MDHAR nije mijenjala (Wang i sur., 2011). Wang i suradnici (2011) su također uočili značajne fluktuacije u metabolizmu AsA-GSH ciklusa u prisutnosti Se te utvrdili kako su GR i DHAR odgovorni za regulaciju navedenog ciklusa. S druge strane, Huang i suradnici (2018a) su zaključili da Na₂SeO₃ ublažava oksidacijski stres nastao uslijed izlaganja niskim temperaturama u listovima jagoda također aktivirajući AsA-GSH ciklus, ali s naglaskom da povećana aktivnost MDHAR ima ključnu ulogu u održavanju ravnoteže između potrošnje i regeneracije AsA. Osim što Se može smanjiti nakupljanje ROS-a i koncentracije MDA aktivirajući AsA-GSH ciklus, uočeno je da može interferirati i s gliksalaznim sustavom (Hasanuzzaman i sur., 2011; Ulhassan i sur., 2019). Ulhassan i suradnici (2019) su dokazali kako manje primijenjene koncentracije selenita (25 μ M) održavaju nisku razinu MG-a povećavajući aktivnosti enzima gliksalaznog sustava, Glo1 i Glo2. Hasanuzzaman i suradnici (2011) su došli do istog zaključka u istraživanju učinka 50 μ M selenata na uljanu repicu (*B. napus* cv. BINA). Prisutnost Se utječe i na dva enzima ovisnih o GSH, a to su GPX i GST. Tako su Mostofa i suradnici (2017) su uočili povećanje aktivnosti GPX i GST u biljkama riže nakon izlaganja Na₂SeO₄. Slične

rezultate pokazala su i druga istraživanja provedena na ljulju (Hartikainen i sur., 2000), bijeloj djetelini (Wang i sur., 2011) i uljanoj repici (Hasanuzzaman i sur., 2011).

Suprotno djelovanju manjih, veće koncentracije Se uzrokuju pojačano stvaranje i akumulaciju ROS-a, poput H_2O_2 , (Khalofah i sur., 2021) čije prekomjerno nakupljanje dovodi do oksidacijskih oštećenja biološki važnih makromolekula (Hartikainen i sur., 2000). Povećanje koncentracije ROS-a uslijed izlaganja većim koncentracijama Se zabilježeno je u vrstama kao što je bob (Mroczek-Zdyrska i Wójcik, 2012), krastavac (Józwiak i Politycka, 2019), kvinoja (Khalofah i sur., 2021) i riža (Cabral Gouveia i sur., 2020). Akumulacija ROS-a uslijed izlaganja Se potiče LPO čime se narušava integritet stanica što može rezultirati staničnom smrću (Hawrylak-Nowak i sur., 2015). Stoga je, kao biomarker oksidacijskog oštećenja uslijed izlaganja Se često praćena razina LPO (Ramos i sur., 2011; Łabanowska i sur., 2012; Mostofa i sur., 2017; Štolfa i sur., 2017; Ulhassan i sur., 2019). Povećanje razine LPO može biti praćeno smanjenjem aktivnosti antioksidacijskih enzima poput CAT, GR i DHAR, ali i smanjenjem neenzimskih antioksidansa poput AsA-e (Mostofa i sur., 2017), ali i suprotno tomu povećanjem aktivnosti antioksidacijskih enzima. Tako su Mostofa i suradnici (2017) uslijed tretmana većim koncentracijama Se primijetili povećane koncentracije GSH i aktivnost GST te zaključili kako veće koncentracije Se mogu uzrokovati desinkronizaciju antioksidacijskog sustava. Također, Akbulut i Çakir (2010) su utvrdili da se povećanjem koncentracija selenata (2-16 ppm) u listovima ječma (*Hordeum vulgare* L.) povećava intenzitet LPO, ali i aktivnost enzima CAT, APX, GR i GST. Slične rezultate su dobili Khalofah i suradnici (2021) proučavajući učinak $20 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ selenita na kvinoju gdje su, uz povećanje intenziteta LPO, zabilježili porast aktivnosti enzima SOD, CAT, APX i GR. Takvi rezultati ukazuju na neučinkovitost antioksidacijskog sustava u zaštiti od oksidacijskih oštećenja uzrokovanim Se. Treba naglasiti kako i selenat i selenit uzrokuju toksične učinke što je vidljivo kroz povećanje intenziteta LPO, ali da je selenit toksičniji oblik jer uzrokuje toksičnosti pri manjim koncentracijama od selenata (Hawrylak-Nowak i sur., 2015). Prooksidacijsko djelovanje anorganskog Se je zapravo često vezano za oksidaciju tiola kao što je GSH što može rezultirati povećanim stvaranjem ROS-a (Grant i sur., 2011; Schiavon i sur., 2016). Anorganski Se može reagirati s GSH prilikom čega nastaju selenotrisulfidi koji potiču lančanu reakciju s drugim tiolima također uzrokujući povećano stvaranje ROS-a (Mézes i Balogh, 2009). Sukladno tome, uslijed djelovanja toksičnih koncentracija Se, porast akumulacije ROS-a u stanicama se može povezati s opadanjem razine GSH koji je

jedan od najznačajnijih antioksidansa u biljkama (Freeman i sur., 2010; Grant i sur., 2011). Tako su Freeman i suradnici (2010) uočili kako je 20 μM selenata uzrokovalo simptome toksičnosti kod vrste *Stanleya albescens* zbog smanjenih količina GSH i AsA koje su dovele do nakupljanja ROS-a. S druge strane, ista koncentracija selenata nije uzrokovala toksičnost kod vrste *S. pinnata* jer je imala veće razine GSH i AsA u odnosu na *S. albescens* što je doprinijelo većoj toleranciji. Uslijed pojave toksičnosti uzrokovane Se, utvrđeno je da oksidacijska oštećenja mogu nastati i pri povećanim količinama GSH, ali koja su praćena smanjenim razinama AsA-e (Ulhassan i sur., 2019). Ulhassan i suradnici (2019) su također utvrdili da koncentracije selenita veće od 25 μM mogu smanjiti aktivnost Glo1 i Glo2 te tako uzrokovati nakupljanje MG-a u stanicama.

Aktivnost antioksidacijskih enzima uglavnom je praćena i odgovarajućim odgovorom na razini transkripcije, pri čemu ekspresija gena antioksidacijskih enzima u izdanku i korijenu ovisi o primijenjenom obliku Se. Tako su Wang i suradnici (2016) utvrdili da manje koncentracije selenita (3 i 6 $\text{mg} \times \text{L}^{-1}$) uzrokuju porast aktivnosti antioksidacijskih enzima, ali i ekspresije odgovarajućih gena (APX, GPX i GST) u klijancima kikirikija (*Arachis hypogaea* L.). Ulhassan i suradnici (2019) su utvrdili da tretman 100 μM selenatom uzrokuje porast ekspresije i aktivnosti enzima SOD i APX, a ujedno i smanjenje ekspresije i aktivnosti enzima CAT, GR i DHAR pri čemu su promjene bile slabije izražene u korijenu. Analiza transkriptoma korijena i lista čajevca nakon izlaganja selenitu pokazala je veći broj eksprimiranih gena u korijenu u odnosu na list (Cao i sur., 2018). Da selenit značajno potiče gensku ekspresiju antioksidacijskih enzima u korijenu dokazali su i Kumar i suradnici (2014). Oni su uslijed tretmana 25 μM selenitom utvrdili porast ekspresije gena koji kodiraju antioksidacijske enzime (APX, GPX i GST) a koja je bila u korelaciji s njihovim aktivnostima. S druge strane, Van Hoewyk i sur. (2008) su utvrdili povećanje broja transkripata u izdanku uročnjaka nakon tretmana 40 μM selenatom. Porast aktivnosti antioksidacijskih enzima SOD, CAT, GR, GST, ali i ekspresije njihovih odgovarajućih gena zabilježen je u listovima vrste *B. juncea* L. nakon izlaganja manjim koncentracijama selenata (do 6 $\mu\text{M} \times \text{kg}^{-1}$) (Handa i sur., 2019). Osim na aktivnost antioksidacijskih enzima te koncentraciju neenzimskih antioksidansa, Se može regulirati i gensku ekspresiju gena uključenih u rast i razvoj biljke te metabolizam S (Cao i sur., 2018; Van Hoewyk i sur., 2008) kako je i spomenuto prethodno u tekstu.

1.7. Cilj istraživanja

Usprkos brojnim dosadašnjim istraživanjima djelovanja Se na biljke, složenost mehanizma njegova djelovanja još uvijek je nedovoljno istražena. Prema dosadašnjoj literaturi, istraživanja većim dijelom obuhvaćaju uloge Se kao antioksidansa nakon izlaganja abiotičkom i biotičkom stresu, dok je manje onih koji istražuju mehanizam djelovanja Se bez da su biljke bile izložene stresu. Iako pojedina istraživanja opisuju utjecaje različitih koncentracija i kemijskih oblika Se na različita biljna tkiva i vrste u različitim razvojnim fazama, tako i pšenice, mnogima od njih nedostaju ključni pokazatelji koji bi doprinijeli boljem razjašnjenju mehanizma djelovanja Se, praga tolerancije na Se, kapaciteta detoksikacije Se i morfo-fiziološkog, biokemijskog te molekularnog odgovora biljke na tretman Se. Ovo istraživanje je prvi sveobuhvatni prikaz mehanizma djelovanja i detoksikacije Se u klijancima pšenice koji obuhvaća utjecaj različitih koncentracija i oblika Se na korijen i izdanak, kako na morfo-fiziološkoj i biokemijskoj razini, tako i na razini ekspresije gena.

Osnovna hipoteza rada je da selenat i selenit povećavaju koncentraciju Se u klijancima pšenice ovisno o primijenjenoj koncentraciji i kemijskom obliku Se što je praćeno tkivno-specifičnim odgovorom. Osim toga, pretpostavka je da oba oblika Se utječu na oksidacijski status klijanaca pšenice, na antioksidacijske i druge detoksikacijske mehanizme te da će najveće promjene nastati uslijed izlaganja najvećim koncentracijama. Različiti oblici Se će uzrokovati različit mehanizam antioksidacijskog dogovora u različitim biljnim organima. Također, Se će, ovisno o kemijskom obliku i koncentraciji različito utjecati i na ekspresiju antioksidacijskih enzima, kao i na ekspresiju gena enzima uključenih u asimilaciju Se.

Kako bi se istražila utemeljenost hipoteza, postavljeni su sljedeći istraživački ciljevi:

- Odrediti utjecaj različitih kemijskih oblika i koncentracija Se na oksidacijski status i antioksidacijski odgovor klijanaca pšenice (*Triticum aestivum* L. sorta Kraljica);
- Odrediti utjecaj različitih oblika Se na metabolizam i status GSH, na askorbat-glutationski ciklus i enzime uključene u druge mehanizme detoksikacije;

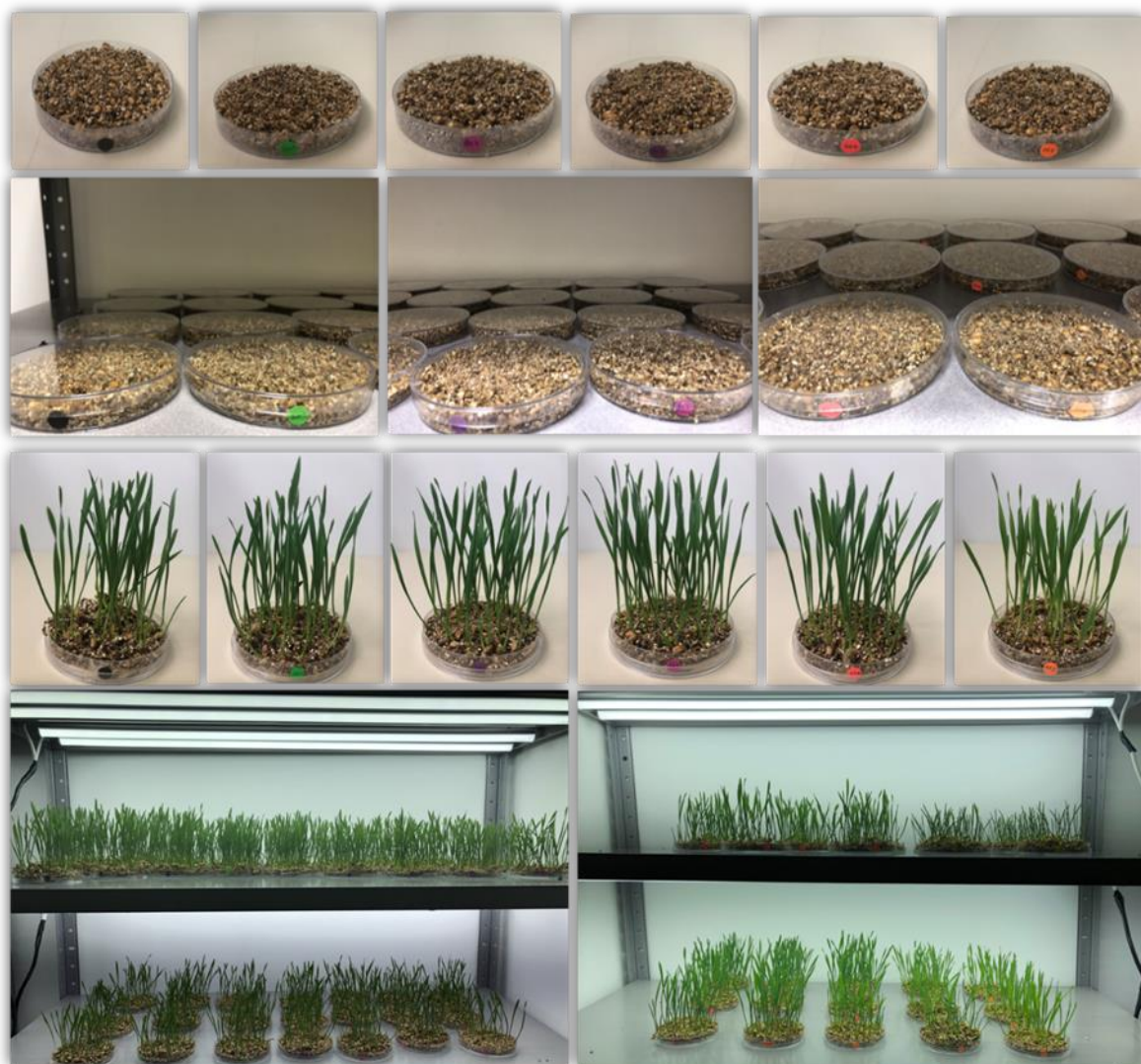
- Odrediti učinak različitih tretmana Se na ekspresiju gena koji kodiraju antioksidacijske enzime kao i enzime metabolizma Se i GSH;
- Utvrditi tkivno-specifične razlike u biokemijskom i molekularnom odgovoru pšenice na različite kemijske oblike Se (selenat i selenit).

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Biljni materijal i opis eksperimenta

U ovom istraživanju korištena je ozima pšenica sorte Kraljica (*Triticum aestivum*, var. Kraljica) kao visokorodna i najraširenija sorta u proizvodnji u Republici Hrvatskoj. Sjeme je dobiveno s Poljoprivrednog Instituta u Osijeku.

Prije sterilizacije, sjeme je dobro oprano u dH₂O radi uklanjanja grubih nečistoća. Sjeme je sterilizirano kratkotrajnim tretmanom 96%-tnim etanolom kako ne bi dehidriralo, a zatim osam minuta u 1%-tnoj otopini natrijeva diklorizocianurata dihidrata (Izosan-G, PLIVA) s dodatkom 0.001% Tweena. Nakon sterilizacije, sjeme je nekoliko puta isprano sterilnom dH₂O te ostavljeno preko noći u dH₂O na 4 °C radi procesa bubrenja. Sljedeći dan je nabubreno sjeme nasađeno u sterilne plastične Petrijeve zdjelice (Ø 90 mm) napunjene supstratom za klijanje, vermikulitom. Vermikulit je prethodno bio steriliziran i natopljen s 20 mL hranjive otopine po Hoaglandu (pH 6.0) (*Tablica 1*) (Hoagland i Arnon, 1950) s dodatkom Se u obliku natrijeva selenata (Na₂SeO₄) ili natrijeva selenita (Na₂SeO₃) do konačnih okolišno relevantnih i subletalnih koncentracija od 0.4, 4, 20, 40 i 400 mg × kg⁻¹. Kontrolne biljke su rasle na hranjivoj podlozi bez dodatka Se. Pšenica je rasla u kontroliranim uvjetima u klima-sobi tijekom sedam dana pri fotoperiodu od 16 h svjetlosti i temperaturi od 25 °C te 8 h tame i temperaturi od 20 °C uz redovito zalijevanje hranjivom otopinom (*Slika 4*). Nakon sedam dana, klijanci pšenice su uzorkovani u svrhu provođenja morfofizioloških, biokemijskih i molekularnih analiza.



Slika 4. Pšenica (*Triticum aestivum* L. sorta Kraljica) uzgajana u klima-sobi.

Tablica 1. Sastav hranjive otopine po Hoagland-u.

Makronutrijenti (stock otopine)	Mr ($g \times mol^{-1}$)	c (M)	γ ($g \times L^{-1}$)	Volumen za 1L (mL)	Element	Koncentracija elementa u 1 L otopine (mM)
NH₄H₂PO₄	115.03	1	115.03	1	P	1
KNO₃	101.11	1	101.11	6	K	6
Ca(NO₃)₂	236.16	1	236.16	4	Ca	4
MgSO₄x7H₂O	246.47	1	246.47	2	Mg	2
Mikronutrijenti (stock otopine)	Mr ($g \times mol^{-1}$)	c m(M)	γ ($g \times L^{-1}$)	Volumen za 1L (mL)	Element	Koncentracija elementa u 1 L otopine (μM)
H₃BO₃	61.84	46.25	2.86	1	B	46.25
MnCl₂x4H₂O	197.91	9.15	1.81	1	Mn, Cl	9.15
ZnSO₄x7H₂O	289.55	0.77	0.22	1	Zn	0.77
CuSO₄x5H₂O	249.71	3.20	0.8	1	Cu	3.20
Na₂MoO₄x2H₂O	241.97	1.03	0.25	1	Mo	1.03
Fe-EDTA	346.08	20	6.92	0.25	Fe	5

2.2. Određivanje koncentracije Se

Nakon tjedan dana rasta, mladi izdanci i korijeni pšenice su uzorkovani kako bi se odredila koncentracija Se. Tkivo je sušeno u sušioniku na 105 °C tijekom 24 sata nakon čega je bilo usitnjeno u fini prah pomoću metalnog laboratorijskog ultracentrifugalnog mlina (Retsch ZM 200). Usitnjenom prahu je dodano 10 mL mješavine HNO₃ : H₂O₂ (5:1), a nastali homogenati su zagrijavani 60 minuta na 180 °C. Nakon hlađenja u homogenate je dodano 5 mL koncentrirane HCl u svrhu redukcije Se⁶⁺ do Se⁴⁺. Koncentracija Se u izdancima i korijenima pšenice određena je primjenom optičke emisijske spektrometrije s induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES, model Perkin Elmer Optima 2100 DV) gdje je kao referentni materijal korišteno rižino brašno IRMM-804.

2.3. Biomasa i klijavost

Morfo-fiziološka svojstva klijanaca pšenice kao što su prinos biomase izdanka i korijena te klijavost, određivana su na dan uzorkovanja. Biomasa je određena

vaganjem mase svježe tvari izdanka i korijena, a klijavost brojem iskljicalih zrna pšenice izraženih u postotku.

2.4. Određivanje koncentracije klorofila i karotenoida

Za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata tkivo izdanka pšenice je usitnjeno u tekućem dušiku pomoću tarionika i tučka. Na usitnjeni prah (0.1 g) dodan je magnezijev hidrogenkarbonat (MgHCO_3), a zatim i 1 mL hladnog 80%-tnog acetona. Pigmenti su ekstrahirani tijekom 15 minuta na ledu nakon čega su centrifugirani 15 minuta pri $22\ 000 \times g$ i temperaturi od $4\ ^\circ\text{C}$. Supernatant je dekantiran u plastične epruvete, a postupak ekstrakcije s hladnim acetonom je ponovljen još tri puta dok se talog nije obezbojio. Reekstrahirani supernatanti su prikupljeni u istu epruvetu te je menzuroom izmjeren njihov volumen. Ekstrakti su potom bili razrijeđeni do konačnog volumena od 10 mL, nakon čega su prebačeni u staklenu kivetu, u kojoj su spektrofotometrijski izmjerene apsorbancije ekstrakata pri tri valne duljine: 470 nm, 645 nm i 662 nm (Lichtenthaler, 1987). Koncentracija pigmenata je izražena u mg klorofila, odnosno karotenoida po g svježe tvari ($\text{mg} \times g^{-1}$ svježe tvari).

2.5. Biomarkeri oksidacijskog stresa

2.5.1. Određivanje količine produkata lipidne peroksidacije

Razina LPO u izdanku i korijenu pšenice određena je spektrofotometrijskom metodom kojom se mjere reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline (TBARS), uglavnom MDA (Verma i Dubey, 2003). Oko 0.2 g tkiva, prethodno usitnjenog u tekućem dušiku pomoću tarionika i tučka, homogenizirano je s 1 mL 0.1% (w/v) trikloroetene kiseline (TCA), te je ekstrakcija provedena 15 minuta na ledu. Nakon ekstrakcije, homogenati su centrifugirani 5 minuta pri $6\ 000 \times g$ i $4\ ^\circ\text{C}$. Dobiveni supernatant (0.5 mL) pomiješan je s 1 mL 0.5%-tne tiobarbiturne kiseline (TBA) u 20%-tnoj TCA. Slijepa proba pripremljena na isti način, pri čemu je umjesto uzorka dodano 0.5 mL 0.1% TCA. Reakcijska smjesa je zatim inkubirana 30 minuta u vodenoj kupelji pri $95\ ^\circ\text{C}$ prilikom čega dolazi do reakcije MDA s TBA što je popraćeno promjenom boje u crvenu. Reakcija je zaustavljena naglim hlađenjem reakcijske smjese na ledu, nakon čega je smjesa centrifugirana 15 minuta pri $20\ 000 \times g$ i temperaturi $4\ ^\circ\text{C}$. Količina TBARS-a određena je spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri valnim duljinama 532 nm i 600 nm. Apsorbancija pri 600 nm oduzeta je od apsorbancije pri

532 nm zbog korekcije za nespecifičnu reakciju. Količina TBARS-a, kao produkta lipidne peroksidacije, izračunata je na temelju molarnog ekstinkcijskog koeficijenta ($\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) i izražena u nmol po gramu svježe tvari ($\text{nmol} \times \text{g}^{-1}$ svježe tvari).

2.5.2. Određivanje količine vodikovog peroksida

Količina H_2O_2 u izdancima i korijenju pšenice određena je spektrofotometrijskom metodom koju su opisali Mukherjee i Choudhuri (1983). Tkivo pšenice usitnjeno je u tekućem dušiku uz pomoć tarionika i tučka. Na 0.1 g usitnjenog praha dodan je 1 mL ledeno-hladnog acetona te je H_2O_2 ekstrahiran tijekom 15 minuta na ledu. Slijepa proba pripremljena je na isti način, uz dodatak 1 mL acetona umjesto uzorka. Nakon ekstrakcije, uzorci su centrifugirani tijekom 5 minuta pri $6\,000 \times \text{g}$ i 4°C . Odvojeni supernatant je pomiješan s 400 μL titanovog reagensa i 500 μL koncentriranog amonijevog hidroksida (NH_4OH) kako bi nastao kompleks titan-peroksid. Bijeli talog titan-peroksida je odvojen centrifugiranjem tijekom 10 minuta pri $15\,000 \times \text{g}$ i 4°C i otopljen u 1 mL 2 M sumporne kiseline (H_2SO_4). Centrifugiranje je ponovljeno, a dobiveni supernatant je odvojen u kivetu te mu je mjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 415 nm. Ukupna količina H_2O_2 je izračunata iz standardne krivulje dobivene s poznatim količinama H_2O_2 , a rezultati su izraženi u nmol H_2O_2 po gramu svježe tvari ($\text{nmol} \times \text{g}^{-1}$ svježe tvari).

2.6. Ekstrakcija ukupnih topljivih proteina

Tkivo pšenice je usitnjeno u tekućem dušiku uz pomoć tarionika i tučka uz dodatak polivinil-polipirrolidona (PVPP). Proteini iz tkivnog praha (oko 0.3 g) su ekstrahirani dodatkom 1.5 mL hladnog ekstrakcijskog pufera 15 minuta na ledu. Korištena su dva različita ekstrakcijska pufera, 100 mM kalij-fosfatni s dodatkom 1 mM EDTA (pH 7.0, pufer A) i 50 mM kalij-fosfatni s dodatkom 1 mM EDTA (pH 7.8, pufer B). Nakon centrifugiranja homogenata tijekom 15 minuta pri $20\,000 \times \text{g}$ i 4°C , dobiveni supernatanti su alikvotirani u mikroepruvete, smrznuti u tekućem dušiku te pohranjeni na -80°C do daljnjih analiza. Analize su obuhvaćale određivanje koncentracije proteina i mjerenje aktivnosti antioksidacijskih enzima. Iz ekstrakta pripremljenog u puferu A mjerene su aktivnosti CAT, GPOD, APX, DHAR, MDHAR i Glo1, dok su iz ekstrakta pripremljenog u puferu B mjerene aktivnosti GR, GPX i GST.

2.7. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u proteinskim ekstraktima izdanka i korijena pšenice je određena metodom po Bradford-u (1976), prilagođenom za mjerenje u mikrotitarskim pločicama. Metoda se temelji na pomaku maksimuma apsorpcije od 465 nm do 595 nm do kojeg dolazi kada se boja Coomassie briljant plavo (CBB) iz Bradfordovog reagensa veže na proteine.

U jažicama mikrotitarske pločice 5 μL razrijeđenog/nerazrijeđenog proteinskog ekstrakta inkubirano je, 5 minuta na sobnoj temperaturi, s 250 μL komercijalnog Bradfordovog reagensa (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka). Proteinski ekstrakti izdanka pšenice su 5 \times razrijeđeni, dok su ekstrakti korijena bili nerazrijeđeni. Intenzitet nastalog plavog obojenja mjereno je pri valnoj duljini od 595 nm na čitaču mikrotitarskih pločica Spark multimode sa softverom SparkControl (Tecan, Männedorf, Švicarska). Kao standard je korišten albumin goveđeg seruma (BSA), u rasponu koncentracija 0.1 - 1.4 $\text{mg} \times \text{mL}^{-1}$, a koncentracija proteina je izračunata iz standardne krivulje te je izražena u miligramima po gramu svježe tvari ($\text{mg} \times \text{g}^{-1}$ svježe tvari).

2.8. Određivanje aktivnosti katalaze

Aktivnost CAT (EC 1.11.1.6) određena je spektrofotometrijskom metodom koristeći H_2O_2 kao supstrat (Aebi, 1984). Reakcijski pufer se sastojao od 0.036% H_2O_2 u 50 mM kalij-fosfatnom puferu (pH 7.0). U UV kivetu s 1450 μL reakcijskog pufera je dodano 50 μL enzimskog ekstrakta čime je započela reakcija. Za potrebe mjerenja, proteinski ekstrakt izdanka razrijeđen je 4 \times , dok je ekstrakt korijena bio nerazrijeđen. Uslijed razgradnje H_2O_2 dolazi do pada apsorpcije što je spektrofotometrijski praćeno svakih 10 sekundi, tijekom 3 minute pri valnoj duljini od 240 nm. Specifična aktivnost CAT izračunata je koristeći molarni ekstinkcijski koeficijent ($\epsilon = 0.04 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), a izražena je kao količina razgrađenog H_2O_2 u μmol po minuti po miligramu proteina ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ proteina), odnosno u jedinicama aktivnosti CAT po miligramu proteina ($U \text{ CAT} \times \text{mg}^{-1}$ proteina; $U = \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$).

2.9. Određivanje aktivnosti gvajakol-peroksidaze

Aktivnost GPOD (EC 1.11.1.7) određena je metodom koju su opisali Siegel i Galston (1967), a koja se temelji na oksidaciji gvajakola u tetragvajakol zbog prisutnosti H_2O_2 . Reakcijski pufer je sadržavao 18 mM gvajakol i 5 mM H_2O_2 u kalij-fosfatnom

puferu (pH 7.0). U kivetu je dodano 950 μL reakcijskog pufera i 50 μL proteinskog ekstrakta. Proteinski ekstrakt izdanka je bio 20 \times razrijeđen, a korijena 60 \times . Porast apsorbancije uslijed nastanka smeđe obojenoga produkta tetragvajakola praćen je svakih 10 sekundi tijekom 2.5 minute pri valnoj duljini od 470 nm. Aktivnost GPOD je izračunata koristeći molarni ekstinkcijski koeficijent ($\epsilon = 15.83 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), a izražena je kao količina nastalog tetragvajakola u μmol po minuti po miligramu proteina ($\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1} \text{ proteina}$), odnosno u jedinicama aktivnosti GPOD po miligramu proteina ($\text{U GPOD} \times \text{mg}^{-1} \text{ proteina}$; $\text{U} = \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$).

2.10. Određivanje aktivnosti askorbat-peroksidaze

Aktivnost enzima APX (EC 1.11.1.11) je mjerena prema metodi Nakana i Asade (1981). Reakcijska smjesa za mjerenje aktivnosti sastojala se od 0.5 mM AsA, 0.1 mM EDTA i 50 μL proteinskog ekstrakta u 50 mM kalij-fosfatnom puferu (pH 7.0), u ukupnom volumenu od 1 mL. Za potrebe mjerenja aktivnosti, proteinski ekstrakt izdanka je 7 \times razrijeđen, a korijena 5 \times . Reakcijska smjesa je kratko inkubirana na sobnoj temperaturi, nakon čega je reakcija pokrenuta dodatkom 0.12 mM H_2O_2 . Pad apsorbancije spektrofotometrijski je praćen pri valnoj duljini od 290 nm svakih 10 sekundi, tijekom 3 minute. Aktivnost APX je izračunata koristeći molarni ekstinkcijski koeficijent ($\epsilon = 2.8 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), a izražena je kao količina razgrađenog askorbata u μmol po minuti po miligramu proteina ($\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1} \text{ proteina}$), odnosno u jedinicama aktivnosti APX po miligramu proteina ($\text{U APX} \times \text{mg}^{-1} \text{ proteina}$; $\text{U} = \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$).

2.11. Određivanje aktivnosti glutation-reduktaze

Aktivnost glutation-reduktaze (GR, EC 1.6.4.2) određena je metodom koja se temelji na redukciji oksidiranog glutationa (GSSG) u prisutnosti GR i NADPH kao reducensa (Racker, 1955). Reakcijska smjesa sastojala se od 1 mM GSSG, 1 mM EDTA i 25 μL proteinskog ekstrakta u 100 mM kalij-fosfatnom puferu (pH 7.5) u ukupnom volumenu od 1 mL. Smjesa je inkubirana 10 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega je pokrenuta reakcija dodatkom 0.1 mM NADPH. Pad apsorbancije uslijed oksidacije NADPH spektrofotometrijski je praćen pri valnoj duljini 340 nm svakih 10 sekundi, tijekom 3 minute. Specifična aktivnost GR izražena je kao količina NADPH u μmol po minuti po gramu proteina ($\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1} \text{ proteina}$) koristeći molarni

ekstinkcijski molarni koeficijent ($\epsilon = 6.220 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), odnosno u jedinicama aktivnosti GR po gramu proteina ($U \text{ GR} \times \text{g}^{-1} \text{ proteina}$; $U = \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$).

2.12. Određivanje aktivnosti glutation S-transferaze

Aktivnost GST (EC 2.5.1.18) u proteinskim ekstraktima određena je spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na praćenju nastanka konjugata između 1-kloro-2,4-dinitrobenzena (CDNB) i GSH (Habig i sur., 1974). Reakcijska smjesa u UV kiveti se sastojala od 2 mM GSH, 1 mM CDNB i 1 mM EDTA u 100 mM kalij-fosfatnom puferu (pH 6.5), u ukupnom volumenu od 1.5 mL. Smjesa je kratko inkubirana na sobnoj temperaturi, a enzimska reakcija je započeta dodatkom 50 μL proteinskog ekstrakta. Kako u reakciji dolazi do stvaranja G-SDNB konjugata, pratio se rast apsorbancije pri valnoj duljini od 340 nm, svakih 10 sekundi, tijekom 3 minute. Specifična aktivnost GST izražena je kao količina nastalog konjugata u μmol po minuti po gramu proteina ($\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1} \text{ proteina}$) koristeći molarni ekstinkcijski koeficijent ($\epsilon = 9.600 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), odnosno u jedinicama aktivnosti GST po gramu proteina ($U \text{ GST} \times \text{g}^{-1} \text{ proteina}$; $U = \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$).

2.13. Određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze

Aktivnost GPX (EC 1.11.1.9) mjerena je prema modificiranoj spektrofotometrijskoj metodi koju su opisali Strauss i suradnici (1980). Temelji se na indirektnom određivanju aktivnosti GPX tako što se mjeri oksidacija NADPH u NADP⁺ što je praćeno smanjenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 340 nm. Reakcijska smjesa sastojala se od 1 mM GSH, 0.1 mg $\times \text{mL}^{-1}$ NADPH, 1 U $\times \text{mL}^{-1}$ GR, 0.4 mM EDTA i 25 μL proteinskog ekstrakta u 100 mM kalij-fosfatnom puferu (pH 7.0), u ukupnom volumenu od 1.55 mL. Enzimska reakcija je pokrenuta dodatkom 0.0007% H₂O₂, a pad apsorbancije praćen je svakih 10 sekundi, tijekom 3 minute. Specifična aktivnost GPX izražena je kao količina NADPH u μmol po minuti po gramu proteina ($\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1} \text{ proteina}$) koristeći molarni ekstinkcijski koeficijent ($\epsilon = 6.220 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), odnosno u jedinicama aktivnosti GPX po gramu proteina ($U \text{ GPX} \times \text{g}^{-1} \text{ proteina}$; $U = \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$).

2.14. Određivanje aktivnosti gliksilaze I

Aktivnost Glo1 (EC 4.4.1.5) određena je spektrofotometrijskom metodom koju su opisali Arai i suradnici (2014). Glo1 katalizira nastanak S-D-laktoilglutaciona izomerizacijom hemitioacetala, koji se za potrebe mjerenja enzimske aktivnosti dobiva neenzimski inkubacijom reakcijske smjese za mjerenje (100 mM kalij-fosfatni pufer, pH 6.6, 20 mM GSH i 20 mM MG) 10 minuta na 37 °C. Nakon inkubacije, 980 µL reakcijske smjese i 20 µL proteinskog ekstrakta izdanka, odnosno 960 µL reakcijske smjese i 40 µL proteinskog ekstrakta korijena dodano je u UV kivetu, a porast apsorbancije uslijed nastanka S-D-laktoilglutaciona praćen je pri valnoj duljini od 240 nm, svakih 15 sekundi tijekom 3.5 minute. Specifična aktivnost Glo1 izražena je kao količina nastalog S-D-laktoilglutaciona po minuti po gramu proteina, koristeći molarni ekstinkcijski koeficijent ($\epsilon = 2.86 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), odnosno u jedinicama aktivnosti Glo1 po gramu proteina ($U_{\text{Glo1}} \times \text{g}^{-1} \text{ proteina}$; $U = \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$).

2.15. Određivanje aktivnosti monodehidroaskorbat-reduktaze

Aktivnost MDHAR (EC 1.6.5.4) određena je prema metodi koju su opisali Hossain i suradnici (1984), modificiranoj za analizu u mikrotitarskim pločicama. Metoda se temelji na redukciji monodehidroaskorbata, nastalog djelovanjem askorbat-oksidge, u AsA, pomoću NADH kao reducirajućeg supstrata. Reakcijska smjesa za određivanje aktivnosti sastojala se od 2.5 mM AsA, 0.1 mM NADH, 0.14 U askorbat-oksidge i 10 µL proteinskog ekstrakta u 50 mM Tris-HCl puferu (pH 7.6), u konačnom volumenu od 0.2 mL. Pad apsorbancije, uslijed oksidacije NADH, praćen je pri 340 nm svakih 15 sekundi, tijekom 3 minute. Specifična aktivnost MDHAR je izražena kao količina NADH u µmol po minuti po miligramu proteina ($\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1} \text{ proteina}$) koristeći molarni ekstinkcijski koeficijent ($\epsilon = 3.7 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), odnosno u jedinicama aktivnosti MDHAR po miligramu proteina ($U_{\text{MDHAR}} \times \text{mg}^{-1} \text{ proteina}$; $U = \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$).

2.16. Određivanje aktivnosti dehidroaskorbat-reduktaze

Aktivnost DHAR (EC 1.8.5.1) mjerena je prema metodi koju su opisali Ma i Cheng (2004), te za analizu u mikrotitarskim pločicama modificirali Murshed i suradnici (2008). Metoda se temelji na redukciji dehidroaskorbata (DHA) u ovisnosti o GSH. Reakcijska smjesa za mjerenje aktivnosti sastojala se od 0.1 mM EDTA, 2.5 mM GSH, 0.2 mM DHA i 10 µL proteinskog ekstrakta u 50 mM puferu HEPES (pH 7.0), u

ukupnom volumenu od 0.2 mL. Porast apsorbancije praćen je pri valnoj duljini od 265 nm, svakih 15 sekundi tijekom 3 minute. Specifična aktivnost DHAR je izračunata koristeći molarni ekstinkcijski koeficijent ($\epsilon = 8.33 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), odnosno u jedinicama aktivnosti DHAR po miligramu proteina ($U \text{ MDHAR} \times \text{mg}^{-1} \text{ proteina}$; $U = \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$).

2.17. Određivanje koncentracija askorbata i dehidroaskrobata

Tkivo izdanka i korijena klijanaca pšenice usitnjeno je uz pomoć tekućeg dušika. Na 0.15 g usitnjenog tkiva dodan je 1 mL 5% sulfosalicilne kiseline (SSA) (*w/v*) te je uslijedila ekstrakcija tijekom 15 minuta na ledu. Homogenati su potom centrifugirani 15 minuta na $19\,000 \times g$ i $4 \text{ }^\circ\text{C}$, a dobiveni supernatanti su odvojeni za određivanje ukupnog askorbata ($t\text{AsA} = \text{AsA} + \text{DHA}$) i AsA. Koncentracije $t\text{AsA}$ i AsA su određene u svježim ekstraktima prema metodi koju su opisali Kampfenkel i suradnici (1995), modificiranoj za analizu na mikrotitarskim pločicama prema Murshed i suradnici (2008). Reagens za mjerenje koncentracija $t\text{AsA}$ i AsA sastojao se od 10%-tnog TCA, 42%-tne (*v:v*) ortofosforne kiseline, 4%-tnog (*w:v*) 2,2-bipiridila otopljenog u 70%-tnom etanolu, te 3%-tnog (*w:v*) željezovog klorida redom u omjeru 2.5:2:2:1 (*v:v*). Za mjerenje koncentracije $t\text{AsA}$, 10 μL tkivnog ekstrakta inkubirano je u mikrotitarskoj pločici s 10 μL 10 mM DL-dititreitola (DTT) i 20 μL 0.2 mM kalij-fosfatnog pufera (pH 7.4), 15 minuta na $42 \text{ }^\circ\text{C}$. Nakon inkubacije dodano je 10 μL 0.5%-tnog (*w:v*) *N*-etilmaleimida radi uklanjanja preostalog DTT-a. Potom je u reakcijsku smjesu dodano 150 μL pripremljenog reagensa te je smjesa inkubirana 40 minuta na $42 \text{ }^\circ\text{C}$. Nakon inkubacije, mjerena je apsorbancija pri valnoj duljini od 525 nm na čitaču mikrotitarskih pločica Spark multimode sa softverom SparkControl (Tecan, Männedorf, Švicarska). Za određivanje koncentracije AsA, reakcija je izvedena na isti način kao i za $t\text{AsA}$, s tim da je iz reakcije izostavljen DTT i *N*-etilmaleimid, čiji su volumeni nadomješteni dodatkom 0.2 M kalij-fosfatnog pufera (pH 7.4). Koncentracije $t\text{AsA}$ i AsA određene su iz standardne krivulje s poznatim koncentracijama AsA, a koncentracija DHA dobivena je iz razlike $t\text{AsA}$ i AsA. Koncentracija AsA, odnosno DHA izražena je u μg po g svježih tvari ($\mu\text{g} \times \text{g}^{-1} \text{ svježe tvari}$).

2.18. Određivanje količine reduciranog i oksidiranog glutaciona

Tkivo izdanka i korijena pšenice je usitnjeno u tarioniku s tučkom uz pomoć tekućeg dušika. Usitnjeni prah (0.1 g) homogeniziran je s 1 mL 5% sulfosalicilne

kiseline (SSA) (*w/v*), a homogenati su potom inkubirani 10 minuta na ledu te centrifugirani tijekom 15 minuta na $10\,000 \times g$ i $4\text{ }^\circ\text{C}$. Dobiveni supernatanti su smrznuti u tekućem dušiku te pohranjeni na $-80\text{ }^\circ\text{C}$, do daljnje analize.

Ukupni glutation (tGSH = GSH + GSSG) i GSSG su mjereni kinetičkom metodom koja se temelji na redukciji 5,5-ditiobis(2-nitrobenzoične kiseline) (DTNB) pomoću GSH, a pri čemu nastaje žuto obojeni produkt 5-tio-2-nitrobenzoična kiselina (TNB). Redukcijom GSH nastaje GSSG koji se reciklira pomoću GR i NADPH (Griffith, 1980). Reakcijska smjesa za mjerenje sastojala se od $0.031\text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$ DTNB-a, $0.115\text{ U} \times \text{mL}^{-1}$ GR-a, 1 mM EDTA i $50\text{ }\mu\text{L}$ deproteiniziranog ekstrakta u 100 mM kalij-fosfatnog pufera ($\text{pH } 7.0$), u ukupnom volumenu od 1.05 mL . Nakon 5 minuta ekvibracije, reakcija je pokrenuta dodatkom $48\text{ }\mu\text{M}$ NADPH. Porast apsorbancije, do kojeg dolazi uslijed nastanka TNB-a, praćen je pri valnoj duljini od 412 nm , svakih 30 sekundi tijekom 4 minute. Sadržaj tGSH je određen iz standardne krivulje s poznatim koncentracijama GSH, a izražen je nmol po gramu svježe tvari ($\text{nmol} \times \text{g}^{-1}$ svježe tvari).

Za određivanje količine GSSG-a, alikvot deproteiniziranog ekstrakta inkubiran je s 2-vinilpiridinom i trietanolaminom tijekom sat vremena na sobnoj temperaturi. Količina GSSG-a mjerena je na isti način kao i tGSH. Sadržaj GSSG-a je određen iz standardne krivulje s poznatim količinama GSSG-a, a izražen je u nmol po gramu svježe tvari ($\text{nmol} \times \text{g}^{-1}$ svježe tvari). GSH je dobiven iz razlike tGSH i GSSG.

2.19. Izdvajanje ukupne RNA iz izdanka i korijena pšenice

Ukupna RNA izolirana je iz svježeg tkiva pšenice pomoću komercijalnog reagensa *TRI Reagent* (Termo Fisher) prema uputama proizvođača. Oko 0.05 g tkiva, usitnjeno je mikropistilom u mikroepreveti uz pomoć tekućeg dušika. Na usitnjeno smrznuto tkivo dodan je 1 mL reagensa *TRI* te je dodatno homogenizirano mikropistilom. Nakon 5 minuta inkubacije dodano je $100\text{ }\mu\text{L}$ bromokloropropana (BCP) te je homogenat ponovno inkubiran 10 minuta na sobnoj temperaturi. Homogenati su centrifugirani tijekom 15 minuta na $12\,000 \times g$ i $4\text{ }^\circ\text{C}$ te je $400\text{ }\mu\text{L}$ gornjeg (vodenog) sloja dobivenog supernatanta odvojeno u novu mikroeprevetu. Odvojenom vodenom sloju dodano je $500\text{ }\mu\text{L}$ izopropanola u svrhu taloženja RNA. Sadržaj u mikroepreveti je promiješan nekoliko puta inverznim okretanjem, inkubiran 10 minuta na sobnoj temperaturi te centrifugiran tijekom 8 minuta na $12\,000 \times g$ i $4\text{ }^\circ\text{C}$. Supernatant je dekantiran, a bijeli talog RNA ispran s 1 mL 75%-tnog etanola. Sadržaj je ponovno centrifugiran tijekom 5 minuta na $7\,500 \times g$, etanol dekantiran, a mikroeprevete

ostavljene otvorene kako bi ispario preostali etanol. Talog RNA izdanka je otopljen u 50 μL , a korijena u 30 μL deionizirane vode te pohranjen na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do daljnjih analiza.

2.20. Određivanje količine i kakvoće RNA

Koncentracija RNA je mjerena pri valnoj duljini od 260 nm pomoću instrumenta NanoPhotometer N60-Touch (Implen, München, Njemačka). Također su mjereni i omjeri A_{260}/A_{280} te A_{260}/A_{230} pokazatelji čistoće dobivene RNA. Omjer A_{260}/A_{280} je pokazatelj onečišćenosti proteinima, a A_{260}/A_{230} onečišćenosti fenolima i drugim spojevima.

Cjelovitost RNA analizirana je horizontalnom elektroforezom na agaroznom gelu. Agarozni gelovi (1%) 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. Prije nanošenja na gel, uzorci RNA su pomiješani s puferom za nanošenje uzoraka (*Blue/Orange Loading dye*, 6 \times) u konačnoj koncentraciji 1 \times . Na gel je nanošeno 5 μL uzorka ukupne RNA i 3 μL standarda 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 razdvajaju na vrpce koje su vizualizirane pomoću UV transiluminatora te dokumentirane fotografiranjem pomoću kamere Kodak EDAS 290 (Eastman Kodak).

2.21. Tretman DNazom i obrnuto prepisivanje RNA u komplementarnu DNA

Prije obrnutog prepisivanja RNA u komplementarnu DNA (cDNA), RNA je bila tretirana s DNazom I (*RNase-Free DNase*, Promega) kako bi se uklonila moguća kontaminacija genomskom DNA. Digestija DNA provedena je na alikvotu ukupne RNA (4 μg), koja je inkubirana je s 2 μL reakcijskog pufera, 4 μL Dnaze I (1 U \times μg^{-1} RNA) i vodom do konačnog volumena 18 μL . Digestija je provedena u PCR uređaju MiniAmp Plus Thermal PCR Cycler (Applied Biosystems, Waltham, MA, SAD) 30 minuta na 37 $^{\circ}\text{C}$. Reakcija je zaustavljena dodatkom 2 μL otopine za zaustavljanje reakcije (*Dnase Stop Solution*) i inkubacijom 10 minuta na 65 $^{\circ}\text{C}$ kako bi se inaktivirale Dnaze. Nakon digestije DNA, u reakciju obrnutog prepisivanja ulazi cjelokupni volumen od 20 μL .

Obrnuto prepisivanje (engl. *Reverse Transcription*, RT) u cDNA je provedeno pomoću komercijalnih reagensa za obrnuto prepisivanje i kvantitativni PCR (qPCR)

GoTaq 2-Step RT-qPCR (Promega) prema uputama proizvođača. RNA dobivena nakon digestije DNA je zajedno s 2 μ L oligo d(T) početnicama denaturirana 5 minuta na 70 °C. Smjesa je naglo ohlađena 5 minuta na 4 °C, nakon čega je smjesi dodan drugi dio reakcijske smjese za obrnuto prepisivanje. Drugi dio reakcijske smjese sadržavao je 1x reakcijski pufer *GoScript*, 0.5 mM smjese četiri nukleotida, 20 U inhibitora ribonukleaza (*Recombinant Rnasin*), 1 U reverzne transkriptaze *GoScript* i vodu do ukupnog volumena od 40 μ L. Obrnuto prepisivanje provedeno je u PCR uređaju MiniAmp Plus Thermal PCR Cycler (Applied Biosystems, Waltham, MA, SAD) prema uvjetima navedenima u tablici 2, a nastala cDNA je bila pohranjena na -20°C.

Tablica 2. Uvjeti reakcije obrnutog prepisivanja.

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	∞

Tablica 3. Sljedovi oligonukleotidnih početnica korišteni za umnažanje odsječaka gena *actin*, *ATP-Sul*, *cs*, *gr*, *gpx*, *apx*, *gst*, *mdhar* i *dhar* qPCR-om te očekivanom veličinom PCR produkata.

Početnice	Oligonukletidni slijed	Veličina PCR produkta
<i>actin</i> FW	TGACCGTATGAGCAAGGAG	215 bp
<i>actin</i> REV	CCAGACAACCTCGCAACTTAG	
<i>ADP-rf</i> FW	GCTCTCCAACAACATTGCCAAC	165 bp
<i>ADP-rf</i> REV	GCTTCTGCCTGTCACATACGC	

<i>Početnice</i>	<i>Oligonukleotidni slijed</i>	<i>Veličina PCR produkta</i>
<i>ATP-Sul FW</i>	GCCATCCAACAGAGAAGAG	119 bp
<i>ATP-Sul REV</i>	CGTATCGTATGCTGCTACC	
<i>cs FW</i>	CTTGGGAATGAAAGGAGCTG	83 bp
<i>cs REV</i>	CCTGTGCCTTTCCAGATTTC	
<i>gr FW</i>	TGCGTCCCGAAGAAGATACT	96 bp
<i>gr REV</i>	GTTGATGTCCCGTTGATCT	
<i>gpx FW</i>	TCGCTTCCAAGCAGAGTTTC	176 bp
<i>gpx REV</i>	GTGCATATCGGTTTCATGACG	
<i>apx FW</i>	TGGAAGACGTGATTCGTCAG	174 bp
<i>apx REV</i>	TCAAACCCAGACCTTTCAGG	
<i>gst FW</i>	AGATGACCTGAAGCTGCTCG	175 bp
<i>gst REV</i>	GTTGTGGATGAGCACGGGTA	
<i>mdhar FW</i>	AGGCGTTATCGATGGTTGTC	105 bp
<i>mdhar REV</i>	GCACGTCTTTCTTGCTTTCC	
<i>dhar FW</i>	CTGTGTATAACGGTGGTGATGG	153 bp
<i>dhar REV</i>	TCAAGAACGTGACGAAGGTG	

2.22. Kvantitativni PCR

Razina ekspresije gena (*ATP-Sul*, *cs*, *gr*, *gpx*, *apx*, *gst*, *mdhar*, *dhar*) određena je metodom qPCR koristeći komercijalni paket reagensa za kvantitativnu analizu RNA GoTaq 2-Step RT-qPCR (Promega) prema uputama proizvođača. Jedan dio specifičnih oligonukleotidnih početnica preuzet je iz literature, dok je veći dio početnica dizajniran na temelju sekvenci iz baze podataka GeneBank pomoću softverskog alata Primer3 (Tablica 3). Neke su početnice dizajnirane tako da se protežu na spoj egzon-egzon koji sadrži intron, kako bi mogli razlikovati amplifikaciju RNA (tj cDNA) od genomske DNA, čime se potvrđuje odsutnost kontaminacije genomskom DNA. Dobivena cDNA je za potrebe kvantifikacije 5× razrijeđena. Reakcijska smjesa za qPCR sastojala se od 5 μL razrijeđene cDNA, 1× komercijalne smjese za QPCR (*GoTaq qPCR Master Mix*), 200 nM svake specifične početnice, 0.25 μL CXR referentne boje i vode do konačnog volumena od 25 μL. Komercijalna smjesa za qPCR (*GoTaq qPCR Master Mix*) sadrži *hot-start* DNA polimerazu, smjesu dNTP-a, ione Mg²⁺ i fluorescentnu boju *SYBR Green I* koja se veže na dvolančanu DNA te fluorescira. Reakcija qPCR provedena je na instrumentu StepOnePlus™ Real-Time PCR System sa softverom StepOnePlus™ v2.3 (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) prema uvjetima prikazanim u tablici 4. Sva mjerenja su provedena u tri tehničke replike. Specifičnost umnažanja potvrđena je analizom krivulje disocijacije, a relativna ekspresija gena je kvantificirana pomoću relativne standardne krivulje dobivene 3× serijskim razrijeđenjem smjesa cDNA, te normalizirana prema referentnim genima *actin* i *ADP-ribozilacijski faktor (ADP-rf)* (Paolacci *et al.*, 2009).

Tablica 4. Program standardne qPCR reakcije za umnažanje i kvantifikaciju gena *actin*, *ADP-ribozilacijski faktor*, *ATP-Sul*, *cs*, *gr*, *gpx*, *apx*, *gst*, *mdhar* i *dhar*.

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

2.23. Statistička obrada podataka

Podaci dobiveni ovim istraživanjem obrađeni su u statističkom programu Statistica 14.0.0.15 (TIBCO Inc., SAD), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija (SD). Normalnost distribucije testirana je Shapiro-Wilksovim testom, a s obzirom na normalnu distribuciju i homogenost varijanci korištena je jednofaktorska analiza varijance (engl. *One-way ANOVA*). Nakon jednofaktorske analize, proveden je Duncan *post hoc* test 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. Koncentracija Se u izdanku i korijenu pšenice

Koncentracija Se u klijancima pšenice se dosta mijenjala ovisno o primijenjenoj koncentraciji, ali i o obliku Se (Tablica 5). U izdanku pšenice, koncentracija Se se uglavnom povećavala kako su primijenjene koncentracije bile veće. Raspon koncentracija u izdancima tretiranim selenatom kretao se od $1.31 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ do $219.48 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ koja je zabilježena nakon izlaganja najvećoj koncentraciji ($400 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$). Svi tretmani selenatom, osim najmanje primijenjene koncentracije ($0.4 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$), su značajno utjecali na akumulaciju Se u izdanku u odnosu na kontrolu. Izlaganje selenitu je također povećalo koncentraciju Se u izdancima u odnosu na kontrolne izdanke, no raspon koncentracija je značajno manji nego uslijed izlaganja selenatu te se kreće od $7.72 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ do $53.22 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$.

S druge strane, u korijenu pšenice su samo najveće koncentracije ($400 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$) oba oblika Se uzrokovala značajniju akumulaciju Se u odnosu na kontrolu. Pri tretmanima selenatom i selenitom je zabilježen porast koncentracija po porastu primijenjenih koncentracija, kao i u izdanku. No, izmjerene koncentracije su bile nešto veće uslijed izlaganja selenitu nego selenatu, a kretale su se od $7.64 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ do $424 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$.

Tablica 5. Koncentracija Se u izdanku i korijenu klijanaca pšenice (*T. aestivum* L. sorta Kraljica) nakon izlaganja selenatu i selenitu.

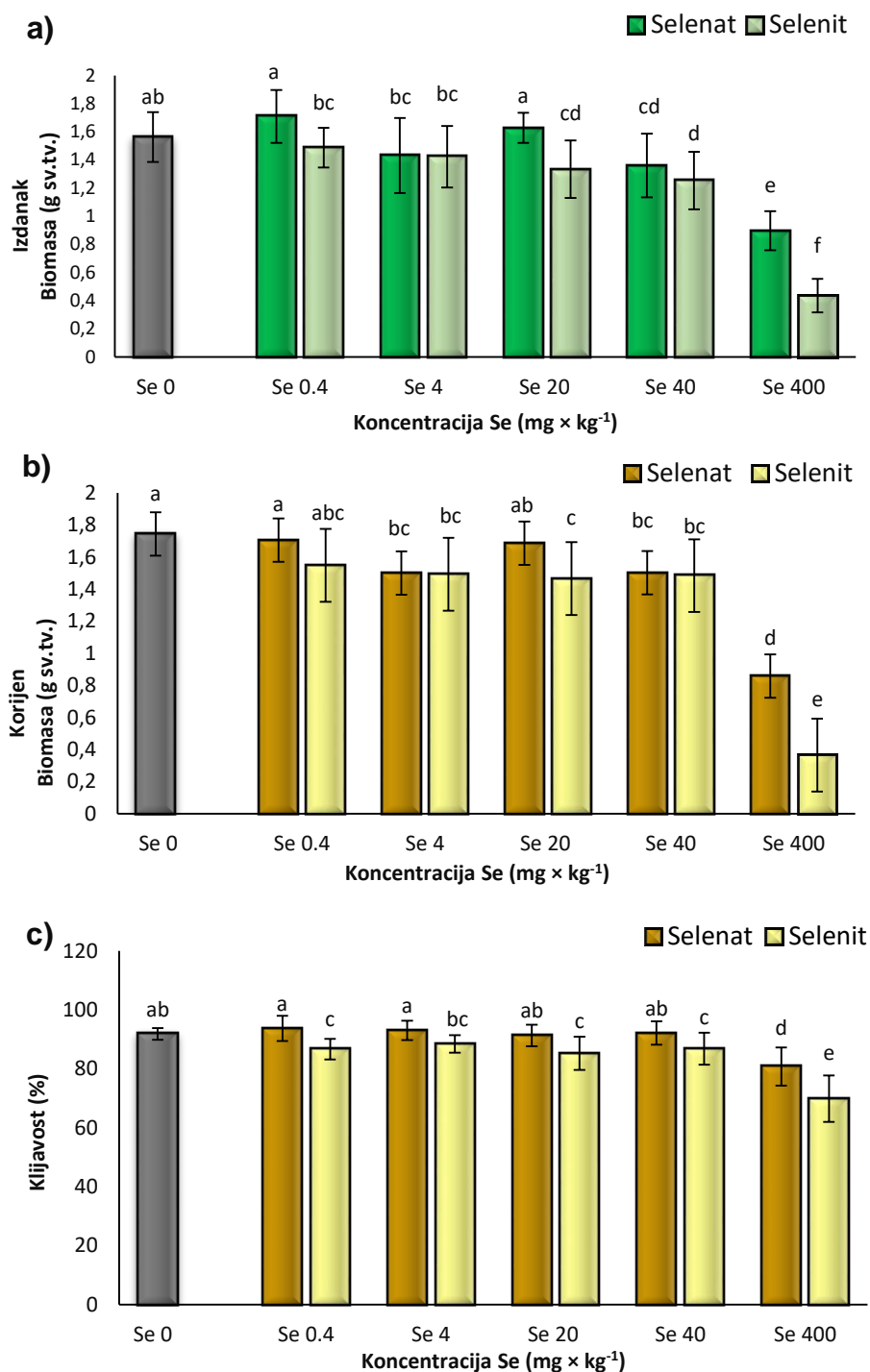
Tretman ($\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$ Se)	Koncentracija Se u izdanku ($\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$)		Koncentracija Se u korijenu ($\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$)	
	SELENAT	SELENIT	SELENAT	SELENIT
0	0.223 ± 0.019		0.360 ± 0.088	
0.4	1.310 ± 0.071	$7.720 \pm 1.148^{***}$	4.44 ± 0.325	7.650 ± 1.888
4	$12.18 \pm 0.547^{**}$	$6.760 \pm 1.490^{***}$	9.45 ± 0.400	10.01 ± 1.299
20	$56.43 \pm 1.394^{***}$	$8.720 \pm 1.184^{***}$	21.53 ± 3.384	$30.35 \pm 1.054^{***}$
40	$118.34 \pm 3.625^{***}$	$11.29 \pm 0.478^{***}$	$46.89 \pm 4.641^{**}$	$60.29 \pm 1.573^{***}$
400	$219.48 \pm 10.074^{***}$	$53.23 \pm 2.377^{***}$	$415.66 \pm 48.71^{***}$	$333.4 \pm 29.15^{***}$

Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SD. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu su prikazane oznakama * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) i *** ($p < 0.001$).

3.2. Biomasa i klijavost pšenice

Tretmani s oba oblika Se su utjecali na biomasu izdanka i korijena pšenice. U izdanku, samo su dvije najveće koncentracije selenata (40 i 400 mg × kg⁻¹) i tri koncentracije selenita (20, 40 i 400 mg × kg⁻¹) uzrokovale značajno smanjenje biomase u odnosu na kontrolu (*Slika 5a*). Sličan odgovor na prisutnost Se je pokazao i korijen gdje su 4, 40 i 400 mg × kg⁻¹ selenata te 4, 20, 40 i 400 mg × kg⁻¹ selenita također smanjili biomasu (*Slika 5b*). Uspoređujući međusobno utjecaj dva oblika Se na biomasu izdanka, selenit je u tri tretmana (0.4, 20 i 400 mg × kg⁻¹) uzrokovao smanjenje u odnosu na isti tretman selenatom, kao i u korijenu u tretmanima s 20 i 400 mg × kg⁻¹.

Prisutnost Se je utjecala na klijavost pšenice, posebno u obliku selenita (*Slika 5c*). Naime, selenit je u većini tretmana uzrokovao značajno smanjenje klijavosti i u odnosu na kontrolu i u odnosu na selenat. Suprotno, selenat u većini tretmana nije imao utjecaj na klijavost pšenice usporedivši s kontrolom. Izuzetak je bila najveća koncentracija selenata (400 mg × kg⁻¹) koja je uzrokovala smanjenje klijavosti za 11.99%. Iako su oba oblika Se primijenjena u najvećoj koncentraciji smanjile klijavost u odnosu na kontrolu, klijavost je bila za 13.56% manja u tretmanu selenitom u odnosu na isti tretman selenatom.

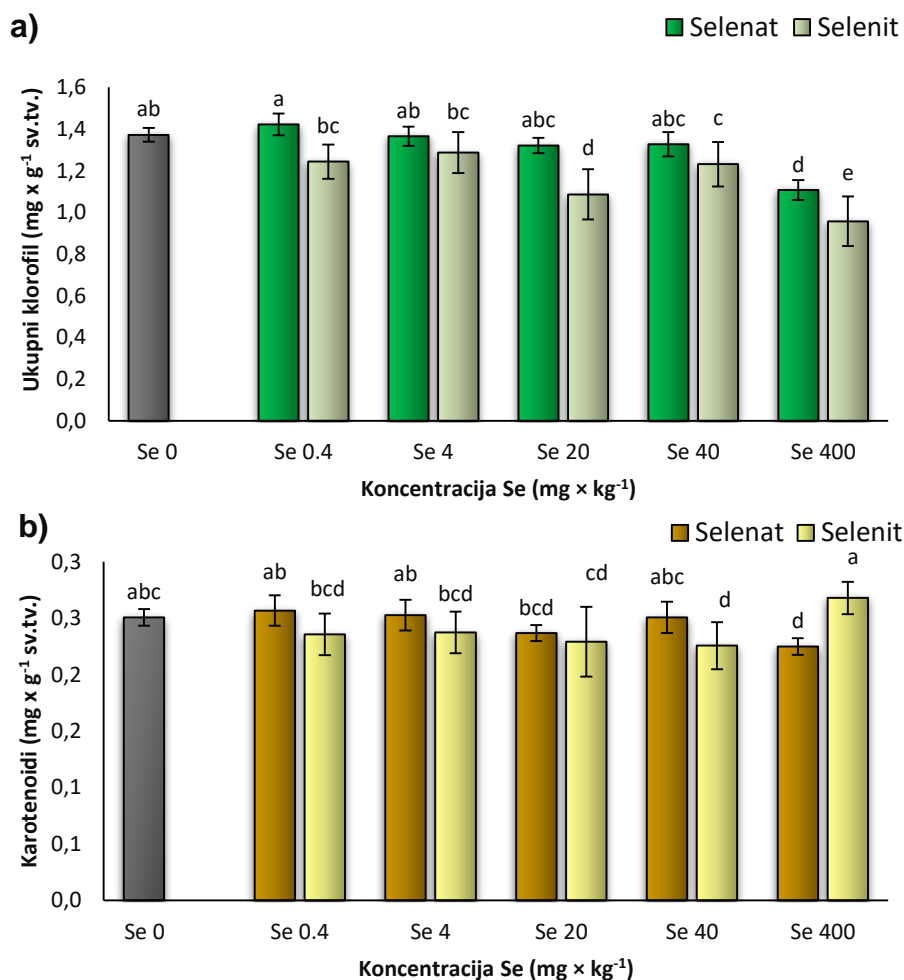


Slika 5. Biomase izdanka (a), korijena (b) te klijavost (c) pšenice nakon tretmana s različitim koncentracijama selenata i selenita (Se 0.4, Se 4, Se 20, Se 40 i Se 400 $\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$). Kontrolni klijanci su rasli bez dodatka Se (Se 0 $\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$). Rezultati ($n = 9$) su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Duncan post hoc testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

3.3. Koncentracije ukupnog klorofila i karotenoida

Selenat primijenjen u manjim koncentracijama (0.4, 4, 20 i 40 mg \times kg⁻¹) nije uzrokovao promjenu koncentracije ukupnog klorofila u izdanku pšenice u odnosu na kontrolu, dok je najveća koncentracija (400 mg \times kg⁻¹) uzrokovala smanjenje od 19.34% (*Slika 6a*). Za razliku od selenata, selenit je u tri tretmana (20, 40 i 400 mg \times kg⁻¹) uzrokovao smanjenje koncentracije ukupnog klorofila. Tako je koncentracija klorofila smanjena za 20.93% pri tretmanu s 20 mg \times kg⁻¹, 10.35% pri tretmanu s 40 mg \times kg⁻¹ te za 30.26% pri tretmanu s najvećom koncentracijom (400 mg \times kg⁻¹). Pri 400 mg \times kg⁻¹ selenita je ujedno zabilježena i najmanja koncentracija ukupnog klorofila među svim tretmanima, a iznosila je 0.95 mg \times g⁻¹ svježe tvari. Uspoređujući međusobni utjecaj dva oblika Se na koncentraciju ukupnog klorofila u izdanku, pri tretmanu selenatom zabilježene su veće koncentracije klorofila nego pri tretmanu selenitom. Iako su veće koncentracije ukupnog klorofila zabilježene pri svim primijenjenim koncentracijama, razlika je bila statistički značajna samo u tri tretmana (0.4, 20 i 400 mg \times kg⁻¹). Tako je tretman s 0.4 mg \times kg⁻¹ selenata uzrokovao za 12.58% veću koncentraciju u odnosu na isti tretman selenitom, tretman s 20 mg \times kg⁻¹ za 17.70% te tretman s 400 mg \times kg⁻¹ za 13.54%.

Selenat je na koncentraciju karotenoida u izdanku pšenice djelovao isto kao i na koncentraciju klorofila (*Slika 6b*). Naime, dok četiri tretmana selenatom (0.4, 4, 20 i 40 mg \times kg⁻¹) nisu imali nikakav utjecaj na karotenoide, najveća koncentracija je uzrokovala smanjenje njihove koncentracije za 10.21% u odnosu na kontrolu. To je ujedno i najmanja zabilježena koncentracija karotenoida u izdanku, a iznosila je 0.2250 mg \times g⁻¹ svježe tvari. Smanjenje koncentracije karotenoida u izdanku je zabilježeno i uslijed izlaganja selenitu u koncentraciji od 40 mg \times kg⁻¹ gdje su karotenoidi bili za 9.97% manji u odnosu na kontrolu. Ostali tretmani selenita nisu značajno utjecali na koncentraciju karotenoida. Uspoređujući međusobno dva oblika Se te njihov utjecaj na koncentracije karotenoida, zabilježene su dvije statistički značajne razlike pri tretmanima s 40 i 400 mg \times kg⁻¹. Pri tretmanu od 40 mg \times kg⁻¹ selenata u izdanku su karotenoidi bili za 9.97% veći od karotenoida zabilježenim pri istom tretmanu selenita. S druge strane, pri najvećoj primijenjenoj koncentraciji selenata (400 mg \times kg⁻¹) koncentracija karotenoida je bila za 16.01% manja nego kod selenita.

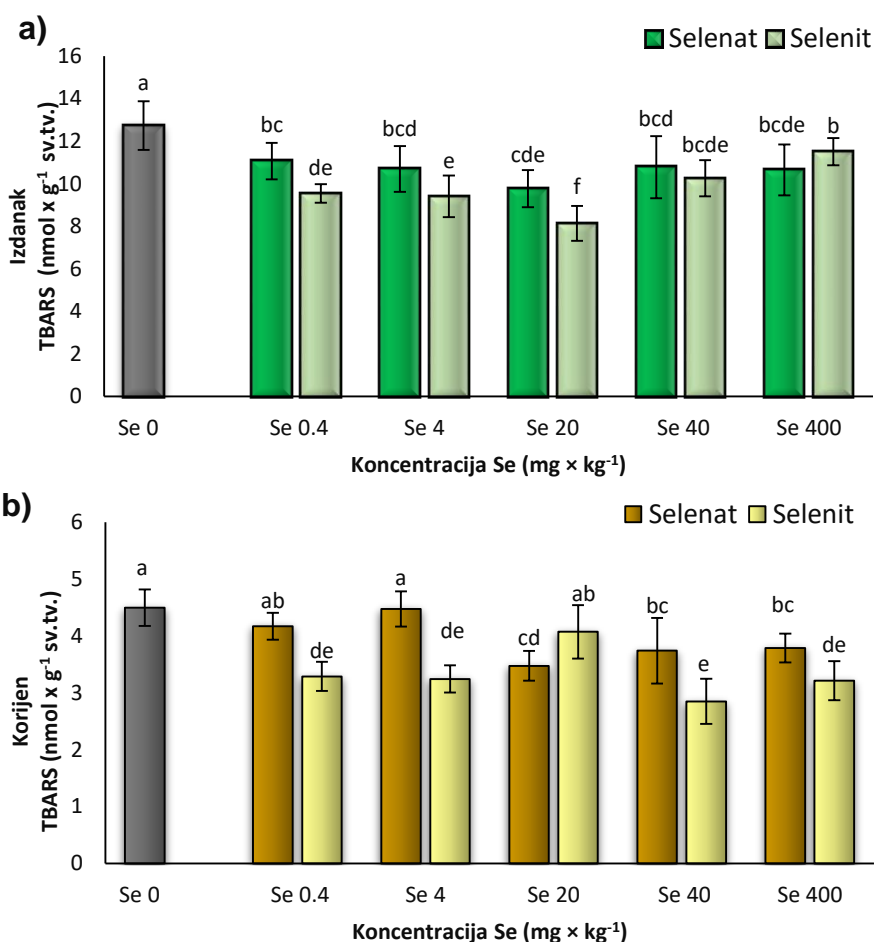


Slika 6. Koncentracija ukupnog klorofila (a) i karotenoida (b) u izdanku klijanaca pšenice nakon tretmana s različitim koncentracijama selenata i selenita (Se 0.4, Se 4, Se 20, Se 40 i Se 400 mg × kg⁻¹). Kontrolni klijanci su rasli bez dodatka Se (Se 0 mg × kg⁻¹). Rezultati (n = 9) su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Duncan post hoc testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

3.4. Razina lipidne peroksidacije u izdanku i korijenu pšenice

Oksidacijski status izdanka i korijena pšenice procjenjivan je određivanjem razine LPO koja je praćena mjerenjem količine TBARS-a. U izdanku, oba oblika Se su u svim primijenjenim koncentracijama (0.4, 4, 20, 40 i 400 mg × kg⁻¹) uzrokovala značajno smanjenje količine TBARS-a u odnosu na kontrolu (Slika 7a). U tretmanima selenatom međusobno nije uočena značajna razlika u razini LPO izdanaka, dok su između pojedinih tretmana selenitom utvrđene razlike. Naime, kod 20 mg × kg⁻¹

selenita je zabilježena najmanja količina TBARS-a, nakon čega je pri 400 mg × kg⁻¹ zabilježen porast od 29.29%. Selenit je u dvije primijenjene koncentracije, 0.4 i 20 mg × kg⁻¹, uzrokovao veći pad LPO nego iste koncentracije selenata, dok u ostalim nije bilo razlike između dva oblika Se.



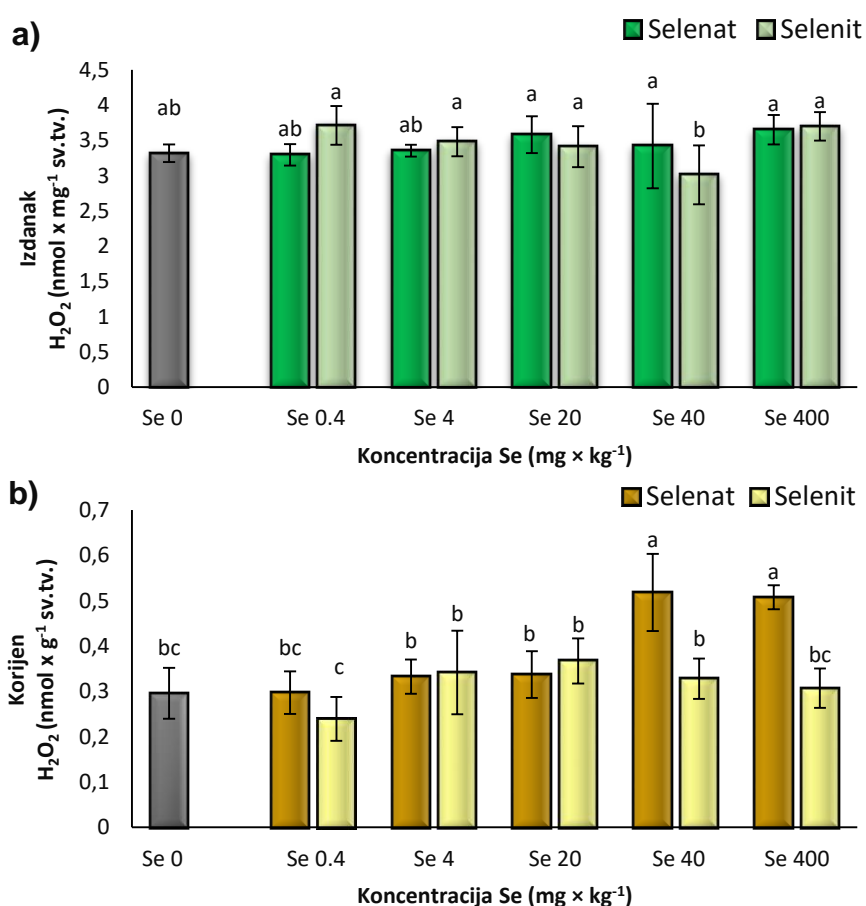
Slika 7. Količina TBARS u izdanku (a) i korijenu (b) klijanaca pšenice nakon tretmana s različitim koncentracijama selenata i selenita (Se 0.4, Se 4, Se 20, Se 40 i Se 400 mg × kg⁻¹). Kontrolni klijanci su rasli bez dodatka Se (Se 0 mg × kg⁻¹). Rezultati (n = 9) su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Duncan post hoc testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

U korijenu je zabilježen sličan odgovor na dva oblika Se kao i u izdanku jer je u većini tretmana Se uzrokovao smanjenje količine TBARS-a (*Slika 7b*). Četiri tretmana selenitom (0.4, 4, 40 i 400 mg × kg⁻¹) te tri tretmana selenatom (20, 40 i 400 mg × kg⁻¹)

1) su značajno smanjila količinu TBARS-a u odnosu na kontrolnu. Selenat i selenit su, kako u izdanku tako i u korijenu, pokazali različit utjecaj na LPO. U četiri tretmana selenitom (0.4, 4, 40 i 400 mg × kg⁻¹) količina TBARS-a u korijenu klijanaca je bila značajno manja u odnosu na iste koncentracije selenata. Suprotno, samo je 20 mg × kg⁻¹ selenita uzrokovalo veću razinu LPO od nego što je 20 mg × kg⁻¹ selenata.

3.5. Količina vodikovog peroksida u izdanku i korijenu pšenice

Osim razine LPO, oksidacijski status izdanka i korijena pšenice se pratio i mjerenjem količine H₂O₂. U odnosu na kontrolu, niti jedan oblik Se nije uzrokovao značajnu promjenu u količini H₂O₂ u izdanku pšenice (*Slika 8a*). U većini tretmana nije bilo promjene niti između tretmana selenata i selenita, osim pri koncentraciji od 40 mg × kg⁻¹ gdje je količina H₂O₂ bila 12.90% veća nakon izlaganja selenatu nego selenitu.



Slika 8. Količina H₂O₂ u izdanku (a) i korijenu (b) klijanaca pšenice nakon tretmana s različitim koncentracijama selenata i selenita (Se 0.4, Se 4, Se 20, Se 40 i Se 400 mg × kg⁻¹). Kontrolni klijanci su rasli bez dodatka Se (Se 0 mg × kg⁻¹). Rezultati (n = 9) su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina

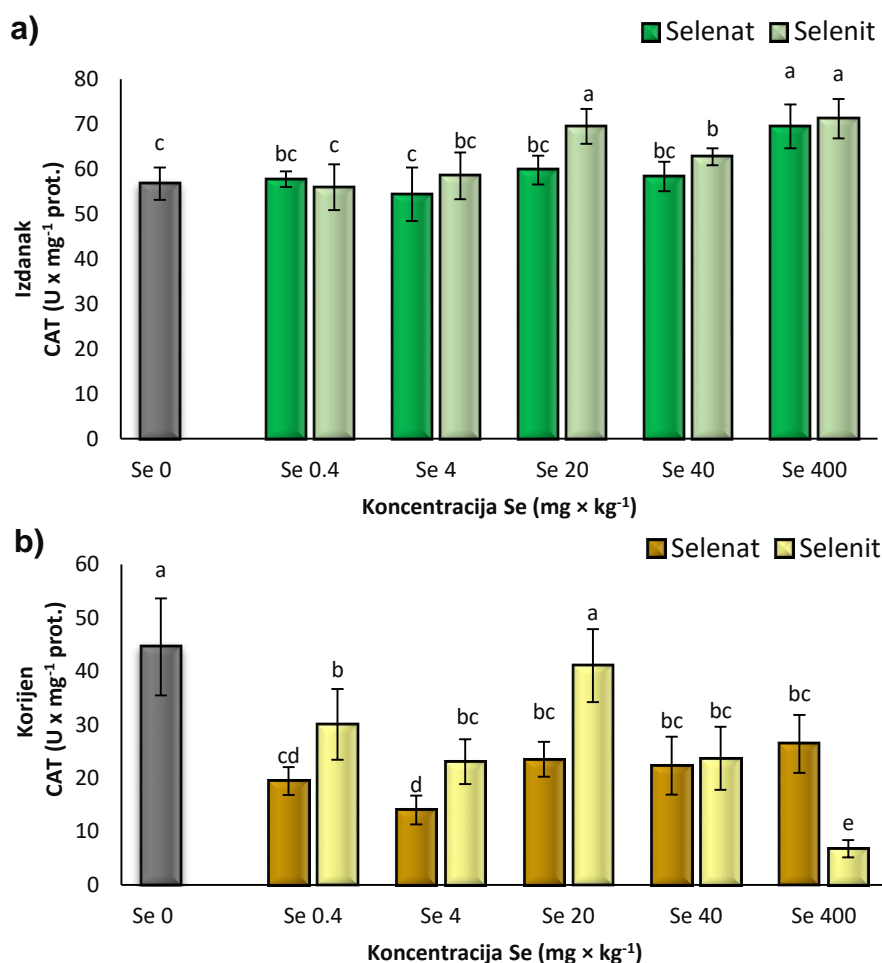
testirane su Duncan post hoc testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

Količina H_2O_2 u korijenu većinom nije bila pod značajnim utjecajem u prisutnosti Se. Samo su tretmani s 40 i 400 mg \times kg⁻¹ selenata uzrokovali porast količine H_2O_2 redom za 42.92% i 41.77% u odnosu na kontrolno korijenje (*Slika 8b*). Također, značajnije razlike između djelovanja selenata i selenita nisu zabilježene, osim u dvjema najvećim koncentracijama (40 i 400 mg \times kg⁻¹), gdje su pri tretmanima selenatom zabilježene znatno veće količine H_2O_2 kako u odnosu na kontrolu, tako i u odnosu na tretmane selenitom.

3.6. Aktivnost katalaze u izdanku i korijenu pšenice

Specifična aktivnost CAT u izdanku i korijenu pšenice prikazana je na slici 9. U izdanku, aktivnost CAT je bila neovisna o većini primijenjenih koncentracija selenata, osim najveće (400 mg \times kg⁻¹) koja je povećala njezinu aktivnost za 18.34% u odnosu na kontrolu (*Slika 9a*). Za razliku od selenata, selenit primijenjen u tri najveće koncentracije (20, 40 i 400 mg \times kg⁻¹) je uzrokovao značajan porast specifične aktivnosti CAT u odnosu na kontrolu, i to redom za 18.32%, 9.52% i 20.32%. Uspoređujući utjecaj selenata i selenita međusobno, značajnija razlika je zabilježena samo pri koncentraciji od 20 mg \times kg⁻¹ gdje je selenit uzrokovao 13.98% veću aktivnost CAT u odnosu na selenat.

Odgovor korijena pšenice, vidljiv kroz aktivnost CAT, na prisutnost Se u potpunosti se razlikuje od odgovora zabilježenog u izdanku. U korijenu su svi tretmani, osim 20 mg \times kg⁻¹ selenita, uzrokovali statistički značajno smanjenje specifične aktivnosti CAT u odnosu na kontrolu (*Slika 9b*). Također, kod tri najmanje koncentracije selenita (0.4, 4 i 20 mg L⁻¹) su zabilježene veće aktivnosti CAT u odnosu na iste koncentracije selenata. Suprotno, najveća koncentracija selenita (400 mg \times kg⁻¹) snizila je aktivnost CAT u usporedbi s istim tretmanom selenata, i to za 74.47%.

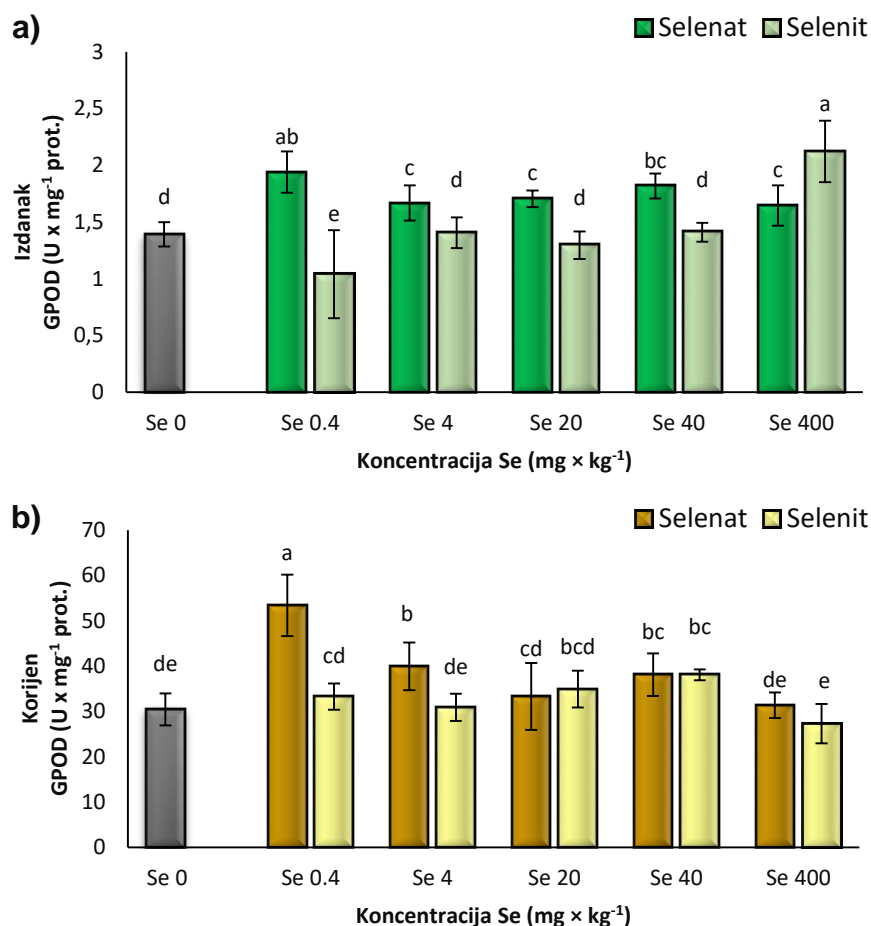


Slika 9. Specifična aktivnost CAT u izdanku (a) i korijenu (b) klijanaca pšenice nakon tretmana s različitim koncentracijama selenata i selenita (Se 0.4, Se 4, Se 20, Se 40 i Se 400 mg × kg⁻¹). Kontrolni klijanci su rasli bez dodatka Se (Se 0 mg × kg⁻¹). Rezultati (n = 9) su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Duncan post hoc testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

3.7. Aktivnost gvajakol-peroksidaze u izdanku i korijenu pšenice

Specifična aktivnost GPOD u izdanku pšenice je bila povećana uslijed izlaganja svim tretmanima selenata (Slika 10a). S druge strane, najmanja koncentracija selenita (0.4 mg × kg⁻¹) je smanjila aktivnost GPOD za 25.18%, dok 4, 20 i 40 mg × kg⁻¹ nisu imale nikakav utjecaj u odnosu na kontrolu. Aktivnost GPOD je, nakon najveće

primijenjene koncentracije selenita, $400 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$, bila za 34.44% veća u odnosu na aktivnost u izdancima kontrolnih biljaka. Uspoređujući tretmane selenata i selenita međusobno, selenat je u četiri tretmana ($0.4, 4, 20$ i $20 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$) uzrokovao veću aktivnost GPOD u odnosu na selenit. Izuzetak je bio tretman s $400 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ prilikom kojeg je zabilježena 22.17% veća aktivnost nakon izlaganja selenitu.



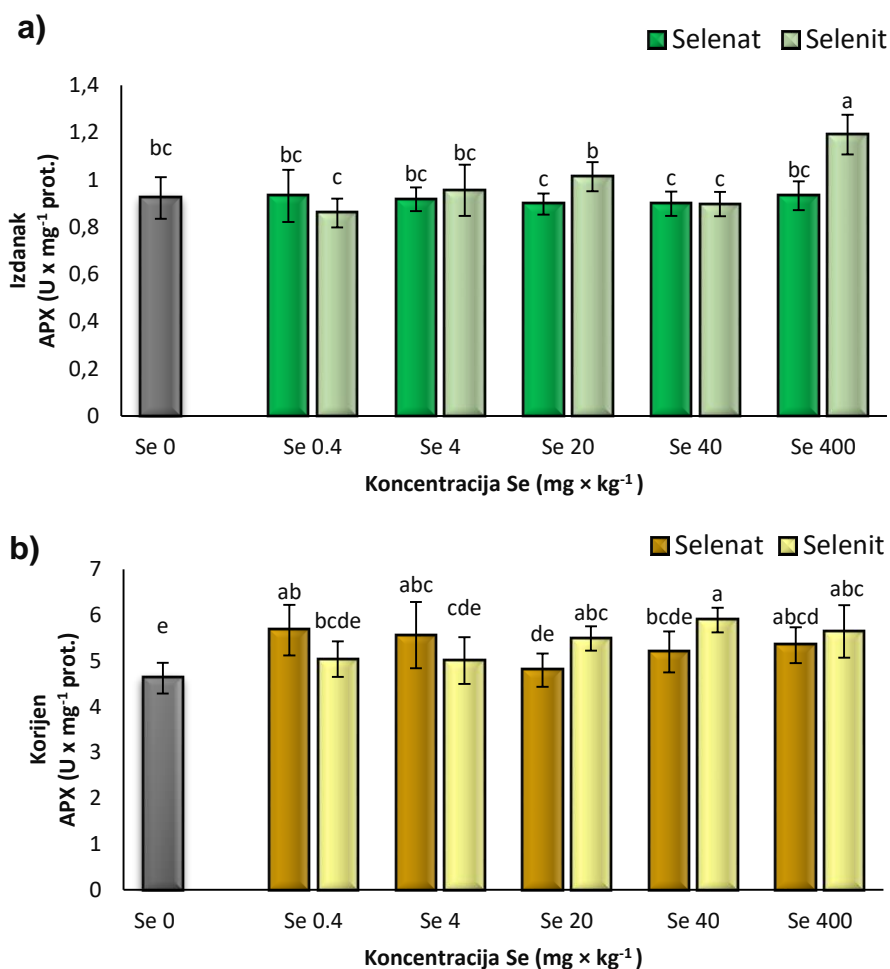
Slika 10. Specifična aktivnost GPOD u izdanku (a) i korijenu (b) klijanaca pšenice nakon tretmana s različitim koncentracijama selenata i selenita (Se 0.4, Se 4, Se 20, Se 40 i Se 400 $\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$). Kontrolni klijanci su rasli bez dodatka Se (Se 0 $\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$). Rezultati ($n = 9$) su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Duncan post hoc testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

Selenat je u korijenu također povećao aktivnost GPOD, ali samo u tri tretmana (0.4, 4 i 40 mg × kg⁻¹) i to redom za 42.96%, 23.73% i 20.09% (*Slika 10b*). U ostalim tretmanima (20 i 400 mg × kg⁻¹), aktivnost se nije značajno mijenjala u odnosu na kontrolu kao niti nakon izlaganja koncentracijama selenita od 0.4, 4, 20 i 400 mg × kg⁻¹. S druge strane, tretman s 40 mg × kg⁻¹ selenita uzrokovao je značajniju promjenu aktivnosti GPOD u korijenu gdje je aktivnost bila za 19.97% veća nego u kontroli. Razlike između tretmana selenata i selenita u korijenu su vidljive nakon izlaganja dvjema najmanjim koncentracijama (0.4 i 4 mg × kg⁻¹) prilikom čega kod selenata zabilježena znatno veća aktivnost u odnosu na selenit. U ostalim tretmanima nije vidljiva razlika u aktivnosti GPOD između dva oblika Se.

3.8. Aktivnost askorbat-peroksidaze u izdanku i korijenu pšenice

Prisutnost Se u izdanku pšenice u većini tretmana nije promijenio specifičnu aktivnost APX u odnosu na kontrolnu skupinu (*Slika 11a*). Najveća koncentracija selenita, 400 mg × kg⁻¹, jedina je uzrokovala značajniju promjenu te je pritom zabilježena 22.52% veća aktivnost koja je ujedno i najveća. Izdanci tretirani s 20 i 400 mg × kg⁻¹ selenita su uzrokovali veću APX aktivnost u izdanku nego tretmani s istim koncentracijama selenata. Ostale koncentracije nisu pokazale značajnije razlike između oblika primijenjenog Se.

Iako selenat u izdanku pšenice nije uzrokovao promjene aktivnosti APX, u korijenu su tri tretmana selenatom (0.4, 4 i 400 mg × kg⁻¹) povećala istu redom za 18.49%, 16.86% i 13.45% (*Slika 11b*). Tri najveće primijenjene koncentracije selenita (20, 40 i 400 mg × kg⁻¹) su također uzrokovale porast aktivnosti u odnosu na kontrolno korijenje. Značajnije razlike u aktivnosti APX korijena uspoređujući tretman selenata i selenita, zabilježene su samo pri koncentracijama 20 i 40 mg × kg⁻¹ gdje je aktivnost nakon izlaganja selenitu bila za 12.61% i 11.83% veća u odnosu na tretman selenatom.

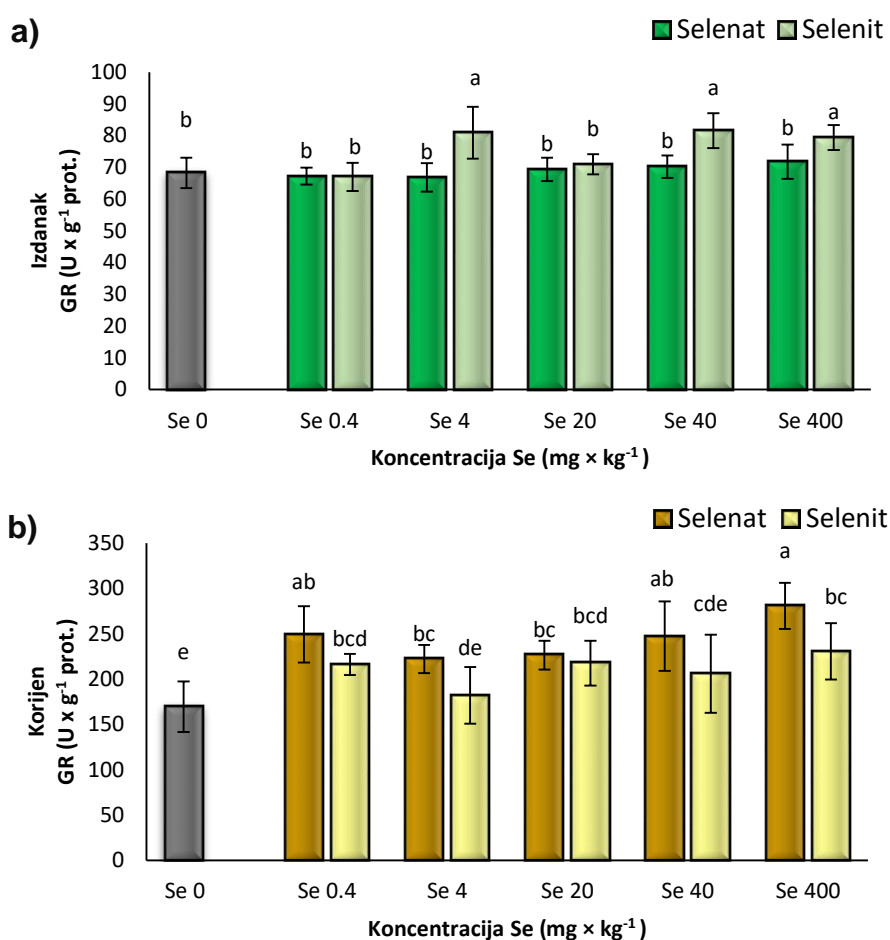


Slika 11. Specifična aktivnost APX u izdanku (a) i korijenu (b) klijanaca pšenice nakon tretmana s različitim koncentracijama selenata i selenita (Se 0.4, Se 4, Se 20, Se 40 i Se 400 $\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$). Kontrolni klijanci su rasli bez dodatka Se (Se 0 $\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$). Rezultati ($n = 9$) su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Duncan post hoc testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

3.9. Aktivnost glutation-reduktaze u izdanku i korijenu pšenice

Specifična aktivnost GR u izdanku pšenice, prikazana na *slici 12a*, bila je nepromijenjena uslijed izlaganja selenatu. S druge strane, koncentracije od 4, 40 i 400 $\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$ selenita su povećale aktivnosti GR redom za 15.60%, 16.32% i 13.99% u odnosu na kontrolne izdanke. U istim tretmanima zabilježene su i statistički veće aktivnosti u tretmanima selenita uspoređujući utjecaj dva oblika Se.

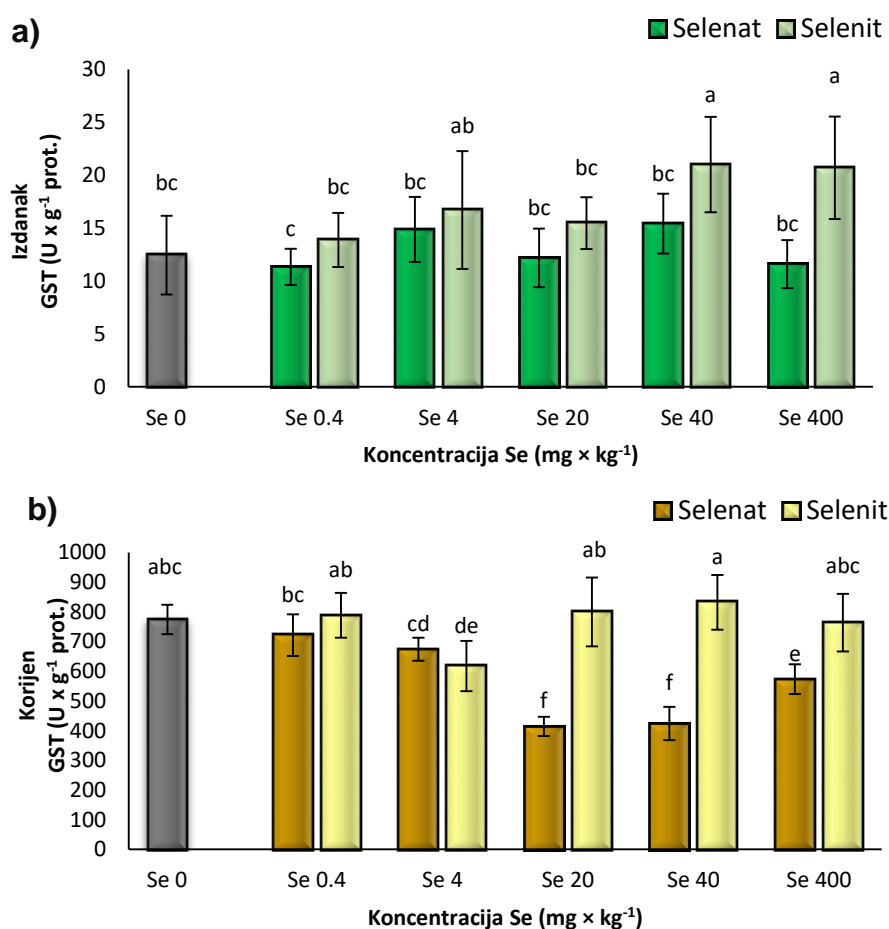
U korijenu je selenat uzrokovao drugačiji odgovor nego u izdanku jer su svi tretmani selenatom uzrokovali porast aktivnosti u odnosu na kontrolu (*Slika 12b*). Od najmanje do najveće primijenjene koncentracije, redom su zabilježeni porasti od 32.04%, 23.73%, 25.16%, 31.48% i 39.66%. Iako se uslijed izlaganja selenitu također povećala aktivnost, ona je bila statistički značajna samo nakon tretmana s 0.4, 20 i 400 mg \times kg⁻¹ selenita. Kod korijenja tretiranih s 4, 40 i 400 mg \times kg⁻¹ je zabilježen veći porast aktivnosti GR nakon izlaganja selenatu nego selenitu, dok u ostala dva tretmana (0.4 i 20 mg \times kg⁻¹) nije bilo razlike.



Slika 12. Specifična aktivnost GR u izdanku (a) i korijenu (b) klijanaca pšenice nakon tretmana s različitim koncentracijama selenata i selenita (Se 0.4, Se 4, Se 20, Se 40 i Se 400 mg \times kg⁻¹). Kontrolni klijanca su rasli bez dodatka Se (Se 0 mg \times kg⁻¹). Rezultati (n = 9) su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Duncan post hoc testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

3.10. Aktivnost glutation S-trasferaze u izdanku i korijenu pšenice

Aktivnost GST u izdanku pšenice se nije mijenjala nakon tretmana s pet različitim koncentracijama selenata u odnosu na kontrolu, kao niti nakon izlaganja koncentracijama od 0.4, 4 i 20 mg \times kg⁻¹ selenita (Slika 13a). Samo su dvije najveće primijenjene koncentracije selenita, 40 i 400 mg \times kg⁻¹, uzrokovale porast aktivnosti redom za 40.78% i 39.90%. U dva prethodno spomenuta tretmana selenitom zabilježene su najveće aktivnosti GST u izdanku pšenice. Isti tretmani su se pokazali kao jedini u usporedbi selenata i selenita gdje je uočena značajna razlika u aktivnosti.



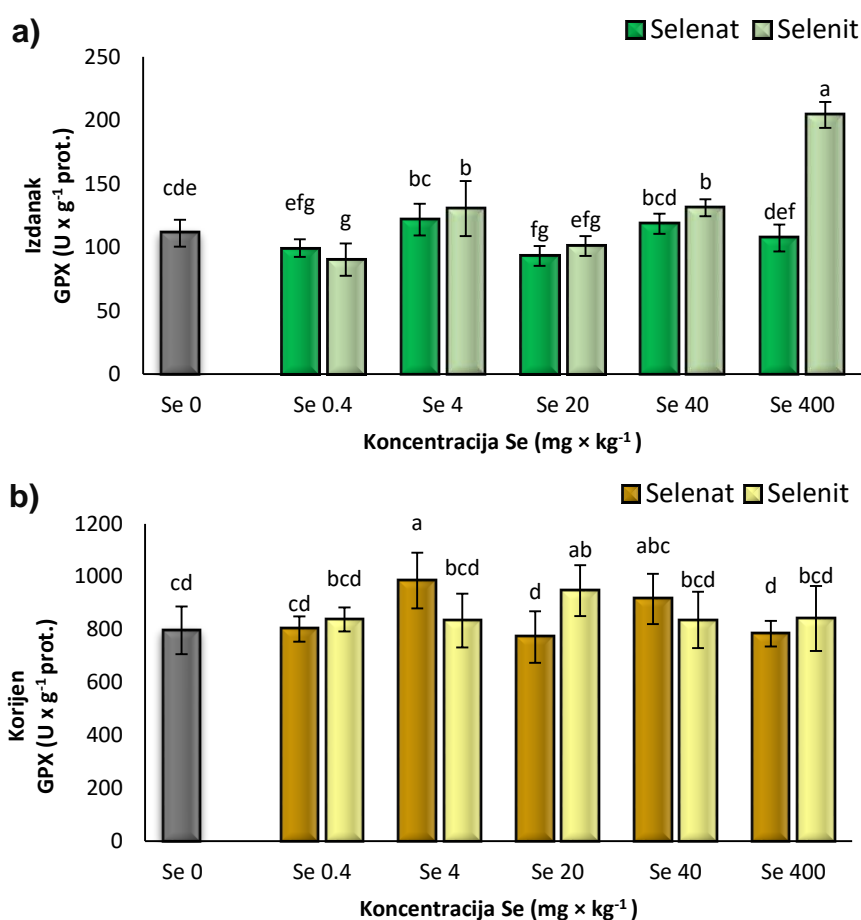
Slika 13. Specifična aktivnost GST u izdanku (a) i korijenu (b) klijanaca pšenice nakon tretmana s različitim koncentracijama selenata i selenita (Se 0.4, Se 4, Se 20, Se 40 i Se 400 mg \times kg⁻¹). Kontrolni klijanci su rasli bez dodatka Se (Se 0 mg \times kg⁻¹). Rezultati (n = 9) su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Duncan post hoc testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

Za razliku od izdanka, selenat je u korijenu pšenice uzrokovao značajno smanjenje aktivnosti u tretmanima s 20, 40 i 400 mg \times kg⁻¹, a zabilježeno smanjenje je redom za 46.52%, 45.24% i 26.01% u odnosu na kontrolu (*Slika 13b*). Selenit u većini tretmana nije djelovao na aktivnost GST, osim u tretmanu s 4 mg \times kg⁻¹ gdje je smanjio aktivnost za 20.24%. U trima najvećim primijenjenim koncentracijama (20, 40 i 400 mg \times kg⁻¹) zabilježena je značajna razlika između oblika Se, gdje je aktivnost uslijed izlaganja selenatu bila manja i u odnosu na aktivnost nakon izlaganja selenitu.

3.11. Aktivnost glutation-peroksidaze u izdanku i korijenu pšenice

Zabilježena specifična aktivnost GPX u izdanku pšenice se pokazala dosta promjenjivom, što je ovisilo o obliku i koncentraciji primijenjenog Se (*Slika 14a*). Dok četiri tretmana selenatom (0.4, 4, 40 i 400 mg \times kg⁻¹) nisu uzrokovala promjenu aktivnosti GPX u odnosu na kontrolne izdanke, tretman s 20 mg \times kg⁻¹ je smanjio aktivnost za 16.07%. Nadalje, jedini tretman selenitom koji nije uzrokovao značajniju promjenu aktivnosti GR bio je onaj s 20 mg \times kg⁻¹, dok su ju ostali povećali ili smanjili. Najmanja koncentracija selenita, 0.4 mg \times kg⁻¹, smanjila je aktivnost za 18.68%, a 4, 40 i 400 mg \times kg⁻¹ selenita su uzrokovali porast redom za 14.88%, 15.33% i 45.66% u odnosu na kontrolu. Razlike u aktivnosti među tretmanima selenata i selenita nije bilo, osim pri najvećoj primijenjenoj koncentraciji gdje je selenit povećao aktivnost za 47.49% u odnosu na selenat. To je bila ujedno i najveća zabilježena aktivnost GR u izdanku.

Prisutnost Se u korijenu pšenice većinom nije utjecala na promjenu aktivnosti GPX (*Slika 14b*). Oba oblika su u samo jednoj primijenjenoj koncentraciji uzrokovali porast aktivnosti u odnosu na kontrolno korijenje. Selenat primijenjen u koncentraciji 4 mg \times kg⁻¹ je povećao aktivnost za 19.08%, a tretman s 20 mg \times kg⁻¹ selenita za 15.87%. Spomenuta dva tretmana su pokazala i jedinu razliku u aktivnosti GPX korijena između dva oblika Se.

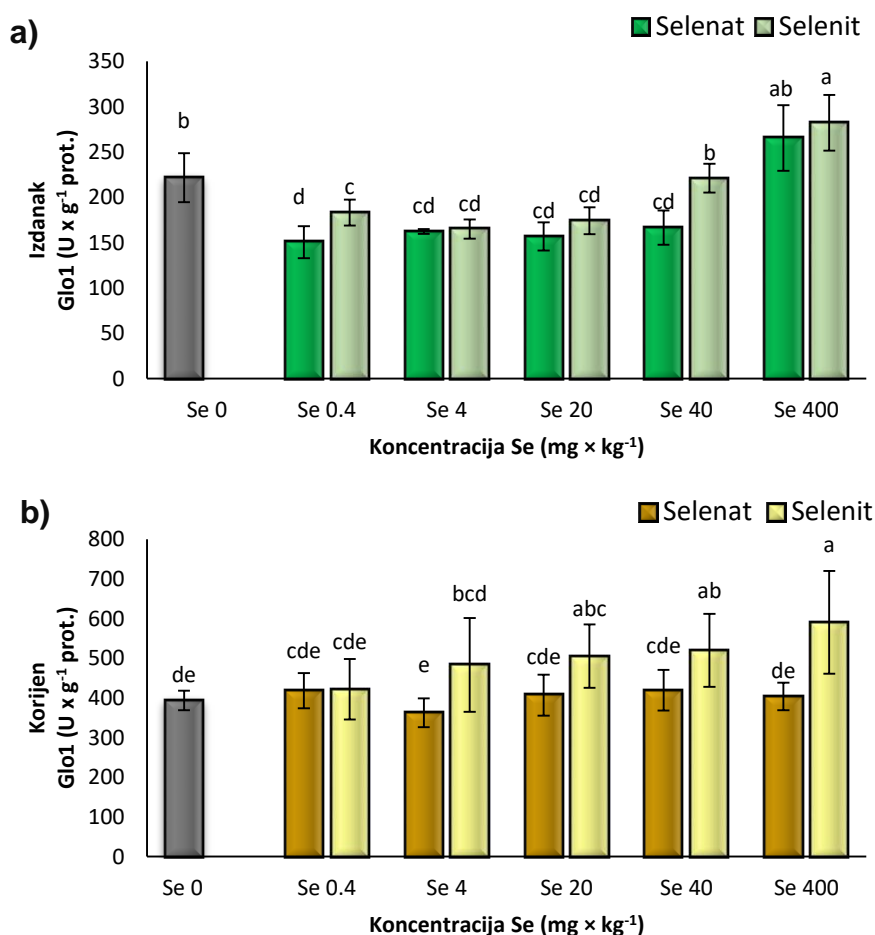


Slika 14. Specifična aktivnost GPX u izdanku (a) i korijenu (b) klijanaca pšenice nakon tretmana s različitim koncentracijama selenata i selenita (Se 0.4, Se 4, Se 20, Se 40 i Se 400 mg × kg⁻¹). Kontrolni klijanci su rasli bez dodatka Se (Se 0 mg × kg⁻¹). Rezultati (n = 9) su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Duncan post hoc testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

3.12. Aktivnost gliksilaze I u izdanku i korijenu pšenice

Prisutnost Se je uvelike utjecala na specifičnu aktivnost Glo1 u izdanku pšenice (*Slika 15a*). Oba oblika Se su u manjim primijenjenim koncentracijama značajno smanjila aktivnost u odnosu na kontrolu. Naime, selenat primijenjen u četiri najmanje koncentracije (0.4, 4, 20 i 40 mg × kg⁻¹) je redom smanjio aktivnosti za 32.09%, 26.74%, 29.24% i 24.74% u odnosu na kontrolne izdanke. Nakon tretmana s 400 mg × kg⁻¹ selenata, zabilježena aktivnost je bila značajno veća u odnosu na druge tretmane selenatom, no u odnosu na kontrolu nije bilo razlike. Nadalje, aktivnost Glo1

je također bila smanjena uslijed izlaganju trima najmanjim koncentracijama selenita (0.4, 4 i 20 mg × kg⁻¹). Tretman s 0.4 mg × kg⁻¹ selenita je smanjio aktivnost za 39.53%, 4 mg × kg⁻¹ selenita za 25.52% te 20 mg × kg⁻¹ selenita ju je smanjio za 21.45% u odnosu na kontrolu. Daljnjim porastom primijenjenih koncentracija selenita (40 i 400 mg × kg⁻¹) je uočen rast specifične aktivnosti u odnosu na tretmane s manjim koncentracijama. Rast je bio statistički značajan samo nakon izlaganja koncentraciji od 400 mg × kg⁻¹ selenita, a bio je za 21.50% veći od kontrole. Uspoređujući specifičnu aktivnost Glo1 između pojedinih oblika Se, razlike su zabilježene samo pri koncentracijama od 0.4 i 40 mg × kg⁻¹. Pri tome je u oba tretmana selenitom zabilježena veća aktivnost nego u tretmanu selenatom.



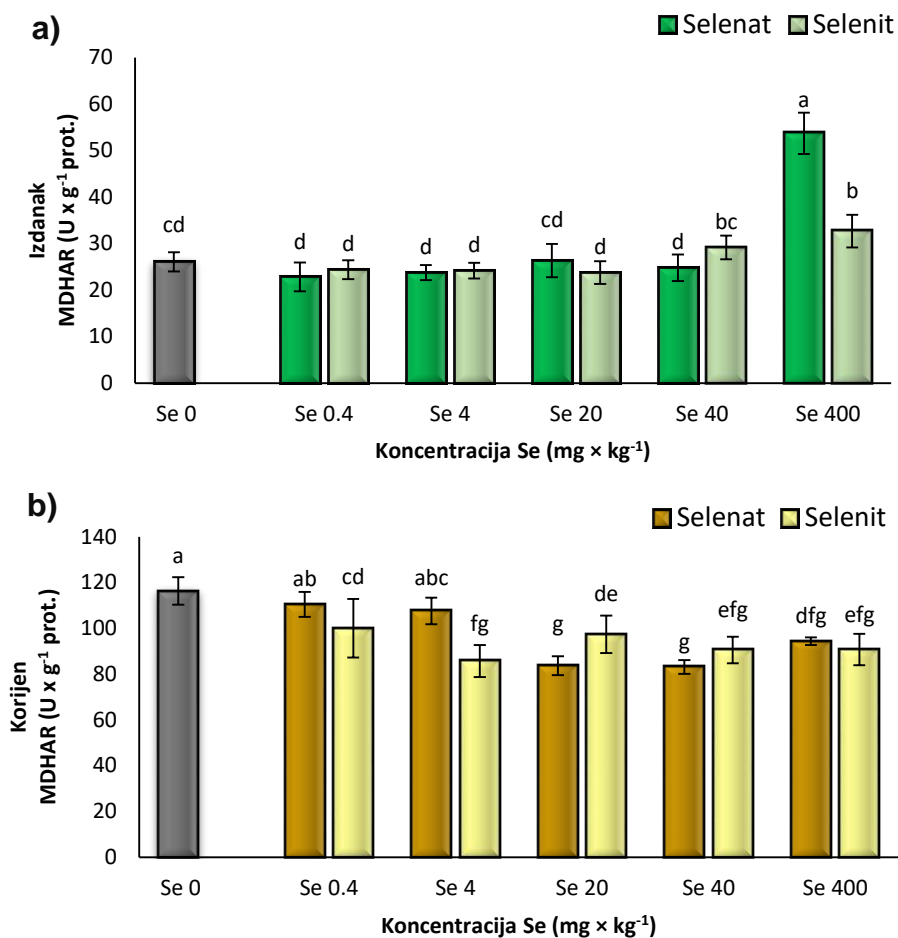
Slika 15. Specifična aktivnost Glo1 u izdanku (a) i korijenu (b) klijanaca pšenice nakon tretmana s različitim koncentracijama selenata i selenita (Se 0.4, Se 4, Se 20, Se 40 i Se 400 mg × kg⁻¹). Kontrolni klijanci su rasli bez dodatka Se (Se 0 mg × kg⁻¹). Rezultati (n = 9) su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Duncan post hoc testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

Korijen je na prisutnost Se odgovorio na bitno drugačiji način nego izdanak (*Slika 15b*). U odnosu na kontrolu, selenat niti jednom primijenjenom koncentracijom nije promijenio specifičnu aktivnost Glo1, dok je uslijed izlaganja selenitu bio vidljiv trend porasta aktivnosti po porastu primijenjenih koncentracija. No, porast uslijed izlaganja selenitu je bio statistički značajan samo u tri najveće primijenjene koncentracije (20, 40 i 400 mg × kg⁻¹). Tako je tretman s 20 mg × kg⁻¹ selenita povećao aktivnost Glo1 za 22.15%, tretman s 40 mg × kg⁻¹ za 24.37% te tretman s 400 mg × kg⁻¹ za 33.40% što je bila i najveća zabilježena aktivnost u korijenu. Uspoređujući razlike u aktivnosti između dva primijenjena oblika Se, značajne razlike su uočene u tretmanima s 4, 40 i 400 mg × kg⁻¹ prilikom čega su tretmani selenitom uzrokovali veću aktivnost nego tretmani selenatom.

3.13. Aktivnost monodehidroaskorbat-reduktaze u izdanku i korijenu pšenice

Prisutnost Se u izdanku pšenice u većini tretmana nije utjecala na specifičnu aktivnost MDHAR (*Slika 16a*). Izuzetak su bile najveće koncentracije (400 mg × kg⁻¹) oba primijenjena oblika Se koje su povećale aktivnost u odnosu na kontrolu. Pri tome je tretman s 400 mg × kg⁻¹ selenita povećao aktivnost za 20.21%, a 400 mg × kg⁻¹ selenata za 51.90% što je ujedno i najveća zabilježena aktivnost MDHAR u izdanku. Tretman s 400 mg × kg⁻¹ je ujedno i jedini prilikom kojeg su zabilježene razlike u aktivnosti MDHAR između selenata i selenita gdje je selenat uzrokovao za 39.19% veću aktivnost MDHAR u odnosu na selenit.

Uspoređujući s izdankom, korijen je u potpunosti drugačije odgovorio na prisutnost Se jer je većina tretmana utjecala na aktivnost MDHAR (*Slika 16b*). Dok dvije najmanje koncentracije selenata (0.4 i 4 mg × kg⁻¹) nisu uzrokovale promjenu aktivnosti u odnosu na kontrolne vrijednosti, tretmani s 20, 40 i 400 mg × kg⁻¹ su aktivnost MDHAR smanjili redom za 28.04%, 28.55% i 18.88%. Nadalje, sve primijenjene koncentracije selenita (0.4, 4, 20, 40 i 400 mg × kg⁻¹) su uzrokovale pad aktivnosti, i to redom po porastu primijenjenih koncentracija za 13.98%, 26.31%, 16.30%, 22.14% i 22.00%. Uspoređujući međusobno utjecaj dva oblika Se na aktivnost, razlike su vidljive u prva tri tretmana. Pri selenitu primijenjenom u koncentracijama 0.4 i 4 mg × kg⁻¹ su zabilježene za 9.45% i 20.36% manje aktivnosti u odnosu na iste koncentracije selenata. Tretman s 20 mg × kg⁻¹ selenata je uzrokovao za 14.02% manju aktivnost u odnosu na isti tretman selenitom.

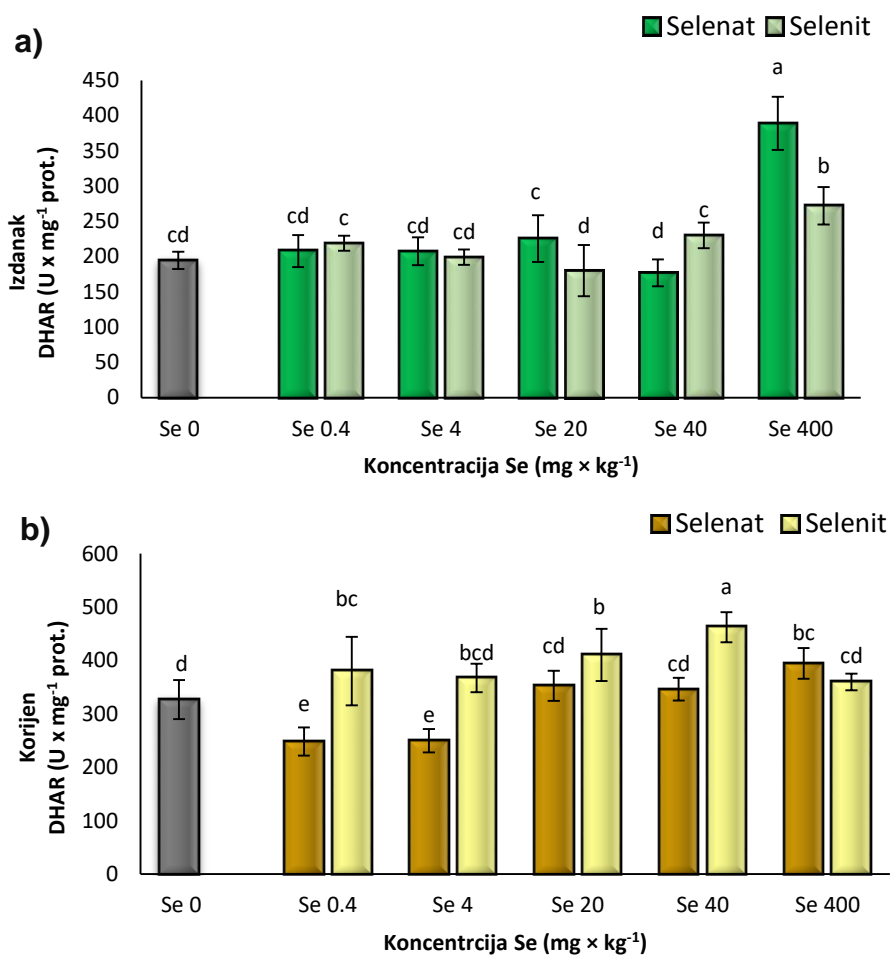


Slika 16. Specifična aktivnost MDHAR u izdanku (a) i korijenu (b) klijanaca pšenice nakon tretmana s različitim koncentracijama selenata i selenita (Se 0.4, Se 4, Se 20, Se 40 i Se 400 mg × kg⁻¹). Kontrolni klijaneci su rasli bez dodatka Se (Se 0 mg × kg⁻¹). Rezultati (n = 9) su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Duncan post hoc testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

3.14. Aktivnost dehidroaskorbat-reduktaze u izdanku i korijenu pšenice

Specifična aktivnost DHAR u izdanku, uslijed izloženosti Se, mijenjala se slično kao i aktivnost MDHAR. Naime, četiri tretmana (0.4, 4, 20 i 40 mg × kg⁻¹) s oba oblika Se nisu utjecala na aktivnost u odnosu na kontrolne izdanke, dok je jedina promjena zabilježena pri tretmanu s najvećom koncentracijom Se (400 mg × kg⁻¹) (*Slika 17a*). Tretman s 400 mg × kg⁻¹ selenata je povećao aktivnost DHAR za 49.94%, a sa 400 mg × kg⁻¹ selenita za 28.46%. Značajne razlike u aktivnosti između dva oblika Se su zabilježene pri koncentracijama od 20, 40 i 400 mg × kg⁻¹. Pri tretmanu s 20 i 400 mg

$\times \text{kg}^{-1}$ selenata aktivnost je bila za 20.11% i 30.03% veća nego u tretmanu sa selenitom, dok je tretman sa $40 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ selenata uzrokovao 23.15% manju aktivnost DHAR.



Slika 17. Specifična aktivnost DHAR u izdanku (a) i korijenu (b) klijanaca pšenice nakon tretmana s različitim koncentracijama selenata i selenita (Se 0.4, Se 4, Se 20, Se 40 i Se 400 $\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$). Kontrolni klijanci su rasli bez dodatka Se (Se 0 $\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$). Rezultati ($n = 9$) su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Duncan post hoc testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

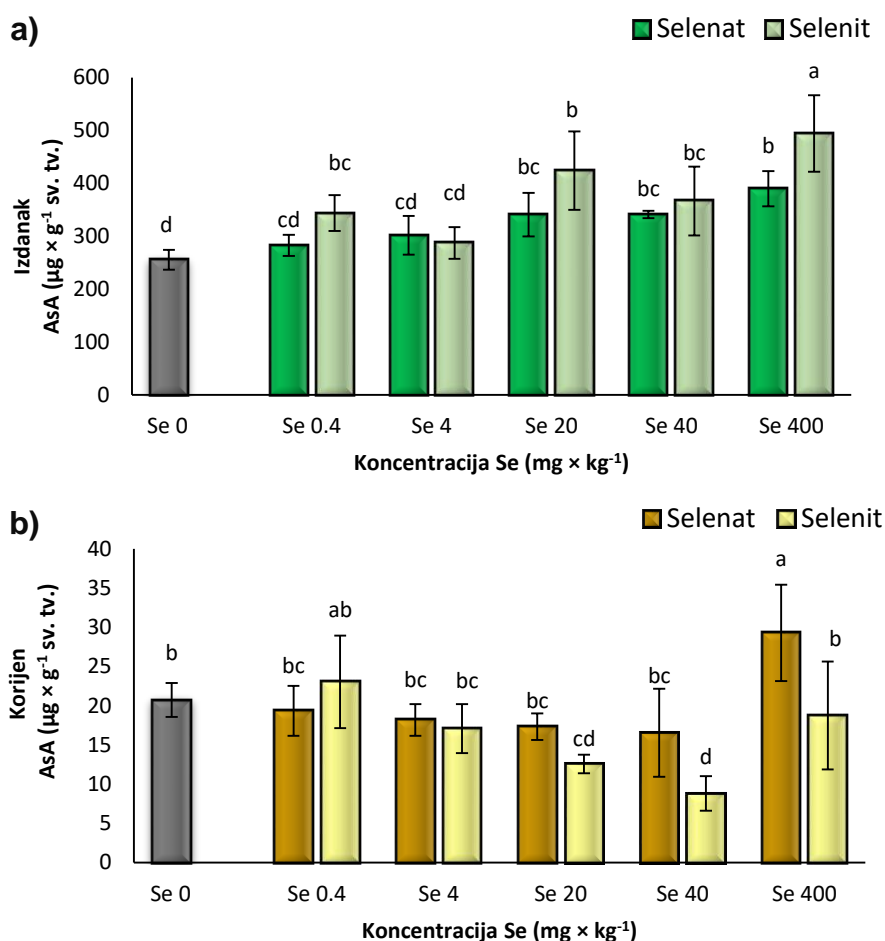
Aktivnost DHAR u korijenu pšenice se uvelike mijenjala uslijed izlaganja dvama oblicima Se (*Slika 17b*). Tretmani s 0.4 i 4 $\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$ selenata su smanjili aktivnost redom za 24.01% i 23.5%, dok je najveća koncentracija (400 $\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$) povećala istu za 17.19% u odnosu na kontrolu. Selenat primijenjen u koncentracijama

20 i 40 mg \times kg⁻¹ nije imao značajan učinak na aktivnost DHAR. Nadalje, iako su sve primijenjene koncentracije selenita uzrokovale povećanje aktivnosti u odnosu na kontrolu, to je statistički bilo značajno samo prilikom četiri tretmana (0.4, 4, 20, 40 mg \times kg⁻¹). Navedeni tretmani su povećali redom aktivnosti za 14.06%, 11.01%, 20.44% i 29.35%. Uspoređujući međusobno utjecaj selenata i selenita na aktivnost, kod četiri primijenjene koncentracije (0.4, 4, 20 i 40 mg \times kg⁻¹) selenit je uzrokovao veću aktivnost DHAR u korijenu u odnosu na jednake koncentracije selenata.

3.15. Koncentracija askorbata u izdanku i korijenu pšenice

Prisutnost Se u izdanku klijanaca pšenice je značajno promijenila koncentraciju AsA-e u odnosu na kontrolu, posebno pri većim koncentracijama Se (*Slika 18a*). Selenat primijenjen u tri najveće koncentracije (20, 40 i 400 mg \times kg⁻¹) je povećao koncentraciju AsA-e za 25.01%, 25.08%, odnosno za 34.41% u odnosu na kontrolne izdanke. Sadržaj AsA-e je, također, bio veći od kontrole nakon izlaganja selenitu te je ovisio o primijenjenim koncentracijama. Redom po porastu primijenjenih koncentracija (0.4, 20, 40 i 400 mg \times kg⁻¹), zabilježeni su porasti od 25.60%, 39.67%, 30.30% i 48.27%. Jedino tretman s 4 mg \times kg⁻¹ selenita nije promijenio koncentraciju AsA-e. Uspoređujući utjecaj selenata i selenita međusobno, statistički značajne razlike su zabilježene pri koncentracijama od 0.4, 20 i 400 mg \times kg⁻¹. Pri ovim koncentracijama, koncentracija AsA-e u izdanku je bila veća nakon tretmana selenitom u odnosu na selenat te su tako zabilježeni porasti za 17.68% pri tretmanu s 0.4 mg \times kg⁻¹, za 19.57% pri tretmanu s 20 mg \times kg⁻¹ te porast za 21.13% pri tretmanu s 400 mg \times kg⁻¹.

Za razliku od izdanka klijanaca gdje je prisutnost Se uzrokovala porast koncentracije AsA-e u većini tretmana, u korijenu ju je povećala samo najveća koncentracija selenata (400 mg \times kg⁻¹) (*Slika 18b*). U tom tretmanu, sadržaj AsA-e je bio za 29.25% veći od kontrole, a to je ujedno i najveća zabilježena koncentracija AsA-e u korijenu klijanaca (29.30 μ g \times g⁻¹ sv. tv.). S druge strane, koncentracije od 20 i 40 mg \times kg⁻¹ selenita su smanjile koncentraciju AsA-e za 39.32%, odnosno za 57.44% u odnosu na kontrolu. Razlike u koncentracijama AsA-e između dva oblika primijenjenog Se su vidljive u dvjema najvećim koncentracijama, 40 i 400 mg \times kg⁻¹, pri kojima su veće vrijednosti zabilježene u tretmanima selenatom u odnosu na selenit.



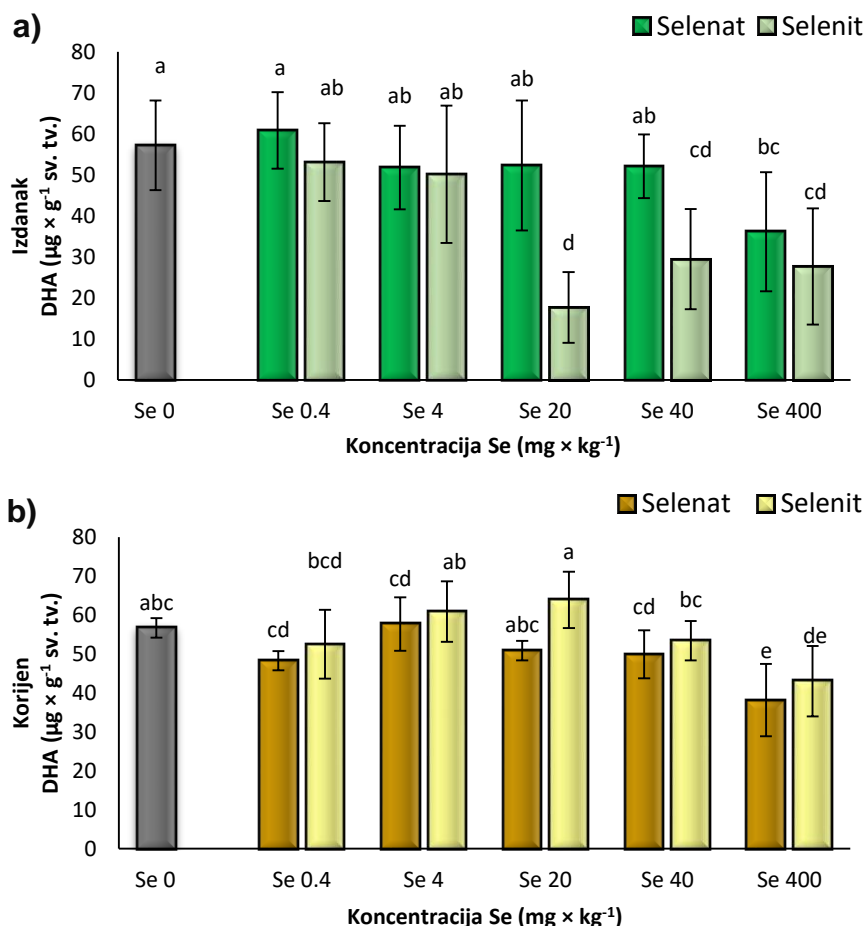
Slika 18. Koncentracija AsA u izdanku (a) i korijenu (b) klijanaca pšenice nakon tretmana s različitim koncentracijama selenata i selenita (Se 0.4, Se 4, Se 20, Se 40 i Se 400 mg × kg⁻¹). Kontrolni klijanci su rasli bez dodatka Se (Se 0 mg × kg⁻¹). Rezultati (n = 9) su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Duncan post hoc testom. Slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

3.16. Koncentracija dehidroaskorbata u izdanku i korijenu pšenice

U izdanku klijanaca pšenice, koncentracija DHA je uvelike ovisio o koncentraciji i obliku primijenjenog Se. U tretmanima selenitom, koncentracija DHA se počela drastično smanjivati pri koncentraciji od 20 mg × kg⁻¹ selenita, a smanjenje je zabilježeno i pri 40 te 400 mg × kg⁻¹ (Slika 19a). Tako je koncentracija DHA u tretmanu s 20 mg × kg⁻¹ selenita bila za 79.41% manji od kontrole, pri 40 mg × kg⁻¹ manji za 58.00 % te je pri 400 mg × kg⁻¹ bio manji za 61.78%. Najveća primijenjena

koncentracija selenata, $400 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$, također je smanjila koncentraciju DHA u odnosu na kontrolu, i to za 36.78%. Iako je pri tretmanima s tri najveće koncentracije Se (20, 40 i $400 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$) utvrđena manja koncentracija DHA u tretmanima selenitom u odnosu na iste tretmane selenatom, on je bio statistički značajan samo pri dva tretmana (20 i $40 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$).

Iako je pri najvećim primijenjenim koncentracijama oba oblika Se vidljiv trend smanjenja koncentracije DHA u korijenu klijanaca, te promjene u većini tretmana nisu bile statistički značajne u odnosu na kontrolne vrijednosti (Slika 19b). Samo najveće koncentracije selenata i selenita ($400 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$) su uzrokovale promjenu koncentracije DHA prilikom čega su ju smanjile u odnosu na kontrolu. Dok je tretman sa $400 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ selenata smanjio koncentraciju DHA za 32.74%, isti tretman selenitom ju je smanjio za 24.15%.



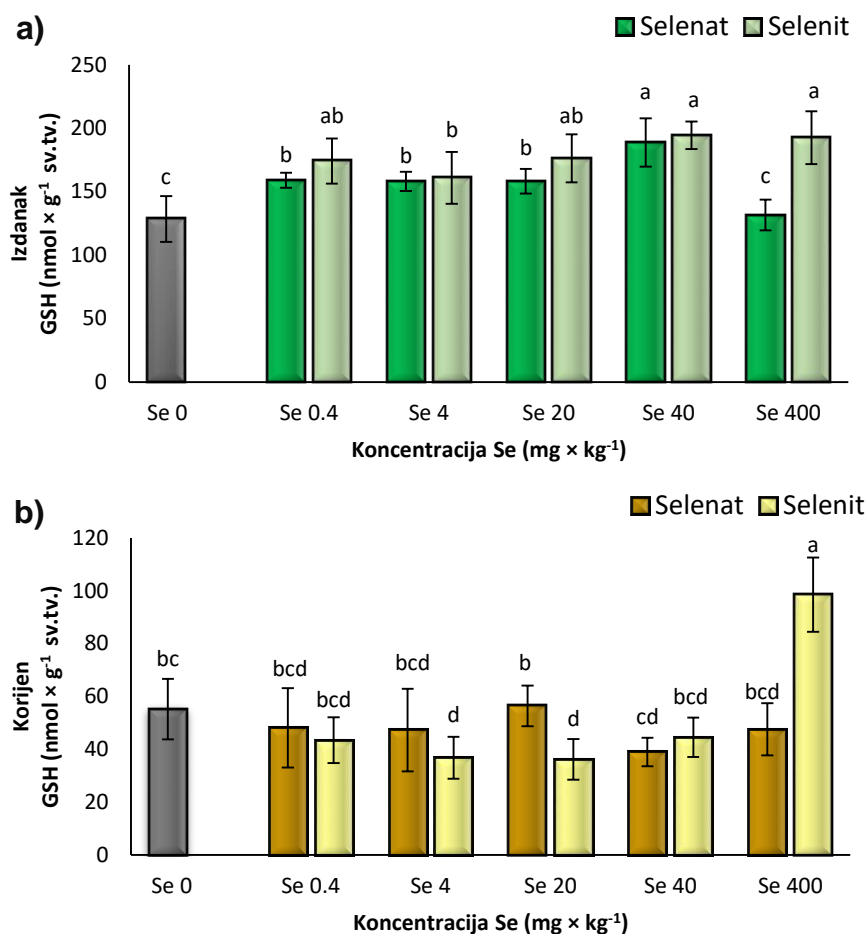
Slika 19. Koncentracija DHA u izdanku (a) i korijenu (b) klijanaca pšenice nakon tretmana s različitim koncentracijama selenata i selenita (Se 0.4, Se 4, Se 20, Se 40 i Se $400 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$). Kontrolni klijanci su rasli bez dodatka Se (Se $0 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$). Rezultati ($n = 9$) su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Razlike između

skupina testirane su Duncan post hoc testom. Slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

3.17. Količina reduciranog glutationa u izdanku i korijenu pšenice

Prisutnost Se u izdanku klijanaca je uvelike utjecala na količinu GSH. Oba oblika Se su pri gotovo svim primijenjenim koncentracijama uzrokovali porast količine GSH u odnosu na izdanak (*Slika 20a*). Selenat primijenjen u četiri koncentracije (0.4, 4, 20 i 40 mg \times kg⁻¹) je redom povećao GSH za 19.21%, 18.71%, 18.8% i 31.95%. Najveća koncentracija selenata (400 mg \times kg⁻¹) nije značajno promijenila količinu GSH u odnosu na kontrolne vrijednosti. Nadalje, količina GSH u izdanku se povećao i uslijed izlaganja svim tretmanima selenita (0.4, 4, 20, 40 i 400 mg \times kg⁻¹). Tako je s porastom primijenjenih koncentracija selenita zabilježen redom porast količine GSH za 26.28%, 20.13%, 27.14%, 33.92 i 33.26% u odnosu na vrijednosti u kontrolnim uzorcima. Količina GSH se nije značajno razlikovala između pojedinih tretmana selenitom i selenatom, osim pri najvećoj primijenjenoj koncentraciji selenitom (400 mg \times kg⁻¹) gdje je nakon tretmana zabilježeno povećanje sadržaja za 31.67% u odnosu na vrijednosti utvrđene pri tretmanu selenatom.

U korijenu je, za razliku od izdanka, uočen drugačiji trend vrijednosti količine GSH u odgovoru na Se. Dok su tretmani s 4 i 20 mg \times kg⁻¹ selenita uzrokovali smanjenje količine GSH za 33.31%, odnosno za 34.40% u odnosu na kontrolu, najveća koncentracija selenita je povećala količinu GSH za 43.95% (*Slika 20b*). Pri tretmanu s 400 mg \times kg⁻¹ selenita je zabilježena najveća količina GSH u izdanku, a iznosila je 98.51 nmol \times g⁻¹ svježe tvari. Razlike u količinama GSH uslijed primjene različitih oblika Se su bile vidljive pri koncentracijama od 20 i 400 mg \times kg⁻¹. Pri tome je količina GSH pri tretmanu s 20 mg \times kg⁻¹ selenata bila za 35.84% veći u odnosu na tretman selenitom, dok je pri tretmanu s 400 mg \times kg⁻¹ selenita količina GSH bila za 51.75% veća u odnosu na tretman selenatom.

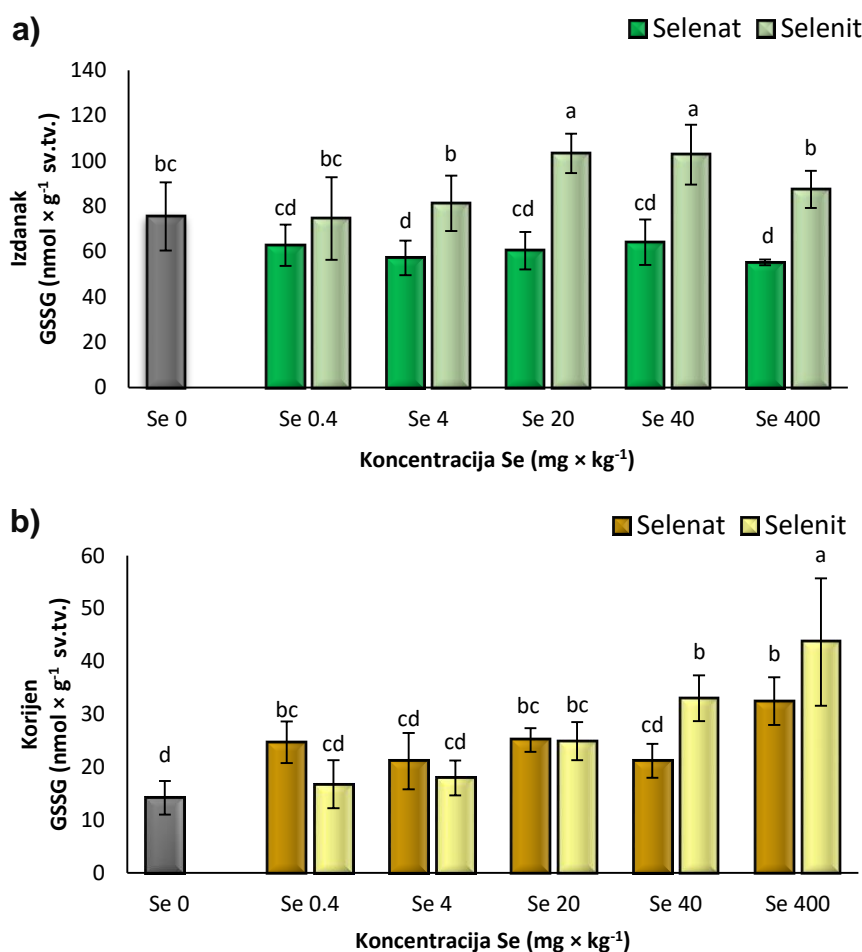


Slika 20. Količina GSH u izdanku (a) i korijenu (b) klijanaca pšenice nakon tretmana s različitim koncentracijama selenata i selenita (Se 0.4, Se 4, Se 20, Se 40 i Se 400 mg × kg⁻¹). Kontrolni klijanci su rasli bez dodatka Se (Se 0 mg × kg⁻¹). Rezultati (n = 9) su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Duncan post hoc testom. Slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

3.18. Količina oksidiranog glutatona u izdanku i korijenu pšenice

Količina GSSG-a u izdanku klijanaca se mijenjala u ovisnosti o obliku i koncentraciji primijenjenog Se (*Slika 21a*). Iako je pri svim tretmanima selenatom vidljivo smanjenje količine GSSG-a u odnosu na kontrolu, ono je bilo statistički značajno samo pri 4 i 400 mg × kg⁻¹. Tako je tretman sa 4 mg × kg⁻¹ selenata smanjio količinu GSSG-a za 24.18%, a sa 400 mg × kg⁻¹ selenata za 26.90% u odnosu na kontrolu. Selenit je, s druge strane, uzrokovao povećanje količine GSSG-a samo pri tretmanu s 20 i 40 mg × kg⁻¹ Se u odnosu na kontrolne izdanke. Tretmani s 20 i 40 mg

$\times \text{kg}^{-1}$ selenita su povećali GSSG za 26.97%, odnosno za 26.56% u odnosu na kontrolu te su upravo pri tim tretmanima zabilježene najveće količine GSSG-a u izdancima klijanaca. Uspoređujući utjecaj dva primijenjena oblika Se na sadržaj GSSG, u četiri varijante (4, 20, 40 i $400 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$) vidljive su veće vrijednosti nakon izlaganja selenitu u odnosu na selenat. Tako je količina GSSG-a po porastu primijenjenih koncentracija selenita bila za 29.59%, 41.59%, 37.66% i 36.91% veća od vrijednosti izmjerenih nakon tretmana selenatom.



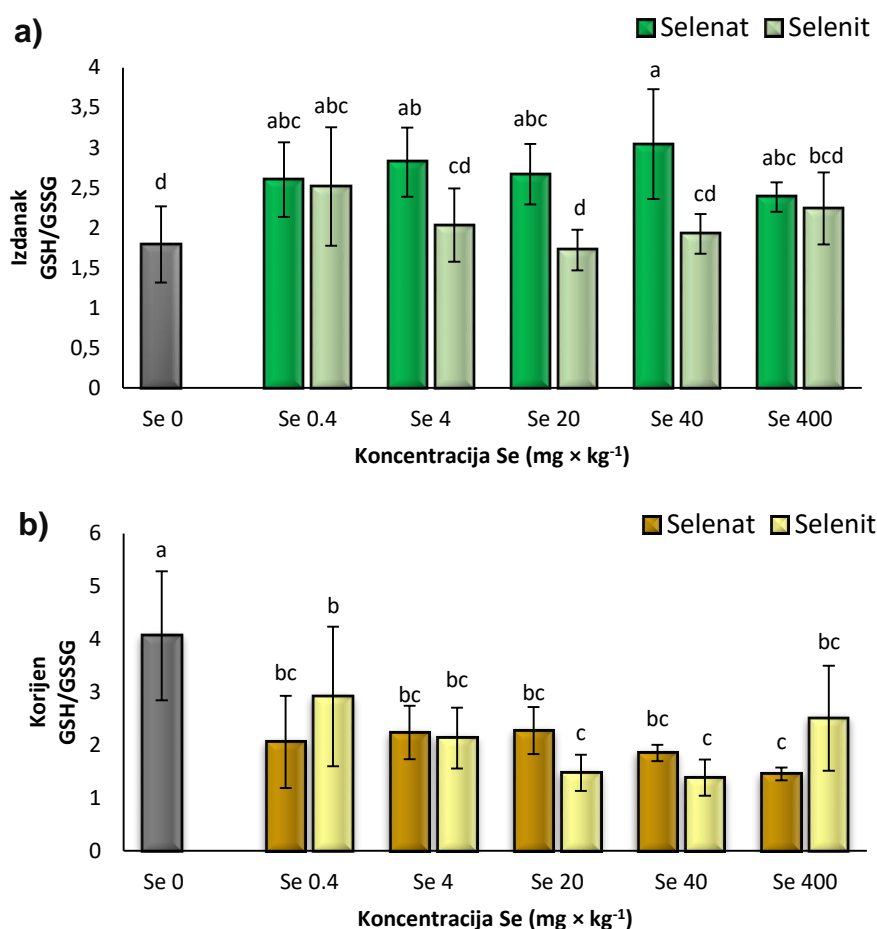
Slika 21. Količina GSSG u izdanku (a) i korijenu (b) klijanaca pšenice nakon tretmana s različitim koncentracijama selenata i selenita (Se 0.4, Se 4, Se 20, Se 40 i Se 400 $\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$). Kontrolni klijaneci su rasli bez dodatka Se (Se 0 $\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$). Rezultati ($n = 9$) su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Duncan post hoc testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

Prisutnost Se u korijenu klijanaca pšenice je u većini tretmana uzrokovalo povećanje količine GSSG-a u odnosu na kontrolu (*Slika 21b*). Tri koncentracije selenata (0.4, 20 i 400 mg × kg⁻¹) su povećale količinu GSSG-a redom za 42.44%, 43.47% i 56.27%. Iako je porast GSSG-a vidljiv i kod tretmana s 4 i 40 mg × kg⁻¹ selenata, on nije bio statistički značajan. Povećanje količine GSSG-a u odnosu na kontrolu zabilježeno je i pri tretmanu s tri najveće koncentracije selenita (20, 40 i 400 mg × kg⁻¹). Tako je količina GSSG-a nakon tretmana s 20, 40 i 400 mg × kg⁻¹ selenita bio za 42.98%, 56.98% i 67.45% veća u odnosu na kontrolne vrijednosti. Razlike u količini GSSG-a između dva primijenjena oblika Se su vidljiva samo pri dvije najveće koncentracije, 40 i 400 mg × kg⁻¹. Pri obje koncentracije selenita zabilježene su veće količine GSSG-a nego u istim tretmanima selenatom. Tretmani s 40 i 400 mg × kg⁻¹ selenita su uzrokovali za 35.79%, odnosno 25.59% veću količinu GSSG-a u odnosu na selenat.

3.19. Omjer reduciranog i oksidiranog glutationa u izdanku i korijenu pšenice

Omjer GSH/GSSG, kao jedan od pokazatelja oksidacijskog i antioksidacijskog statusa, uvelike se mijenjao u izdanku klijanaca u prisutnosti Se, naročito pri tretmanu selenatom (*Slika 22a*). Naime, sve koncentracije selenata uzrokovale su značajan porast omjera u odnosu na kontrolu, i to redom za 31.16%, 36.49%, 32.93%, 41.20% i 24.87%. Omjer se povećao i nakon izlaganja najmanjoj koncentraciji selenita (0.4 mg × kg⁻¹) i to za 28.85% u odnosu na kontrolu. Ostali tretmani selenitom nisu uzrokovali značajnije promjene omjera. Uspoređujući dva oblika Se međusobno, razlike su vidljive u trima primijenjenim koncentracijama (4, 20 i 40 mg × kg⁻¹) prilikom čega je zabilježen veći omjer kod izdanaka tretiranih selenatom nego kod onih tretiranih selenitom.

Za razliku od izdanka gdje je omjer GSH/GSSG bio nepromijenjen ili povećan, u korijenu je taj omjer uslijed prisutnosti Se značajno smanjen (*Slika 22b*). Omjer se redom smanjio uslijed izlaganja selenatu po porastu primijenjenih koncentracija (0.4, 4, 20, 40 i 400 mg × kg⁻¹) za 49.37%, 45.03%, 44.06%, 54.52% i 64.24% u odnosu na kontrolu. Nadalje, omjer se smanjio i uslijed izlaganja selenitu i to redom za 28.23%, 47.57%, 63.71%, 66.01% i 38.36%. Uspoređujući omjere između selenata i selenita, nije uočena niti jedna značajna razlika.



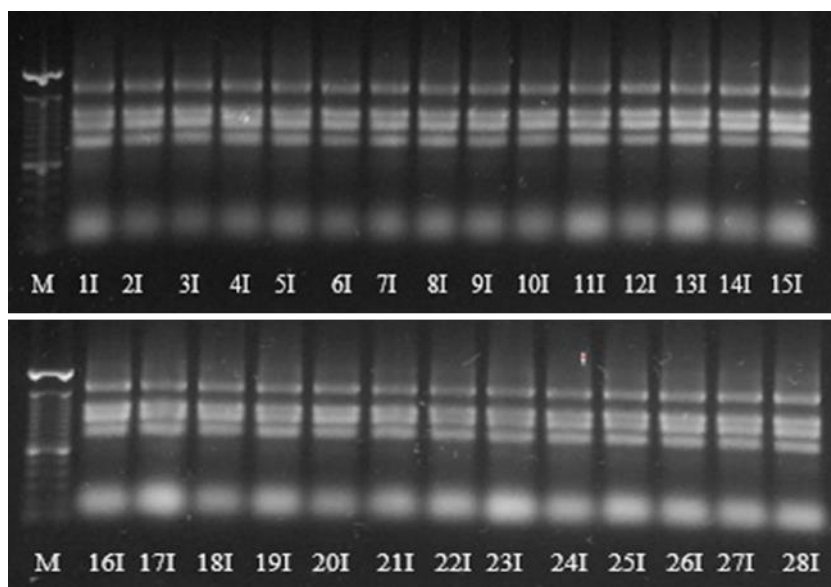
Slika 22. Omjer GSH/GSSG u izdanku (a) i korijenu (b) klijanaca pšenice nakon tretmana s različitim koncentracijama selenata i selenita (Se 0.4, Se 4, Se 20, Se 40 i Se 400 mg × kg⁻¹). Kontrolni klijanci su rasli bez dodatka Se (Se 0 mg × kg⁻¹). Rezultati (n = 9) su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Duncan post hoc testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

3.20. Kvaliteta izolirane ukupne RNA iz korijena i izdanka pšenice

S ciljem određivanja utjecaja tretmana rastućim koncentracijama selenata i selenita na ekspresiju gena *ATP-Sul*, *cs*, *gr*, *gpx*, *apx*, *gst*, *mdhar* i *dhar* u korijenu i izdanku klijanaca pšenice, izolirana je ukupna RNA iz navedenih tkiva (*Slika 25 i 26*). Raspon koncentracija ukupne RNA izolirane iz izdanka bio je od 727 ng × μL⁻¹ do 1498 ng × μL⁻¹, dok je raspon koncentracija u korijenu iznosio od 315 ng × μL⁻¹ do 1780 ng × μL⁻¹. Vrijednosti spektrofotometrijskog mjerenja omjera A260/A280 bile su između 1.8 i 2.1 te su pokazatelj su čistoće izolirane RNA u odnosu na proteine. Iako su u

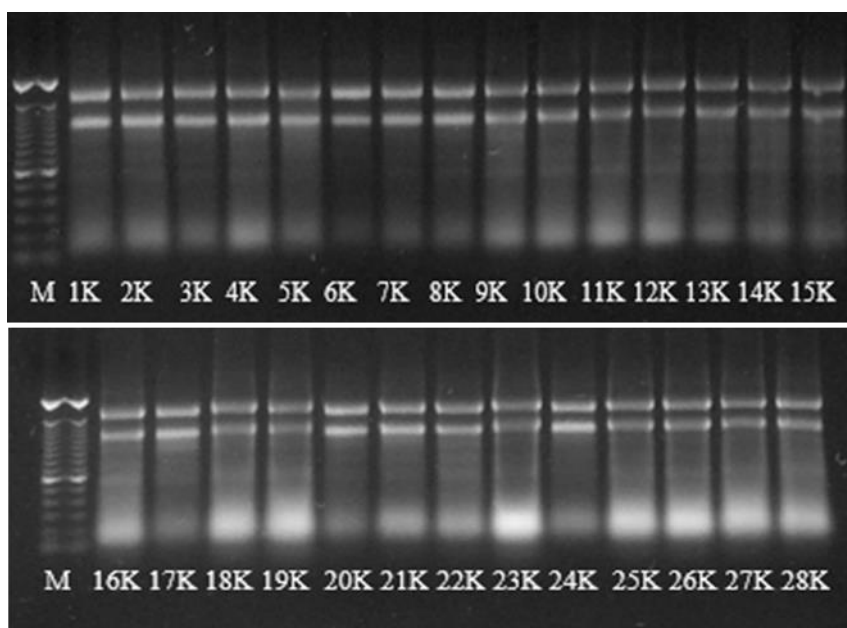
omjeru A260/A230 bile prisutne male varijacije (1.9-2.3), to nije utjecalo na daljnje analize. Budući da je RNA izrazito osjetljiva i sklona degradaciji, elektroforezom je provjerena cjelovitost izolirane RNA.

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 25*). Oštre vrpce kao i njihov intenzitet ukazuju na cjelovitost izolirane ukupne RNA. Osim toga, na gelu nije uočena kontaminacija s genomskom DNA.



Slika 23. Kvaliteta ukupne RNA izolirane iz izdanka klijanaca pšenice tretirane različitim koncentracijama selenita i selenata. M: standard duljine odsječaka DNA (*100 bp DNA Ladder*); 1I-4I: kontrolna skupina, 5I-8I: tretman s $0.4 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ selenata; 9I-12I: tretman s $20 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ selenata; 13I-16I: tretman s $400 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ selenata; 17I-20I: tretman s $0.4 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ selenita; 21I-24I tretman s $20 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ selenita; 25I-28I: tretman s $400 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ 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 26*). Oštre vrpce kao i njihov intenzitet ukazuju na cjelovitost izolirane ukupne RNA. Također, niti ovdje nije uočena kontaminacija s genomskom DNA.



Slika 24. 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 $0.4 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ selenata; 9K-12K: tretman s $20 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ selenata; 13K-16K: tretman s $400 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ selenata; 17K-20K: tretman s $0.4 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ selenita; 21K-24K tretman s $20 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ selenita; 25K-28K: tretman s $400 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ selenita.

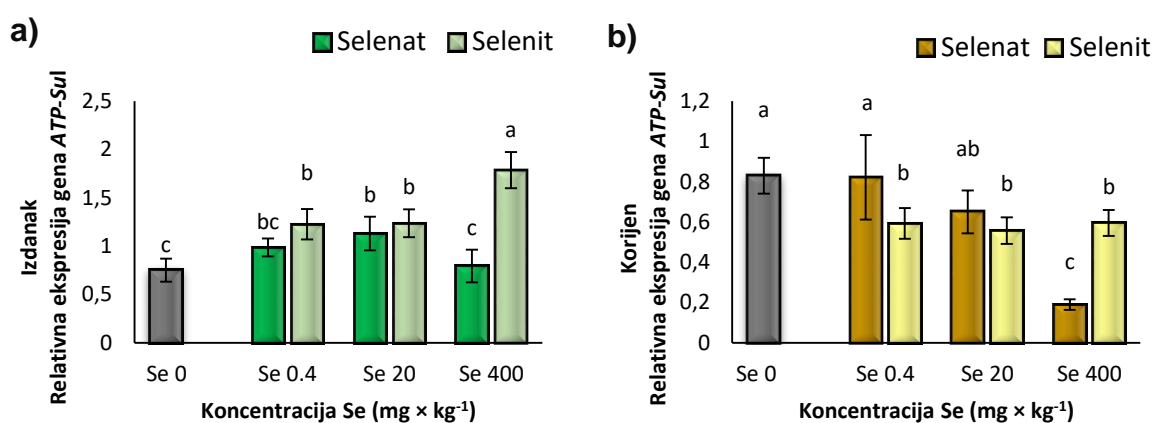
3.21. Genska ekspresija

3.21.1. Relativna ekspresija gena *ATP-Sul* u izdanku i korijenu pšenice

Kemijski oblik Se je različito utjecao na ekspresiju gena za *ATP-Sul*. Tako je tretman s $20 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ selenata u izdanku klijanaca uzrokovao značajnu promjenu ekspresije koja je bila vidljiva kao povećanje razine transkripta *ATP-Sul* za 33.53% u odnosu na kontrolu (*Slika 27a*). Suprotno tomu, selenit je pri svim tretmanima (0.4 , 20 i $400 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$) povećao ekspresiju gena *ATP-Sul* i to redom za 38.78%, 39.25% i 57.96% u odnosu na kontrolu. Pri najvećoj koncentraciji selenita ($400 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$) zabilježena je i najveća ekspresija gena među svim ispitivanim tretmanima. Pri toj najvećoj koncentraciji uočena je i jedina značajna razlika između tretmana s dva oblika Se pri čemu je uslijed izlaganju selenitu zabilježena puno veća razina transkripata *ATP-Sul* nego kod tretmana selenatom.

Dok je u izdanku uočen porast ekspresije gena *ATP-Sul* ili izostanak odgovora, u korijenu pšenice je taj odgovor bio suprotan (*Slika 27b*). Najveća koncentracija

selenata je smanjila ekspresiju gena za 77.16% u odnosu na kontrolu što je ujedno i najmanja zabilježena vrijednost među analiziranim tretmanima. Tretmani s 0.4 i 20 mg \times kg⁻¹ nisu značajno utjecali na razinu ekspresije gena *ATP-Sul*. Iako je selenit u izdanku povećao ekspresiju gena, u korijenu ju je smanjio u svim tretmanima. Porastom primijenjenih koncentracija selenita, redom su zabilježena smanjenja ekspresije za 28.55%, 32.80% i 28.33% u odnosu na kontrolno korijenje. Značajne razlike u ekspresiji gena *ATP-Sul* između pojedinih oblika Se su zabilježene pri tretmanima s 0.4 i 400 mg \times kg⁻¹. Dok je pri tretmanu s 0.4 mg \times kg⁻¹ selenita zabilježena niža ekspresija u odnosu na tretman selenatom, pri 400 mg \times kg⁻¹ selenita je ekspresija bila za 68.14% veća.



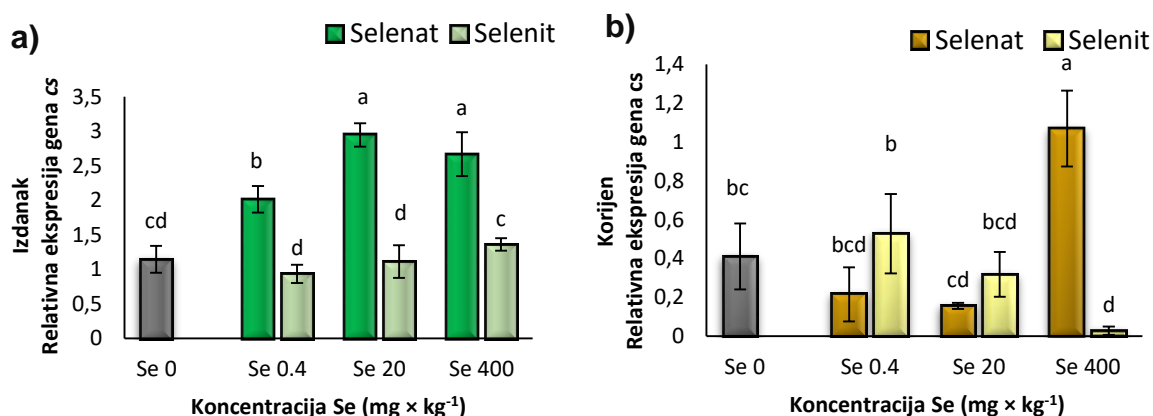
Slika 25. Relativna ekspresija gena *ATP-Sul* u izdanku (a) i korijenu (b) klijanaca pšenice nakon tretmana s različitim koncentracijama selenata i selenita (Se 0.4, Se 20 i Se 400 mg \times kg⁻¹). Kontrolni klijanci su rasli bez dodatka Se (Se 0 mg \times kg⁻¹). Rezultati (n = 4) su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Duncan post hoc testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

3.21.2. Relativna ekspresija gena *cs* u izdanku i korijenu pšenice

Tretman selenatom je jedini značajno utjecao na relativnu ekspresiju gena *cs* u izdanku pšenice pri čemu su sva tri tretmana selenatom (0.4, 20 i 400 mg \times kg⁻¹) uzrokovala značajan porast ekspresije gena u odnosu na kontrolu i to redom za 43.16%, 61.13% i 57.09% (*Slika 28a*). Osim u odnosu na kontrolu, tretmani selenatom su uzrokovali veću ekspresiju gena *cs* u odnosu na iste koncentracija selenita. Tako je

pri tretmanu s $0.4 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ selenata ekspresija bila za 53.66% veća, pri tretmanu s $20 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ za 62.23% te pri tretmanu s $400 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ za 57.43%.

Iako su u korijenu oba kemijska oblika Se značajno utjecala na ekspresiju *cs*, imala su suprotan učinak. Jedina statistički značajna razlika je uočena pri tretmanima najvećim koncentracijama selenata i selenita ($400 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$) (Slika 28b). Ekspresija *cs* nakon izlaganja najvećoj koncentraciji selenata ($400 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$) bila je 61.6% veća od ekspresije u kontrolnom korijenju, dok je ekspresiju bila za 93% manja nakon izlaganja istoj koncentraciji selenita ($400 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$).



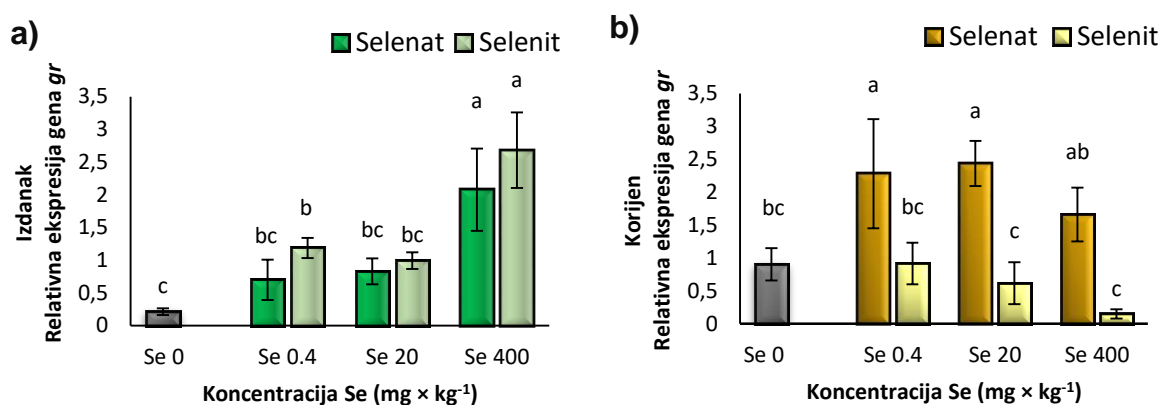
Slika 26. Relativna ekspresija gena *cs* u izdanku (a) i korijenu (b) klijanaca pšenice nakon tretmana s različitim koncentracijama selenata i selenita (0.4 , 20 i $400 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$). Kontrolni klijaneci su rasli bez dodatka Se ($0 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$). Rezultati ($n = 4$) su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Duncan post hoc testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

3.21.3. Relativna ekspresija gena *gr* u izdanku i korijenu pšenice

U izdanku pšenice je pri svim tretmanima Se vidljiva povećana ekspresija gena *gr* u odnosu na kontrolu, no statistički značajno povećanje je utvrđeno samo pri određenim tretmanima (Slika 29a). Tako je samo tretman s najvećom koncentracijom selenata uzrokovao značajno povećanje ekspresije gena za 89.74% u odnosu na kontrolu, dok ostala dva tretmana nisu imala statistički značajan utjecaj. Nadalje, tretmani selenitom u koncentracijama 0.4 i $400 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ su povećali relativnu

ekspresiju gena *gr* za 82.02% , odnosno 92.05% u odnosu na kontrolu. Kemijski oblik Se nije značajno utjecao na razlike u u ekspresiji gena *gr* u izdanku pšenice.

U korijenu je samo tretman s dvije manje koncentracije selenata (0.4 i 20 mg × kg⁻¹) značajno povećao relativnu ekspresiju gena *gr* u odnosu na kontrolu (Slika 29b). Tako je pri tretmanu s 0.4 mg × kg⁻¹ selenata uočen porast ekspresije gena za 60.37%, a pri tretmanu s 20 mg × kg⁻¹ porast za 62.92% u odnosu na kontrolu. S druge strane, tretman selenitom nije značajno utjecao na ekspresiju gena *gr* u korijenu. Tretman selenatom je pri svim koncentracijama uzrokovao značajno veću razinu ekspresije gena *gr* u odnosu na iste tretmane selenitom. Sukladno tome, pri tretmanima s 0.4, 40 i 400 mg × kg⁻¹ selenata ekspresija gena *gr* je bila za 59.84%, 74.60%, odnosno za 90.95% veća u odnosu na tretmane sa selenitom.



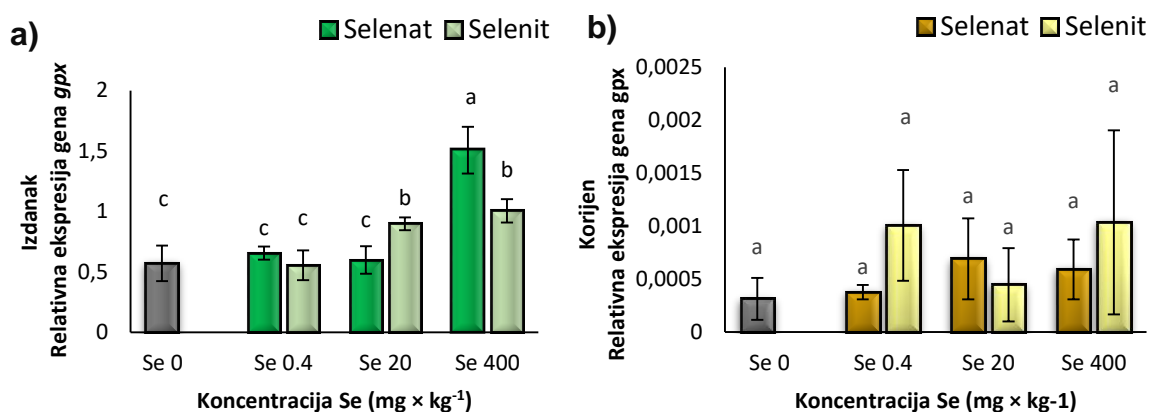
Slika 27. Relativna ekspresija gena *gr* u izdanku (a) i korijenu (b) klijanaca pšenice nakon tretmana s različitim koncentracijama selenata i selenita (Se 0.4, Se 20 i Se 400 mg × kg⁻¹). Kontrolni klijaneci su rasli bez dodatka Se (Se 0 mg × kg⁻¹). Rezultati (n = 4) su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Duncan post hoc testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

3.21.4. Relativna ekspresija gena *gpx* u izdanku i korijenu pšenice

Tretman Se značajno je utjecao na relativnu ekspresiju gena *gpx* u izdanku pšenice (Slika 30a). Samo je najveća primijenjena koncentracija selenata (400 mg × kg⁻¹) značajno povećala ekspresiju gena *gpx* za 62.14% u odnosu na kontrolu, dok je tretman selenitom i pri 20 i 400 mg × kg⁻¹ uzrokovao porast relativne ekspresije gena *gpx* u odnosu na kontrolu, redom za 36.44% i 43.23%. Uspoređujući utjecaj na

ekspresiju dva oblika Se međusobno, značajne razlike su zabilježene samo pri tretmanima s 20 i 400 mg \times kg⁻¹. Selenit primijenjen u koncentraciji od 20 mg \times kg⁻¹ je uzrokovao za 33.47% veću ekspresiju gena *gpx* u odnosu na istu koncentraciju selenata. Suprotno, pri 400 mg \times kg⁻¹ selenita je zabilježena za 33.32% manja ekspresija *gpx* u odnosu na isti tretman selenatom.

U korijenu, niti jedan oblik Se nije uzrokovao značajnije promjene u ekspresiji gena *gpx* u odnosu na kontrolu (*Slika 30b*).



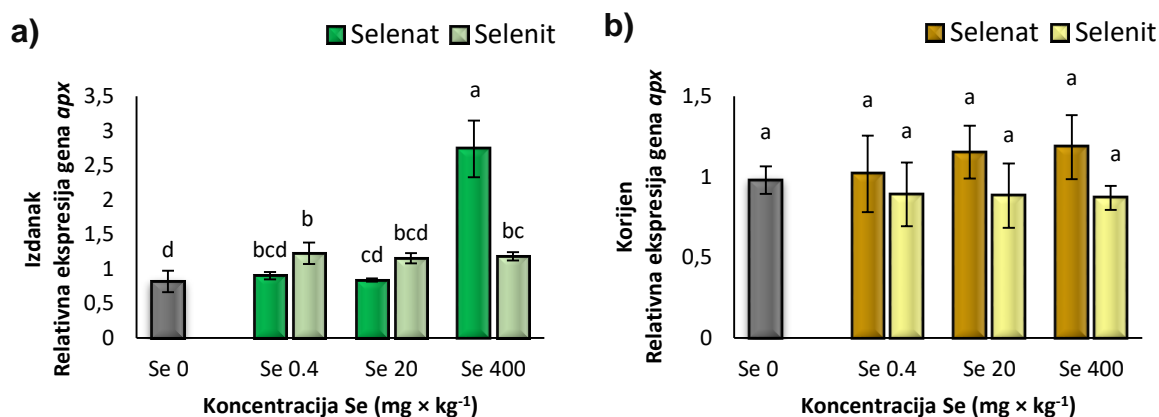
Slika 28. Relativna ekspresija gena *gpx* u izdanku (a) i korijenu (b) klijanaca pšenice nakon tretmana s različitim koncentracijama selenata i selenita (Se 0.4, Se 20 i Se 400 mg \times kg⁻¹). Kontrolni klijaneci su rasli bez dodatka Se (Se 0 mg \times kg⁻¹). Rezultati (n = 4) su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Duncan post hoc testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

3.21.5. Relativna ekspresija gena *apx* u izdanku i korijenu pšenice

Relativna ekspresija gena *apx* u izdanku klijanaca pšenice se mijenjala u prisutnosti Se (*Slika 31a*). Iako tretman s dvije manje koncentracije selenata nije značajno utjecao na ekspresiju gena *apx*, nakon izlaganja najvećoj koncentraciji selenata (400 mg kg⁻¹) ekspresija gena se povećala za 70.10% u odnosu na kontrolu. Ekspresija gena *apx* je bila povećana u odnosu na kontrolu i nakon tretmana s 0.4 i 400 mg kg⁻¹ selenita i to za 33.32%, odnosno za 30.68%. Uspoređujući utjecaj dva oblika Se međusobno na ekspresiju gena, jedina razlika se može uočiti pri tretmanu

najvećom koncentracijom, gdje je selenat uzrokovao za 56.78% veću ekspresiju gena *apx* u odnosu na selenit.

U korijenu, niti jedan oblik Se nije uzrokovao značajnije promjene u ekspresiji gena *apx* u odnosu na kontrolu (*Slika 31b*). Iako su se mogle primijetiti određene razlike u ekspresiji između dva primijenjena oblika Se međusobno, one nisu bili statistički značajne.



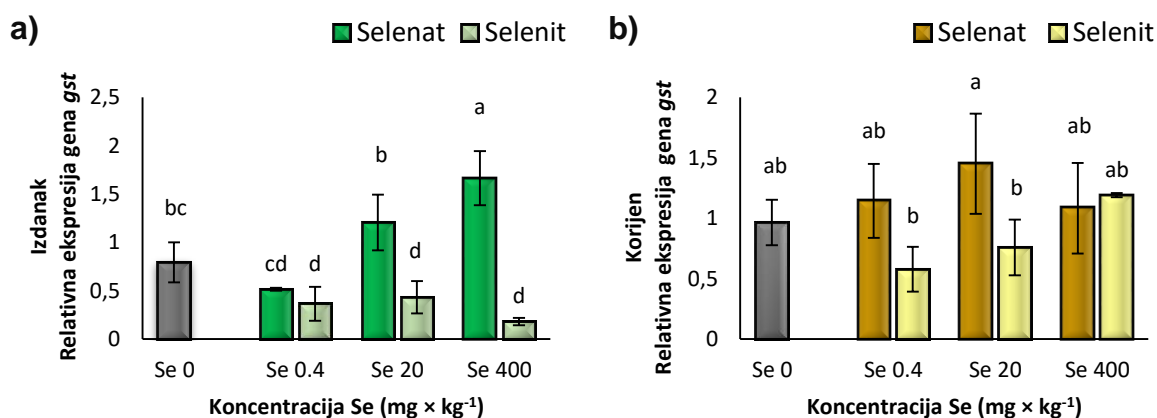
Slika 29. Relativna ekspresija gena *apx* u izdanku (a) i korijenu (b) klijanaca pšenice nakon tretmana s različitim koncentracijama selenata i selenita (Se 0.4, Se 20 i Se 400 mg × kg⁻¹). Kontrolni klijanci su rasli bez dodatka Se (Se 0 mg × kg⁻¹). Rezultati (n = 4) su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Duncan post hoc testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

3.21.6. Relativna ekspresija gena *gst* u izdanku i korijenu pšenice

Odgovor izdanka prikazan kroz relativnu ekspresiju gena *gst* na tretman Se je uvelike ovisio o njegovom kemijskom obliku (*Slika 32a*). Tretman s 400 mg × kg⁻¹ selenata je povećao ekspresiju gena *gst* u odnosu na kontrolu za 52.35% što je ujedno bila i najveća zabilježena vrijednost relativne ekspresije u izdanku pšenice. Suprotno selenatu, svi tretmani selenitom (0.4, 20 i 400 mg × kg⁻¹) su smanjili relativnu ekspresiju gena *gst* i to redom prema primijenjenim koncentracijama za 54.15%, 45.47% i 77.32%. Kao što je pri najvećoj primijenjenoj koncentraciji selenata zabilježena najveća vrijednost ekspresije, tako je pri istoj koncentraciji selenita zabilježena najmanja vrijednost ekspresije. Međusobna razlika u utjecaju dva oblika Se na

ekspresiju gena *gst* vidljiva je pri koncentracijama od 20 i 400 mg × kg⁻¹ gdje je ekspresija bila značajno veća u tretmanima selenatom u odnosu na selenit. Tako je pri tretmanu s 20 mg × kg⁻¹ selenata zabilježena 64.16%, a pri tretmanu s 400 mg × kg⁻¹ 89.19% veća relativna ekspresija gena *gst* u odnosu na tretman selenitom.

Za razliku od izdanka, u korijenu niti jedan oblik primijenjenog Se nije uzrokovao statistički značajnu promijenu ekspresije *gst-a* u odnosu na kontrolu (*Slika 32b*). Također, samo je pri tretmanu s 20 mg × kg⁻¹ zabilježena razlika u ekspresiji između tretmana selenatom i selenitom gdje je ekspresija uslijed izlaganja selenatu bila za 47.77% veća nego pri tretmanu selenitom.



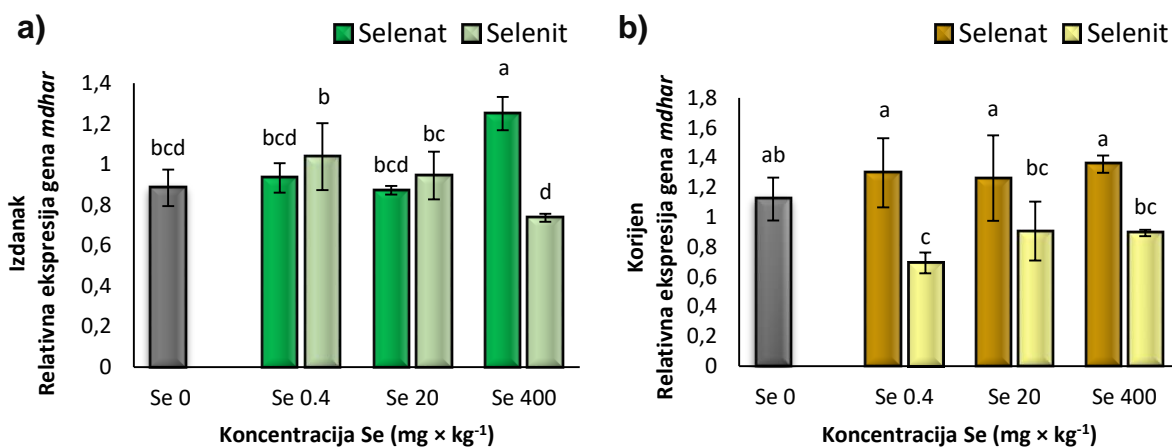
Slika 30. Relativna ekspresija gena *gst* u izdanku (a) i korijenu (b) klijanaca pšenice nakon tretmana s različitim koncentracijama selenata i selenita (Se 0.4, Se 20 i Se 400 mg × kg⁻¹). Kontrolni klijaneci su rasli bez dodatka Se (Se 0 mg × kg⁻¹). Rezultati (n = 4) su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Duncan post hoc testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

3.21.7. Relativna ekspresija gena *mdhar* u izdanku i korijenu pšenice

Značajan utjecaj selenata na relativnu ekspresiju gena *mdhar* u izdanku pšenice je bio zabilježen samo pri najvećoj primijenjenoj koncentraciji (*Slika 33a*). Naime, tretman s 400 mg × kg⁻¹ selenata je povećao ekspresiju gena *mdhar* za 29.32% u odnosu na kontrolu. S druge strane tretman selenitom nije uzrokovao značajniju promjenu ekspresije gena *mdhar* u odnosu na kontrolu u izdancima pšenice. Uspoređujući utjecaj dva oblika Se na ekspresiju međusobno, razlika je zabilježena pri

tretmanu s najvećom koncentracijom gdje je uslijed tretmana selenatom ekspresija gena *mdhar* bila za 41.10% veća u odnosu na tretman selenitom.

Za razliku od izdanka, selenat u korijenu nije uzrokovao značajnu promijenu relativne ekspresije gena *mdhar* u odnosu na kontrolu, dok je samo najmanja koncentracija selenita ($0.4 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$) smanjila ekspresiju gena *mdhar* za 46.58% u odnosu na kontrolu (Slika 33b). Uspoređujući međusobno utjecaj dva oblika Se, značajne razlike u ekspresiji su zabilježene pri sve tri koncentracije. Tako je pri tretmanu s $0.4 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ selenita ekspresija bila za 46.58% manja od istog tretmana selenatom, pri tretmanu s $20 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ za 28.23% te pri tretmanu s $400 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ za 34.04% manja.



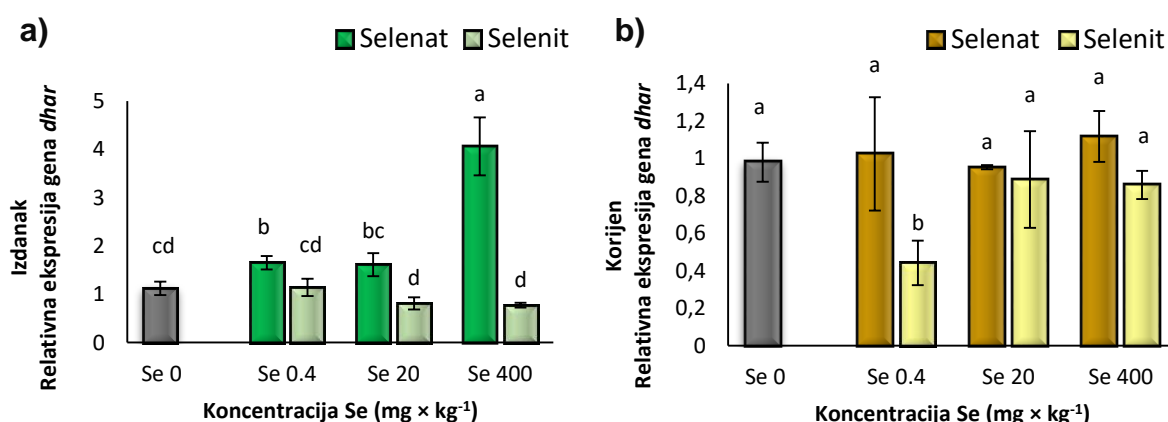
Slika 31. Relativna ekspresija gena *mdhar* u izdanku (a) i korijenu (b) klijanaca pšenice nakon tretmana s različitim koncentracijama selenata i selenita ($\text{Se } 0.4$, $\text{Se } 20$ i $\text{Se } 400 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$). Kontrolni klijanci su rasli bez dodatka Se ($\text{Se } 0 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$). Rezultati ($n = 4$) su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Duncan post hoc testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

3.21.8. Relativna ekspresija gena *dhar* u izdanku i korijenu pšenice

U izdancima klijanaca pšenice, ekspresija gena *dhar* se značajno mijenjala samo uslijed izlaganja selenatu, dok tretman selenitom nije značajno utjecao na razinu ekspresije (Slika 34a). Selenat primijenjen u koncentracijama 0.4 i $400 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ je povećao relativnu ekspresiju u odnosu na kontrolne izdanke za 32.11%, odnosno 72.39%. Iz rezultata je vidljivo kako je razina ekspresije ovisila o primijenjenom obliku Se te je utvrđeno da su svi tretmani svim koncentracijama selenata uzrokovali

značajno veću ekspresiju nego isti tretmani selenitom. Tako su uslijed izlaganja koncentracijama 0.4, 20 i 400 mg \times kg⁻¹ selenata zabilježene za 30.79%, 49.70%, odnosno 80.90% veće vrijdnosti ekspresije nego pri tretmanima selenitom.

Suprotno izdanku, u korijenu tretman selenatom nije značajno utjecao na ekspresiju gena *dhar* (Slika 34b). Također, samo je najmanja koncentracija selenita (0.4 mg \times kg⁻¹) smanjila ekspresiju gena *dhar* za 54.90% u odnosu na kontrolu. Pri toj koncentraciji je uočena i jedina razlika u učinku selenita i selenata na relativnu ekspresiju gena *dhar* pri čemu je ekspresija nakon izlaganja selenitu bila za 56.83% manja u odnosu na tretman selenatom.



Slika 32. . Relativna ekspresija gena *dhar* u izdanku (a) i korijenu (b) klijanaca pšenice nakon tretmana s različitim koncentracijama selenata i selenita (Se 0.4, Se 20 i Se 400 mg \times kg⁻¹). Kontrolni klijanci su rasli bez dodatka Se (Se 0 mg \times kg⁻¹). Rezultati (n = 4) su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Duncan post hoc testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

4. RASPRAVA

Usvajanje, distribucija i učinak Se u pšenici ovise o kemijskom obliku i primijenjenoj koncentraciji Se. U ovom istraživanju, povećanje primijenjenih koncentracija selenata i selenita uzrokovalo je uglavnom linearno povećanje koncentracije Se u izdancima i korijenu (*Tablica 5*) što je u korelaciji s brojnim drugim istraživanjima (Ríos i sur., 2008; Ramos i sur., 2010; Zhao i sur., 2018a; Lara i sur., 2019). No, iako je došlo do linearnog povećanja koncentracije Se pri svim tretmanima, pri tretmanu sa selenitom u izdancima su utvrđene od 2x do 10x manje koncentracije Se u usporedbi s koncentracijom Se nakon tretmana sa selenatom (*Tablica 5*). Takve razlike u akumulaciji Se prilikom izlaganja selenatu i selenitu nastaju uslijed različitih mehanizama usvajanja i različite brzine prijenosa u nadzemni dio, pa se tako selenat uglavnom akumulira u izdanku, a selenit u korijenu. Selenat se, nakon usvajanja sulfatnim prijenosnicima (Li i sur., 2008), ksilemom prenosi do kloroplasta gdje počinje njegova redukcija do selenita. Suprotno, selenit se usvaja pasivnom difuzijom (Arvy, 1989) ili putem fosfatnih (Zhang i sur., 2014) te silicijevih prijenosnika (Zhao i sur., 2010) nakon čega se asimilira do organskih oblika u korijenu neposredno nakon usvajanja što smanjuje njegovu translokaciju u izdanak (Li i sur., 2008). To dokazuje istraživanje Li i suradnika (2008) koji su u ksilemskom soku pšenice, nakon izlaganja pšenice selenitu, pronašli selenit, ali i organske oblike kao što je MeSeCys. Slične razlike u akumulaciji Se su Kaur i Sharma (2018a) utvrdili u listovima pšenice pri čemu su nakon izlaganja selenatu dobili do 60 puta veće koncentracije Se u izdanku u odnosu na selenit i zaključili da je selenat mobilniji oblik od selenita. Važno je naglasiti da je selenat uzrokovao veći porast koncentracije Se u izdanku klijanaca nego u korijenu, izuzev najveće primijenjene koncentracije. Pri tretmanu najvećom koncentracijom selenata vrlo je vjerojatno da je došlo do smanjene translokacije selenata iz korijena prema izdanku. Naime, u tretmanima manjim koncentracijama selenata u izdanak se translociralo do 71.62% Se od ukupnog usvojenog Se, dok se pri najvećoj koncentraciji selenata translociralo samo 34.50%. To bi mogla biti posljedica disfunkcije sulfatnih prijenosnika koji prenose selenat ksilemom iz korijena u nadzemni dio biljke. Tome u prilog ide istraživanje Boldrina i suradnika (2018) koji su utvrdili smanjenje ekspresije gena *Sultr1* u nekoliko sorti pšenice nakon tretmana 13 μ M selenatom.

Kako su brojni istraživači utvrdili različit stupanj translokacije Se između korijena i izbojka (Ximénez-Embún i sur., 2004; Lyons i sur., 2009; Longchamp i sur., 2015), ovisno o kemijskom obliku Se, može se zaključiti da razvojni stadij biljke utječe na

kapacitet akumulacije Se u korijenu te da se usvajanje i akumulacija povećavaju kako biljke sazrijevaju.

Kako je već prije navedeno, nakon usvajanja selenit većinom asimiliraju i akumuliraju u korijenu, dok se selenat prenosi do listova gdje započinje njegova redukcija do selenita reakcijom koju katalizira ATP-Sul. Geni za *ATP-Sul* i *cs* su dominantni u metabolizmu i akumulaciji Se, a njihova povećana ekspresija pridonosi većoj akumulaciji i toleranciji biljaka na Se. Brojna istraživanja su pokazala kako i selenat i selenit značajno utječu na ekspresiju *ATP-Sul* (Jiang i sur., 2018; Zhao i sur., 2018; Cao i sur., 2018; Feng i Ma, 2021). U ovom istraživanju tretmani s 20 mg × kg⁻¹ selenata i svi tretmani selenitom su povećali relativnu ekspresiju gena *ATP-Sul* u izdanku klijanaca, dok je ekspresija kod ostalih tretmana bila nepromijenjena (Slika 27a). O raznolikom utjecaju koncentracije Se na ekspresiju govori istraživanje Zhao i suradnika (2018) gdje je ispitan utjecaj četiriju različitih koncentracija selenita (0.5, 1, 2.5 i 5 mg × kg⁻¹) na ekspresiju asimilacijskih gena. Tako se ekspresija *ATP-Sul* u vrsti *Brassica tumida Tsenet Lee L.* postepeno smanjivala u tretmanima 0.5-1 mg × kg⁻¹, značajno se povećala i bila najveća pri 2.5 mg × kg⁻¹ nakon čega je opet uslijedio pad pri tretmanu s 5 mg × kg⁻¹ selenita. Osim o koncentraciji, ekspresija u izdanku je ovisila i o obliku Se jer su se značajnije promjene dogodile uslijed izlaganja selenitu. Zhao i suradnici (2017) su također zabilježili povećanje ekspresije *ATP-Sul* u listovima tri kultivara rajčice nakon izlaganja koncentracijama 5 i 10 mg × kg⁻¹ selenita. Ukoliko je dio anorganskog selenita dospio do izdanaka klijanaca, ne može se isključiti mogućnost njegove pretvorbe u selenat te daljnja asimilacija koju započinje ATP-Sul. Analizom transkriptoma hiperakumulatorne vrste *Cardamine hupingshanensis* utvrđen je značajan porast ekspresije sulfat-oksidaze nakon izlaganja selenitu te zaključeno da bi selenit mogao biti prvo pretvoren u selenat nakon čega bi uslijedila njegova asimilacija (Zhou i sur., 2018). Nadalje, suprotno izdanku, ekspresija u korijenu je bila smanjena uslijed izlaganja selenitu, kao i najvećoj koncentraciji selenata (Slika 27b). Različiti odgovori na razini transkripcije između izbojka i korijena je zabilježen kod čajevca nakon izlaganja selenitu (0.05 mM) prilikom čega je u korijenu bila značajnija ekspresija gena koji sudjeluju u asimilacijskom putu Se, a među kojima je i *ATP-Sul*. Uz oblik i koncentraciju Se, poznato je da ekspresija *ATP-Sul* ovisi još o biljnoj vrsti, tj. kultivaru, njezinoj starosti te vremenu izlaganja Se (Boldrin i sur., 2018; Feng i Ma, 2021). Ovakav odgovor korijena ne iznenađuje jer za brzu redukciju selenita koja se odvija u korijenu nije potrebna ATP-Sul, a redukcija selenata za koju je ATP-Sul

neophodna se, s druge strane, odvija u izdanku. Analizom transkriptoma korijena dva tjedna stare vrste *Avena sativa* L. izložene 20 μM selenatu, identificirano je 27 različitih gena povezanih s metabolizmom selenata, a među kojima su geni uključeni u sintezu SeCys (Liu i sur., 2021). Povećanje ekspresije *cs* je zabilježeno i nakon izlaganja selenitu (Chauhan i sur., 2017). Zahvaljujući povećanju ekspresije *cs* uslijed izlaganja selenatu, ali ne i selenitu, pretpostavlja se da se redukcija selenida do SeCys u izdancima odvija upravo posredovanjem CS.

Se može utjecati na brojne biljne morfo-fiziološke karakteristike, a sam odgovor ovisi prvenstveno ovisi o njegovoj koncentraciji. Iako je zabilježeno da manje koncentracije mogu pozitivno utjecati na klijanje i fiziološku kvalitetu sjemena (Khaliq i sur., 2015; Moulick i sur., 2016; Du i sur., 2019), također je zabilježeno da primjena manjih koncentracija nema značajan utjecaj na klijanje (Molnárová i Fargašová, 2009; Lapaz i sur., 2019) kao što je vidljivo i u našem istraživanju nakon izlaganja manjim koncentracijama selenata (0.4, 4, 20 i 40 $\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$) (Slika 5c). S druge strane, manje koncentracije selenita (0.4, 20 i 40 $\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$) su inhibirale klijanje pšenice što dovodi do zaključka da klijanje uvelike ovisi i o kemijskom obliku Se te da je selenit pri manjim koncentracijama toksičniji oblik od selenata. Najveće koncentracije selenata i selenita uzrokovale su najveću inhibiciju klijavosti pšenice u odnosu na kontrolu, s naglaskom da je najmanja klijavost bila zabilježena pri najvećoj koncentraciji selenita. Tako su dosadašnja istraživanja utvrdila da klijavost najčešće inhibiraju povećane koncentracije Se (El Mehdawi i sur., 2011; Du i sur., 2019; Lapaz i sur., 2019). Lapaz i suradnici (2019) su ispitivali utjecaj 11 različitih koncentracija Se u rasponu od 0.1 do 800 $\text{mg} \times \text{L}^{-1}$ na klijavost i druge morfološke karakteristike vrste *Vigna unguiculata* te utvrdili da je samo najveća koncentracija Se inhibirala klijavost, dok ostale koncentracije nisu imale utjecaja na klijavost. El Mehdawi i suradnici (2011) su zabilježili smanjenje klijavosti vrste *Arabidopsis thaliana* pri koncentracijama Se većim od 5 $\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$ suhe tvari, dok je pri 10 $\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$ (125 μM Na_2SeO_4) inhibicija bila na 50%. Inhibicijski učinak Se na sjeme pšenice može biti povezan s inhibicijom enzima koji hidroliziraju metabolite potrebne za razvoj biljnog embrija kao što je zaključeno u istraživanju Sreekala i Lalitha (1998). Naime, oni su utvrdili da 0.5 ppm Na_2SO_3 povećava aktivnosti enzima β -galaktozidaze i β -glukozidaze u vrsti *Trigonella foenum-graecum*, no koncentracije iznad 1 ppm drastično smanjuju njihove aktivnosti čime se smanjuje i klijavost.

Osim na klijavost pšenice, tretman različitim koncentracijama Se utječe na rast i prinos biomase klijanaca. Klijavost i biomasa su povezani jer manja klijavost može smanjiti ukupnu biomasu što pokazuju rezultati ovog istraživanja (*Slika 5c*). Iako brojna istraživanja govore o pozitivnom učinku manjih koncentracija na rast i biomasu pšenice (Chu i sur., 2010; Guerrero i sur., 2014; Idrees i sur., 2018), u okviru ovog istraživanja nije utvrđen značajan utjecaj manjih koncentracija Se na izdanak i korijen klijanaca. Suprotno, veće koncentracije oba oblika Se su značajno smanjila biomasu klijanaca pri čemu je najveći pad biomase je bio zabilježen pri tretmanima s $400 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ Se (*Slika 5a,b*). Da veće koncentracije Se uzrokuju smanjenje biomase, zabilježeno je kod brojnih biljnih vrsta među kojima su *Lactuca sativa* L. (Ramos i sur., 2010; Hawrylak-Nowak, 2013), *Sinapis alba* L. (Fargašová, 2004), *Oryza sativa* (Cabral Gouveia i sur., 2020), *T. aestivum* L. (Zhang i sur., 2017; Wang i sur., 2021), *Zea mays* L. (Sali i sur., 2018) i *B. napus* L. (Ulhassan i sur., 2019b). Cartes i suradnici (2005) su istraživali utjecaj selenata i selenita (0.1, 0.25, 0.50, 0.75, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8 i 10 mg kg^{-1}) na suhu biomasu izbojaka vrste *Lolium perenne* starih 55 dana te utvrdili da samo selenat uzrokuje smanjenje biomase kada koncentracija Se u izbojcima prelazi $150 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$. Lapaz i suradnici (2019) su utvrdili smanjenje svježe biomase izdanka i korijena kod vrste *V. unguiculata* nakon izlaganja koncentracijama selenata od $40 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$, ali i većim, što je u korelaciji s rezultatima ovog istraživanja. U okviru ovog istraživanja je važno naglasiti da je selenit pri manjim koncentracijama u odnosu na selenat uzrokovao smanjenje biomase izdanka i korijena klijanaca pšenice što pokazuje i niži prag toksičnosti za selenit (*Slika 5a,b*). Kako se prag toksičnosti može definirati kao najmanja koncentracija Se koja uzrokuje značajno smanjenje biomase svježe tvari izdanka ili korijena u odnosu na kontrolne biljke, u izdanku i korijenu klijanaca prag toksičnosti za selenat je bio $40 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$, dok je za selenit u izdanku $20 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$, a u korijenu $4 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$. Ovi rezultati ukazuju na toksičniji učinak selenita na biomasu u odnosu na selenat pri čemu je taj učinak izraženiji na biomasi korijena. Rezultati ovog istraživanja se mogu usporediti s istraživanjem Hawrylak-Nowaka i suradnika (2015) koji su utvrdili smanjenje biomase izbojaka i korijena vrste *Cucumis sativus* L. pri $80 \mu\text{M}$ selenata te pri $20 \mu\text{M}$ selenita, ali i s rezultatima drugih istraživanja kojima je utvrđeno da je selenit toksičniji oblik od selenata (Ríos i sur., 2009; Hawrylak-Nowak, 2013). Veća toksičnost selenita u odnosu na selenat može biti povezana s interakcijom anorganskih oblika Se s usvajanjem i metabolizmom S. Istraživanjem Hurd-Karrere (1937) je utvrđeno smanjenje toksičnosti u pšenici uzrokovane selenatom pri

tretmanima koji su u hranjivom mediju sadržavali sulfate, a manja toksičnost selenata uz prisutnost S je utvrđena i u istraživanjima koja su uslijedila poslije (White i sur., 2004; Tian i sur., 2017). Boldrin i suradnici (2016) su svojim istraživanjem zaključili kako selenat, ali ne i selenit, potiče akumulaciju S u pšenici te smatraju kako tretman selenatom oponaša nedostatak S koji aktivira ekspresiju sulfatnih prijenosnika odgovornih za usvajanje i prijenos S. Iako se selenat natječe za usvajanje i prijenos sa sulfatima, u manjim koncentracijama stimuliraju međusobno usvajanje putem korijena (Lyi i sur., 2005; Boldrin i sur., 2016). Tian i suradnici (2017) su u izbojcima i korijenu vrste *B. oleracea* L. var. *Italica* zabilježili veće koncentracije S kada je bio primijenjen sa selenatom nego kad je bio primijenjen sam ili sa selenitom. Neovisno što su u oba tkiva utvrdili da je povećanje koncentracije Se u tretmanu bez S veće od onog gdje je S bio prisutan, izbojak i korijen su svejedno akumulirali visoke koncentracije Se kada je bio primijenjen u obliku selenata. Tian i suradnici (2017) su naglasili kako je veća toksičnost Se povezana s niskim razinama S prilikom čega raste udio Se u proteinima u odnosu na S. Iz prethodno spomenutih nekoliko istraživanja je vidljivo kako se manje S usvaja u tretmanima selenitom što može uzrokovati i objasniti njegovu veću toksičnost od selenata u klijancima pšenice. Osim navedenog mehanizma, toksičnost uzrokovana Se može se povezati sa smanjenim sadržajem fotosintetskih pigmenata te povećanim oksidacijskim oštećenjima poput povećane LPO (Cabral Gouveia i sur., 2020).

Sadržaj fotosintetskih pigmenata znatno utječe na rast i razvoj biljaka, a može se mijenjati ovisno o prisutnosti Se što je utvrđeno prethodnim istraživanjima (Chu i sur., 2013; Zhang i sur., 2014; Alyemeni i sur., 2018; Sali i sur., 2018; Silva i sur., 2020). Fotosintetski pigmenti, klorofil i karotenoidi, kao dio tilakoidnih membrana kloroplasta nalaze se u kompleksu sa specifičnim polipeptidima te imaju važnu ulogu u fotosintezi. Klorofil, kao esencijalni pigment za odvijanje fotosinteze, ima ulogu apsorpiranja i prijenosa Sunčeve energije (Anderson, 1982). Karotenoidi su pigmenti fotosintetski aktivnih, ali i fotosintetski neaktivnih tkiva (Karuppanapandian i sur., 2011). Uz ulogu pomoćnih pigmenata u apsorpciji svjetlosti, važna je i ona antioksidacijska (Gill i Tuteja, 2010). Osim što štite klorofil od fotooksidacije koja bi uzrokovala oštećenja fotosintetskog aparata, karotenoidi ujedno i stabiliziraju tilakoidne membrane kloroplasta (Gill i Tuteja, 2010). Iako je u brojnim istraživanjima istaknut pozitivan utjecaj manjih koncentracija Se na koncentraciju klorofila i

karotenoida (Handa i sur., 2019; Azizi i sur., 2020), u okviru ovog istraživanja manje koncentracije oba oblika Se nisu značajno mijenjale njihov sadržaj u klijancima pšenice (Slika 6). Da Se ne utječe na sadržaj klorofila, utvrđeno je i u istraživanju Haghghia i suradnika (2016) koji su ispitivali utjecaj 2, 4 i 6 mg × L⁻¹ selenita na rast i fotosintezu vrste *Cucumis sativus* L. Štoviše, u ovom istraživanju je došlo do značajnog smanjenja koncentracije klorofila i to kod tretmana sa selenatom samo pri najvećoj koncentraciji, dok je kod tretmana sa selenitom došlo do smanjenja već pri koncentraciji 20 mg × kg⁻¹. Dobiveni rezultati zajedno sa smanjenjem biomase i klijavosti već i pri manjim koncentracijama selenita potvrđuju njegovu veću toksičnost u odnosu na selenat. Prisutnost visokih koncentracija Se može narušiti usvajanje i sadržaj mikro te makronutrijenata što se može odraziti i na procese fotosinteze (Hawrylak-Nowak i sur., 2015; Ulhassan i sur., 2019a). To se posebno odnosi na Fe i Mg koji su sastavni dio ili sudjeluju u sintezi klorofila i Fe-S proteina (Kroh i Pilon, 2020). Tako su Naseem i suradnici (2021) utvrdili da veće koncentracije Na₂SeO₄ uzrokuju smanjenje koncentracije Fe u izbojcima i korijenju kukuruza, s naglaskom da je smanjenje koncentracije u izbojcima zabilježeno već pri tretmanu s 10 mg × kg⁻¹, a u korijenu pri 20 mg × kg⁻¹ selenata. Fisher i suradnici (2016) su u uvjetima *in vitro* dokazali da neenzimska redukcija selenita oštećuje Fe-S klaster ferodoksina, plastidnog proteina koji je esencijalan za fotosintetske reakcije ovisne o svjetlosti. No, to ne isključuje mogućnost oštećenja Fe-S klastera koji su sastavni dio brojnih drugih proteina, kao i onih koji sudjeluju u sintezi klorofila (Nagane i sur., 2010). Selen može interferirati s enzimima koji sadrže sulfhidrilnu skupinu u aktivnom mjestu kao što je porfobilinogen-sintaza koja je uključena u sintezu klorofila (Padmaja i sur., 1989). Padmaja i suradnici (1989) su utvrdili da je Se u vrsti *Phaseolus vulgaris* L. inhibirao porfobilinogen-sintazu te tako uzrokovao smanjenje sadržaja istog. Naime, ugradnja većih i reaktivnijih selenoaminokiselina u enzime narušava njegovu strukturu, a time i kinetička svojstva (Hondal i sur., 2013).

Činjenica da se u klijancima smanjila koncentracija klorofila, čime se smanjuje apsorpcija svjetlosne energije koja će se prevesti u kemijsku, može rezultirati smanjenom proizvodnjom šećera, tj. glukoze i njezinog skladišnog oblika škroba. Unatoč tome što služi kao opći izvor metaboličke energije i skladištenja energije, glukoza predstavlja početnu metaboličku točku sinteze karboksilata i aminokiselina (Dougall, 1965) te čini osnovnu gradivnu jedinicu za sintezu celuloze, glavne komponente stanične stijenke (Geiger, 2020). Bez obzira na značaj ostalih šećera,

pojedina istraživanja su utvrdila kako upravo celuloza uvelike doprinosi povećanju biomase biljaka, a što je povezano s povećanim sadržajem glukoze (Mazarei i sur., 2018; Maleki i sur., 2020). Maleki i suradnici (2020) su to povezali s povećanim sadržajem klorofila koji je povećao fotosintetsku učinkovitost, a što je rezultiralo povećanom biomasom. Łabanowska i suradnici (2012) su dokazali kako povećane koncentracije Se smanjuju učinkovitost fotosustava I i II te tako inhibiraju fotosintezu kod pšenice što rezultira smanjenom proizvodnjom škroba, a onda i smanjenjem biomase (Wang i sur., 2012). Da veće koncentracije Se smanjuju količinu ukupnih topljivih šećera što utječe i na smanjenje biomase, utvrdili su i Ulhassan i suradnici (2019b) kod nekoliko kultivara vrste *B. napus* L. pri tretmanu sa 100 μ M selenita.

Uz brojne učinke koje Se ima na biljku, bilo na morfo-fiziološkoj, biokemijskoj i ili molekularnoj razini, važno je naglasiti da je većina promjena posredovana redoks promjenama, nastankom ROS-a te aktiviranjem antioksidacijskih i drugih detoksikacijskih mehanizama. Intenzitet promjena povezanih s redoks potencijalom stanica ovisi najviše o koncentraciji Se jer u manjim koncentracijama djeluje kao antioksidans, dok u većim djeluje kao prooksidans (Hartikainen i sur., 2000). Kako bi se procijenio učinak različitih koncentracija i oblika Se na oksidacijski status klijanaca pšenice, ispitivane su količina H_2O_2 i razina LPO. Vodikov peroksid pripada ROS-u koji se normalno proizvodi tijekom staničnih metaboličkih procesa te u manjim koncentracijama može djelovati kao signalna molekula (Sies, 2017). Prekomjerno nakupljanje H_2O_2 ili drugih ROS-a dovodi do oksidacijskog stresa, tj. oksidacijskih oštećenja proteina, nukleinskih kiselina ili lipida (Panda i sur., 2003). Rezultati ovog istraživanja su pokazali da Se nema utjecaja na stanični sadržaj H_2O_2 u izdancima, dok su na sadržaj H_2O_2 u korijenu utjecale samo dvije najveće koncentracije selenata (Slika 8). Već je spomenuto kako je pri tretmanima većim koncentracijama selenata došlo do njegove smanjene translokacije iz korijena u izdanak. Akumulacija anorganskog oblika, selenata, koji se najvećim dijelom asimilira u listu, mogla je biti razlog povećane količine H_2O_2 . Rezultati količine TBARS-a jasno ukazuju na to da povećanje H_2O_2 nije uzrokovalo negativne posljedice u korijenu klijanaca što ide u prilog njegovoj ulozi u staničnoj signalizaciji. Razina LPO, izražena kroz količinu TBARS-a, jedan je od važnijih biomarkera oksidacijskog stresa koji ukazuje na stupanj oksidacijskih oštećenja u stanicama. Nastaje uslijed prekomjernog nakupljanja ROS-a koje napadaju polinezasićene masne kiseline biomembrana što rezultira nastankom reaktivnih međuprodukata te degradacijom membrana. Poznato je da manje

koncentracije Se mogu smanjiti LPO, dok veće djeluju negativno te uzrokovati porast peroksidacije (Hartikainen i sur., 2000; Ramos i sur., 2010). Osim toga, Se može zaštititi različite biljne vrste od oksidacijskog oštećenja nastalog uslijed abiotičkog stresa što se vidi kroz smanjenje LPO praćenog pojačanom regulacijom detoksikacijskih obrambenih sustava (Xue i Hartikainen, 2010; Wang i sur., 2011; Elkelish i sur., 2019). U izdanku klijanaca su oba primijenjena oblika Se smanjila LPO u svim tretmanima, a isto je zabilježeno i u korijenu nakon izlaganja selenitu te dvjema najvećim koncentracijama selenata (*Slika 7*). Pretpostavlja se da ioni Se štite membrane i igraju ključnu ulogu u smanjenju razine LPO. Filek i suradnici (2009) su istraživali svojstva membrana plastida kod pšenice te zaključili da ioni Se mogu potaknuti promjene u sastavu masnih kiselina povećavajući njihovu nezasićenost. Te promjene su povezali sa smanjenom razinom LPO i zaključili da ioni Se mogu zaštititi stanične membrane od oksidacijskih oštećenja. Tome u prilog idu istraživanja koja uključuju istraživanje lipidnog monosloja, a koja potvrđuju da se ioni Se mogu vezati na specifične membranske domene i tako utjecati na njezina svojstva (Gzyl-Malcher i sur., 2009, 2011; 2017). Osim toga, održavanju niskih razina LPO pridonosi aktivni antioksidacijski obrambeni sustav.

Za obranu od stresa, biljke su razvile antioksidacijske i druge detoksikacijske mehanizme. Antioksidacijski obrambeni sustav, koji štiti biljke od prekomjernog nakupljanja ROS-a i oksidacijskih oštećenja, može biti enzimski i neenzimski. Jedan od prvih u nizu ROS koji nastaje u stanicama je $O_2^{\cdot -}$ koji vrlo brzo dismutira u O_2 i H_2O_2 . Nakon toga, H_2O_2 može direktno ili indirektno biti preveden u O_2 i H_2O aktivnošću nekoliko enzima kao što su CAT, GPOD, GPX i APX (*Slika 35*) te tako spriječiti njegovo nagomilavanje i negativne posljedice. Povećane aktivnosti ovih enzima u izdanku i korijenu klijanaca su održavale količinu H_2O_2 nepromijenjenom u većini tretmana. CAT je enzim koji ima niski afinitet za H_2O_2 za razliku od peroksidaza i aktivna je pri vrlo visokim količinama H_2O_2 (Gechev i sur., 2006), dok manje količine H_2O_2 uklanjaju enzimi poput GPOD (El-Hadary, 2021), GPX (Makino i sur., 1994) i APX (Anjum i sur., 2014). Nepromijenjena aktivnost CAT u izdancima klijanaca pšenice uslijed izlaganja četirima najmanjim koncentracijama selenata te manjim koncentracijama selenita može biti povezana s manjom nastalom količinom H_2O_2 koju prioritarno uklanjaju drugi enzimi. Kao u ovom istraživanju, tako su Lara i suradnici (2019) također uočili nepromijenjenu količinu H_2O_2 i aktivnosti CAT u pšenici nakon tretmana s 0, 12, 21, 38, 68 i 120 g x ha⁻¹ Na₂SeO₄. S druge strane, povećana aktivnost

CAT u izdanku nakon izlaganja većim koncentracijama Se predstavlja važan mehanizam detoksikacije H_2O_2 . Tome u prilog ide istraživanje Kaura i Sharme (2018) kojim je utvrđena prisutnost nekoliko novih CAT izoenzima u listu pšenice nakon izlaganja većim dozama selenata i selenita. Silva i suradnici (2020) su svojim istraživanjem utvrdili da i selenat i selenit uzrokuju porast aktivnosti CAT u listu vrste *Vigna unguiculata* (L.) Walp., ali ne u svim tretmanima jednako. Dok je selenat uzrokovao povećanje aktivnosti CAT samo pri većim primijenjenim koncentracijama (20, 40 i 60 g \times ha⁻¹), selenit je povećao aktivnost CAT u svim tretmanima (2.5, 5, 10, 20, 40 i 60 g \times ha⁻¹) (Silva i sur., 2020). i u okviru ovog istraživanja selenit je i u izdanku klijanaca pšenice u većem broju tretmana uzrokovao porast CAT aktivnosti, dok je porast uslijed izlaganja selenatu zabilježen samo pri najvećoj koncentraciji (*Slika 9a*). Osim toga, rezultati ovog istraživanja su pokazali da je aktivnost CAT i tkivno-specifična. Naime, za razliku od zabilježene aktivnosti CAT u izdancima pšenice gdje je bila povećana ili nepromijenjena, prisutnost Se je inhibirala njezinu aktivnost u korijenu (*Slika 9b*). Chioti i Zervoudakis (2017) su izvijestili o razlikama u osjetljivosti CAT između korijena i izbojaka različitih biljnih vrsta. S obzirom na osjetljivost na inhibitor kojeg su koristili, zaključili su da je u izbojku ispitivanih vrsta CAT monofunkcionalan, a u korijenu bifunkcionalni enzim. Monofunkcionalna CAT ima uobičajeno katalazno djelovanje kojim u dva koraka pretvori H_2O_2 u H_2O i O_2 , dok bifunkcionalna, uz uobičajeno katalazno, pokazuje i peroksidazno djelovanje uz prisutnog donora elektrona (Nicholls i sur., 2001). O različitom odgovoru CAT između izbojaka i korijena govori istraživanje Gayatri i suradnici (2013). Oni su, nakon tretmana sa salicilnom kiselinom i vrstom *Fusarium* sp., u izbojcima i korijenju različitih genotipova vrste *Cicer arietinum* L. uočili različit broj izoformi CAT. Osim toga, utvrdili su veliku razliku između izbojaka i korijenja u osjetljivosti na salicilnu kiselinu, kao i to da su aktivnosti nekih izoformi bile u potpunosti inhibirane pojedinim tretmanom. Razliku u osjetljivosti CAT iz različitih tkiva su povezali s tkivno specifičnom ekspresijom izoformi. Postojanje različitih izoformi CAT koje se razlikuju u osjetljivosti na različite tvari te čija je ekspresija regulirana različitim mehanizmima (Zhang i sur., 2022) mogla bi objasniti činjenicu da je prisutnost Se imala različite učinke na aktivnost CAT u izdanku i korijenu klijanaca pšenice te da je CAT u korijenu puno osjetljivija na prisutnost Se u odnosu na CAT u izdancima. S obzirom na to da se oksidacija proteina uslijed akumulacije ROS-a događa izravnom oksidacijom aminokiselina kao što su Met, Cys, Tyr i Trp, ne može se isključiti da je akumulacija ROS-a uslijed izlaganja Se uzrokovala smanjenje

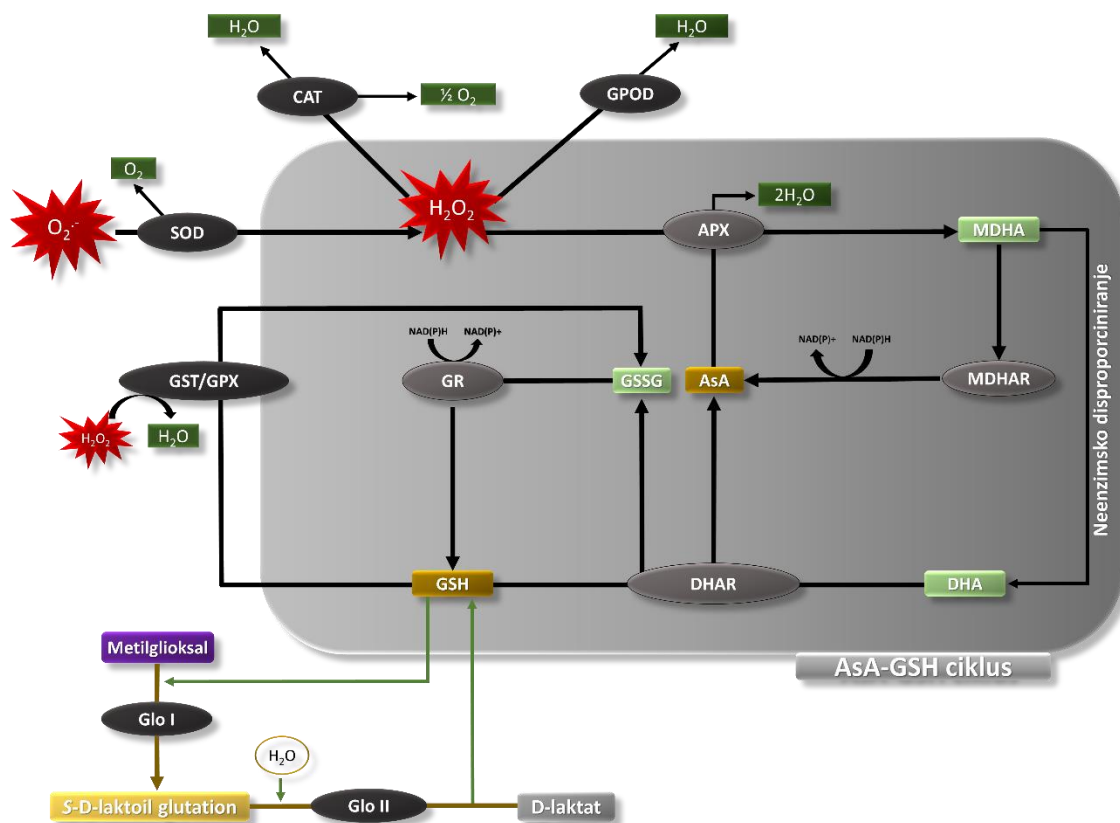
aktivnosti CAT u korijenu klijanaca. Naime, uz His-65 i Asn-138, Tyr-348 je jedan od konzerviranih aminokiselinskih ostataka katalitičkog mjesta CAT-e u pšenici (Tyagi i sur., 2021).

Uz CAT, važnu ulogu u uklanjanju H_2O_2 ima enzim GPOD koja se aktivira pri znatno manjim količinama H_2O_2 u odnosu na CAT (Gadjev i sur., 2008). Velikim brojem dosadašnjih istraživanja je utvrđeno kako CAT i GPOD slično odgovaraju na prisutnost Se te je porast aktivnosti jednog enzima često praćena porastom aktivnosti drugog, neovisno o obliku primijenjenog Se (Yao i sur., 2009; Khaliq i sur., 2015; Huang i sur., 2018; Handa i sur., 2019; Khalofah i sur., 2021). No, kod klijanaca pšenice su zabilježeni drugačiji rezultati. Dok je selenat uzrokovao porast aktivnosti GPOD u izdanku te dijelom i u korijenu, selenit u najvećem broju tretmana nije utjecao na aktivnost GPOD (*Slika 10*). Različiti putevi usvajanja, prijenosa i asimilacije selenata i selenita u biljkama mogu biti uzrok proizvodnje ROS-a u različitim staničnim odjeljcima te ovisno o mjestu nakupljanja ROS-a, aktiviraju se različiti mehanizmi detoksikacije. GPOD je u pšenici pronađen u citosolu, staničnoj stijenci i vakuoli (Dey i sur., 2007). S obzirom na lokalizaciju GPOD-a u stanicama, moguće je da prilikom aktivnog prijenosa selenata došlo do stvaranja H_2O_2 u staničnom zidu, ali i u vakuoli gdje se selenat može skladištiti. (Mazej i sur., 2008). Pri istim tretmanima selenata, aktivnosti CAT su bile nepromijenjene ili značajno smanjene, a suprotan odgovor aktivnosti CAT i GPOD je zabilježen i u istraživanju Saidia i suradnika (2014). Naime, dok su u listovima vrste *Helianthus annuus*, izložene Cd, utvrdili da predtretmani s 5 i 10 μM selenata smanjuju aktivnost GPOD, u istima su uočili povećanje aktivnosti CAT. Nadalje, Józwiak i Politycka (2019) su, uz porast aktivnosti GPOD u korijenu vrste *Cucumis sativus* L. nakon tretmana s 5 i 10 μM selenita, utvrdili i smanjenje aktivnosti CAT. Kako se količina H_2O_2 u korijenu krastavaca nije mijenjala, zaključili su GPOD odgovoran za održavanje niskih količina H_2O_2 . Prema tome, aktivnost GPOD bi bila jedna od ključnih mehanizama detoksikacije H_2O_2 u izdancima te pri manjim koncentracijama i u korijenu klijanaca pšenice nakon izlaganja selenatu.

Sljedeći enzim koji je važan dio sustava za detoksikaciju H_2O_2 u biljkama je APX koji je dio AsA-GSH ciklusa (*Slika 35*). Upravo je uklanjanje H_2O_2 jedna od glavnih uloga ciklusa, a APX zajedno s GR čine ključne enzime istoga (Pang i Wang, 2010). APX je enzim koji kao elektron donor koristi AsA prilikom čega nastaje njegov oksidirani oblik, kratkotrajni MDHA. Nastali MDHA može biti direktno reduciran u AsA pomoću enzima MDHAR ili može spontano disproporcionirati u DHA. Regeneraciju

AsA iz MDHA i DHA katalizira MDHAR ovisna o NAD(P)H, odnosno GSH-ovisna DHAR. Dosadašnja istraživanja su pokazala kako se aktivnost APX ili povećava ili ostaje nepromijenjena uslijed izlaganja Se, ovisno o biljnoj vrsti, njezinom genotipu, koncentraciji te obliku primijenjenog Se (Łabanowska i sur., 2012; Mostofa i sur., 2017; Lara i sur., 2019; Cabral Gouveia i sur., 2020). Slični rezultati su zabilježeni i ovim istraživanjem. Dok se u izdancima pšenice aktivnost APX uglavnom nije mijenjala, osim pri najvećoj koncentraciji selenita, aktivnost u korijenu se povećala već pri tretmanu s 20 mg × kg⁻¹ selenita i samo pri najvećoj koncentraciji selenata (*Slika 11*). Povećana aktivnost u korijenu predstavlja važan mehanizam detoksikacije H₂O₂ u korijenu klijanaca, ali ne i u izdanku. Se je utjecao i na razinu transkripata *apx* gena u izdanku klijanaca, što je posebno izraženo pri tretmanu s najvećim koncentracijama oba oblika Se. U tretmanu selenitom, porast transkripcije je praćen i porastom aktivnosti APX, dok u tretmanu selenatom nije jer su posrijedi vjerojatno bile promjene posttranslacijskih modifikacija (Kaur i sur., 2021). Kaur i suradnici (2021) su utvrdili kako S-nitrozilacija i S-sulfhidrilacija imaju pozitivan utjecaj, a tirozin-nitracija negativan utjecaj na aktivnost APX iz vrste *A.thaliana*. Cilj je S-nitrozilacije i S-sulfhidrilacije modifikacija Cys-32 prilikom čega se povećava afinitet za vezanje AsA, a time i aktivnost APX. Moguće je da se u izdancima klijanaca pšenice selenat asimilirao do SeCys koji je zamijenio Cys prilikom sinteze APX-a što je dovelo do konformacijskih promjena koje su spriječile vezanje AsA. Aktivnost APX utječe na koncentraciju AsA-e u stanicama, neenzimskog antioksidansa koji se obnavlja putem AsA-GSH ciklusa. Povećanje koncentracije AsA-e u izdancima nakon izlaganja manjim koncentracijama oba oblika Se nije bilo korelaciji s povećanjem aktivnosti APX-a stoga se može pretpostaviti da detoksikacija H₂O₂ u izdancima pšenice nije išla tim putem. Iznimku je činio tretman najvećom koncentracijom selenita koji je povećao aktivnost APX što je zahtijevalo povećanu koncentraciju AsA-e koja se postigla njezinom aktivnom regeneracijom putem MDHAR-a i DHAR-a čije su aktivnosti bile povećane pri najvećoj koncentraciji selenita u izdancima. Obnavljanje AsA-e u izdanku je zabilježeno i uslijed izlaganja najvećoj koncentraciji selenata, a povećane aktivnosti MDHAR-a i DHAR-a su bile praćene povećanom genskom ekspresijom. Chen i suradnici (2003) su utvrdili da se povećanje koncentracije AsA-e u biljkama može postići njegovom regeneracijom putem povećane aktivnosti DHAR-a koja je ujedno praćena i povećanom ekspresijom gena *dhar*. No, povećanje koncentracije AsA-e u izdancima pri manjim koncentracijama oba oblika Se (20 i 40 mg × kg⁻¹) (*Slika 18a*) nije bilo praćeno

povećanjem aktivnosti MHDAR-a i DHAR-a (*Slike 16a, 17a*), što ukazuje na to da proces regeneracije AsA nije bio vjerojatan pri navedenim uvjetima. Wang i suradnici (2011) su u vrsti *Trifolium repens* L. izložene suši utvrdili da je porast AsA-e, osim povećane aktivnosti DHAR-a, rezultat i sinteze *de novo*. S obzirom na to da je koncentracija AsA-e u stanicama regulirana sintezom i regeneracijom (Hancock i Viola, 2005), povećanje koncentracije AsA-e u izdancima klijanaca bi moglo biti posljedica pojačane sinteze. Kako redoks stanje AsA-e u korijenu uvelike ovisi o njegovom prijenosu floemom od izbojka do korijena (Herschbach i sur., 2010), jedan od mogućih razloga povećane sinteze AsA u izdancima pšenice može biti i povećana potreba za održavanjem njezine razine u korijenu. U okviru ovog istraživanja se odgovor AsA-GSH ciklusa u korijenu nakon izlaganja Se dosta se razlikovao od odgovora izdanka. Naime, u korijenu klijanaca pšenice regeneraciju AsA-e je obavljao DHAR jer je aktivnost MDHAR-a bila značajno smanjena (*Slika 16b*). Tako su Yin i suradnici (2010) istraživali ulogu MDHAR-a i DHAR-a u regeneraciji AsA-e tijekom Al stresa u transgenoj vrsti *Nicotiana tabacum* s genom citosolnih MDHAR-a i DHAR-a iz uročnjaka te utvrdili da povećana aktivnost DHAR-a, ali ne i MDHAR-a, održava visoke razine AsA-e važne za toleranciju na Al. Da bi DHAR mogao imati važnu ulogu u održavanju ravnoteže redoks stanja AsA-e kada je niska aktivnost MDHAR, utvrdili su i Li i suradnici (2010) u listovima jabuke. Smanjenje aktivnosti MDHAR-a se vrlo vjerojatno javilo zbog ograničene količine dostupnog NADPH jer se isti koristio u reakcijama koje katalizira GR za obnavljanje GSH. Osim toga, NADPH se troši i u neenzimskoj redukciji Se^{2-} do SeCys, točnije prilikom redukcije selenodiglutationa do selenopersulfida (Ng i Anderson, 1979; Chauhan i sur., 2019). Iako porast aktivnosti DHAR-a može biti praćen smanjenjem koncentracije DHA (Wang i sur., 2011), u korijenu klijanaca pšenice koncentracija DHA je u većini tretmana nepromijenjena (*Slika 19b*). Razlog tomu je što se regenerirana AsA putem povećane aktivnosti DHAR, neprestano troši u reakcijama detoksikacije H_2O_2 katalizirane APX-om čime se opet stvara DHA. Upravo je to razlog zašto su koncentracije DHA, ali i AsA nepromijenjene ili smanjene.



Slika 35. Askorbat-glutationski ciklus (Asa-GSH ciklus) i njegova poveznica s glioksalaznim detoksikacijskim sustavom. Preuzeto i modificirano prema (Hasanuzzaman i sur., 2019)

GSH je, uz AsA, drugi neenzimski antioksidans koji je ključni dio Asa-GSH ciklusa, ali i drugih detoksikacijskih sustava (Slika 35). Osim što sudjeluje u direktnom ili indirektnom uklanjanju ROS-a u biljnim stanicama, održava u reduciranom stanju druge antioksidanse, kao što su AsA i α -tokoferol. Glo1, GPX i GST (Slika 35) su enzimi koji u svojim reakcijama detoksikacije koriste GSH. Svaka od ovih reakcija, osim onih koje kataliziraju GST i Glo1, rezultira stvaranjem GSSG-a. S obzirom na kritičnu važnost reduciranog oblika GSH u održavanju redoks potencijala u različitim reakcijama i staničnim procesima, važno je održavati njegovu razinu u stanicama redukcijom GSSG u GSH pomoću enzima GR u prisutnosti NADPH kao reducirajućeg agensa (Deponete, 2013). GSH ima značajnu ulogu u otpornosti biljaka na tretman selenatom što su utvrdili Grant i suradnici (2011) su u svom istraživanju na *Arabidopsisu*. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da je Se skoro pri svim tretmanima povećao količinu GSH u izdanku klijanaca, a jedini porast u korijenu je zabilježen nakon izlaganja najvećoj koncentraciji selenita (Slika 20). Povećanje

količine GSH u izdancima u skladu je s mnogim drugim istraživanjima koja obuhvaćaju različite biljne vrste i tkiva (Wang i sur., 2011; Mostofa i sur., 2017; Zhu i sur., 2017; Ulhassan i sur., 2019; Silva i sur., 2020). S obzirom na izostanak povećanja aktivnosti GR-a u izdancima nakon izlaganja selenatu, može se pretpostaviti da je u izdancima potaknuta sinteza GSH, a ne regeneracija iz GSSG-a što potvrđuje i pojačana ekspresija gena za *cs* (*Slika 28a*) koja igra važnu ulogu u njegovoj sintezi. Da se može utjecati na sintezu GSH, utvrdili su Cao i suradnici (2018) analizirajući transkriptom čajevca nakon izlaganja Se te uočili povećanu razinu transkripata glutation-sintetaze. Povećanje potrebe za GSH u izdancima klijanaca mogu nastati zbog trošenja GSH za procese redukcije selenata (Hugouvieux i sur., 2009), regeneraciju AsA-e (Nakano i Asada, 1981), ali i da se zadovolje povećane potrebe za GSH u korijenu. Prema literaturi, izbojci biljaka su primarno mjesto sinteze GSH (Wachter i sur., 2005; Mendoza-Cózatl i sur., 2008) pa ne iznenađuje da su u izdancima pšenice zabilježene veće količine GSH nego u korijenu.

Suprotno tretmanu selenatom, u izdancima pšenice tretiranim selenitom došlo je do povećanja količine GSH, ali je ono bilo praćeno i porastom aktivnosti GR-a (*Slika 12a*) i aktivnosti GPX-a (*Slika 14a*). Stoga se može pretpostaviti da se GSH u izdanku klijanaca izlaganim selenitu trošio u reakcijama GPX-a u uklanjanju H₂O₂ te u reakcijama redukcije selenita, ali se vrlo uspješno regenerirao iz GSSG što je vidljivo iz povećanih aktivnosti GR-a. Povećana aktivnost GR bila je praćena i povećanom genskom ekspresijom *gr* što je u korelaciji s drugim istraživanjem kojim je također utvrđena poveznica između njegove aktivnosti i ekspresije uslijed izlaganja Se (Handa i sur., 2019). Ekspresija *gr* je bila značajno veća i uslijed izlaganja najvećoj koncentraciji selenata. Kako su u istom tretmanu zabilježeni pad GSSG-a, ali i povećanje aktivnosti GR-a koje nije bilo statistički značajno, ne može se u potpunosti tvrditi da je došlo do posttranslacijskih modifikacija *gr* što se moglo odraziti na aktivnost.

Što je tiče količine GSH u korijenu klijanaca, ona je nakon izlaganja dvama oblicima Se ostala nepromijenjena ili se smanjila. Samo je najveća koncentracija selenita uzrokovala njegovo značajno povećanje (*Slika 20b*). Pri tome je količina GSSG-a rasla (*Slika 21b*), kao i aktivnost GR-a (*Slika 12b*), a posljedično se smanjio i GSH/GSSG omjer (*Slika 22b*). U biljkama suncokreta koje su bile tretirane s 5, 10 i 20 μM selenata prije izlaganja Cd je uočeno smanjenje količine GSH, unatoč povećanju aktivnosti GR (Saidi i sur., 2014). Autori su pretpostavili kako povećana GR aktivnost

uslijed izlaganja Se nije bila dovoljna da nadoknadi veliku potrošnju GSH. U korijenu klijanaca, najviše GSH se trošilo u redukciji selenita i u obnavljanju AsA-e koju katalizira DHAR, posebno nakon izlaganja selenitu. Održavanje aktivnosti GR, a time i AsA-GSH ciklusa, može biti ograničeno dostupnošću NADPH što u klijancima nije bio slučaj. Štoviše, Dimkovikj i Van Hoewyk (2014) su u korijenu uljane repice izlagane 50 μ M selenitu utvrdili povećanje količine NADPH i aktivnosti glukoza-6-fosfat dehidrogenaze te utvrdili kako je selenit stimulira pentoza-fosfatni put. NADPH se još koristi u neenzimskoj redukciji selenida do SeCys i u obnavljanju AsA-e koju katalizira MDHAR.

Aktivnost GPX također utječe na stanične razine GSH i GSSG-a (Mahmood i sur., 2010). Istraživanja provedena u vrsti *Lolium perenne* su pokazala pozitivnu korelaciju između koncentracije Se i aktivnosti GPX (Hartikainen i sur., 1997; Hartikainen i sur., 2000). Slično je utvrđeno u pšenici (Štolfa i sur., 2017), krumpiru (Seppänen i sur., 2003) i kineskom kupusu (Wu i sur., 2017). Zaključeno je da povećana aktivnost GPX-a uklanja većinu H_2O_2 i time sprječava aktivaciju ostalih enzima koji sudjeluju u njegovom uklanjanju, ali i uklanjanjem lipidnih hidroperoksida smanjuje LPO (Cartes i sur., 2011; Štolfa i sur., 2017). Iako spomenuta korelacija nije uočena u klijancima pšenice, povećana aktivnost u izdancima uslijed izlaganja selenitu je doprinijela detoksikaciji H_2O_2 , ali i smanjenju LPO. Prisutnost Se u izdancima, posebno pri najvećim koncentracijama, povećao je ekspresiju *gpx*-a (Slika 30a) što se kod tretmana selenitom odrazilo na aktivnost, dok kod tretmana selenatom nije (Slika 14a). Naime, proteini GPX iz pšenice sadrže tri visoko konzervirana Cys ostatka odgovorna za katalitičku funkciju (Tosatto i sur., 2008), kao i proteini APX koji su pokazali očuvani obrazac aminokiselinskih ostataka koji su uključeni u vezanje liganda i katalizu, a među kojima je i Cys (Tyagi i sur., 2021). Aktivno mjesto GR-a također sadrži dva Cys (Madhu i sur., 2021), kao i aktivno mjesto GST-a (Mohsenzadeh i sur., 2011). Zamjena Cys sa SeCys, koji je nastao nakon asimilacije selenata, može objasniti zašto povećana ekspresija nije bila praćena i porastom aktivnosti jer SeCys u potpunosti mijenja strukturu proteina i njegovu reaktivnost (Hondal i sur., 2013). Nadalje, postoji mogućnost da je selenit, koji je dospio u izdanak klijanaca, uzrokovao promjene redoks stanja te aktivirao različite signalne puteve koji vode k promjeni ekspresije gena i aktivaciji detoksikacijskih mehanizama. Uz povećanu ekspresiju i aktivnost GPX, aktivirani mehanizmi detoksikacije obuhvaćaju i GST, kao i GR koji regenerira GSH.

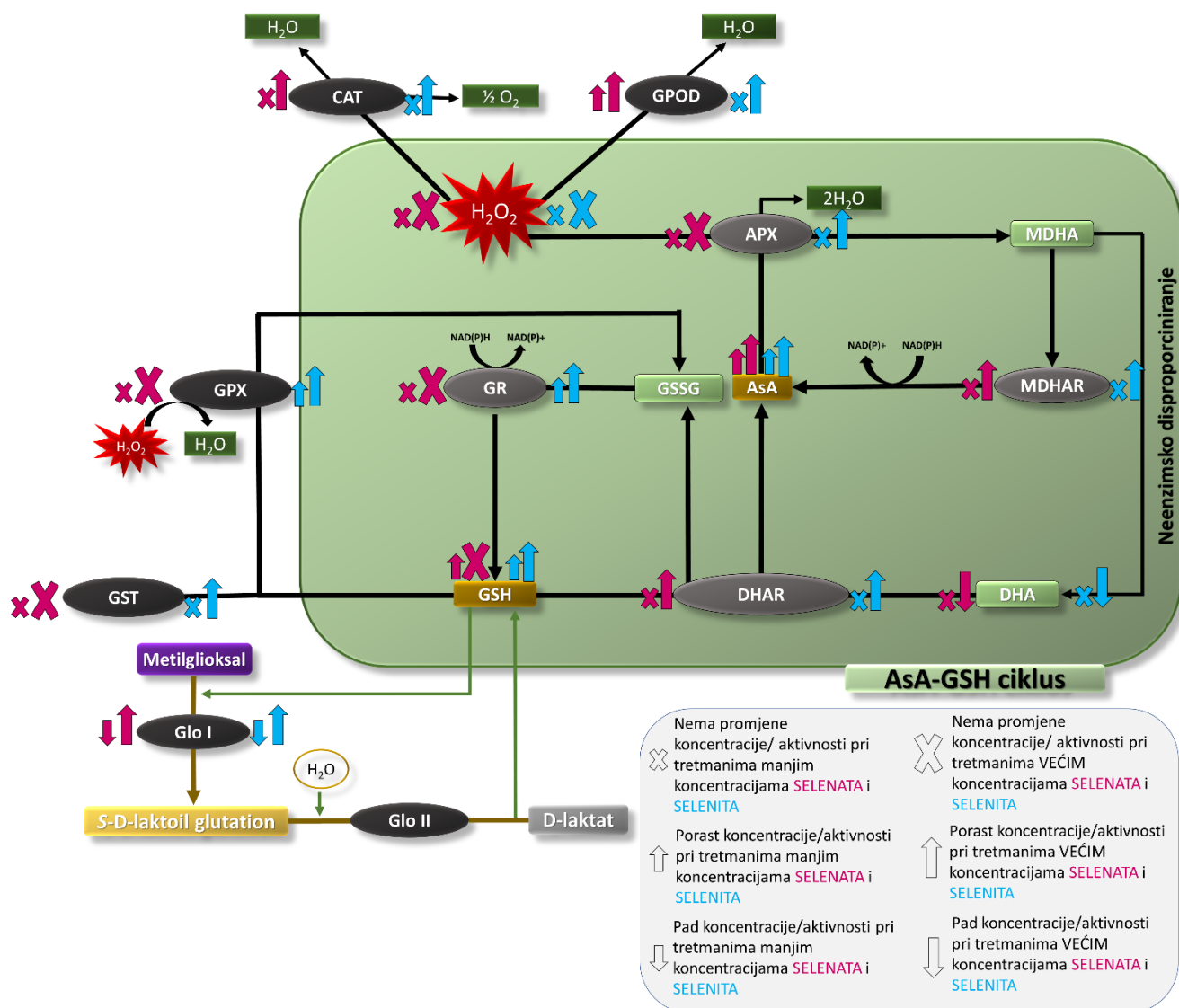
GST katalizira konjugaciju GSH s različitim toksičnim tvarima nakon čega se isti prenose u vakuolu, štiteći tako stanice od oksidacijskih oštećenja (Huang i sur., 2012). Dok u korijenu na razini transkripcije nije bilo promjene, u izdancima klijanaca uočeno je smanjenje ekspresije gena *gst* nakon izlaganja selenitu te povećanje ekspresije *gst* pri tretmanu najvećom koncentracijom selenata (*Slika 32a*). No, nijedna od tih promjena nije bila u korelaciji s aktivnošću GST (*Slika 13a*). Kumar i suradnici (2014) su utvrdili kako se uslijed povećane ekspresije gena *gst* povećava i aktivnost u riži nakon izlaganja selenitu što je poslije dokazano i kod vrste *B. juncea* (Handa i sur., 2019). U izdancima klijanaca povećana ekspresija *gst* nije bila praćena i povećanom aktivnosti, a mogući razlog su modifikacije tijekom translacije koje su obuhvaćale ugradnju SeCys u aktivno mjesto umjesto Cys (spomenuto gore). Puglisi i suradnici (2013) su *in silico* istraživanjem pokazali korelaciju između GST-a i mehanizama posttranskripcijske regulacije koji mogu uključivati reverzibilnu kontrolu fosforilacijom ili miristoilacijom. No, ne treba isključiti niti posttranskripcijske regulacije posredovane mikroRNA molekulama (Cakir i sur., 2016; Li i sur., 2021). Analizom transkriptoma vrste *Astragalus chrysochlorus* koja je bila tretirana s 5 mg L⁻¹ selenata, Cakir i suradnici (2016) su utvrdili veliki broj mikroRNA molekula koje mogu posttranskripcijski regulirati gensku ekspresiju. Nadalje, analizom transkriptoma pšenice nakon izlaganja 10 µM selenatu, utvrđeno je da dolazi do smanjenja ekspresije *gst* (Feng i Ma, 2021), a Polidoros i Scandalios (1999) su utvrdili i da manje količine H₂O₂ (0.1 mM) mogu djelovati na smanjenje ekspresije *gst1* iz vrste *Zea mays* L. Iako je i u izdancima klijanaca također uočena smanjena ekspresija *gst*, pri dvije najveće koncentracije selenita u izdanku je zabilježen porast aktivnosti GST što je doprinijelo smanjenju oksidacijskih oštećenja uklanjanjem lipidnih peroksida (Bela i sur., 2015). Iako brojna istraživanja govore kako prisutnost Se utječe na povećanje GST aktivnosti (Hartikainen i sur., 2000; Akbulut i Çakir, 2010; Hasanuzzaman i sur., 2011; Mostofa i sur., 2017), u korijenu je aktivnost inhibirana uslijed tretmana selenatom s tri najveće koncentracije selenata (*Slika 13b*). Nema dokaza da selenat može direktno uzrokovati inhibiciju, no nakupljanje H₂O₂ (iako prisutno samo u dva tretmana) je moglo dovesti do oksidacijskih oštećenja koju su zahvatila GST. Ovi rezultati su pokazali da aktivnost GST uglavnom ne sudjeluje u regulaciji tolerancije na oksidacijski stres izazvan Se u klijanacima, osim pri većim koncentracijama selenita u izdanku. Također, različit odgovor između izdanka i korijena ovisi o kemijskom obliku primijenjenog Se, sugerirajući da su ekspresija i funkcija GST-a ovisne o tipu biljnog tkiva. Zhang i Ge

(2008) su došli do sličnog zaključka nakon što su u izbojcima riže utvrdili porast, a u korijenu pad aktivnosti GST nakon izlaganja Cd.

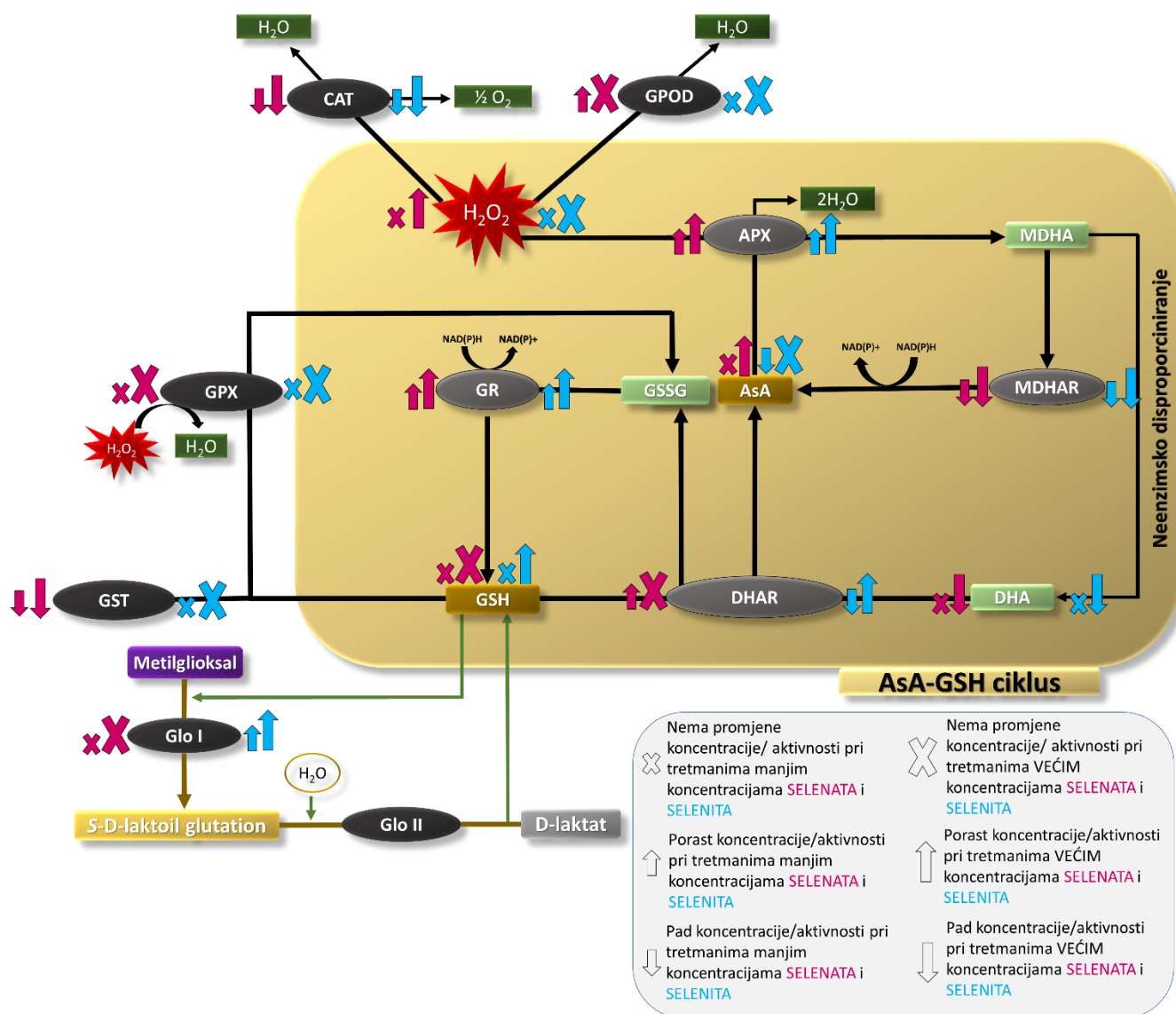
Uz detoksikacijske mehanizme GPX-a i GST-a koji zahtijevaju GSH, neophodno je spomenuti i gliksilacijski detoksikacijski sustav koji uklanja većinu citotoksičnog MG-a u dva koraka te tako sprječava njegovu akumulaciju (*Slika 35*). U prvom koraku Glo1 izomerizira hemitioacetal stvoren spontanom spajanjem MG-a i GSH-a, dovodeći do nastanka S-D-laktoilglutaciona kojeg zatim Glo2 hidrolizira u D-laktat obnavljajući GSH (Kaur i sur., 2014; Kaur i sur., 2014). Prethodna istraživanja su pokazala kako količina MG-a raste kako raste i koncentracija primijenjenog Se (Mostofa i sur., 2017; Ulhassan i sur., 2019). Pritom je zabilježeno da se aktivnosti Glo1 i Glo2 pri manjim koncentracijama Se povećavaju, dok se pri većim značajno smanjuju (Mostofa i sur., 2017; Ulhassan i sur., 2019). Poznato je da povećane aktivnosti Glo1 i Glo2 štite biljke od različitih abiotičkih i biotičkih stresova, dok smanjene aktivnosti istih uzrokuju nakupljanje MG-a što može dovesti do oštećenja važnih biomolekula unutar stanica (Yadav i sur., 2005; Hasanuzzaman i sur., 2012; Rahman i sur., 2021). Prisutnost dva oblika Se različito su utjecala na aktivnost Glo1 u izdanku i korijenu klijanaca (*Slika 15*). Oba primijenjena oblika Se su pri manjim koncentracijama smanjila aktivnost Glo1 u izdanku, dok ju je najveća koncentracija povećala. Jedna je mogućnost da manje koncentracije Se aktiviraju druge mehanizme uklanjanja MG-a kako bi se potrošnja GSH prioritarno iskoristila u drugim reakcijama, a druga da prisutnost Se smanjuje nastajanje MG-a koji se može stvarati spontano i pri normalnim fiziološkim uvjetima. Naime, iako je gliksilazni mehanizam glavni mehanizam uklanjanja MG-a, postoji nekoliko aldo-keto reduktaza koje mogu metabolizirati MG (Kaur i sur., 2016). Kako je aktivnost aldo-keto reduktaza ovisna o NADPH, a s obzirom na rezultate aktivnosti GR-a i MDHAR-a koji isto koriste NADPH kao kofaktor, čini se kako je bilo dovoljno NADPH koji bi se iskoristio i za detoksikaciju MG-a. Veće koncentracije koje su uzrokovale prekomjerno nakupljanje MG-a su povećale aktivnost Glo1 u svrhu njegovog učinkovitijeg uklanjanja. Na aktivnost Glo1 u korijenu klijanaca su utjecala samo tri najveća tretmana selenitom te povećali njezinu aktivnost, kao i najveće koncentracije Se u izdanku. Kako je pretpostavka da je selenit u korijenu klijanaca potaknuo pentoza-fosfatni put u svrhu nastajanja NADPH koji je neophodan za veliki broj reakcija, ne iznenađuje ni povećano stvaranje MG-a. Naime, uz glikolizu, pentoza-fosfatni put je jedan od glavnih izvora trioza-fosfata koji su prekurzori MG-a (Mostofa i sur., 2018). Pri istim tretmanima je zabilježena povećana aktivnost Glo1 što se može

povezati s akumulacijom MG-a koji može biti signalna molekula te utjecati na redoks stanje stanica (Kaur i sur., 2015). Kaur i suradnici (2015) su utvrdili da tretman MG-om uzrokuje značajne promjene u ekspresiji gena koji sudjeluju u transdukciji signala, posebno transkripcijskih faktora kao što su bZIP, AP2 i WRKY koji su pronađeni i nakon tretmana Se (Van Hoewyk i sur., 2008; Cao i sur., 2018). Osim toga, smatra se kako MG može direktno utjecati na ekspresiju gena metilgliksilirajući histon H3 i H3K4 čime kromatin postaje dostupniji (Fu i sur., 2021). Neovisno o mehanizmu djelovanja, akumulacija MG-a uslijed izlaganja Se je svakako mogla uzrokovati intenzivniji odgovor klijanaca na razini transkripcije.

Selen u biljkama interferira s brojnim metaboličkim putevima te uzrokuje niz promjena na biokemijskoj i molekularnoj razini, što upućuje na složenost njegovog djelovanja u biljkama. Učinak Se na mehanizme odgovora detoksikacijskih enzima kod klijanaca pšenice ovisi kako o kemijskom obliku i koncentraciji primijenjenog Se tako i biljnom tkivu, izdanku (*Slika 36*) ili korijenu (*Slika 37*).



Slika 36. Detoksikacijski sustav u izdanku klijanaca pšenice tretiranim različitim koncentracijama selenata i selenita. CAT (katalaza); GPOD (gvajakol-peroksidaza); H_2O_2 (vodikov peroksid), APX (askorbat-peroksidaza); MDHA (monodehidroaskorbat); GPX (glutation-peroksidaza); GR (glutation-reduktaza); GSSG (oksidirani glutation); MDHAR (monodehidroaskorbat-reduktaza); GST (glutation-S-transferaza); GSH (reducirani glutation); DHAR (dehidroaskorbat-reduktaza); DHA (dehidroaskorbat); Glo I (gliksilaza 1); Glo II (gliksilaza 2).



Slika 37. Detoksikacijski sustav u korijenu klijanaca pšenice tretiranim različitim koncentracijama selenata i selenita. CAT (katalaza); GPOD (gvajakol-peroksidaza); H₂O₂ (vodikov peroksid), APX (askorbat-peroksidaza); MDHA (monodehidroaskorbat); GPX (glutation-peroksidaza); GR (glutation-reduktaza); GSSG (oksidirani glutation); MDHAR (monodehidroaskorbat-reduktaza); GST (glutation-S-transferaza); GSH (reducirani glutation); DHAR (dehidroaskorbat-reduktaza); DHA (dehidroaskorbat); Glo I (glioksilaza 1); Glo II (glioksilaza 2).

Osim što dobiveni rezultati značajno pridonose razvoju učinkovitijih strategija i optimizaciji agronomske biofortifikacije, također pridonose razumijevanju uloge Se u poboljšanju antioksidacijskog odgovora biljaka na nepovoljne uvjete u okolišu koje nastaju kao posljedica klimatskih promjena. Osim gena enzima asimilacije S čija je uloga dosad već dobro istražena i čije promjene ekspresije značajno utječu na primanje Se i učinkovitost biofortifikacije, dobiveni rezultati pokazuju i važnu ulogu komponenti detoksifikacijskog sustava kao mogućih meta za genske modifikacije u svrhu dobivanja otpornijih i kvalitetnijih usjeva.

5. ZAKLJUČCI

- Oba kemijska oblika selena (Se) su uzrokovala povećanje koncentracije Se u izdanku i korijenu pri čemu su u izdancima tretiranim selenatom utvrđene veće koncentracije Se u odnosu na izdanke tretirane sa selenitom, a u korijenu tretiranom selenatom manje koncentracije Se u odnosu na tretman selenitom. Te razlike bi mogle biti posljedica različitih načinima usvajanja ova dva oblika Se te bržom stopom translokacije selenata u nadzemne dijelove biljaka, a čije je usvajanje općenito bilo veće nego selenita.
- Primjena manjih koncentracija oba oblika Se nije imala značajan utjecaj na klijavost pšenice, dok su veće koncentracije smanjile postotak klijavosti te biomasu izdanaka i korijena pri čemu je prag toksičnosti bio niži za selenit. Također, značajno smanjenje koncentracije klorofila utvrđeno je samo pri najvećoj koncentraciji selenata te pri manjim koncentracijama selenita. Stoga se može zaključiti da klijanje i biomasa pšenice uvelike ovise o kemijskom obliku primijenjenog selena te da je selenit toksičniji oblik od selenata.
- Oba oblika selena su utjecala na antioksidacijski odgovor i druge detoksikacijske mehanizme prilikom čega je uočen tkivno-specifični odgovor klijanaca ovisan o kemijskom obliku i koncentraciji primijenjenog selena.
- Tretmani s oba oblika Se nisu značajno utjecali na količinu H_2O_2 u izdancima, dok su u korijenu samo dvije najveće koncentracije selenata uzrokovale blago povećanje H_2O_2 . Kako je u većini tretmana Se smanjio intenzitet LPO to jasno ukazuje na zaštitnu ulogu selena u održavanju biomembrana i aktivan antioksidacijski sustav koji uspješno održava količinu H_2O_2 .
- Uklanjanje H_2O_2 u izdanku i korijenu je išlo različitim mehanizmima ovisno o kemijskom obliku i koncentraciji Se. Primarnu ulogu uklanjanja H_2O_2 nastalog djelovanjem selenita u izdanku ima CAT i GPX, dok H_2O_2 nastao uslijed tretmana selenatom primarno uklanja GPOD. Ipak, najveće koncentracije oba oblika Se aktivirale su GPOD i APX. GPOD zadržava svoju ulogu i u korijenu zajedno s APX-om kod tretmana selenatom, dok je kod tretmana selenitom APX preuzeo glavnu ulogu u uklanjanju H_2O_2 .

- Manje koncentracije oba oblika Se uzrokovala su povećanje koncentracije AsA-e u izdancima što upućuje na sintezu *de novo*, dok je pri najvećoj koncentraciji selenita i selenata AsA nastala aktivnom regeneracijom putem povećanih aktivnosti enzima MDHAR-a i DHAR-a. Povećana genska ekspresija navedenih enzima pri tretmanu selenatom rezultirala je i njihovom većom aktivnošću u odnosu na tretman selenitom. S druge strane u korijenu klijanaca pšenice regeneraciju AsA-e je uglavnom obavljao DHAR jer je aktivnost MDHAR-a bila značajno smanjena vrlo vjerojatno zbog ograničene količine dostupnog NADPH.
- Rezultati ovog istraživanja su pokazali da je Se gotovo pri svim tretmanima povećao količinu GSH u izdanku klijanaca, a jedini porast u korijenu je zabilježen nakon izlaganja najvećoj koncentraciji selenita. Porast GSH u izdancima uslijed izlaganja selenatu, kao i porast ekspresije gena *cs*, upućuju na sintezu *de novo*, dok je selenit aktivirao regeneraciju GSH iz GSSG-a putem povećane aktivnosti GR-a koja je bila praćena i povećanom ekspresijom.
- Suprotno tretmanu selenatom, u izdancima pšenice tretiranim selenitom porast količine GSH bio je praćen porastom aktivnosti GR-a i GPX-a. Stoga se može pretpostaviti da se GSH u izdanku klijanaca izlaganim selenitu trošio u reakcijama GPX-a u uklanjanju H₂O₂ te u reakcijama redukcije selenita, ali se vrlo uspješno regenerirao iz GSSG što je vidljivo iz povećanih aktivnosti GR-a koje su bile praćene i porastom genske ekspresije.
- U izdancima pšenice su oba primijenjena oblika Se pri manjim koncentracijama smanjila aktivnost Glo1 što se može objasniti s aktivacijom drugih mehanizama u uklanjanju MG-a, dok su veće koncentracije Se povećale aktivnost Glo1. U korijenu klijanaca su samo tri najveće koncentracije selenita povećale aktivnost Glo1 gdje je zbog povećanih potreba za NADPH, uslijed povećanih aktivnosti GR-a, vjerojatno došlo do aktivacije pentoza-fosfatnog puta koji je glavni izvor prekursora MG-a.

- Na razini ekspresije gena enzima uključenih u metabolizam GSH, najizraženije promjene bile su vidljive u izdancima pšenice pri najvećim koncentracijama oba oblika Se. Iako je većinom promjena ekspresija gena bila praćena promjenom aktivnosti enzima, izostanak takve korelacije mogao bi biti rezultat posttranskripcijskih i/ili posttranslacijskih modifikacija nastalih uslijed ugradnje selenocisteina umjesto cisteina u aktivnom mjestu GR-a, GPX-a, APX-a i GST-a koja u potpunosti mijenja strukturu i funkciju navedenih enzima.
- Na razini transkripcije, prisutnost Se je uzrokovala tkivno-specifične promjene gena metabolizma Se, *ATP-Sul* i *cs*. U izdancima klijanaca je tretman selenitom povećao ekspresiju gena *ATP-Sul*, dok ju je u korijenu isti tretman smanjio. S druge strane, tretman selenitom nije imao značajan utjecaj na ekspresije gena *cs*, dok je tretman selenatom uzrokovao povećanje ekspresije što, uz sintezu Cys potrebnog za sintezu GSH, upućuje na enzimsku redukciju selenida do SeCys. U korijenima klijanaca su najveće koncentracije Se također imale suprotan učinak na ekspresiju gena *cs*, dok je tretman selenatom povećao ekspresiju gena *cs*, tretman selenitom ju je smanjio zbog dovoljne količine GSH prisutnog pri navedenom tretmanu u korijenu.
- Selenat i selenit povećavaju koncentraciju Se u klijanacima pšenice ovisno o primijenjenoj koncentraciji i kemijskom obliku Se što je praćeno tkivno-specifičnim odgovorom na morfo-fiziološkoj, biokemijskoj i molekularnoj razini. Pri tome, različiti kemijski oblici Se aktiviraju različiti mehanizam antioksidacijskog odgovora u izdancima i korijenu klijanaca pšenice.
- Ovo istraživanje doprinijelo je boljem razumijevanju fiziološkog, biokemijskog i molekularnog odgovora pšenice na selen, te razvoju novih spoznaja o mehanizama toksičnosti uvjetovanih koncentracijom, kemijskim oblikom i tipom biljnog organa. Uvid u biokemijske i molekularne mehanizme tolerancije i akumulacije selena, dobiven ovim istraživanjem, pridonosi razvoju učinkovitijih strategija biofortifikacije, a koje između ostaloga uključuju genetičku manipulaciju metaboličkim i drugim detoksikacijskim putovima.

6. LITERATURA

Abdel-Hamid MI, Skulberg OM (1995) Effect of selenium on the growth of some selected green and blue-green algae. *Lake Reserv Manag* 1:205-2111.

Adriano D (2001) *Selenium: Trace Elements in Terrestrial Environments*. New York, USA: Springer, pp. 275–286.

Aebi H (1984) '[13] Catalase in vitro. *Method Enzymol* 105:121-126.

Ahmad P, Jaleel CA, Salem MA, Nabi G, Sharma S (2010) Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Crit Rev Biotechnol* 30: 161-175.

Akbulut M, Çakir S (2010) The effects of Se phytotoxicity on the antioxidant systems of leaf tissues in barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *Plant Physiol Biochem* 48:160-166.

Alfthan G, Eurola M, Ekholm P, Venäläinen E-R, Root T, Korkalainen K, Hartikainen H, Salminen P, Hietaniemi PA, Aro A (2015) Effects of nationwide addition of selenium to fertilizers on foods, and animal and human health in Finland: From deficiency to optimal selenium status of the population. *J Trace Elem Med Biol* 31:42-147.

Alscher RG (1989) Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. *Physiol Plant* 77:457-464.

Alyemeni MN, Ahanger MA, Wijaya L, Alam P, Bhardwaj R, Ahmad P (2018) Selenium mitigates cadmium-induced oxidative stress in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants by modulating chlorophyll fluorescence, osmolyte accumulation, and antioxidant system. *Protoplasma* 255:459-469.

Ambroziak U, Hybsier S, Shahnazaryan U, Krasnodębska-Kiljańska M, Rijntjes E, Bartoszewicz Z, Bednarczuk T, Schomburg L (2017) Severe selenium deficits in pregnant women irrespective of autoimmune thyroid disease in an area with marginal selenium intake. *J Trace Elem Med Biol* 44:186-191.

Anderson JM (1982) The role of chlorophyll-protein complexes in the function and structure of chloroplast thylakoids. *Mol Cell Biochem* 46:161-172.

Andrade FR, da Silva GN, Guimarães KC, Barreto HBF, de Souza KRD, Guilherme LRG, Faquin V, Reis ARD (2018) Selenium protects rice plants from water deficit stress. *Ecotoxicol Environ Saf* 164: 562-570.

Anjum NA, Gill SS, Gill R, Hasanuzzaman M, Duarte AC, Pereira E, Ahmad I, Tuteja R, Tuteja N (2014) Metal/metalloid stress tolerance in plants: role of ascorbate, its redox couple, and associated enzymes. *Protoplasma*, 251:1265-1283.

Arai M, Nihonmatsu-Kikuchi N, Itokawa M, Rabbani N, Thornalley PJ (2014) Measurement of glyoxalase activities. *Biochem Soc* 42:491-494.

Arvy MP (1989) Some factors influencing the uptake and distribution of selenite in the bean plant (*Phaseolus vulgaris*). *Plant Soil*, 117:129-133.

Ashraf MA, Akbar A, Parveen A, Rasheed R, Hussain I, Iqbal M (2018) Phenological application of selenium differentially improves growth, oxidative defense and ion homeostasis in maize under salinity stress. *Plant Physiol Biochem* 123:268-280.

Azizi I, Esmailpour B, Fatemi H (2020) Effect of foliar application of selenium on morphological and physiological indices of savory (*Satureja hortensis*) under cadmium stress. *Food Sci Nutr* 8:6539-6549.

Behne D, Kyriakopoulos A, Meinhold H, Köhrle J (1990) Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 173:1143-1149.

Bela K, Horváth E, Gallé Á, Szabados L, Tari I, Csiszár J (2015) Plant glutathione peroxidases: Emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses. *J Plant Physiol* 176:192-201.

Bodnar M, Konieczka P, Namiesnik J (2012) The properties, functions, and use of

selenium compounds in living organisms. J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev 30:225-252.

Boldrin PF, Faquin V, Ramos SJ, Boldrin KV, Avila FW, Guilherme LRG (2013) Soil and foliar application of selenium in rice biofortification. J Food Compos Anal 31:238-244.

Boldrin PF, de Figueiredo MA, Yang Y, Luo H, Giri S, Hart JJ, Faquin V, Guilherme LR, Thannhauser TW, Li L (2016) Selenium promotes sulfur accumulation and plant growth in wheat (*Triticum aestivum*). Physiol Plant 158: 80-91.

Boldrin PF, Faquin V, Clemente ADCS, de Andrade T, Guilherme LRG (2018) Genotypic Variation and Biofortification with Selenium in Brazilian Wheat Cultivars. J Environ Qual 47:1371-1379.

Boyd R (2011) Selenium stories. Nat Chem 3:570.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-254.

Broadley MR, White PJ, Bryson RJ, Meacham MC, Bowen HC, Johnson SE, Hawkesford MJ, McGrath SP, Zhao FJ, Breward N, Harriman M, Tucker M (2006) Biofortification of UK food crops with selenium. Proc Nutr Soc 65:169-181.

Broadley MR, Broadley MR, Alcock J, Alford J, Cartwright P, Foot I, Fairweather-Tait SJ, Zhao FJ (2009) Selenium biofortification of high-yielding winter wheat (*Triticum aestivum* L.) by liquid or granular Se fertilisation. Plant Soil 332:5-18.

Brown TA, Shrift A (1981) Exclusion of Selenium from Proteins of Selenium-Tolerant. Plant Physiol 67:1051-1053.

Burk RF (2002) Selenium, an Antioxidative Nutrient. Nutr Clin Pract 5:75-79.

Burk RF, Hill KE (2009) Selenoprotein P-Expression, functions, and roles in mammals. *Biochim Biophys Acta* 1790:1441-1447.

Cabral Gouveia GC, Galindo FS, Dantas Bereta Lanza MG, Caroline da Rocha Silva A, Pereira de Brito Mateus M, Souza da Silva M, Reis AR dos (2020) Selenium toxicity stress-induced phenotypical, biochemical and physiological responses in rice plants: Characterization of symptoms and plant metabolic adjustment. *Ecotoxicol Environ Saf* 202:110916.

Cakir O, Candar-Cakir B, Zhang B (2016) Small RNA and degradome sequencing reveals important microRNA function in *Astragalus chrysochlorus* response to selenium stimuli. *Plant Biotechnol J* 14:543-556.

Cao D, Liu Y, Ma L, Jin X, Guo G, Tan R, Liu Z, Zheng L, Ye F, Liu W (2018) Transcriptome analysis of differentially expressed genes involved in selenium accumulation in tea plant (*Camellia sinensis*). *PLoS One* 13:0197506.

Cartes P, Gianfreda L, Mora ML (2005) Uptake of selenium and its antioxidant activity in ryegrass when applied as selenate and selenite forms. *Plant Soil* 276:359-367.

Cartes P, Jara AA, Pinilla L, Rosas A, Mora ML (2009) Selenium improves the antioxidant ability against aluminium-induced oxidative stress in ryegrass roots. *Ann Appl Biol* 156:297-308.

Cartes P, Gianfreda L, Paredes C, Mora ML (2011) Selenium uptake and its antioxidant role in ryegrass cultivars as affected by selenite seed pelletization. *J Soil Sci Plant Nutr* 11:1-14.

Chauhan R, Awasthi S, Tripathi P, Mishra S, Dwivedi S, Niranjana A, Mallick S, Tripathi P, Pande V, Tripathi RD (2017) Selenite modulates the level of phenolics and nutrient element to alleviate the toxicity of arsenite in rice (*Oryza sativa* L.). *Ecotoxicol Environ Saf* 138:7-55.

Chauhan, R, Awasthi S, Srivastava S, Dwivedi S, Pilon-Smiths EAH, Dhankher OP,

Tripathi RD (2019) Understanding selenium metabolism in plants and its role as a beneficial element. *Crit Rev Environ Sci Technol* 49:1937-1958.

Chen M, Zeng L, Luo X, Mehboob MZ, Ao T, Lang M (2019) Identification and functional characterization of a novel selenocysteine methyltransferase BjSMT from *Brassica juncea* L.. *J Exp Bot* 18: 6401-6416.

Chen X, Yang G, Chen J, Chen X, Wen Z, Ge K (1980) Studies on the Relations of Selenium and Keshan Disease. *Biol Trace Elem Res* 2:97-107.

Chen Z, Young TE, Ling J, Chang SC, Gallie DR (2003) Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3525-3530.

Chilimba ADC, Young SD, Black CR, Meacham MC, Lammel J, Broadley MR (2012) Agronomic biofortification of maize with selenium (Se) in Malawi. *Field Crops Res* 125:118-128.

Chioti V, Zervoudakis G (2017) Is root catalase a bifunctional catalase-peroxidase? *Antioxidants* 6:39.

Chu J, Yao X, Yue Z, Li J, Zhao J (2013) The effects of selenium on physiological traits, grain selenium content and yield of winter wheat at different development stages. *Biol Trace Elem Res* 151:434-440.

Chu J, Yao X, Zhang Z (2010) Responses of Wheat Seedlings to Exogenous Selenium Supply Under Cold Stress. *Biol Trace Elem Res* 136:355-363.

Deponte M (2013) Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1830:3217-3266.

Dey SK, Dey J, Patra S, Pothal D (2007) Changes in the antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in wheat seedlings exposed to cadmium and lead stress. *Braz J Plant Physiol* 19:53-60.

Dietz K, Turkan I, Krieger-Liszkay A (2016) Redox and Reactive Oxygen Species-

Dependent Signaling into and out of the Photosynthesizing Chloroplast. *Plant Physiol* 171:1541-1550.

Dimkovikj A, Van Hoewyk D. (2014) Selenite activates the alternative oxidase pathway and alters primary metabolism in *Brassica napus* roots: Evidence of a mitochondrial stress response. *BMC Plant Biol* 14:1-15.

Djanaguiraman M, Devi DD, Shanker AK, Sheeba JA, Bangarusamy U (2005) Selenium - An antioxidative protectant in soybean during senescence. *Plant Soil* 272:77-86.

Djanaguiraman M, Prasad PV, Seppanen M (2010) Selenium protects sorghum leaves from oxidative damage under high temperature stress by enhancing antioxidant defense system. *Plant Physiol Biochem* 48:999-1007.

Dougall DK (1965) The biosynthesis of protein amino acids in plant tissue culture I. Isotope competition experiments using glucose-U-C14 and the protein amino acids. *Plant physiol* 40:891-897.

Du B, Luo H, He L, Zhang L, Liu Y, Mo Z, Pan S, Tian H, Duan M, Tang X (2019) Rice seed priming with sodium selenate: Effects on germination, seedling growth, and biochemical attributes. *Sci Rep* 9:4311.

Ducsay L, Ložek O, Marček M, Varényiová M, Hozlar P, Lošak T (2016) Possibility of selenium biofortification of winter wheat grain. *Plant Soil Environ*, 62:379-383.

El-Hadary AA (2021) Kinetic Studies of Catalase And Peroxidase Enzymes Extracted From Garlic Cloves (*Allium Sativum* L.). *Ann Agric Sci* 59:331-338.

Elkelish AA, Soliman MH, Alhaithloul HA, El-Esawi M (2019) Selenium protects wheat seedlings against salt stress-mediated oxidative damage by up-regulating antioxidants and osmolytes metabolism. *Plant Physiol Biochem* 137:144-153.

Fargašová A. (2004) Toxicity comparison of some possible toxic metals (Cd, Cu, Pb,

Se, Zn) on young seedlings of *Sinapis alba* L. Plant Soil Environ - UZPI 50:33-38.

Feng X, Ma Q (2021) Transcriptome and proteome profiling revealed molecular mechanism of selenium responses in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). BMC Plant Biol 1-16.

Fernández-Martínez A, Charlet L (2009) Selenium environmental cycling and bioavailability: A structural chemist point of view. Rev Environ Sci Biotechnol 8:81-110.

Filek M, Zembala M, hartikainen H, Miszalski Z, Kornas A, WietECKa-Posłuszny R, Walas P (2009) Changes in wheat plastid membrane properties induced by cadmium and selenium in presence/absence of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Plant Cell Tissue Organ Cult 96:19-28.

Filek M, Gzyl-Malcher B, Zembala M, Bednarska E, Laggner P, Kriechbaum M (2010) Effect of selenium on characteristics of rape chloroplasts modified by cadmium. J Plant Physiol 167:28-33.

Fisher B, Yarmolinsky D, Abdel-Ghany S, Pilon M, Pilon-Smits EA, Sagi M, Van Hoewyk D (2016) Superoxide generated from the glutathione-mediated reduction of selenite damages the iron-sulfur cluster of chloroplastic ferredoxin. Plant Physiol Biochem 106:228-235.

Fordyce FM (2013) Selenium Deficiency and Toxicity in the Environment: Essentials of Medical Geology. Springer, Dordrecht 375–416.

Freeman JL, Lindblom SD, Quinn CF, Fakra S, Marcus MA, Pilon-Smits EAH (1960) Selenium accumulation protects plants from herbivory by Orthoptera via toxicity and deterrence. New Phytol 175:490-500.

Freeman JL, Tamaoki M, Stushnoff C, Quinn CF, Cappa JJ, Devonshire J, Fakra SC, Marcus MA, McGrath SP, Van Hoewyk D, Pilon-Smits EA (2010) Molecular mechanisms of selenium tolerance and hyperaccumulation in *Stanleya pinnata*. Plant Physiol 153:1630-1652.

Gadjev I, Stone JM, Gechev TS (2008) Programmed Cell Death in Plants. New Insights into Redox Regulation and the Role of Hydrogen Peroxide. *Int Rev Cell Mol Biol* 270:87-144.

Galinha C, Sánchez-Martínez M, Pacheco AM, Freitas Mdo C, Coutinho J, Maças B, Almeida AS, Pérez-Corona MT, Madrid Y, Wolterbeek HT (2014) Characterization of selenium-enriched wheat by agronomic biofortification. *J Food Sci Technol* 52:4236-4245.

Gayatrivedi S, Jayalakshmi SK, Mulimani VH, Sreeramulu K (2013) Salicylic acid and salicylic acid sensitive and insensitive catalases in different genotypes of chickpea against *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceri. *Physiol Mol Biol Plants* 19:529-536.

Gechev TS, Van Breusegem F, Stone JM, Denev I, Laloi C (2006) Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *Bioessays* 28:1091-1101.

Geiger D (2020) Plant glucose transporter structure and function. *Pflug Arch Eur J Physiol* 472:1111-1128.

Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* 48:909-930.

Gladyshev VN, Jeang KT, Stadtman TC (1996) Selenocysteine, identified as the penultimate C-terminal residue in human T-cell thioredoxin reductase, corresponds to TGA in the human placental gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6146-6151.

Gong J, Yang J, Wu H, Gao J, Tang S, Ma S (2022) Spatial distribution and environmental impact factors of soil selenium in Hainan Island, China. *Sci Total Environ* 811:151329.

Grant K, Carey NM, Mendoza M, Schulze J, Pilon M, Pilon-Smits EA, van Hoewyk D (2011) Adenosine 5'-phosphosulfate reductase (APR2) mutation in *Arabidopsis*

implicates glutathione deficiency in selenate toxicity. *Biochem J* 438:325-335.

Griffith OW (1980) Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide Using Glutathione Reductase and 2-Vinylpyridine. *Anal Biochem* 106:207-212.

Guerrero B, Llugany M, Palacios O, Valiente M (2014) Dual effects of different selenium species on wheat. *Plant Physiol Biochem* 83:300-307.

Guignardi Z, Schiavon M (2017) Biochemistry of Plant Selenium Uptake and Metabolism. *Plant Ecophysiol* pp. 21–34.

Guo K, Yao Y, Yang M, Li Y, Wu B, Lin X (2020) Transcriptome sequencing and analysis reveals the molecular response to selenium stimuli in *Pueraria lobata* (willd.) Ohwi. *PeerJ* 8:1-18.

Gupta M, Gupta S (2017) An overview of selenium uptake, metabolism, and toxicity in plants. *Front Plant Sci* 7:2074.

Gupta UC, Gupta SC (2000) Selenium in soils and crops, its deficiencies in livestock and humans: Implications for management. *Commun Soil Sci Plant Anal* 31:1791-311807.

Gzyl-Malcher B, Filek M, Rudolphi-Skórska E, Sieprawska A (2017) Studies of Lipid Monolayers Prepared from Native and Model Plant Membranes in Their Interaction with Zearalenone and Its Mixture with Selenium Ions. *J Membr Biol* 250:273-284.

Gzyl-Malcher B, Filek M, Brezesinski G (2009) Influence of cadmium and selenate on the interactions between hormones and phospholipids. *Langmuir* 25:13071-13076.

Gzyl-Malcher B, Filek M, Brezesinski G (2011) Mixed DPPC/DPTAP monolayers at the air/water interface: Influence of indolilo-3-acetic acid and selenate ions on the monolayer morphology. *Langmuir* 27:10886-10893.

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S-Transferases. The first

enzymatic step in mercapturic acid formation. J Biol Chem 249:130-139.

Hadrup N, Ravn-Haren G (2020) Acute human toxicity and mortality after selenium ingestion: A review. J Trace Elem Med Biol 58:126435.

Haghighi M, Sheibanirad A, Pessarakli M (2016) Effects of selenium as a beneficial element on growth and photosynthetic attributes of greenhouse cucumber. J Plant Nutr 39:493-1498.

Hancock RD, Viola R (2005) Biosynthesis and catabolism of L-Ascorbic acid in plants. Crit Rev Plant Sci 24:167-188.

Handa N, Kohli SK, Sharma A, Thukral AK, Bhardway R, Abd Allah EF, Alqarawi AA, Ahmad P (2019) Selenium modulates dynamics of antioxidative defence expression, photosynthetic attributes and secondary metabolites to mitigate chromium toxicity in *Brassica juncea* L. plants. Environ Exp Bot 161:180-192.

Hariharan S, Dharmaraj S (2020) Selenium and selenoproteins: it's role in regulation of inflammation. Inflammopharmacology 28:667-695.

Hartikainen H, Ekholm P, Piironen V, Xue T, Koivu T, Yli-Halla M (1997) Quality of the ryegrass and lettuce yields as affected by selenium fertilization. Agric Food Sci in Finland 6:381-387.

Hartikainen H. (2005) Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. J Trace Elem Med Biol 18:309-318.

Hartikainen H, Xue T, Piironen V (2000) Selenium as an anti-oxidant and pro-oxidant in ryegrass. Plant Soil 225:193-200.

Hasanuzzaman M, Bhuyan MHMB, Anee TI, Parvin K, Nahar K, Mahmud JA, Fujita M (2019) Regulation of ascorbate-glutathione pathway in mitigating oxidative damage in plants under abiotic stress. Antioxidants 8:384.

Hasanuzzaman M, Hossai MA, Fujita M (2011) Selenium-induced up-regulation of the

antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system reduces salinity-induced damage in rapeseed seedlings. *Biol Trace Elem Res* 143:1704-1721.

Hasanuzzaman M, Hossain MA Fujita M (2012) Exogenous selenium pretreatment protects rapeseed seedlings from cadmium-induced oxidative stress by upregulating antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems. *Biol Trace Elem Res* 149:248-261.

Haug A, Graham RD, Christophersen OA, Lyons GH (2007) How to use the world's scarce selenium resources efficiently to increase the selenium concentration in food. *Microb Ecol Health Dis* 19:209-228.

Hawrylak-Nowak B (2013) Comparative effects of selenite and selenate on growth and selenium accumulation in lettuce plants under hydroponic conditions. *Plant Growth Regul* 70:149-157.

Hawrylak-Nowak B, Matraszek R, Pogorzelec M (2015) The dual effects of two inorganic selenium forms on the growth, selected physiological parameters and macronutrients accumulation in cucumber plants. *Acta Physiol Plant* 37:41.

Herschbach C, Scheerer U, Rennenberg H (2010) Redox states of glutathione and ascorbate in root tips of poplar (*Populus tremulaxP. alba*) depend on phloem transport from the shoot to the roots. *J Exp Bot*, 61:1065-1074.

Hirner A, Ladwig F, Stransky H, Okumoto S, Keinath M, Harms A, Frommer WB, Koch W (2006) Arabidopsis LHT1 Is a High-Affinity Transporter for Cellular Amino Acid Uptake in Both Root Epidermis and Leaf Mesophyll. *Plant Cell* 18:1931-1946.

Hoagland R, Arnon DI. (1950) The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil. California Agricultural Experiment station 347.

van Hoewyk D, Takahashi H, Inoue E, Hess A, Tamaoki M, Pilon-Smits EA (2008) Transcriptome analyses give insights into selenium-stress responses and selenium tolerance mechanisms in *Arabidopsis*. *Physiol Plant*, 132:236-253.

Hondal RJ, Marino SM, Gladyshev VN (2013) Selenocysteine in thiol/disulfide-like exchange reactions. *Antiox Redox Signal* 18:1675-1689.

Hoque MA, Uraji M, Banu MN, Mori IC, Nakamura Y, Murata Y (2010) The effects of methylglyoxal on glutathione s-transferase from *Nicotiana tabacum*. *Biosci Biotechnol Biochem* 74:2124-2126.

Hoque TS, Hossain MA, Mostofa MG, Burritt DJ, Fujita M, Tran LS (2016) Methylglyoxal: An emerging signaling molecule in plant abiotic stress responses and tolerance. *Front Plant Sci* 7: 1341.

Hossain MA, Nakano Y, Asada K (1984) Monodehydroascorbate Reductase in Spinach Chloroplasts and Its Participation in Regeneration of Ascorbate for Scavenging Hydrogen Peroxide. *Plant Cell Physiol* 25:385–395.

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. *Int J Mol Sci* 19:1913.

Huang CF, Yamaji N, Chen Z, Ma JF (2012) A tonoplast-localized half-size ABC transporter is required for internal detoxification of aluminium in rice. *Plant J* 69:857-867.

Huang S, Van Aken O, Schwarzländer M, Belt K, Millar AH (2016) The Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Cellular Signaling and Stress Response in Plants. *Plant Physiol* 171:1551-1559.

Hugouvieux V, Dutilleul C, Jourdain A, Reynaud F, Lopez V, Bourguignon J (2009) *Arabidopsis* putative selenium-binding protein1 expression is tightly linked to cellular sulfur demand and can reduce sensitivity to stresses requiring glutathione for tolerance. *Plant Physiol* 151:768-781.

Hurd-Karrer AM (1937) Comparative Toxicity of Selenates and Selenites to Wheat. *Am*

J Bot 24:720-728.

Idrees M, Cheema SA, Farooq M, Wakeel A (2018) Selenium nutrition for yield enhancement and grain biofortification of wheat through different application methods. *International J Agric Bio* 20:1701-1709.

Jiang Y, Zheng ZH, Bu Y, Ren CZ, Li JZ, Han JJ, Tao C, Zhang K, Wang XX, Lu GX, Li YJ, Hu YG (2015) Effects of selenium fertilizer on grain yield, Se uptake and distribution in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Plant Soil Environ* 61:371.377.

Jiang Y, Schiavon M, Lima LW, Tripti, Jones RR, El Mehdawi AF, Royer S, Zeng Z, Hu Y, Pilon-Smits EAH, Pilon M (2018) Comparison of ATP sulfurylase 2 from selenium hyperaccumulator *Stanleya pinnata* and non-accumulator *Stanleya elata* reveals differential intracellular localization and enzyme activity levels. *Biochim Biophys Acta Gen Sub* 1862: 2363-2371.

Johnson CC, Fordyce FM, Rayman MP (2010) Symposium on “Geographical and geological influences on nutrition”: Factors controlling the distribution of selenium in the environment and their impact on health and nutrition. *Proc Nutr Soc* 69:119-132.

Jones GD, Droz B, Greve P, Gottschalk P, Poffet D, McGrath SP, Seneviratne SI, Smith P, Winkel LH (2017) Selenium deficiency risk predicted to increase under future climate change. *Proc Natl Acad Sci USA*, 114:2848-2853.

Józwiak W, Politycka B (2019) Effect of selenium on alleviating oxidative stress caused by a water deficit in cucumber roots. *Plants* 8:217.

Kampfenkel K, Van Montagu M, Inzé D (1995) Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. *Anal Biochem* 225:165–167.

Kamran M, Xie K, Sun J, Wang D, Shi C, Lu Y, Gu W, Xu P (2020) Modulation of growth performance and coordinated induction of ascorbate-glutathione and methylglyoxal detoxification systems by salicylic acid mitigates salt toxicity in choysum

(*Brassica parachinensis* L.). Ecotoxicol Environ Saf 188:109877.

Karuppanapandian T, Moon JC, Kim C, Manoharan K, Kim W (2011) Reactive oxygen species in plants: Their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. Aust J Crop Sci 5:709-725.

Kaur C, Singla-Pareek SL, Sopory SK (2014) Glyoxalase and Methylglyoxal as Biomarkers for Plant Stress Tolerance. Crit Rev Plant Sci 33:429-456.

Kaur C, Ghosh A, Pareek A, Sopory SK, Singla-Pareek SL (2014) Glyoxalases and stress tolerance in plants. Biochem Soc Trans 42:485-490.

Kaur C, Sharma S, Singla-Pareek SL, Sopory SK (2016) Methylglyoxal detoxification in plants: Role of glyoxalase pathway. Indian J Plant Physiol 21:377-390.

Kaur M, Sharma S (2018) Influence of selenite and selenate on growth, leaf physiology and antioxidant defense system in wheat (*Triticum aestivum* L.). J Sci Food Agric 98:5700-5710.

Kaur S, Prakash P, Bak DH, Hong SH, Cho C, Chung MS, Kim JH, Lee S, Bai HW, Lee SY, Chung BY, Lee SS (2021) Regulation of Dual Activity of Ascorbate Peroxidase 1 From *Arabidopsis thaliana* by Conformational Changes and Posttranslational Modifications Front Plant Sci 12:678111.

Kaya C, Ashraf M, Alyemeni MN, Ahmad P (2020) The role of endogenous nitric oxide in salicylic acid-induced up-regulation of ascorbate-glutathione cycle involved in salinity tolerance of pepper (*Capsicum annuum* L.) plants. Plant Physiol Biochem 147:10-20.

Khaliq A, Aslam F, Matloob A, Hussain S, Geng M, Wahid A, ur Rehman H (2015) Seed priming with selenium: Consequences for emergence, seedling growth, and biochemical attributes of rice. Bio Trace Elem Res 166:236-244.

Khalofah A, Migdadi H, El-Harty E (2021) Antioxidant Enzymatic Activities and Growth

Response of Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) to Exogenous Selenium Application. *Plants (Basel)* 10: 719.

Kroh GE, Pilon M (2020) Regulation of iron homeostasis and use in chloroplasts. *Int J Mol Sci*, 21: 3395.

Kumar A, Singh RP, Singh PK, Awasthi S, Chakrabarty D, Trivedi PK, Tripathi RD (2014) Selenium ameliorates arsenic induced oxidative stress through modulation of antioxidant enzymes and thiols in rice (*Oryza sativa* L.). *Ecotoxicol* 23:1153-1163.

Łabanowska M, Filek M, Kościelniak J, Kurdziela M, Kuliśa E, Hartikainen H (2012) The effects of short-term selenium stress on Polish and Finnish wheat seedlings-EPR, enzymatic and fluorescence studies. *J Plant Physiol* 169:275-284.

Lamb C, Dixon RA (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Front Biosci (Elite Ed)* 1:142-152.

Lapaz AM, de Melo Santos LF, Pereira Yoshida CH, Heinrichs R, Campos M, dos Reis AR (2019) Physiological and toxic effects of selenium on seed germination of cowpea seedlings. *Bragantia* 78:498-508.

Lara TS, de Lima Lessa JH, de Souza KRD, Corguinha APB, Dias Martins FA, Lopes G, Guimaraes Guilherme LR (2019) Selenium biofortification of wheat grain via foliar application and its effect on plant metabolism. *J Food Compos Anal*, 81:10-18.

Lech T (2002) Suicide by sodium tetraoxoselenate(VI) poisoning. *Forensic Sci Int* 130:44-48.

LeDuc DL, AbdelSamie M, Montes-Bayon M, Wu CP, Reisinger SJ, Terry N (2006) Overexpressing both ATP sulfurylase and selenocysteine methyltransferase enhances selenium phytoremediation traits in Indian mustard. *Environ Pollut* 144:70-76.

Lewis T (2007) Accidental death from acute selenium poisoning. *Med J Aust* 186:487-488.

Li HF, McGrath SP, Zhao FJ (2008) Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite. *New Phytol* 178:92-102.

Li M, Ma F, Guo C, Liu J (2010) Ascorbic acid formation and profiling of genes expressed in its synthesis and recycling in apple leaves of different ages. *Plant Physiol Biochem* 48:216-224.

Li X, Wu Y, Li B, Yang Y, Yang Y (2018) Selenium accumulation characteristics and biofortification potentiality in turnip (*Brassica rapa* var. *rapa*) supplied with selenite or selenate. *Front Plant Sci* 8:2207.

Li Y, He M, Li J, Yao Y, Zhu L, Wu B (2021) Regulatory protein genes and microRNAs in response to selenium stimuli in *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi. *Metallomics*, 13:mfaa004.

Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Meth Enzymol* 148:350-382.

Lidon FC, Oliveira K, Ribeiro MM, Pelica J, Pataco I, Ramalho JC, Reboredo FH. (2018) Selenium biofortification of rice grains and implications on macronutrients quality. *J Cereal Sci* 81:22-29.

De Lima Lessa JH, Araujo AM, Ferreira LA, da Silva Júnior EC, de Oliveira C, Corguinha APB, Dias Martins FA, Pereira de Carvalho HW, Guimarães Guilherme LR, Lopes G (2019) Agronomic biofortification of rice (*Oryza sativa* L.) with selenium and its effect on element distributions in biofortified grains. *Plant Soil* 444:331-342.

Liu K, Cai M, Hu C, Sun X, Cheng Q, Jia W, Yang T, Nie M, Zhao X (2019) Selenium (Se) reduces Sclerotinia stem rot disease incidence of oilseed rape by increasing plant Se concentration and shifting soil microbial community and functional profiles. *Environ Pollut* 254:113051.

Liu T, Liu X, Zhou R, Chen H, Zhang H, Zhang B (2021) *De novo* transcriptome assembly and comparative analysis highlight the primary mechanism regulating the

response to selenium stimuli in oats (*Avena sativa* L.). *Front Plant Sci* 12:1-12.

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

Longchamp M, Castrec-Rouelle M, Biron P, Bariac T (2015) Variations in the accumulation, localization and rate of metabolization of selenium in mature *Zea mays* plants supplied with selenite or selenate. *Food Chem* 182:128-135.

Lopes G, Ávila FW, Guilherme LRG (2017) Selenium behavior in the soil environment and its implication for human health. *Cienc Agrotecnologia* 41:605-615.

Lu J, Holmgren A (2009) Selenoproteins. *J Biol Chem* 284:723-727.

Lyi SM, Heller LI, Rutzke M, Welch RM, Kochian LV, Li L (2005) Molecular and biochemical characterization of the selenocysteine Se-methyltransferase gene and se-methylselenocysteine synthesis in broccoli. *Plant Physiol* 138:409-420.

Lyons GH, Genc Y, Soole K, Stangoulis JCR, Liu F, Graham RD (2009) Selenium increases seed production in Brassica. *Plant Soil*, 318:73-80.

Ma F, Cheng L (2004) Exposure of the shaded side of apple fruit to full sun leads to up-regulation of both the xanthophyll cycle and the ascorbate-glutathione cycle. *Plant Sci* 166:1479-1486.

Ma YH, Ma FW, Zhang JK, Li MJ, Wang YH, Liang D (2008) Effects of high temperature on activities and gene expression of enzymes involved in ascorbate-glutathione cycle in apple leaves. *Plant Sci* 175:761-766.

Madhu, Kaur A, Tyagi S, Shumayla, Singh K, Upadhyay SK (2021) Exploration of glutathione reductase for abiotic stress response in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Rep* 41:639-654.

Mahmood Q, Ahmad R, Kwak SS, Rashid A, Anjum NA (2010) Ascorbate and glutathione: Protectors of plants in oxidative stress. In: Ascorbate-glutathione pathway and stress tolerance in plants. Springer Netherlands, pp. 209–229.

Makino N, Mochizuki Y, Bannai S, Sugita Y (1994) Kinetic studies on the removal of extracellular hydrogen peroxide by cultured fibroblasts. *J Biol Chem* 269:1020-1025.

Maleki SS, Mohammadi K, Movahedi A, Wu F, Ji KS (2020) Increase in cell wall thickening and biomass production by overexpression of *PmCesA2* in Poplar. *Front Plant Sci* 11:110.

Mao H, Wang J, Wang Z, Zan Y, Lyons G, Zou C (2014) Using agronomic biofortification to boost zinc, selenium, and iodine concentrations of food crops grown on the loess plateau in China. *J Soil Sci Plant Nutr* 14:459-470.

Mazarei M, Baxter HL, Li M, Biswal AK, Kim K, Meng X, Pu Y, Wuddineh WA, Zhang JY, Turner GB, Sykes RW, Davis MF, Udvardi MK, Wang ZY, Mohnen D, Ragauskas AJ, Labbé N, Stewart CN Jr (2018) Functional analysis of cellulose synthase *CesA4* and *CesA6* genes in switchgrass (*Panicum virgatum*) by overexpression and RNAi-mediated gene silencing. *Front Plant Sci* 9:1114.

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

El Mehdawi AF, Quinn CF, Pilon-Smits EAH (2011) Effects of selenium hyperaccumulation on plant-plant interactions: Evidence for elemental allelopathy? *New Phytol* 191:20-131.

Mendoza-Cózatl DG, Butko E, Springer F, Torpey JW, Komives EA, Kehr J, Schroeder JI (2008) Identification of high levels of phytochelatins, glutathione and cadmium in the phloem sap of *Brassica napus*. A role for thiol-peptides in the long-distance transport of cadmium and the effect of cadmium on iron translocation. *Plant J* 54:249-259.

Mézes M, Balogh K (2009) Prooxidant mechanisms of selenium toxicity - A review.

Acta Biol Szeged 53:15-18.

Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. Trends Plant Sci 9:490-498.

Sasan M, Maryam E, Fateme M, Maryam S, Babak S, Hassan M (2011) Plant glutathione S-transferase classification, structure and evolution. Afr J Biotechnol 10:8160-8165.

Molnárová M, Fargašová A (2009) Se(IV) phytotoxicity for monocotyledonae cereals (*Hordeum vulgare* L., *Triticum aestivum* L.) and dicotyledonae crops (*Sinapis alba* L., *Brassica napus* L.). J Hazard Mater 172:854-861.

Mostofa MG, Hossain MA, Siddiqui MN, Fujita M, Tran LS (2017) Phenotypical, physiological and biochemical analyses provide insight into selenium-induced phytotoxicity in rice plants. Chemosphere 178:212-223.

Mostofa MG, Ghosh A, Li ZG, Siddiqui MN, Fujita M, Tran LP (2018) Methylglyoxal – a signaling molecule in plant abiotic stress responses. Free Radic Biol Med 122:96-109.

Moulick D, Ghosh D, Chandra Santra S (2016) Evaluation of effectiveness of seed priming with selenium in rice during germination under arsenic stress. Plant Physiol Biochem 109:571-578.

Mroczek-Zdyrska M, Wójcik, M (2012) The influence of selenium on root growth and oxidative stress induced by lead in *Vicia faba* L. minor plants. Biol Trace Elem Res 147:320-328.

Mukherjee SP, Choudhuri MA (1983) Implications of water stress-induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in *Vigna* seedlings. Physiol Plant 58:66-170.

Murshed R, Lopez-Lauri F, Sallanon H (2008) Microplate quantification of enzymes of

the plant ascorbate-glutathione cycle. *Anal Biochem* 383:320-322.

Nagane T, Tanaka A, Tanaka R (2010) Involvement of *AtNAP1* in the regulation of chlorophyll degradation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 231:939-949.

Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 22:867-880.

Nancharaiah YV, Lens PNL (2015) Ecology and biotechnology of selenium-respiring bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 79:61-80.

Naseem M, Anwar-ul-Haq M, Wang X, Farooq N, Awais M, Sattar H, Malik HA, Mustafa A, Ahmad J, El-Esawi MA (2021) Influence of selenium on growth, physiology, and antioxidant responses in maize varies in a dose-dependent manner. *J Food Qual* 2021:6642018.

Natasha, Shahid M, Niazi NK, Khalid S, Murtaza B, Bibi I, Rashid MI (2018) A critical review of selenium biogeochemical behavior in soil-plant system with an inference to human health. *Environ Pollut* 234:915-934.

Nawaz F, Ahmad R, Ashraf MY, Waraich EA, Khan SZ (2015) Effect of selenium foliar spray on physiological and biochemical processes and chemical constituents of wheat under drought stress. *Ecotoxicol Environ Saf* 113:191-200.

Nesterov AI (1964) The clinical course of Kashin-Beck disease. *Arthritis Rheum* 7:29-40.

Ng BH, Anderson JW (1979) Light-dependent incorporation of selenite and sulphite into selenocysteine and cysteine by isolated pea chloroplasts. *Phytochemistry* 18:573-580.

Nicholls P, Fita I, Loewen PC (2001) Enzymology and structure of catalases. *Adv Inorg Chem* 51:51-106.

Noctor G, Queval G, Mhamdi A, Chaouch S, Foyer CH (2011) Glutathione. *The Arabidopsis Book* 9:1-32.

Nothstein AK, Eiche E, Riemann M, Nick P, Winkel LH, Göttlicher J, Steininger R, Brendel R, von Brasch M, Konrad G, Neumann T (2016) Tracking se assimilation and speciation through the rice Plant - Nutrient competition, toxicity and distribution. *PLoS ONE* 11:1-15.

Núñez ME, Hall DB, Barton JK (1999) Long-range oxidative damage to DNA: Effects of distance and sequence. *Chem Biol* 6:85-97.

Padmaja K, Prasad DDK, Prasad ARK (1989) Effect of selenium on chlorophyll biosynthesis in mung bean seedlings. *Phytochemistry* 28:3321-3324.

Panda SK, Chaudhury I, Khan MH (2003) Heavy metals induce lipid peroxidation and affect antioxidants in wheat leaves. *Biol Plant* 46:289-294.

Pang CH, Wang BS (2010) Role of ascorbate peroxidase and glutathione reductase in ascorbate-glutathione cycle and stress tolerance in plants. In: *Ascorbate-glutathione pathway and stress tolerance in plants*. Springer Netherlands, pp. 91-113.

Paolacc AR, Tanzarella OA, Porceddu E, Ciaffi M (2009) Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. *BMC Mol Biol* 10:1-27.

Pilon-Smits EA, Hwang S, Mel Lytle C, Zhu Y, Tai JC, Bravo RC, Chen Y, Leustek T, Terry N (1999) Overexpression of ATP sulfurylase in Indian mustard leads to increased selenate uptake, reduction, and tolerance. *Plant Physiol* 119:123-132.

Pilon-smits EAH, Quinn CF (2010) Selenium Metabolism in Plants. In: *Cell Biology of Metals and Nutrients* pp. 225-241

Pilon M, Owen JD, Garifullina GF, Kurihara T, Mihara H, Esaki N, Pilon-Smits EA (2003) Enhanced Selenium Tolerance and Accumulation in Transgenic Arabidopsis

Expressing a Mouse Selenocysteine Lyase 1', *Plant Physiol* 131:1250-1257.

Polidoros AN, Scandalios JG (1999) Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.). *Physiol Plant* 106:112-120.

Premarathna L, McLaughlin MJ, Kirby JK, Hettiarachchi GM, Stacey S, Chittleborough DJ (2012) Selenate-enriched urea granules are a highly effective fertilizer for selenium biofortification of paddy rice grain. *J Agric Food Chem* 60:6037-6044.

Prins CN, Hantzis LJ, Quinn CF, Pilon-Smits EA. (2011) Effects of selenium accumulation on reproductive functions in *Brassica juncea* and *Stanleya pinnata*. *J Exp Bot* 62:5633-5640.

Puglisi I, Lo Cicero L, Lo Piero AR (2013) The glutathione S-transferase gene superfamily: An *in silico* approach to study the post translational regulation. *Biodegradation* 24:471-485.

Racker, E (1955) Glutathione reductase from bakers' yeast and beef liver. *J Biol Chem* 217:855-865.

Rahman M, Rahman K, Sathi KS, Alam MM, Nahar K, Fujita M, Hasanuzzaman M (2021) Supplemental selenium and boron mitigate salt-induced oxidative damages in *Glycine max* L. *Plants*, 10:1-16.

Ramos SJ, Faquin V, Guilherme LRG, Castro EM, Ávila FW, Carvalho GS, Oliveira C (2010) Selenium biofortification and antioxidant activity in lettuce plants fed with selenate and selenite. *Plant Soil Environ* 56:584-588.

Ramos SJ, Yuan Y, Faquin V, Guilherme LRG, Li L (2011) Evaluation of genotypic variation of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) in response to selenium treatment. *J Agric Food Chem* 59:3657-3665.

Ramos SJ, Rutzke MA, Hayes RJ, Faquin V, Guilherme LR, Li L (2011) Selenium

accumulation in lettuce germplasm. *Planta* 233:649-660.

Ren H, Li X, Guo L, Wang L, Hao X, Zeng J (2022) Integrative Transcriptome and Proteome Analysis Reveals the Absorption and Metabolism of Selenium in Tea Plants [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]. *Front Plant Sci* 13:1-14.

Reznick AZ, Packer L (1994) Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Meth Enzymol* 233:357-363.

Ríos JJ, Rosales MA, Blasco B, Cervilla CM, Romero L, Ruiz JM (2008) Biofortification of Se and induction of the antioxidant capacity in lettuce plants. *Sci Hortic* 116:248-255.

Ríos JJ, Blasco B, Cervilla CM, Rosales MA, Sanchez-Rodriguez E, Romero L, Ruiz JM (2009) Production and detoxification of H₂O₂ in lettuce plants exposed to selenium. *Ann Appl Biol* 154:107-116.

Ros GH, van Rotterdam AMD, Bussink DW, Bindraban PS (2016) Selenium fertilization strategies for bio-fortification of food: an agro-ecosystem approach. *Plant Soil* 404:99-112.

Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG (1973) Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179:588-590.

Saidi I, Chtourou Y, Djebali W (2014) Selenium alleviates cadmium toxicity by preventing oxidative stress in sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. *J Plant Physiol* 171:85-91.

Saito R, Yamamoto H, Makino A, Sugimoto T, Miyake C (2011) Methylglyoxal functions as Hill oxidant and stimulates the photoreduction of O₂ at photosystem I: A symptom of plant diabetes. *Plant Cell Environ* 34:1454-1464.

Sali A, Zeka D, Fetahu S, Rusinovci I, Kaul HP (2018) Selenium supply affects

chlorophyll concentration and biomass production of maize (*Zea mays* L.). *J Land Manage Food Environ* 69:249-255.

Schiavon M, Pilon M, Malagoli M, Pilon-Smits EA (2015) Exploring the importance of sulfate transporters and ATP sulphurylases for selenium hyperaccumulation-a comparison of *Stanleys pinnata* and *Brassica juncea* (Brassicaceae). *Front Plant Sci* 6:1-13.

Schiavon M, Pilon-Smits EA, Citta A, Folda A, Rigobello MP, Dalla Vecchia F (2016) Comparative effects of selenate and selenite on selenium accumulation, morphophysiology, and glutathione synthesis in *Ulva australis*. *Environ Sci Pollut Res* 23:15023-15032.

Schomburg L, Schweizer U, Köhrle J (2004) Selenium and selenoproteins in mammals: Extraordinary, essential, enigmatic. In: *Cellular and Molecular Life Sciences*. Birkhauser Verlag Basel, pp. 1988-1995.

Schwarz K, Foltz CM (1957) Selenium as an integral part of Factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J Am Chem Soc* 79:3292-3293.

Seppänen M, Turakainen M, Hartikainen H (2003) Selenium effects on oxidative stress in potato. *Plant Sci* 165: 311-319.

Sharifi P, Amirnia R, Torkian M, Bidabadi SS (2021) Protective role of exogenous selenium on salinity - stressed *Stachys byzantine* plants. *J Soil Sci Plant Nutr* 21:2660-2672.

Siegel BZ, Galston AW (1967) The Isoperoxidases of *Pisum sativum*. *Plant Physiol* 42:221-226.

Sies H (2017) Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol* 11:613-619.

Silva VM, Bolet EHM, Lanza MGDB, Lavres J, Martins JT, Santos EF, Reis AR dos

(2018) Physiological, biochemical, and ultrastructural characterization of selenium toxicity in cowpea plants. *Environ Exp Bot* 150:172-182.

Silva VM, Rimoldi Tavanti RF, Gratão PL, Alcock TD, Reis ARD (2020) Selenate and selenite affect photosynthetic pigments and ROS scavenging through distinct mechanisms in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) walp) plants. *Ecotoxicol Environ Saf* 201:110777.

Sors TG, Ellis DR, Salt DE (2005) Selenium uptake, translocation, assimilation and metabolic fate in plants. *Photosynth Res* 86:373-89.

de Souza MP, Pilon-Smiths EAH, Lytle CM, Hwang S, Tai J, Honma TSU, Yeh L, Terry N (1998) Rate-limiting steps in selenium assimilation and volatilization by Indian Mustard. *Plant Physiol* 117:1487-1494.

Sreekala M, Lalitha K (1998) Selenium-mediated differential response of beta-glucosidase and beta-galactosidase of germinating *Trigonella foenum-graecum*. *Biol Trace Elem Res* 64:247-258.

Stoffaneller R, Morse NL (2015) A review of dietary selenium intake and selenium status in Europe and the Middle East. *Nutrients*, 7:1494-1537.

Štolfa I, Velki M, Vuković R, Ečimović S, Katanić Z, Lončarić Z (2017) Effect of different forms of selenium on the plant-soil-earthworm system. *J Plant Nutr Soil Sci* 180:231-240.

Strauss RG, Snyder EL, Wallace PD, Rosenberger TG (1980) Oxygen-detoxifying enzymes in neutrophils of infants and their mothers. *J Lab Clin Med* 95:897-904.

Svingen BA, O'Neal FO, Aust SD (1978) The role of superoxide and singlet oxygen in lipid peroxidation. *Photochem Photobiol* 28:803-809.

Szalai G, Kellos T, Galiba G, Kocsy G (2009) Glutathione as an antioxidant and regulatory molecule in plants under abiotic stress conditions. *J Plant Growth Regul*

28:66-80.

Szerement J, Szatanik-Kloc A, Mokrzycki J, Mierzwa-Hersztek M (2021) Agronomic biofortification with Se, Zn, and Fe: An effective strategy to enhance crop nutritional quality and stress defense- A Review. *J Soil Sci Plant Nutr* 22:1129-1159.

Takagi D, Inoue H, Odawara M, Shimakawa G, Miyake C (2014) The calvin cycle inevitably produces sugar-derived reactive carbonyl methylglyoxal during photosynthesis: A potential cause of plant diabetes. *Plant Cell Physiol* 55:333-340.

Thavarajah D, Ruszkowski J, Vandenberg A (2008) High potential for selenium biofortification of lentils (*Lens culinaris* L.). *J Agric Food Chem* 56:10747-10753.

Thavarajah D, Thavarajah P, Vial E, Gebhardt M, Lacher C, Kumar S, Combs GF (2015) Will selenium increase lentil (*Lens culinaris* Medik) yield and seed quality? *Front Plant Sci* 6:356.

Tian M, Hui M, Thannhauser TW, Pan S, Li L (2017) Selenium-induced toxicity is counteracted by sulfur in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*). *Front Plant Sci* 8:1-13.

Tian Y, Fan M, Qin Z, Lv H, Wang M, Zhang Z, Zhou W, Zhao N, Li X, Han C, Ding Z, Wang W, Wang ZY, Bai MY (2018) Hydrogen peroxide positively regulates brassinosteroid signaling through oxidation of the BRASSINAZOLE-RESISTANT1 transcription factor. *Nat Commun* 9:1063.

Tosatto SC, Bosello V, Fogolari F, Mauri P, Roveri A, Toppo S, Flohé L, Ursini F, Maiorino M (2008) The catalytic site of glutathione peroxidases. *Antioxid Redox Signal* 10:1515-1526.

Tyagi S, Shumayla, Madhu, Singh K, Upadhyay SK (2021) Molecular characterization revealed the role of catalases under abiotic and arsenic stress in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Hazard Mater* 403:123585.

Ul Hassan Z, Gill RA, Ali S, Mwamba TM, Ali B, Wang J, Huang Q, Aziz R, Zhou W (2019) Dual behavior of selenium: Insights into physio-biochemical, anatomical and molecular analyses of four *Brassica napus* cultivars. *Chemosphere* 225:329-341.

Valassakis C, Livanos P, Minopetrou M, Haralampidis K, Roussis A (2018) Promoter analysis and functional implications of the selenium binding protein (SBP) gene family in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Physiol* 224-225:19-29.

Verma S, Dubey RS (2003) Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Sci* 164:645-655.

Wachter A, Wolf S, Steininger H, Bogs J, Rausch T (2005) Differential targeting of GSH1 and GSH2 is achieved by multiple transcription initiation: Implications for the compartmentation of glutathione biosynthesis in the Brassicaceae. *Plant J* 41:15-30.

Wang CQ, Xu HJ, Liu T (2011) Effect of selenium on ascorbate-glutathione metabolism during PEG-induced water deficit in *Trifolium repens* L. *J Plant Growth Reg* 30:436-444.

Wang D, Grieve CM, Suarez DL (2005) Composition of irrigation water salinity affects growth characteristics and uptake of selenium and salt ions by soybean. *J Plant Nutr* 28:1073-1088.

Wang G, Zhang H, Lai F, Wu H (2016) Germinating peanut (*Arachis hypogaea* L.) seedlings attenuated selenite-induced toxicity by activating the antioxidant enzymes and mediating the ascorbate-glutathione cycle. *J Agric Food Chem* 64:1298-1308.

Wang M, Ali F, Wang M, Dinh QT, Zhou F, Bañuelos GS, Liang D (2020) Understanding boosting selenium accumulation in Wheat (*Triticum aestivum* L.) following foliar selenium application at different stages, forms, and doses. *Environ Sci Pollut Res* 27:717-728.

Wang M, Ali F, Qi M, Peng Q, Wang M, Banuelos GS, Miao S, Li Z, Dinh QT, Liang D (2021) Insights into uptake, accumulation, and subcellular distribution of selenium

among eight wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars supplied with selenite and selenate. *Ecotoxicol Environ Saf* 207:111544.

Wang YD, Wang X, Wong Y (2012) Proteomics analysis reveals multiple regulatory mechanisms in response to selenium in rice. *J Proteom* 75:849-1866.

Wang Y, Ye XY, Qiu XM, Li ZG (2019) Methylglyoxal triggers the heat tolerance in maize seedlings by driving AsA-GSH cycle and reactive oxygen species-/methylglyoxal-scavenging system. *Plant Physiol Biochem* 138:91-99.

Wang Z, Gao Y (2001) Biogeochemical cycling of selenium in Chinese environments. *J Appl Geochem* 16:1345-1351.

White PJ, Bowen HC, Parmaguru P, Fritz M, Spracklen WP, Spiby RE, Meacham MC, Mead A, Harriman M, Trueman LJ, Smith BM, Thomas B, Broadley MR (2004) Interactions between selenium and sulphur nutrition in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 55:1927-1937.

White PJ, Broadley MR (2005) Biofortifying crops with essential mineral elements. *Trends Plant Sci* 10:586-593.

White PJ, Broadley MR (2009) Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytol* 182:49-84.

Winkel LH, Vriens B, Jones GD, Schneider LS, Pilon-Smits E, Bañuelos GS (2015) Selenium cycling across soil-plant-atmosphere interfaces: A critical review. *Nutrients* 7:4199-4239.

Wu Z, Bañuelos GS, Lin ZQ, Liu Y, Yuan L, Yin X, Li M (2015) Biofortification and phytoremediation of selenium in China. *Front Plant Sci* 6:136.

Wu Z, Liu S, Zhao J, Wang F, Du Y (2017) Comparative responses to silicon and selenium in relation to antioxidant enzyme system and the glutathione-ascorbate cycle

in flowering Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *utilis*) under cadmium stress. *Environ Exp Bot* 133:1-11.

Ximénez-Embún P, Alonso I, Madrid-Albarrán Y, Cámara C (2004) Establishment of selenium uptake and species distribution in lupine, indian mustard, and sunflower plants. *J Agric Food Chem* 52:832-838.

Xue T, Hartikainen H. (2000) Association of antioxidative enzymes with the synergistic effect of selenium and UV irradiation in enhancing plant growth. *Agric Food Sci* 9: 177-186.

Xue T, Hartikainen H, Piironen V (2001) Antioxidative and growth-promoting effect of selenium on senescing lettuce. *Plant Soil*, 237:55-61.

Yadav SK, Singla-Pareek SL, Reddy MK, Sopory SK (2005) Transgenic tobacco plants overexpressing glyoxalase enzymes resist an increase in methylglyoxal and maintain higher reduced glutathione levels under salinity stress. *FEBS Lett* 579:6265-6271.

Yamada H, Kang Y, Aso T, Uesugi H, Fujimura T, Yonebayashi K (1998) Chemical forms and stability of selenium in soil. *Soil Sci Plant Nutr* 44:385-391.

Yao X, Chu J, Wang G (2009) Effects of selenium on wheat seedlings under drought stress. *Biol Trace Elem Res* 130:283–290.

Yao X, Chu JZ, He XL, Ba CJ (2011) Protective role of selenium in wheat seedlings subjected to enhanced UV B radiation. *Russ J Plant Physiol* 58:283-289.

Yildiztugay E, Ozfidan-Konakci C, Kucukoduk M (2016) The impact of selenium application on enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems in *Zea mays* roots treated with combined osmotic and heat stress. *Arch Agron Soil Sci* 63:261-275.

Yin L, Wang S, Eltayeb AE, Uddin MI, Yamamoto Y, Tsuji W, Takeuchi Y, Tanaka K (2010) Overexpression of dehydroascorbate reductase, but not monodehydroascorbate reductase, confers tolerance to Aluminum stress in transgenic

Tobacco. *Planta* 231:609–621.

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

Zhang C hua, Ge Y (2008) Response of glutathione and glutathione s-transferase in rice seedlings exposed to cadmium stress. *Rice Sci* 15:73-76.

Zhang D, Dong T, Ye J, Hou Z (2017) Selenium accumulation in wheat (*Triticum aestivum* L) as affected by coapplication of either selenite or selenate with phosphorus of either selenite or selenate with phosphorus. *Soil Sci Plant Nutr* 63:1-8.

Zhang J, Kirkham MB (1996) Enzymatic responses of the ascorbate-glutathione cycle to drought in sorghum and sunflower plants. *Plant Sci* 113:139-147.

Zhang L, Hu B, Li W, Che R, Deng K, Li H, Yu F, Ling H, Li Y, Chu C (2014) OsPT2, a phosphate transporter, is involved in the active uptake of selenite in rice. *New Phytol* 201:1183-1191.

Zhang M, Tang S, Huang X, Zhang F, Pang Y, Huang Q, Yi Q (2014) Selenium uptake, dynamic changes in selenium content and its influence on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in rice (*Oryza sativa* L.). *Environ Exp Bot* 107:39-45.

Zhang Y, Zheng L, Yun L, Ji L, Li G, Ji M, Shi Y, Zheng X (2022) Catalase (CAT) gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.): Evolution, Expression pattern and function analysis. *Int J Molr Sci* 23:1-19.

Zhao W, Xu W, Chai Y, Zhou X, Zhang M, Xie W (2017) Differences in selenium uptake, distribution and expression of selenium metabolism genes in Tomatoes. *Int J Agric Biol* 19:528-534.

Zhao W, Wang W, Weihong X, Chai Y, Xie W, Chi S (2018) Effects of selenium on activity of glutathione peroxidase and expression of selenium metabolism-related genes in Brassica. *Toxicol Environ Chem* 100:191-204.

Zhao XQ, Mitani N, Yamaji N, Shen RF, Ma JF (2010) Involvement of silicon influx transporter OsNIP2;1 in selenite uptake in rice. *Plant Physiol* 153:1871-1877.

Zhou Y, Tang Q, Wu M, Mou D, Liu H, Wang S, Zhang C, Ding L, Luo J (2018) Comparative transcriptomics provides novel insights into the mechanisms of selenium tolerance in the hyperaccumulator plant *Cardamine hupingshanensis*. *Sci Rep* 8:1-17.

Zhu YG, Pilon-Smiths EAH, Zhao FJ, Williams PN, Meharg AA (2009) Selenium in higher plants: understanding mechanisms for biofortification and phytoremediation. *Trends Plant Sci* 14:436-442.

Zhu Z, Chen Y, Shi G, Zhang X (2017) Selenium delays tomato fruit ripening by inhibiting ethylene biosynthesis and enhancing the antioxidant defense system. *Food Chem* 219:179-184.

7. SAŽETAK

Selen (Se) je esencijalan element za ljude i životinje, a njegov nedovoljan unos može uzrokovati različita patofiziološka stanja. Biljke, koji su glavni izvor Se u ishrani ljudi i životinja, vrlo često imaju nedostatnu koncentraciju Se te se njegov nedostatak uglavnom rješava agronomskom biofortifikacijom. Cilj takve strategije je aplikacijom Se povećati njegovu koncentraciju i bioraspoloživost u jestivim dijelovima poljoprivrednih usjeva kao što je pšenica (*Triticum aestivum* L.) uslijed čega koncentracija Se u tlu i/ili u biljci raste, što uz prevelike količine može imati i negativan učinak na biljke. Biljke Se iz tla usvajaju korijenom u obliku selenata ili selenita te se zbog kemijske sličnosti sa sumporom (S) asimilacija odvija sulfatnim putem. Pri manjim koncentracijama, Se djeluje pozitivno na rast i razvoj biljaka te djeluje kao antioksidans, dok pri većim koncentracijama Se djeluje kao prooksidans te uzrokuje prekomjerno nakupljanje reaktivnih kisikovih jedinki (ROS) što može dovesti do oksidacijskih oštećenja biološki važnih makromolekula. Prooksidacijsko djelovanje Se je, uz zamjenu Cys sa SeCys u proteinima, jedan od glavnih uzroka njegove toksičnosti, a najčešće je vezan za oksidaciju tiola kao što je glutation (GSH). GSH, koji je dio askorbat-glutationskog ciklusa, ima središnju ulogu u antioksidacijskom sustavu te sudjeluje u redukciji selenata i selenita. Budući da Se interferira s brojnim metaboličkim putevima u biljci, cilj ovog rada je bio odrediti utjecaj pet različitih koncentracija selenata i selenita na oksidacijski status te antioksidacijske i druge obrambene odgovore izdanka i korijena klijanaca pšenice te utvrditi tkivno-specifične razlike u biokemijskom i molekularnom odgovoru. Povećanje primijenjenih koncentracija Se uzrokovalo je povećanje Se u izdanku i korijenu klijanaca pšenice, s naglaskom da je selenat uzrokovao veću akumulaciju Se u izdanku, a selenit u korijenu što čini osnovu tkivno-specifičnog odgovora. Odgovor pšenice na prisutni Se se pratio na morfo-fiziološkoj, biokemijskoj i molekularnoj razini. Analizom morfo-fizioloških svojstava kao što su klijavost sjemena, prinos biomase izdanka i korijena te koncentracije klorofila i karotenoida utvrđeno je kako selenit ima niži prag toksičnosti od selenata. Naime, selenit je pri manjim koncentracijama, u odnosu na selenat, uzrokovao smanjenje spomenutih morfo-fizioloških parametara. Mjerenje pokazatelja oksidacijskog stresa, razine LPO i količine vodikovog peroksida (H_2O_2), pokazalo je kako Se u klijanima pšenice ne uzrokuje oksidacijski stres što može biti posljedica uloge Se u zaštiti biomembrana od lipidne peroksidacije, ali i posljedica tkivno-specifičnog utjecaja Se na antioksidacijske i druge detoksikacijske mehanizme. Tako se uklanjanje H_2O_2 u izdanku i korijenu vršilo različitim mehanizmima, ovisno o kemijskom obliku i

koncentraciji primijenjenog Se. H_2O_2 nastao uslijed tretmana selenatom primarno uklanja GPOD i u korijenu i izdanku, dok u izdanku H_2O_2 nastao uslijed tretmana selenitom primarno uklanjaju CAT i GPX, a u korijenu njihovu ulogu preuzima APX. Ipak, najveće koncentracije oba oblika Se su povećale aktivnosti i dodatnih antioksidacijskih enzima. S obzirom na značajnu ulogu GSH kao supstrata antioksidacijskih i drugih detoksikacijskih enzima, mjerena je njegova koncentracija te aktivnosti enzima uključenih u njegov metabolizam. Utvrđeno je povećanje količine GSH u izdanku klijanaca pri gotovo svim tretmanima Se, dok je u korijenu količina bila nepromijenjena. Porast GSH kao i porast ekspresije gena *cs* upućuju na sintezu *de novo*, dok je selenit aktivirao regeneraciju GSH iz GSSG-a putem povećane aktivnosti GR-a koja je bila praćena i povećanom ekspresijom. Porast ekspresije *cs* upućuje i na enzimsku redukciju selenida do SeCys u izdancima klijanaca uslijed izlaganja selenatu. GSH ima ključnu ulogu i u detoksikaciji metilglioksala u kojoj sudjeluje enzim glioksalaza I čija je tkivno-specifična aktivnost ovisila o obliku i koncentraciji Se. Zbog važne uloge GSH u askorbat-glutationskom ciklusu istraživao se učinak Se na koncentraciju askorbata (AsA) kao značajnog antioksidansa kao i učinak Se na aktivnosti i ekspresiju enzima koji sudjeluju u njegovoj regeneraciji u stanicama (APX, DHAR i MDHAR). Tako su manje koncentracije oba oblika Se uzrokovala povećanje koncentracije AsA-e u izdancima koja je vjerojatno rezultat sinteze *de novo*, dok je pri najvećoj koncentraciji AsA nastala aktivnom regeneracijom putem povećanih aktivnosti enzima DHAR-a i MDHAR-a koja je praćena i povećanom genskom ekspresijom. S druge strane, u korijenu klijanaca pšenice regeneraciju AsA-e je uglavnom obavljao DHAR jer je aktivnost MDHAR-a bila značajno smanjena vrlo vjerojatno zbog ograničene količine dostupnog NADPH. Osim na biokemijskoj razini, pratio se odgovor klijanaca i na razini transkripcije. Najizraženije promjene u ekspresiji gena enzima uključenih u metabolizam GSH bile su prisutne u izdancima pšenice i to pri najvećim koncentracijama oba oblika Se. Iako je većinom promjena ekspresija gena bila praćena promjenom aktivnosti enzima, izostanak takve korelacije bila je posljedica posttranskripcijskih i/ili posttranslacijskih modifikacija većinom nastalih uslijed ugradnje selenocisteina umjesto cisteina u aktivnom mjestu GR-a, GPX-a, APX-a i GST-a koja u potpunosti mijenja strukturu i funkciju navedenih enzima.

Ovo istraživanje doprinosi boljem razumijevanju fiziološkog, biokemijskog i molekularnog odgovora pšenice na selen, te razvoju novih spoznaja o mehanizama toksičnosti uvjetovanih koncentracijom, kemijskim oblikom i tipom biljnog organa. Uvid

u biokemijske i molekularne mehanizme tolerancije i akumulacije selena, dobiven ovim istraživanjem, pridonosi razvoju učinkovitijih strategija biofortifikacije, a koje između ostaloga uključuju genetičku manipulaciju metaboličkim i drugim detoksikacijskim putovima.

8. SUMMARY

Selenium (Se) is an essential microelement to humans and animals, and its insufficient intake can cause various pathophysiological conditions. Plants, which are the primary source of Se in human and animal nutrition, often have an insufficient concentration of Se, and its deficiency is mainly solved by agronomic biofortification. Biofortification aims to increase Se concentration and bioavailability in edible parts of crops such as wheat (*Triticum aestivum* L.), resulting in increased concentration of Se in soil and/or plants which can be harmful. Plant roots uptake Se as selenate and selenite, and due to chemical similarity to sulfur, Se assimilation takes place via the sulphate pathway. At lower concentrations, Se is a beneficial element to plant growth and development and acts as an antioxidant. In comparison, at higher concentrations, Se acts as a prooxidant and causes excessive accumulation of reactive oxygen species (ROS), which can lead to oxidative damage of biomolecules. The prooxidative action of Se, in addition to the replacement of Cys with SeCys in proteins, is one of the leading causes of its toxicity in the plant. It is often associated with the oxidation of thiols such as glutathione (GSH). GSH, which is part of the ascorbate-glutathione cycle, plays a central role in the antioxidant system and participates in selenate and selenite reduction. Since Se interferes with numerous metabolic pathways in the plant, this study aimed to determine the effect of five different concentrations of selenate and selenite on oxidative status and antioxidant and other detoxifying system of shoots and roots to determine biochemical and molecular tissue-specific responses. The increase in applied Se concentrations caused an increase in Se shoot and root concentrations, emphasizing that selenate caused a greater accumulation of Se in the shoot and selenite in the root, which represents the basis of the tissue-specific response. Wheat response to Se was monitored at the morpho-physiological, biochemical, and molecular levels. Morpho-physiological analyses such as seed germination, shoot and root biomass, and chlorophyll and carotenoid concentrations revealed that selenite has a lower toxicity threshold than selenate. Namely, selenite caused a decrease in the mentioned morpho-physiological parameters at lower concentrations than selenate. Measurement of oxidative stress indicators, LPO and H₂O₂, showed that Se did not cause oxidative stress in wheat seedlings, which may be due to the role of Se in protecting biomembranes from LPO, but also due to tissue-specific antioxidant and other detoxification mechanisms response. Thus, the removal of H₂O₂ in the shoot and root was performed by different mechanisms, depending on the chemical form and concentration of the applied Se. H₂O₂ originated from selenate treatment primarily

removes GPOD both in shoots and roots. Shoot H_2O_2 originated from selenite treatment primarily removes CAT and GPX, and APX takes over the role of H_2O_2 removal in the root. However, the highest concentrations of both forms of Se increased the activity of additional antioxidant enzymes. Given the significant role of GSH as a substrate of antioxidant and other detoxifying enzymes, its concentration and enzyme activities involved in its metabolism were measured. It was found that Se increased the concentration of GSH in the wheat shoot in almost all treatments, while the concentration in the root remained unchanged. The increase in GSH due to exposure to selenate indicates its synthesis *de novo*, characterized by the increase in *cs* gene expression, while selenite activated the regeneration of GSH from GSSG through increased GR activity, which was accompanied by increased *gr* expression. The increase in *cs* expression also indicates the enzymatic reduction of selenide to SeCys in shoots due to selenate exposure. GSH also plays a key role in the detoxification of methylglyoxal, where the enzyme glyoxalase plays an important role and whose tissue-specific activity depends on the form and concentration of Se. Due to the critical role of GSH in the ascorbate-glutathione cycle, the effect on ascorbate concentration (AsA) and the effect on the activity and expression of enzymes (APX, DHAR, and MDHAR) that affect its concentration were investigated. Thus, lower concentrations of both forms of Se caused an increase in AsA concentration in shoots, probably due to synthesis *de novo*. In contrast, at the highest Se concentration, AsA was formed by active regeneration through increased activity of DHAR and MDHAR enzymes accompanied by increased *dhar* and *mdhar* gene expression. On the other hand, in the wheat root, the regeneration of AsA was mainly performed by DHAR because the activity of MDHAR was significantly reduced, very likely due to the limited amount of available NADPH.

In addition to the biochemical level, the wheat response was monitored at the transcriptional level. At the level of gene expression of enzymes involved in GSH metabolism, the most pronounced changes were visible in wheat shoots at the highest concentrations of both forms of Se. Although changes in enzyme activity accompanied most changes in gene expression, the absence of such a correlation was due to posttranscriptional and/or posttranslational modifications primarily as a result of the incorporation of selenocysteine instead of cysteine into the active site of GR, GPX, APX, and GST what can completely change the structure and function of these enzymes.

This research contributes to a better understanding of the physiological, biochemical, and molecular response of wheat to Se. It also contributes to the development of new insights into the mechanisms of toxicity depending on concentration, chemical form and type of plant organ. The insight into the biochemical and molecular mechanisms of Se tolerance and accumulation obtained by this research contributes to the development of more effective biofortification strategies, including genetic manipulation of metabolic and other detoxification pathways.

9. ŽIVOTOPIS

Ana Vuković je rođena 24. veljače 1992. godine u Slavonskom Brodu. Nakon završene Opće gimnazije u Županji, upisala je preddiplomski studij biologije na Odjelu za biologiju, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Godine 2013. je isti završila, stekla akademski naziv sveučilišne prvostupnice (baccalaurea) biologije te iste godine na Odjelu upisala diplomski znanstveni studij biologije. Diplomirala je na Odjelu za biologiju 2016. godine te stekla akademski naziv magistra biologije (mag.biol.). Tijekom studiranja bila je član nekoliko studentskih udruga, a za izvrsne uspjehe je dobila nekoliko nagrada Odjela za biologiju te Rektorovu nagradu. Također, tijekom 2015. godine, boravila je šest tjedana na Sveučilištu u Łodzu (Poljska) obavljajući IAESTE stručnu praksu.

Krajem studenog 2016. godine zaposlena je na Odjelu za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku kao asistent, a u akademskoj godini 2016/2017 upisala poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti. Sudjeluje u izvođenju praktičnog dijela nastave iz kolegija preddiplomskog i diplomskog studija: Biokemija 1, Biokemija 2, Biokemija 3 i Molekularna biologija. U sklopu ERASMUS+ programa mobilnosti nastavnog i nenastavnog osoblja na stručnom usavršavanju 2018. godine provela je dva tjedna na Sveučilištu u Hannoveru u Njemačkoj (Institute for Radioecology and Radiation Protection), 2019. godine je boravila tjedan dana na Sveučilištu u Lisabonu u Portugalu (The Faculty of Sciences and Technology) te 2021. godine je boravila 5 tjedana na Sveučilištu u Kopenhagenu u Danskoj (Department of Plant and Environmental Sciences).

Ana Vuković je objavila 2 znanstvena rada kao prvi autor, 8 znanstvenih radova kao koautor te je sudjelovala na 15 znanstvenih skupova.

Član je Hrvatskog društva za biljnu biologiju.

10. POPIS PUBLIKACIJA

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima:

Vuković, Rosemary; Štolfa Čamagajevac, Ivna; **Vuković, Ana**; Šunić, Katarina; Begović, Lidija; Mlinarić, Selma; Sekulić, Ramona; Sabo, Nikolina; Španić, Valentina. Physiological, Biochemical and Molecular Response of Different Winter Wheat Varieties under Drought Stress at Germination and Seedling Growth Stage // Antioxidants, 11 (2022), 4; 1-26

Matić, Magdalena; Vuković, Rosemary; Vrandečić, Karolina; Štolfa Čamagajevac, Ivna; **Vuković, Ana**; Ćosić, Jasenka; Dvojković, Krešimir; Novoselović, Dario. The effect of nitrogen fertilization and fusarium culmorum inoculation on the biomarkers of oxidative stress in wheat flag leaves // Poljoprivreda, 27 (2021), 2; 15-24 doi:10.18047/poljo.27.2.2

Štolfa Čamagajevac, Ivna; Vuković, Rosemary; Vuković, Kristina; **Vuković, Ana**; Ivezić, Vladimir; Žuna Pfeiffer, Tanja; Krstin, Ljiljana; Lončarić, Zdenko. Wheat leaf antioxidative status — variety-specific mechanisms of zinc tolerance during biofortification // Plants, 10 (2021), 10; 2223, 12 doi:10.3390/plants10102223

Vuković, Ana; Velki, Mirna; Ečimović, Sandra; Vuković, Rosemary; Štolfa Čamagajevac, Ivna; Lončarić, Zdenko. Vermicomposting - facts, benefits and knowledge gaps // Agronomy, 11 (2021), 10; 1952, 15 doi:10.3390/agronomy11101952

Matić, Magdalena; Vuković, Rosemary; Vrandečić, Karolina; Štolfa Čamagajevac, Ivna; Ćosić, Jasenka; **Vuković, Ana**; Sabljčić, Kristina; Sabo, Nikolina; Dvojković, Krešimir; Novoselović, Dario. Oxidative status and antioxidative response to fusarium attack and different nitrogen levels in winter wheat varieties // Plants, 10 (2021), 4; 611, 12 doi:10.3390/plants10040611

Zjalić, Milorad; Mustapić, Mislav; Glumac, Zvonko; Prološčić, Ivan; Blažetić, Senka; **Vuković, Ana**; Masud, Mostafa; Billah, Motasim; Khan, Aslam; Šegota, Suzana et al. Construction of AC/DC magnetic syringe device for stimulated drug release, injection and ejection of nanocarriers and testing cytotoxicity in vitro // MethodsX, 8 (2021), 101312, 6 doi:10.1016/j.mex.2021.101312

Mustapić, Mislav; Glumac, Zvonko; Heffer, Marija; Zjalić Milorad; Prološčić, Ivan; Masud, Mostafa; Blažetić, Senka; **Vuković, Ana**; Billah, Motasim; Khan, Aslam et al.

AC/DC magnetic device for safe medical use of potentially harmful magnetic nanocarriers // Journal of hazardous materials, 409 (2021), 124918, 11 doi:10.1016/j.jhazmat.2020.124918

Mlinarić, Selma; Gvozdić, Vlatka; **Vuković, Ana**; Varga, Martina; Vlašiček, Ivan; Cesar, Vera; Begović, Lidija. The Effect of Light on Antioxidant Properties and Metabolic Profile of Chia Microgreens // Applied Sciences-Basel, 10 (2020), 17; 5731, 13 doi:10.3390/app10175731

Vuković, Ana; Schulz, Wolfgang; Štolfa Čamagajevac, Ivna; Gaur, Apoorva; Walther, Clemens; Gupta, DK. Mycoremediation Affects Antioxidative Status in Winter Rye Plants Grown at Chernobyl Exclusion Zone Site in Ukraine // Environmental science and pollution research, 27 (2020), 25818-25827 doi:10.1007/s11356-020-09137-w

Gupta, Dharmendra K; **Vuković, Ana**; Semenishchev, Vladimir S; Inouhe, Masahiro; Walther, Clemens. Uranium accumulation and its phytotoxicity symptoms in *Pisum sativum* L. // Environmental science and pollution research, 27 (2019), 3513-3522 doi:10.1007/s11356-019-07068-9