ANTIOKSIDACIJSKI ODGOVOR ENZIMA U IZDANKU I KORIJENU KLIJANACA PŠENICE NA TRETMAN CINKOM

Kreković, Tihana

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:222901

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

ODJEL ZA BIOLOGIJU

Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni

Tihana Krekovi

ANTIOKSIDACIJSKI ODGOVOR ENZIMA U IZDANKU I KORIJENU KLIJANACA PŠENICE NA TRETMAN CINKOM

Diplomski rad

OSIJEK, 2015.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Odjel za biologiju
Diplomski rad
Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

ANTIOKSIDACIJSKI ODGOVOR ENZIMA U IZDANKU I KORIJENU KLIJANACA PŠENICE NA TRETMAN CINKOM

Tihana Kreković

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

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

Neposredni voditelj: dr.sc. *Rosemary Vuković*, **viši asistent**

Cink je važan mikronutrijent koji ima važnu ulogu u brojnim metaboličkim procesima u biljci, no pri većim koncentracijama je toksičan te može uzrokovati inhibiciju rasta i oksidacijski stres u brojnim biljnim vrstama. S ciljem istraživanja utjecaja cinka na antioksidacijski odgovor u korijenu i izdanku, mladi klijanci dviju sorti ozime pšenice (Divana i Srpanjka) tretirani su s dva različita izvora cinka (cinkov sulfat i cink-EDTA) tijekom sedam dana. Tretman cinkom nije značajno utjecao na klijavost obje sorte pšenice, dok je tretman cink-EDTA značajno povećao omjer mase korijena i izdanka kod sorte Srpanjka. Tretman cinkom uzrokovao je promjene u aktivnosti glutation-reduktaze, glutation-peroksidaze i glutation-S-transferaze koje su bile uvjetovane sortom, vrstom biljnog organa i kemijskim oblikom cinka.

Broj stranica: 50
Broj slika: 8
Broj literaturnih navoda: 185
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: cink, *Triticum aestivum* L., izdanak, korijen, glutation-reduktaza, glutation-peroksidaza, glutation-S-transferaza

Datum obrane: 25.09. 2015.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. **Dr. sc.** *Ljiljana Krstin*, **docent, predsjednica**
2. **Dr. sc.** *Ivna Štolfa*, **docent, mentor, član**
3. **Dr. sc.** *Tanja Žuna Pfeiffer*, **docent, član**

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek Department of Biology
Master Thesis
Graduate university study programme in Biology

Scientific Area: Natural science
Scientific Field: Biology

THE RESPONSE OF ANTIOXIDANT ENZYMES TO ZINC TREATMENT IN THE SHOOTS AND ROOTS OF WHEAT SEEDLINGS

Tihana Kreković

Thesis performed at: Laboratory of Biochemistry, Department of Biology, Osijek

Supervisor: **Ph.D.** *Ivna Štolfa*, **Assistant Professor**

Assistant in charge: Ph.D. *Rosemary Vukovi*ć

Zinc is an important micronutrient which has a role in numerous metabolic processes in the plant, but is toxic at higher concentrations and can cause inhibition of growth and oxidative stress in a range of plant species. With the aim of investigating the effects of zinc on the antioxidant response in the root and shoot, young seedlings of two varieties of winter wheat (Divana and Srpanjka) were treated with two different sources of zinc (zinc sulphate and zinc-EDTA) in the period of seven days. Zinc treatment had no significant effect on germination of both wheat varieties, while the zinc-EDTA treatment significantly increased the shoot to root ratio of the Srpanjka variety. Zinc treatment caused a significant changes in the activity of glutathione reductase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase, which were determined by the wheat variety, the type of plant organ and the chemical form of zinc.

Number of pages: 50
Number of figures: 8
Number of references: 185
Original in: Croatian

Key words: zinc, *Triticum aestivum* L., shoot, root, glutathione reductase, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase.

Date of the thesis defense: 25.09.2015.

Reviewers:
1. **Ph. D.** *Ivna Štolfa*, **Assistant Professor**
2. **Ph. D.** *Tanja Žuna Pfeiffer*, **Assistant Professor**
3. ***Ph. D.*** *Ljiljana Krstin*, **Assistant Professor**

Thesis deposited in: Library of Department of Biology, University of J.J. Strossmayer Osijek and in National university library in Zagreb in elektronic form. It is also disposable on the web site of Department of Biology, University of J.J. Strossmayer Osijek.

Od srca se zahvaljujem mentorici doc.dr.sc. Ivni Štolfi što mi je omogućila izradu diplomskog rada i bez čije pomoći ga ne bi uspjela napisati. Hvala na pruženoj pomoći, savjetima, strpljenju i razumijevanju.

Veliko hvala također dugujem i asistentici dr.sc. Rosemary Vuković na korisnim savjetima i velikoj pomoći u eksperimentalnom radu.

Posebno hvala ide svim mojim prijateljima koji su uvijek bili tu za mene i studentske dane učinili posebnim i nezaboravnim.

Najveće hvala ide mojim roditeljima, braći Iliji i Igoru i sestri Maji zbog velike podrške, razumijevanja i ljubavi prilikom studiranja i u čast tome posvećujem im ovaj rad.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Cink - esencijalan ili toksičan element za biljke? 2

1.2. Usvajanje, transport i akumulacija cinka u biljkama 3

1.3. Učinci manjka cinka na biljku 5

1.4. Toksični učinci cinka na biljku 6

1.5. Antioksidacijski odgovor biljaka na oksidacijski stres uzrokovan povećanim koncentracijama cinka 7

1.5.1. Glutation-reduktaza 8

1.5.2. Glutation-peroksidaza 10

1.5.3. Glutation-sulfo-transferaze 11

1.6. Cilj istraživanja 13

2. MATERIJALI I METODE 14

2.1. Opis eksperimenta 15

2.2. Laboratorijska analiza uzoraka 15

2.2.1. Priprema enzimskih ekstrakata 15

2.2.2. Određivanje aktivnosti enzima glutation-reduktaze 16

2.2.3. Određivanje aktivnosti enzima glutation- peroksidaze 16

2.2.4. Određivanje aktivnosti enzima glutation-S-transferaze 17

2.3. Statistička obrada podataka 17

3. REZULTATI 18

3.1.Utjecaj tretmana cinkom na klijavost i masu klijanaca dviju sorti ozime pšenice 19

3.1.1. Klijavost 19

3.1.2. Ukupna masa klijanaca 19

3.1.3. Omjer mase korijena i izdanka dviju sorti ozime pšenice 20

3.2. Utjecaj tretmana cinkom na aktivnost glutation-reduktaze u izdancima i korijenu klijanaca dviju sorti ozime pšenice 21

3.3. Utjecaj tretmana cinkom na aktivnost glutation-peroksidaze u izdancima i korijenu klijanaca dviju sorti ozime pšenice 22

3.4. Utjecaj tretmana cinkom na aktivnost glutation-S-transferaze u izdancima i korijenu klijanaca dviju sorti ozime pšenice 23

4. RASPRAVA 24

5. GLAVNI REZULTATI I ZAKLJUČCI 29

6. LITERATURA 31

1. UVOD

1.1. Cink - esencijalan ili toksičan element za biljke?

Cink (Zn) je esencijalna komponenta tisuće proteina u biljkama, ali u suvišku je toksičan. Drugi je najzastupljeniji prijelazni metal u organizmima poslije željeza (Fe) i jedini je metal koji se nalazi u svih šest skupina enzima (oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze, ligaze) (Broadley i sur., 2007). Više biljke apsorbiraju Zn kao divalentni kation (Zn^{2+}) koji djeluje kao metalna komponenta enzima ili kao funkcionalni, strukturalni ili regulatorni kofaktor velikog broja enzima (Brown i sur., 1993), a također je i sastavni dio nekoliko transkripcijskih faktora (npr. transkripcijski faktori s motivom cinkovih prstiju) (Chang i sur., 2005). Enzimi koji sadrže vezani Zn su: karboanhidraza (McMall i Bouma, 1973; Marschner, 1986), alkohol-dehidrogenaza (Marschner, 1986); Cu-Zn superoksid-dismutaza (Marschner, 1986) i RNA polimeraza (Marschner, 1986; Obata i Umebayashi, 1988).

U usporedbi s drugim mikronutrijentima, Zn je u biološkim sustavima prisutan u visokim koncentracijama, pogotovo u biomembrani. U korijenu klijanaca pšenice, citoplazmatska koncentracija ukupnog Zn iznosi oko 0,4 mM (Santa Maria i Cogliatti, 1988). Većina važnih funkcija Zn u stanicama ovisi o njegovoj sposobnosti stvaranja tetraedralne koordinacije u različitim dijelovima stanice. Cistein, histidin, aspartat ili glutamat su glavni stanični ligandi za Zn koji tvore tetraedralnu koordinaciju (Vallee i Falchuk, 1993a). Navedeni ligandi, pogotovo cistein i histidin, vežu Zn većim afinitetom i stabilnošću nego Fe (Berg i Shi, 1996). Cink ima važnu ulogu u detoksifikaciji reaktivnih kisikovih spojeva (*eng. Reactive Oxygen Species* - ROS) uključujući superoksidni radikal i vodikov peroksid. Zbog temeljne uloge u aktivaciji i ekspresiji gena (Klug i Rhodes, 1987; Vallee i Falchuk, 1993b), Zn može biti uključen u ekspresiju gena induciranih oksidacijskim stresom koji kodiraju enzime kao što su askorbat-peroksidaza (APX) i glutation-reduktaza (GR) (Allen, 1995; Alscher i sur., 1997).

Zbog važnosti esencijalnih mikronutrijenata u fiziologiji biljaka, izrazito je važno održavati homeostazu ovog metala u biljnim stanicama (Slika 1). To znači da se koncentracija metala treba održavati unutar relativno uskog raspona kako bi se izbjegli štetni učinci manjka ili suviška cinka (Lin i Aarts., 2012). Biljke posjeduju čvrste regulatorne mehanizme za održavanje homeostaze mikronutrijenata.



Slika 1. Krivulja odgovora biljaka na promjene koncentracija esencijalnih mikronutrijenata (modificirano prema Alloway, 1995).

1.2. Usvajanje, transport i akumulacija cinka u biljkama

Uslijed nedovoljne istraženosti mehanizmima apsorpcije Zn u karbonatnim tlima i njegovoj translokaciji unutar biljke, usvajanje, translokacija, distribucija i akumulacija Zn predmet su mnogobrojnih istraživanja (Grotz i Guerinot, 2006; Chandra i sur., 2009). Različite biljne vrste i različiti genotipovi iste vrste značajno se razlikuju u usvajanju i akumulaciji Zn, Cd i Fe (Vasconcelos i sur., 2003; Greger i Lofstedt, 2004). Usvajanje metala u biljke je kompleksan proces koji ovisi o ionskom potencijalu metala i njegovom ionskom polumjeru, a može uključivati nekoliko koraka koji uključuju transport kroz plazmatsku membranu stanica korijena uz pomoć specifičnih transportera metala te translokaciju metala ksilemom (Bernal i sur., 2007; Sharma i Dietz, 2008). Metale koji su esencijalni za normalan rast i razvoj biljka prima iz tla, nakon čega se distribuiraju unutar biljke, a njihove su koncentracije različite u različitim tkivima, stanicama i organima (Hall i Williams, 2003). Kako bi započeo proces unosa metala putem korijena, različite vrste metala moraju biti u topivom obliku dostupnom za membranu korijena (Cataldo i Wildung, 1978). Predložena su dva različita procesa za unos metala: a) pasivni unos, koji ide putem koncentracijskog

gradijenta kroz plazma membranu i b) aktivni unos koji je specifičan za supstrat, ovisan o korištenju energije i posredovan nosačima (Williams i sur., 2000). Unos većine metala odvija se u mlađim dijelovima korijena gdje Kasparijeve pruge nisu potpuno razvijene (Prasad, 2004).

Pretpostavlja se da se većina Zn transportira simplastnim putem preko korijena do ksilema, iako bitan dio može proći korijenom i doći do ksilema apoplastnim putem (White i sur., 2002b; Broadley i sur., 2007). Zn se može unijeti kroz plazma membranu stanica korijena kao Zn^{2+} ili kao kompleks Zn-fitosiderofori (Grotz i Guerinot, 2006; Suzuki i sur., 2006; Broadley i sur., 2007; Ismail i sur., 2007). Iako su neki Ca^{2+} kanali na membrani propusni za Zn^{2+} (Demidchik i sur., 2002; White i sur., 2002a), smatra se da je većina unosa Zn^{2+} u citoplazmu posredovano ZIP (eng. ZRT-*zinc regulated transporter*, IRT- *iron regulated trasporter – related Proteins*) (Colangelo i Guerinot, 2006; Broadley i sur., 2007; Palmgren i sur., 2008) te da YSL (eng. *yellow stripe – like*) proteini kataliziraju unos kompleksa Zn-fitosiderofori (Suzuki i sur., 2006; Haydon i Cobbett, 2007). Smatra se da članovi ZIP obitelji sudjeluju kao posrednici unosa Zn^{2+} u stanice lista i u floem (Ishimaru i sur., 2005). Cinkom inducirani transporter (ZIF1) je uključen u transport Zn u vakuolu putem $Zn^{2+/}H^{+}$ antiportnog mehanizma, dok su NRAMP (eng. *natural resistance-associated macrophage proteins*) uključeni u mobilizaciju Zn u vakuolu (Thomine i sur., 2003). Smatra se da se Zn sekvestrira u vakuolu u obliku kompleksa s organskim kiselinama (Broadley i sur., 2007). Unutar ksilema, Zn se može transportirati kao Zn^{2+} ili u kompleksu s organskim kiselinama, histidinom ili nikotinaminom (von Wiren i sur., 1999; White i sur., 2002b; Broadley i sur., 2007; Palmgren i sur., 2008).

Biljke imaju visoko specifične mehanizme za translokaciju i pohranu mikronutrijenata kao i toksičnih elemenata. Akumulacija Zn uglavnom je prisutna u korijenu, sa slabijom translokacijom u nadzemne dijelove biljke (Marques i sur., 2007; Rivelli i sur., 2012).

1.3. Učinci manjka cinka na biljku

Cink je najčešći mikronutrijent koji nedostaje poljoprivrednim usjevima (Çakmak, 2002, 2004; Alloway, 2004). Manjak Zn u biljkama uglavnom je povezan s vapnenačkim tlima s visokim pH vrijednostima gdje je niska dostupnost Zn ili s pješčanim tlima i kiselim tlima gdje je sadržaj Zn vrlo nizak (Takkar i Walker, 1993). Kritične vrijednosti Zn u biljkama predložili su Dobermann i sur. (2000): <10 mg kg^{-1} (definitivni nedostatak), 10-15 mg kg^{-1} (vrlo moguć nedostatak), 15-20 mg kg^{-1} (moguć nedostatak) i > 20 mg kg^{-1} (dovoljna koncentracija Zn). U većini usjeva, tipična koncentracija Zn u listu potrebna za adekvatan rast iznosi 15-20 mg Zn kg^{-1} DW (Marschner, 1995). Nedostatak Zn u početku se očituje smanjenjem internodalnog rasta, što dovodi do smanjenja duljine stabljike i poprimanja oblika rozete, dok u kasnijim fazama razvoja listovi mogu pokazati simptome poput kloroze i nekroza (Sharma, 2006). Simptomi nedostatka Zn su prvo vidljivi na mladim listovima što ukazuje na smanjenu mobilnost Zn (Brennan, 1993). Učinci nedostataka Zn različiti su čak i unutar iste vrste i simptomi se razvijaju brzo, ali uvelike ovise o stupnju stresa (Kubota i sur., 1972).

Nedostatak Zn rezultira velikim gubicima u prinosu i prehrambenim kvalitetama žitarica. Važna strategija za povećanje koncentracije mikronutrijenata u zrnu je uzgoj ili kultiviranje otpornijih genotipova (kultivara). Kako su ranije utvrdili Welch i Graham (2004), uspješna biofortifikacija bi trebala zadovoljiti sljedeće kriterije: (1) kapacitet prinosa zrna biofortificiranih genotipova mora se održavati; (2) povećanje razine mikronutrijenata mora imati značajan utjecaj na ljudsko zdravlje i (3) postignuta razina mikronutrijenata mora biti relativno stabilna na različitim lokacijama i klimatskim zonama. Uzgoj biljaka (genetska biofortifikacija) i korištenje gnojiva Zn koji se dodaju u tlo ili folijarnim putem (agronomska biofortifikacija) su dvije važne poljoprivredne strategije za povećavanje koncentracije Zn u zrnu (Pfeiffer i sur., 2007; Brinch-Pedersen i sur., 2007; Çakmak i sur., 2010).

Međutim, u procesu agronomske biofortifikacije važan utjecaj na njenu uspješnost imaju i uvjeti u okolišu pri čemu je interakcija između genotipa i okoline vrlo značajna (Çakmak i sur., 2004).

1.4. Toksični učinci cinka na biljku

Toksičnost Zn javlja se u tlima kontaminiranim produktima rudarstva i aktivnostima taljenja, u poljoprivrednim tlima tretiranim s kanalizacijskim muljem te u urbanim tlima obogaćenim antropogenim utjecajima, posebice u uvjetima niskih pH vrijednosti tla (Chaney, 1993). Zn je jedan od najraširenijih toksičnih elemenata u agro-ekosustavima (Roy i Couillard, 1998; Nan i sur., 2002). Toksičnost teških metala odvija se u dvije faze. Prva faza indukcije (traje 1-2 dana) uključuje povećanu aktivnost signalnih procesa, enzimske aktivnosti i promjene u strukturi stanične stijenke i stanične membrane. Druga faza (traje više od 2 dana) podrazumijeva dugotrajne učinke koji uključuju biokemijske promjene koje omogućuju smanjenje posljedica oksidacijskog stresa i degradacijske procese koji dovode do starenja stanica i u konačnici do programirane stanične smrti (Maksymiec i sur., 2008).

Cink je esencijalan mikronutrijent za biljke, ali u supraoptimalnim koncentracijama postaje toksičan (Cuypers i sur., 1999). Toksičnost Zn se očituje kroz (1) smanjenje sadržaja esencijalnih nutrijenata kao što su Fe, Cu i Mn (Ebbs i Kochian, 1997), (2) pojavu oksidacijskih oštećenja biomembrana (Cuypers i sur., 2001) i (3) ometanja fotosinteze (Vangronsveld i Clijesters, 1994). Cink inducira oksidacijski stres poticanjem stvaranja ROS koji dovode do peroksidacije lipida u biomembranama (Madhava Rao i Sresty, 2000).

Prag toksičnosti Zn je određen genotipskim karakteristikama biljnih vrsta, vremenu izloženosti i koncentraciji Zn te samom sastavu ostalih nutrijenata u hranjivom mediju (Hafeez i sur., 2013). Kritična toksična koncentracija za biljke je oko 500 μg Zn g^{-1} (Chaney, 1993). Suvišak Zn^{2+} uzrokuje smanjenje rasta i razvoja, metaboličke aktivnosti i inducira oksidacijska oštećenja u raznim vrstama biljaka (Panda i sur., 2003). Rast graška (*Pisum sativum* L.) bio je inhibiran nakon primjene 1000μM Zn (Doncheva i sur., 2001). Toksičnost cinka uzrokuje inhibiciju primarnog rasta korijena i pojavu bočnog korijena (Ren i sur., 1993). Zn^{2+} je uzrokovao smanjenje stope respiracije i povećao oštećenja membrane u biljci suncokreta (*Helianthus annus*) (Ismail i Azooz, 2005). Unos Zn^{2+} utječe na akumulaciju drugih nutrijenata u različitim biljkama (Ismail i Azooz, 2005). Visoke razine Zn mogu pomaknuti Mg iz water splliting mjesta u fotosustavu 1, čime se inhibiraju oba fotosustava i lanac prijenosa elektrona, kao što se primijetilo u grahu (*Phaseolus vulgaris* L.) nakon tretmana Zn (Van Assche i Clijsters, 1986). Zbog sličnosti u ionskom polumjeru divalentnih kationa, suvišak cinka može pomaknuti određenu fiziološku ravnotežu lokalnom kompeticijom na različitim mjestima (Kemper i sur., 1997). Konkretno, pokazano je da cink

ima negativan učinak na unos minerala i enzimske aktivnosti vezane uz oksidacijski metabolizam (Quariti i sur., 1997).

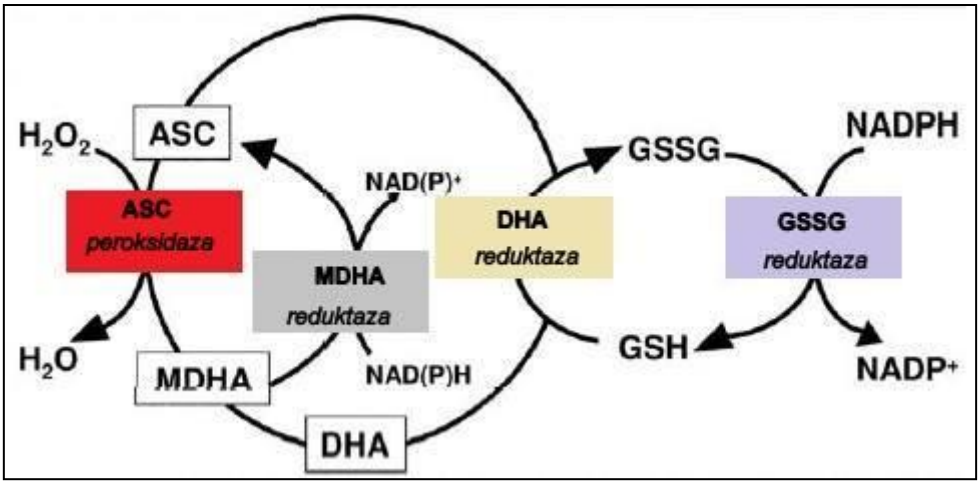
Početni simptomi toksičnosti Zn su kloroza, pa čak i crvenilo koje se pojavljuje u teškim slučajevima, zbog proizvodnje antocijanina (Fontes i Cox, 1995). Nakon toga slijedi pojava nekrotičnih smeđih mrlja na listovima nekih vrsta praćeno smanjenim prinosom (Broadley i sur., 2007). Većina biljaka zahtijeva u listu koncentraciju veću od 15-30 mg kg-1 DM za maksimalni prinos, a njihov rast je inhibiran ako je koncentracija Zn veća od 100-700 mg kg^{-1} DM (Fageria 2009; White i Brown, 2010).

1.5. Antioksidacijski odgovor biljaka na oksidacijski stres uzrokovan povećanim koncentracijama cinka

Akumulacijom većine teških metala, uključujući i Zn, u biljnim tkivima dolazi do povećane sinteze ROS-a, kao što su superoksidni anion ($O^{2-\cdot}$), hidroksilni radikal ($OH^{\cdot}$), vodikov peroksid (H_2O_2) itd. ROS u suvišku izazivaju oksidacijski stres u tkivima popraćen povećanom peroksidacijom lipida, oksidacijom staničnih proteina te fragmentacijom nukleinskih kiselina (Gupta, 2011). Cink je nereducirajući metal, ali može utjecati na stvaranje ROS-a što dovodi do indukcije antioksidacijskih enzima (Prasad i sur 1999; Chang i sur. 2005). Oksidacijski stres izazvan toksičnošću cinka u konačnici može dovesti i do stanične smrti (Chang i sur., 2005).

Za uklanjanje ROS-a i prevladavanje oksidacijskih oštećenja, biljke imaju antioksidacijski obrambeni sustav koji sadrži neenzimske antioksidanse poput askorbata, glutationa, karotena, tokoferola i antioksidacijskih enzima kao što su superoksid-dismutaza, katalaza, peroksidaze i enzimi askorbat-glutationskog ciklusa (Gupta, 2011). Asc-GSH put je ključni dio mreže reakcija koje uključuju važne enzime za učinkovito uklanjanje ROS te na taj način sprječava oksidacijski stres (Noctor i Foyer, 1998; Aravind i Prasad, 2005; Anjum i sur., 2010). Enzimi askorbat-glutationskog ciklusa askorbat-peroksidaza (APX), monodehidroaskorbat-reduktaza (MDHAR), dehidroaskorbat-reduktaza (DHAR) i glutation-reduktaza (GR) imaju ključnu ulogu u održavanju razine antioksidanasa askorbinske kiseline (Asc) i glutationa (GSH) u njihovim reduciranim oblicima u kloroplastima i ostalim staničnim odjeljcima kao što su citosol, mitohondriji, apoplast i peroksisomi (Mittler, 2002) (Slika 2).

Kod biljaka, askorbat-glutationski ciklus djeluje u citosolu, mitohondrijima, plastidima i peroksisomima (Jimenez i sur., 1998;. Meyer 2009).



Slika 2. Askorbat-glutationski ciklus. Shema međuprodukata i enzima Asc-GSH ciklus. ASC, askorbat; MDHA, monodehidroaskorbat; DHA, dehidroaskorbat; GSH, glutation; GSSG, glutation disulfid (modificirano prema Gupta, 2011).

1.5.1. Glutation-reduktaza

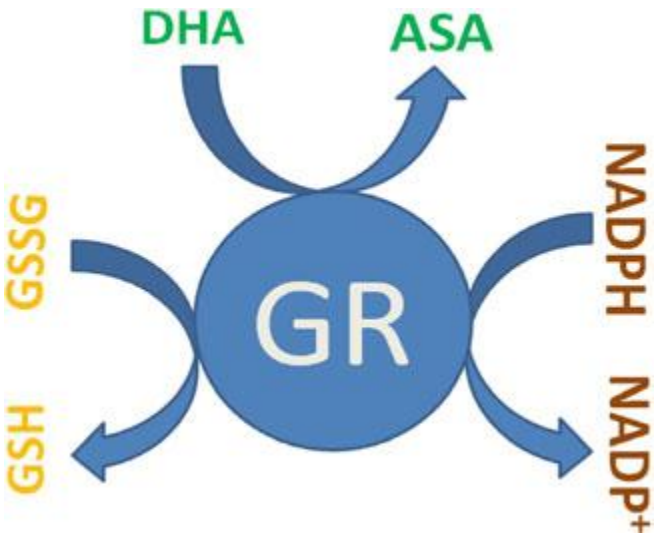
Glutation-reduktaza (GR, EC 1.6.4.2) je flavoprotein oksidoreduktaza koja katalizira redukciju glutation disulfida (GSSG) u sulfhidrilni oblik GSH (Ahmad i Prasad, 2012). Ovaj enzim koristi NADPH kao reducens (Slika 3). Potrebna je za održavanje visokog omjera GSH/GSSG u biljnim stanicama te za ubrzavanje puta vezanja u biljkama osobito u uvjetima stresa (Smith i sur., 1989). GR katalizira sljedeću reakciju:

$$\mathrm{GSSG} + \mathrm{NADPH} + \mathrm{H}^+ \xrightarrow{\text{glutation-reduktaza}} 2\,\mathrm{GSH} + \mathrm{NADP}^+$$

GR ima visoke specifičnosti za svoje supstrate, iako se neki konjugati glutationa i glutation- disulfida mogu reducirati pomoću GR (Gaullier i sur., 1994). Većina GR u biljkama imaju visok afinitet za NADPH (<10 μM). GR može također reducirati GSSG pomoću NADH, ali afinitet za NADH je vrlo nizak (Halliwell i Foyer, 1978). Afinitet GR za GSSG varira od 10 - 7.300 μM (Mullineaux i Creissen, 1997). Molekularna težina biljnih GR je u rasponu od 60-190 kDa (Mullineaux i Creissen, 1997). GR je uglavnom lokalizirana u

kloroplastima, mitohondrijima i citosolu (Edwards i sur., 1990; Creissen i sur., 1995; Jimenez i sur., 1997; Rudhe i sur., 2004). Također je pronađena u peroksisomima (Jimenez i sur., 1997; del Río i sur., 2002). Općenito, GR u kloroplastima ima veću aktivnost (Stevens i sur., 2000) i oko 80% GR aktivnosti u tkivu lista su činili kloroplastni izoenzimi (Edwards i sur., 1990). GR je jedan od glavnih enzima enzimatskog antioksidacijskog sustava, koji održava reducirani status GSH putem askorbat-glutationskog puta i igra vitalnu ulogu u održavanju sulfhidrilnih (-SH) skupina.

Niz biotičkih i abiotičkih faktora, uključujući metaloide i teške metale imaju utjecaj na aktivnost GR u biljkama (Anjum i sur., 2010, 2011; Gill i Tuteja, 2010). Mnoge biljke izložene metalima Zn, Cu, Fe, Cd pokazale su smanjenje aktivnosti enzima GR, odgovornog za sintezu GSH (Gallego i sur., 1996). S druge strane u istraživanju s klijancima graha (*Phaseolus vulgaris* L.) tretman Zn uzrokovao je povećanje aktivnosti GR (Cuypers i sur., 2001). Promjene u enzimskoj aktivnosti mogu varirati ovisno o ispitivanom biljnom organu (Lomonte i sur., 2010), vrsti i koncentraciji primjenjenog metala i genotipskim svojstvima (Anjum i sur., 2012).



Slika 3. Shematski dijagram koji prikazuje molekularno funkcioniranje GR (preuzeto iz Ahmad i Prasad, 2012).

1.5.2. Glutation-peroksidaza

Glutation-peroksidaza (GPX) katalizira redukciju vodika iz lipidnih peroksida (LOOH) s reduciranim glutationom:

$2GSH + H_2O_2 \rightarrow H_2O + GSSG$

GSSG se zatim reducira nazad do GSH pomoću glutation- reduktaze uz utrošak NADPH:

$GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$

GPX su velika obitelj različitih izoenzima koji imaju širok spektar supstrata te djeluju kao antioksidacijski enzimi, posvuda su rasprostranjeni u biljnoj stanici uključujući citosol, kloroplaste, mitohondrije, peroksisome i apoplast te kataliziraju redukciju H_2O_2, organskih i lipidnih hidroperoksida koristeći GSH direktno kao reducens i na taj način štite stanice od oksidacijskih oštećenja (Noctor i sur., 2002a; Milla i sur., 2003; Anjum i sur., 2010, 2011b). Selenoproteini GPX su rijetki u biljkama, umjesto toga biljni GPX ima cistein umjesto selenocisteina u aktivnom mjestu (također se naziva neselenska GPX NS-GPX), što smanjuje njenu katalitičku aktivnost u usporedbi sa selenoproteinskom GPX (Mano i sur., 2001; Herbette i sur., 2007). Štoviše, u usporedbi sa 4 tipa GPX-a pronađenih u životinjskim stanicama (Toppo i sur., 2008; Lu i Holmgren, 2009), više biljke su pokazale da su zadržale samo monomerni oblik i vjerojatno stariji neselenski tip (Eshdat i sur., 1997), dok je kod *Chlamydomonas reinhardtii*, klorofilske zelene alge pokazano da sadrži jednu neselensku i dva tipa selenske GPX (Dayer i sur., 2008). Millar i suradnici (2003) su identificirali obitelj sedam srodnih proteina u *Arabidopsis* nazvanih AtGPX1- AtGPX7. Među izoenzimima, AtGPX1 i AtGPX2 su posttranslacijski usmjereni u kloroplast (Milla i sur., 2003) pružajući antioksidacijski odgovor (Chang i sur., 2009). Drugi GPX izoenzimi lokalizirani su u citosolu, mitohondrijima i endoplazmatskom retikulumu (Milla i sur., 2003).

Postoje kontradiktorni rezultati koji se odnose na odgovor GPX pri različitim koncentracijama teških metala u različitim biljnim vrstama. Smanjenje aktivnosti peroksidaza u odgovoru na višak Zn je pronađeno u izdanku i korijenu raznih biljaka (Jain i sur., 2010; Ozdener i Aydin, 2010). Aktivnost GPX se smanjila u okri (*Hibiscus esculentus* cv. Hassawi) pri tretmanu Zn (Youssef i Azooz, 2013), dok je s druge strane utvrđena povećana aktivnost GPX pri tretmanu Zn u izdancima i korijenu klijanaca kukuruza (Hosseini i Poorakbar, 2013).

1.5.3. Glutation-sulfo-transferaze

GSH-S-transferaze/GSH-transferaze (GST, EC 2.5.1.18) su GSH ovisni enzimi koji detoksificiraju ROS i uglavnom su pronađeni u citosolu biljke (Sheehan i sur., 2001). GST predstavljaju obitelj multifunkcionalnih proteina koji kataliziraju nukleofilnu konjugaciju reduciranog tripeptida glutationa (GSH, γ-Glu-Cys-Gly) sa širokim rasponom hidrofobnih i elektrofilnih supstrata. Dixon i sur. (1998) i Edwards i sur. (2000) su istražili ulogu GSH u konjugaciji s različitim hidrofobnim i elektrofilnim spojevima te potvrdili njihovu važnost u detoksifikaciju različitih ksenobiotika, endogenih toksičnih i netoksičnih metabolita. Također, imaju važnu ulogu u zaštiti stanica od oksidacijskih oštećenja jer funkcioniraju i kao GPX sudjelujući u detoksifikaciji citotoksičnih alkenala i lipidnih hidroperoksida koji nastaju u procesu peroksidacije membranskih lipida i oštećenja nukleinskih kiselina (Dixon i sur., 2002). GST također mogu djelovati i kao nekatalitički nosači, npr. auksina i citokinina (Zettl i sur., 1994; Edwards i sur, 2000; Dixon i sur., 2002) ili antocijanina (Marrs i sur., 1995; Mueller i sur., 2000), i tako pridonijeti homeostazi hormona ili vakuolarnoj sekvestraciji antocijanina.

Biljne glutation-S-transferaze (GST) su multifunkcionalni proteini koji igraju glavnu ulogu u detoksifikaciji i metabolizmu oksidacijskog stresa. Gotovo sve poznate citosolne GST su pokazale da se javljaju kao homo- ili heterodimeri sa podjedinicama s molekulskom masom od 23-29 kDa (Droog, 1997) u kojoj svaka podjedinica ima GSH vezno mjesto (G-mjesto) i susjedno vezno mjesto za elektrofilni supstrat (H-mjesto) (Marrs, 1996). Flury i sur. (1996) i Frova (2003) su izvijestili i pojavu mikrosomalnih, plastidijalnih, nuklearnih i apoplastnih izoformi GST-a i u nekim slučajevima GST u svojoj formi citoplazmatskog proteina predstavlja više od 1% topljivih proteina u listu kukuruza (*Zea mays* L.) (Dixon i sur., 1998; Edwards i Dixon., 2000).

Porodice gena biljnih GST velike su i vrlo raznolike: 48 članova *Arabidopsis*, preko 25 članova u soji i 42 u kukuruzu (McGonigle i sur., 2000; Dixon i sur., 2002). Na temelju homologije proteina i genske organizacije klasificirane su u razrede (phi, φ; tau, τ; theta, θ; zeta, ζ; lambda, λ) od kojih su phi (φ), tau (τ) i DHAR razredi specifični za biljke (Dixon i Edwards, 2010).

GST geni pokazuju vrlo različite regulacije u odgovoru na biotičke i abiotičke čimbenike stresa, ali je njihova uloga u odgovoru biljaka na teške metale još nedovoljno istražena. Uloga GST u odgovoru biljaka na tretman herbicidima je detaljno istraživana (Marrs 1996; Xu i

sur, 2002), ali su podaci o samoj funkciji tih enzima i dalje nedostatni. GST su uključene u odgovor biljaka na patogene i oksidacijski stres (Marrs, 1996). Mnoge biljne GST kao što su Theta, Phi i Tau klase imaju glutation-peroksidaznu aktivnost koja detoksificira citotoksične alkenale i lipidne hidroperokside (Mauch i Dudler, 1993), a reduciraju lipidne hidroperokside masnih kiselina u odgovorajuće monohidroalkohole. Ta redukcija ima središnju ulogu u sprječavanju razgradnje organskih hidroperoksida u citotoksične derivate aldehida (Dixon i sur., 2002). Ekspresija peroksidazne GST kod vrste *Arabidopsis* posreduje u obrani od oksidacijskog oštećenja uslijed različitih čimbenika stresa (Roxas i sur., 1997).

1.6. Cilj istraživanja

Ciljevi ovog istraživanja bili su:

1. utvrditi razlike u antioksidacijskom odgovoru klijanaca dvije sorte pšenice na tretman s dva izvora cinka (cinkov sulfat i cink-EDTA).
2. istražiti razlike u aktivnostima antioksidacijskih enzima u korijenu i izdanku klijanaca dviju sorti ozime pšenice tretiranih s dva različita izvora cinka.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Opis eksperimenta

U istraživanju su korištena zrna dviju sorti ozime pšenice (Divana – standard za kvalitetu u Republici Hrvatskoj i Srpanjka – standard za visinu prinosa u Republici Hrvatskoj).

Zrna su prvo sterilizirana etanolom, a zatim izosanom (10g/L + 1μL Tweena) u vremenu od osam minuta uz stalno miješanje. Uslijedilo je ispiranje sterilnom vodom te su zrna ostavljena 24 h u hladnjaku na proces bubrenja. Zrna (50 komada) su stavljena na filter papir u sterilne plastične Petrijeve posudice i zalivena s 15 mL sterilne vode (kontrola) te s 15 mL 100 μM otopine cinkovog sulfata ($ZnSO_4 \times 7H_2O$) i s 15 mL 100 μM otopine cink-EDTA.

Nakon pet dana naklijavanja u inkubatoru u tami klijanci su dodatno zaliveni s 10 mL odgovarajuće otopine. Sedmi dan naklijavanja su klijanci pšenice uzorkovani za daljnja laboratorijska istraživanja.

2.2. Laboratorijska analiza uzoraka

Laboratorijske analize provedene su u laboratoriju za biokemiju Odjela za biologiju u Osijeku. Laboratorijska analiza uzoraka uključivala je određivanje :

- Klijavost sjemenki
- Ukupna masa klijanaca
- Omjer mase izdanka i korijena klijanaca dviju sorti ozime pšenice
- Aktivnosti enzima glutation-reduktaze
- Aktivnosti enzima glutation- peroksidaze
- Aktivnosti enzima glutation-S-transferaze

2.2.1. Priprema enzimskih ekstrakata

Svježe tkivo izdanka i korijena klijanaca pšenice usitnjavano je u tarioniku pomoću tekućeg dušika uz dodatak PVPP-a (polivinilpolipirolidin). Iz usitnjenog su tkiva (0,2 g) enzimi ekstrahirani 15 minuta na ledu uz dodatak 1 mL hladnog ekstrakcijskog pufera (100 mM KH_2PO_4, 100 mM K_2HPO_4, 1 mM EDTA, pH 7.0). Homogenati su zatim centrifugirani 20 minuta na 20 000 g i +4 ºC. Dobiveni supernatanti korišteni su za spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima glutation-reduktaze, glutation-S-transferaze i glutation-peroksidaze.

2.2.2. Određivanje aktivnosti enzima glutation-reduktaze

Aktivnost glutation-reduktaze (EC 1.6.4.2; GR) u enzimskim ekstraktima određena je prema metodi koja se temelji na principu redukcije oksidiranog oblika glutationa (GSSG) u prisutnosti GR uz NADPH kao reducens (Halliwel i Foyer, 1978).

$$\mathrm{GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{glutation-reduktaza} 2\,GSH + NADP^+}$$

U kivetu od kvarcnog stakla dodano je 400 µL 100 mM kalij fosfatnog pufera (pH 7.5) koji je sadržavao 1 mM otopinu EDTA, 500 µL 2 mM otopine GSSG, 50 µL enzimskog ekstrakta te 50 µL 2 mM otopine NADPH. Smanjenje apsorbancije, uslijed oksidacije NADPH, praćeno je pri valnoj duljini od 340 nm svakih 10 sekundi tijekom 2 minute. GR je izražena u enzimskim jedinicama (U) koje predstavljaju količinu enzima koji katalizira oksidaciju 1 µmola NADPH u minuti pri 25 ºC i pH 7.5 po g svježe tvari.

2.2.3. Određivanje aktivnosti enzima glutation- peroksidaze

Aktivnost glutation-peroksidaze (EC.1.11.1.9.) u enzimskim ekstraktima mjerila se spektrofotometrijski na 340 nm po principu reakcije:

$$\mathrm{H_2O_2 + 2GSH \xrightarrow{glutation-peroksidaza} 2H_2O + GSSG}$$

$$\mathrm{GSSG + ß - NADPH \xrightarrow{glutation-reduktaza} ß - NADPH + 2GSH}$$

U plastičnu UV-kivetu redom je dodano 1500 µL reakcijske smjese, 40 µL enzimskog ekstrakta i 25 µL 0,042% otopine H_2O_2. Apsorbancija 0,042% otopine vodikovog peroksida pri 240 nm bi trebala iznositi 0.054. Reakcijska smjesa je sadržavala otopinu NADPH (200 mM), 50 mM kalij-fosfatnog pufera s 0,4 mM EDTA (pH= 7,0), otopinu glutation-reduktaze (100U/ml) i otopinu reduciranog glutationa (200 mM). Nakon dodatka uzorka u kivetu, prati se smanjenje apsorbancije na 340 nm svakih 30 sekundi tijekom 5 minuta. Jedna jedinica enzima (GPX) katalizira oksidaciju H_2O_2 pomoću 1µmola reduciranog glutationa u oksidirani glutation po minuti pri pH 7,0 i 25 °C.

2.2.4. Određivanje aktivnosti enzima glutation-S-transferaze

Aktivnost glutation-S-transferaze (EC 2.5.1.18; GST) u enzimskim ekstraktima određena je spektrofotometrijskim praćenjem nastajanja produkta reakcije konjugacije između GSH i 1-kloro-2,4-dinitrobenzena (CDNB) pri 340 nm (Habig i sur., 1974; Simons i Jagt, 1977):

$$\mathrm{G-SH + CDNB} \xrightarrow{\text{glutation-S-transferaza}} \mathrm{G-SDNB + HCl}$$

U plastičnu UV kivetu s 1350 µL 100mM kalij fosfatnog pufera (pH 6.5) koji je sadržavao 1 mM EDTA, dodano je 50 µL 75 mM otopine GSH te 50 µL 30 mM otopine CDNB. Enzimska reakcija započinje dodavanjem 50 µL razrijeđenog enzimskog ekstrakta. Enzimski ekstrakti su razrijeđeni 10x na način da je u 20 µL uzorka dodano 180 µL kalij fosfatnog pufera (pH 7.0, koji je korišten i za samu ekstrakciju). Porast apsorbancije, do kojeg dolazi uslijed stvaranja G-SDNB konjugata, mjeren je svakih 30 sekundi tijekom 5 minuta pri valnoj duljini od 340 nm. Jedna jedinica aktivnosti GST jednaka je količini enzima potrebnog za konjugaciju 1 µmola CDNB s reduciranim glutationom po minuti pri pH 6.5 i temperaturi od 25 ºC, a izražena je po g svježe tvari.

2.3. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka obavljena je softverskim paketom Statistica 12 (StatSoft.Inc). Provedena je analiza varijance (ANOVA) uz test najmanje značajne razlike (LSD).

3. REZULTATI

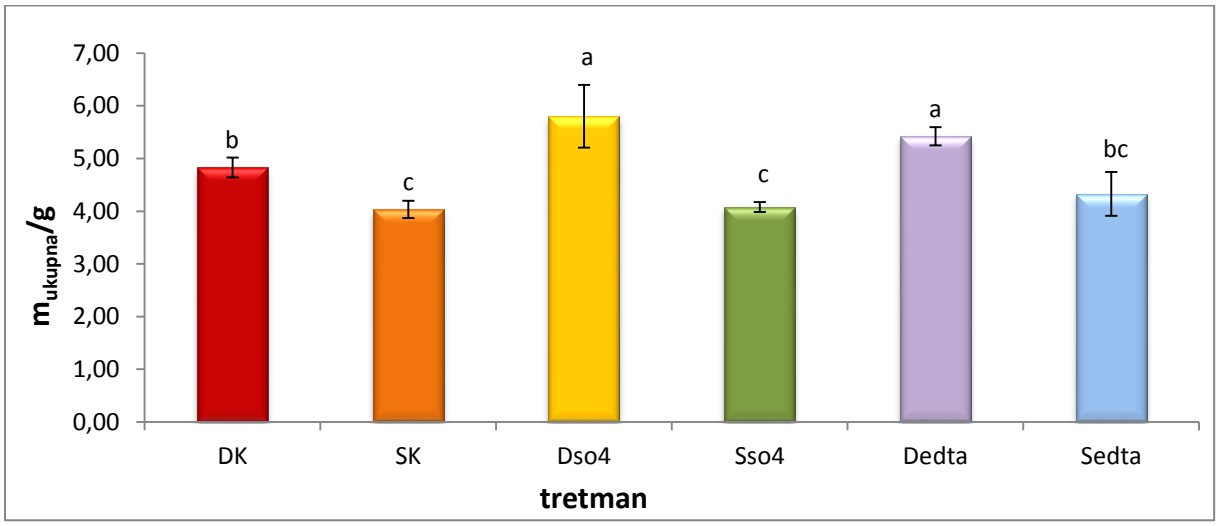
3.1. Utjecaj tretmana cinkom na klijavost i masu klijanaca dviju sorti ozime pšenice

3.1.1. Klijavost

Na temelju analize varijanci (ANOVA) pokazano da nema statistički značajnih razlika u % klijavosti izdanka i korijena dviju sorti ozime pšenice u odnosu na kontrolu.

3.1.2. Ukupna masa klijanaca

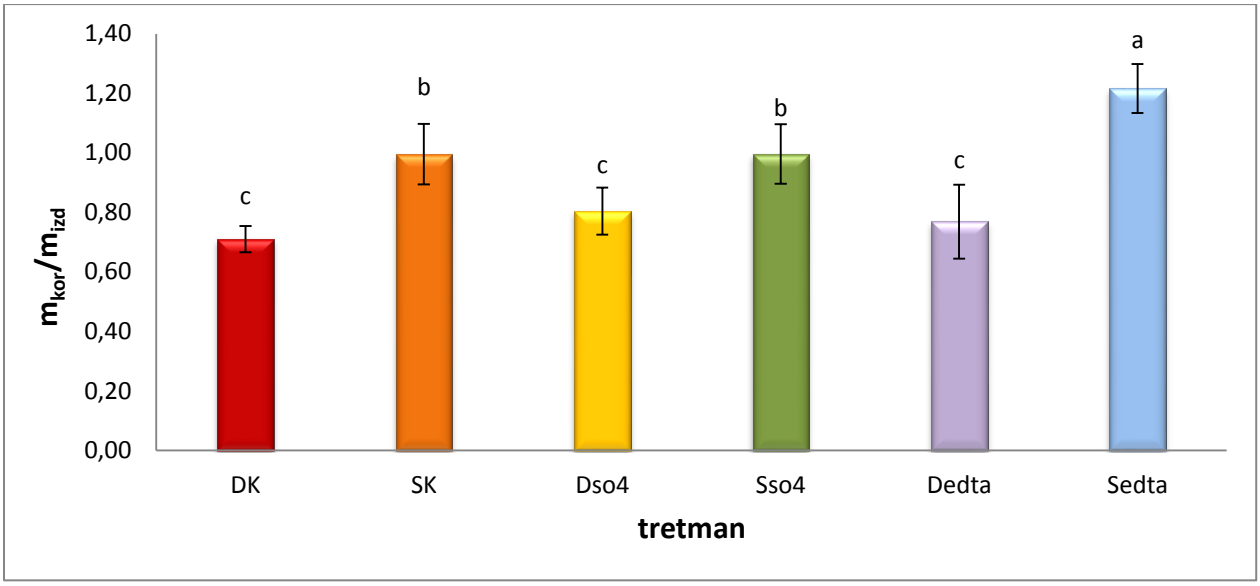
Tretman sa $ZnSO_4$ uzrokovao je značajno povećanje mase klijanaca sorte pšenice Divana za 20% u odnosu na kontrolne klijance, dok je tretman sa ZnEDTA uzrokovao povećanje mase klijanaca iste sorte za 12%. Primjena oba oblika Zn nije uzrokovala statistički značajnu razliku u ukupnoj masi klijanaca pšenice sorte Srpanjka u odnosu na ukupnu masu kontrolnih klijanaca (Slika 4).



Slika 4. Ukupna masa klijanaca dviju sorti ozime pšenice (Divana i Srpanjka) tretiranih sa $ZnSO_4$ i ZnEDTA, DK- Divana kontrola, SK- Srpanjka kontrola, Dso_4 – Divana tretirana cink sulfatom, Sso_4 –Srpanjka tretirana $ZnSO_4$, Dedta- Divana tretirana ZnEDTA i Sedta- Srpanjka tretirana ZnEDTA. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Prosječne vrijednosti označene istim slovom (a,b,c) ne razlikuju se prema LSD testu; $p<0.05$.

3.1.3. Omjer mase korijena i izdanka dviju sorti ozime pšenice

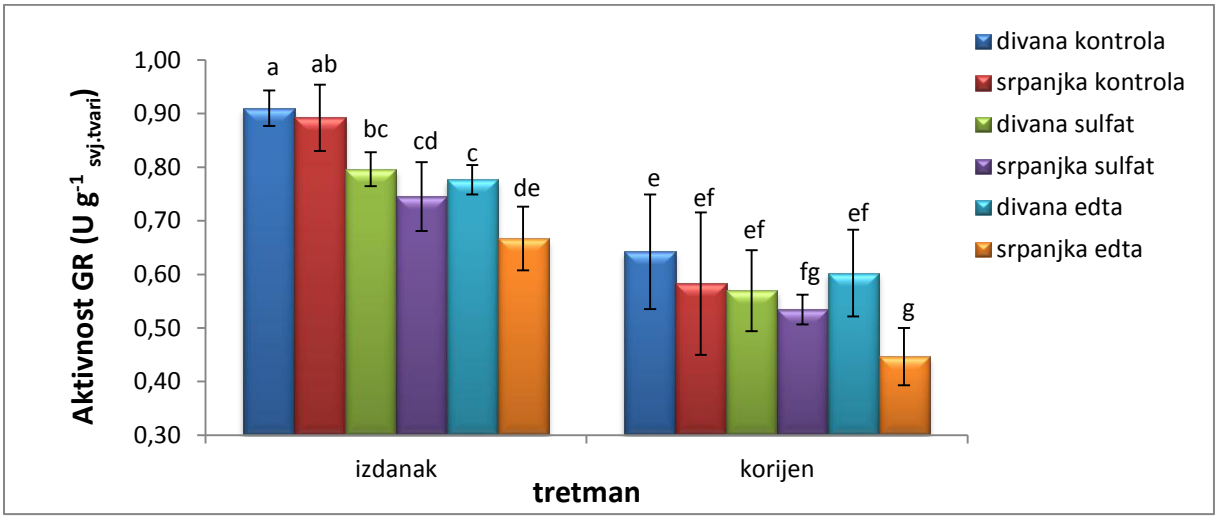
Tretmani s oba oblika Zn nisu značajno utjecali na omjer mase korijena i izdanka klijanaca sorte pšenice Divana. Kod klijanaca sorte Srpanjka samo je tretman sa ZnEDTA uzrokovao povećanje omjera mase i izdanka od 21% u odnosu na kontrolne biljke (Slika 5).



Slika 5. Omjer mase korijena i izdanka dviju sorti ozime pšenice (Divana i Srpanjka) tretiranih sa $ZnSO_4$ i ZnEDTA, DK- Divana kontrola, SK - Srpanjka kontrola, Dso4 – Divana tretirana ZnSO4, Sso_4 - Srpanjka tretirana ZnSO4, Dedta - Divana tretirana ZnEDTA i Sedta - Srpanjka tretirana ZnEDTA. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Prosječne vrijednosti označene istim slovom (a,b,c) ne razlikuju se prema LSD testu; $p<0.05$.

3.2. Utjecaj tretmana cinkom na aktivnost glutation-reduktaze u izdancima i korijenu klijanaca dviju sorti ozime pšenice

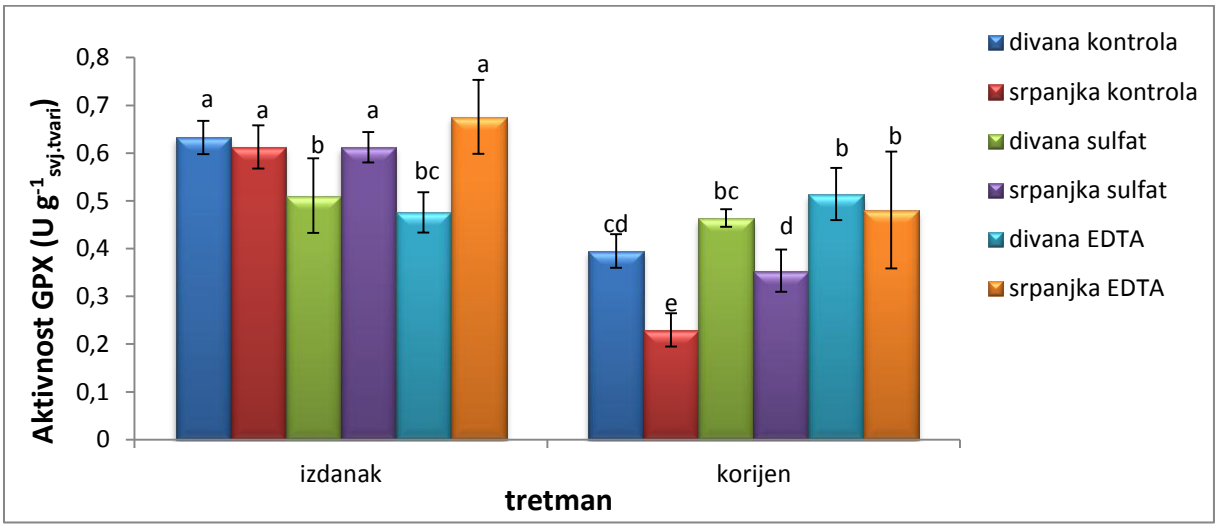
Primjena $ZnSO_4$ rezultirala je smanjenjem aktivnosti GR od 13%, dok je tretman sa ZnEDTA uzrokovao smanjenje od 15% u odnosu na aktivnost kontrolnih izdanka sorte Divana. Statistički značajno smanjenje aktivnosti GR također je utvrđeno u izdancima sorte Srpanjka i to od 17% pri tretmanu sa $ZnSO_4$, odnosno 25% pri tretmanu sa ZnEDTA u odnosu na kontrolne izdanke. Oba tretmana cinkom nisu rezultirala statistički značajnim razlikama u aktivnosti GR u korijenu klijanaca sorte Divana u usporedbi s kontrolnim vrijednostima. U korijenu sorte Srpanjka samo je tretman sa ZnEDTA rezultirao značajnim smanjenjem aktivnosti GR od 23% u odnosu na kontrolne biljke (Slika 6).



Slika 6. Aktivnost glutation-reduktaze (GR) u izdanku i korijenu dviju sorti ozime pšenice (Divana i Srpanjka) tretiranih sa $ZnSO_4$ i ZnEDTA. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Prosječne vrijednosti označene istim slovom (a,b,c) ne razlikuju se prema LSD testu; $p<0.05$.

3.3. Utjecaj tretmana cinkom na aktivnost glutation-peroksidaze u izdancima i korijenu klijanaca dviju sorti ozime pšenice

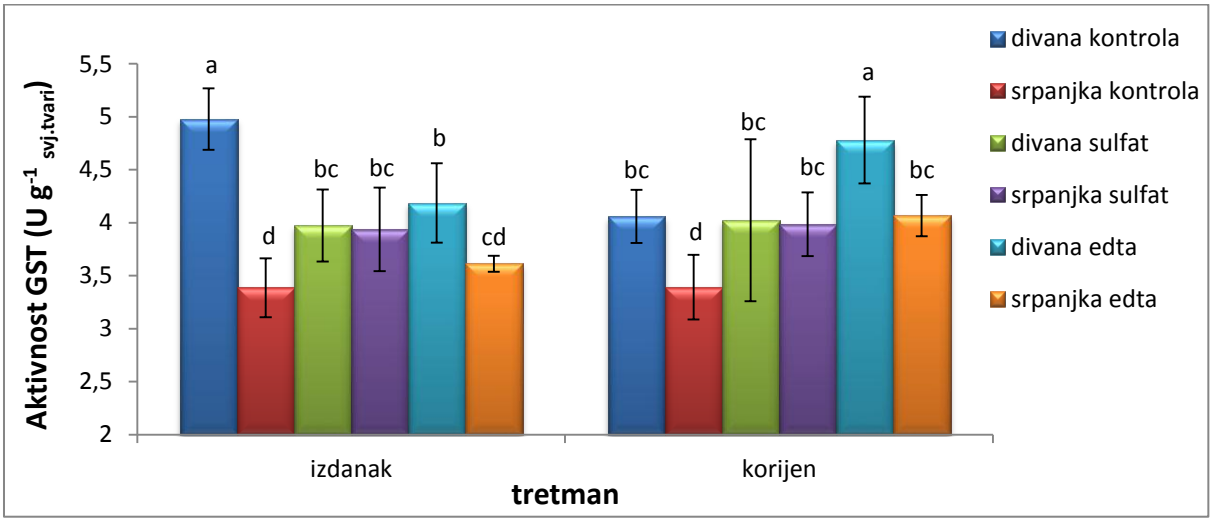
Tretman sa $ZnSO_4$ i ZnEDTA uzrokovao je statistički značajno smanjenje aktivnosti glutation-peroksidaze (GPX) u izdancima sorte pšenice Divana u odnosu na aktivnost u kontrolnim klijancima, s tim da je smanjenje tretmanom $ZnSO_4$ bilo 19%, a sa ZnEDTA 25%. U usporedbi sa sortom Divana, primjena ovih tretmana kod sorte pšenice Srpanjka nije rezultirala statistički značajnim razlikama u aktivnosti GPX u izdancima u odnosu na kontrolu. U korijenu sorte Divana samo je tretman sa ZnEDTA rezultirao značajnim povećanjem aktivnosti GPX od 30% u odnosu na kontrolne biljke. Statistički značajno povećanje aktivnosti GPX utvrđeno je u korijenu sorte Srpanjka i to od 54% pri tretmanu sa $ZnSO_4$, odnosno 110% pri tretmanu sa ZnEDTA u odnosu na kontrolne biljke (Slika 7).



Slika 7. Aktivnost glutation-peroksidaze (GPX) u izdanku i korijenu dviju sorti ozime pšenice (Divana i Srpanjka) tretiranih sa $ZnSO_4$ i ZnEDTA. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Prosječne vrijednosti označene istim slovom (a,b,c) ne razlikuju se prema LSD testu; $p<0.05$.

3.4. Utjecaj tretmana cinkom na aktivnost glutation-S-transferaze u izdancima i korijenu klijanaca dviju sorti ozime pšenice

Tretman otopinom $ZnSO_4$ uzrokovao je smanjenje aktivnosti GST od 20%, dok je tretman sa ZnEDTA uzrokovao smanjenje od 16% u odnosu na aktivnost kontrolnih izdanaka sorte Divana. Za razliku od sorte Divana, sorta Srpanjka rezultirala je statistički značajnim povećanjem aktivnosti GST za 16% u izdancima klijanaca u usporedbi sa kontrolnim biljkama pri tretmanu ZnSO4, dok tretman sa ZnEDTA nije uzrokovao značajnu promjenu aktivnosti. U korijenu sorte Divana samo je tretman sa ZnEDTA uzrokovao statistički značajno povećanje aktivnosti GST od 18% u odnosu na kontrolne biljke. Oba tretmana cinkom uzrokovala su statistički značajno povećanje aktivnosti GST u korijenu klijanaca pšenice Srpanjka i to od 18% pri tretmanu $ZnSO_4$, odnosno 20% pri tretmanu ZnEDTA u odnosu na kontrolne biljke (Slika 8).



Slika 8. Aktivnost glutation-S-transferaze (GST) u izdanku i korijenu dviju sorti ozime pšenice (Divana i Srpanjka) tretiranih sa $ZnSO_4$ i ZnEDTA. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Prosječne vrijednosti označene istim slovom (a,b,c) ne razlikuju se prema LSD testu; $p<0.05$.

4. RASPRAVA

Na vigor sjemenki utječu različiti faktori kao što su genotip, klima, tlo, veličina sjemena, rezervne tvari prisutne u sjemenu i status hraniva (Peacok i Hawkins, 1970; Das Gupta i Austenson, 1973), pri čemu Zn također ima značajnu ulogu (Rengel i Graham, 1995; Dong i sur., 1995). Cink u malim koncentracijama potiče rast klijanaca, dok pri visokim koncentracijama uzrokuje smanjeni rast i ometa odvijanje metaboličkih procesa (Van Assche i Clijsters, 1986; Alia i sur., 1995). Prvo vidljivo oštećenje pri suvišku Zn je smanjen rast korijena (Harmens i sur., 1993) i to zbog smanjenja staničnih dioba (Powell i sur., 1986). Cink različito utječe na klijavost pšenice ovisno o koncentraciji pri čemu koncentracije < 10 mM ne utječe značajno na klijavost, a veće koncentracije inhibiraju klijavost (Wang i sur., 2011). U ovom istraživanju, tretman Zn nije značajno utjecao na klijavost kod obje sorte pšenice, štoviše ukupnu masu klijanaca sorte Divana značajno je povećao (Slika 4.). Pozitivan učinak Zn na rast korijena i izdanka utvrđen je kod klijanaca suncokreta (Jadia i Fulekar, 2008) i kikirikija (Prasad i sur., 2012), dok je u klijancima riže tretman Zn > 50μM imao negativan učinak na rast izdanaka (Asadi i sur., 2012).

Različita istraživanja pokazala su da tretman Zn negativno utječe na razvoj korijena, a pozitivno na razvoj izdanaka tako smanjujući omjer korijen/izdanak u ranim fazama razvoja (Çakmak i sur., 1996; Erenoglu i sur., 1999; Alam i Shereen, 2002). Takvi rezultati nisu povoljni za preživljavanje mladih biljaka pogotovo u uvjetima suše i niskih temperatura budući da mladi izdanci za svoj razvoj troše puno više vode i podložniji su oštećenjima uslijed niskih temperatura. Pravilno razvijen korijen klijanaca je od posebnog značaja za preživljavanje mlade biljke u nepovoljnim uvjetima u okolišu (Sonmez, 2013). U ovom istraživanju tretman Zn nije značajno utjecao na omjer mase korijena i izdanka kod sorte Divana, dok je kod sorte Srpanjka tretman EDTA značajno povećao taj omjer (Slika 5). Općenito, kontrolni klijanci sorte Srpanjka imali su veći omjer mase korijena i mase izdanka, dok je tretman ZnEDTA dodatno povećao taj omjer (Slika 5) što ukazuje na veću otpornost mladih klijanaca sorte Srpanjka na moguće nepovoljne uvjete u okolišu u prvim stadijima razvoja. Takve sortno specifične razlike u rastu klijanaca na tretman Zn utvrđen je u prijašnjim istraživanjima kod pšenice (Gecit i sur., 1987; Genctan i sur., 1994; Nasharty i sur., 2013).

Cink je esencijalan mikronutrijent za biljke, ali pri većim koncentracijama, koje se pojavljuju u industrijski onečišćenim tlima, postaje toksičan (Cuypers i sur., 1999). Kada su biljke izložene visokim koncentracijama teških metala dolazi do hiperprodukcije ROS-a (Luna i sur., 1994; Schützendubel i Polle, 2002) koja je popraćena odgovorom antioksidacijskog sustava (Prasad i sur., 1999; Rao i Sresty, 2000; Bonnet i sur., 2000). Cink

ima svojstva prijelaznih metala i u mogućnosti je inducirati oksidacijski stres tako što potiče stvaranje ROS-a, odnosno H_2O_2 (Rout i Das, 2003; Jain i sur., 2010; Hosseini i Poorakbar, 2013) koji djeluje kao signalna molekula u odgovoru na teške metale i ostale abiotičke stresove (Dat i sur., 2000). Za uklanjanje H_2O_2 i održavanje stanične ravnoteže biljke su razvile učinkovit antioksidacijski sustav (Noctor i Foyer, 1998; Aravind i Prasad, 2005; Anjum i sur., 2010).

Glutation-peroksidaza (GPX), kao i ostale peroksidaze, razgrađuje H_2O_2 do H_2O pri čemu koristi reducirani glutation (GSH) kao reducirajući spoj. Regeneracija GSH moguća je kroz redukciju oksidiranog glutationa (GSSG) uz pomoć glutation-reduktaze (GR) čime se zatvara proces (Apel i Hirt, 2004). GR je također važan enzim ASA-GSH ciklusa koji je odgovoran za održavanje sadržaja GSH koji je neophodan za aktivnost dehidroaskorbat-peroksidaze (Miteva i sur., 2010), GSH je ujedno i supstrat za glutation-S-transferaze (GST) (Marrs, 1996) i ishodna molekula za sintezu fitokelatina koji imaju važnu ulogu u vezanju teških metala i smanjivanju njihove toksičnosti (Steffens, 1990).

U ovom istraživanju se aktivnost GR u izdanku obje sorte pšenice značajno smanjila primjenom oba oblika cinka, dok je u korijenu taj učinak izostao osim kod sorte Srpanjka pri tretmanu sa ZnEDTA (Slika 6). U istraživanju Li i suradnika (2013) utvrđeno je da nakon šest dana tretmana Zn (0.5, 1 i 3 mM) dolazi do povećanja aktivnosti GR u listovima klijanaca pšenice, dok u isto vrijeme dolazi do inhibicije aktivnosti GR u korijenu. Dobiveni rezultati ukazuju na neučinkovitost AsA-GSH ciklusa u korijenu klijanaca pšenice tretiranih Zn što su potvrdila i prijašnja istraživanja utjecaja Zn na klijancima drugih biljnih vrsta (D'Souza i Devaraj, 2012; Li i sur., 2013). Razlike u dobivenim rezultatima u izdanku mogu se pripisati sortnoj specifičnosti pšenice te uvjetima izlaganja otopini Zn jer su u istraživanju Li i suradnika (2013) klijanci bili izloženi Zn u uvjetima svjetla, a u ovom istraživanju u uvjetima tame. Velik broj istraživanja ukazuje na smanjenje aktivnosti GR uslijed tretmana teškim metalima (Khatun i sur., 2008; Smeets i sur., 2008; Nouairi i sur., 2009; Remans i sur., 2012). Glutation-reduktaza ima visoko konzervirani disulfidni most između Cys76 i Cys81 (Lee i sur., 1998) koji se može pocijepati uslijed vezanja teških metala na tiolne skupine i smanjiti aktivnost GR. Inhibicija aktivnosti GR uslijed djelovanja teških metala uglavnom je praćena i smanjenjem koncentracije GSH (Vestena i sur., 2011). To smanjenje koncentracije GSH ne mora nužno značiti i smanjenje aktivnosti GPX koja ga koristi kao supstrat, štoviše Vestena i suradnici (2011) su kod kadulje tretirane Cd utvrdili povećanje aktivnosti GPX za 60% unatoč smanjenju koncentracije GSH. U ovom istraživanju, unatoč izostanku aktivacije enzima GR, u korijenu obje sorte pšenice je tretman sa ZnEDTA značajno povećao aktivnost GPX, dok je

tretman $ZnSO_4$ povećao aktivnost samo kod sorte Srpanjka (Slika 7). To se može objasniti činjenicom da GPX osim GSH koristi i ostale supstrate kao što su lipidni hidroperoksidi (Herbette i sur., 2002) te također postoji velik broj izoenzima GPX koji mogu pokazati različit odgovor ovisno o biljnom organu i biljnoj vrsti (Eshdat i sur., 1997). Aktivnost GPX se uglavnom povećava pri tretmanu teškim metalima što je utvrđeno u izdancima i korijenu klijanaca kukuruza tretiranih Zn (Hosseini i Poorakbar, 2013) i korijenu graška tretiranim Cu (Edwards, 1996). S druge strane tretman Cd nije značajno utjecao na aktivnost GPX u korijenu, dok je uzrokovao blago povećanje aktivnosti u listovima graška (Dixit i sur., 2001).

Glutation-S-transferaza ima važnu ulogu u detoksifikacijskim procesima jer katalizira konjugaciju nekoliko ksenobiotika s GSH (Davis i Swanson, 2001). Također, ima važnu ulogu u zaštiti stanica od oksidacijskih oštećenja jer funkcionira i kao GPX sudjelujući u detoksifikaciji citotoksičnih alkenala i lipidnih hidroperoksida koji nastaju u procesu peroksidacije membranskih lipida i oštećenja nukleinskih kiselina (Dixon i sur., 2002). Uslijed tretmana teškim metalima utvrđene su razlike u odgovoru GST u korijenu i listovima. Tako su Vestena i suradnici (2011) utvrdili povećanja aktivnosti GST nakon tretmana Cd kod vodenog zumbula i kadulje, dok je u korijenu aktivnost bila inhibirana što autori povezuju s većom akumulacijom Cd u korijenu. U ovom istraživanju aktivnosti GST bile su inhibirane u izdanku, osim kod tretmana sorte Srpanjka sa $ZnSO_4$ gdje je aktivnost GST bila značajno veća nego u kontrolnim biljkama (Slika 8). U korijenu je kod sorte Srpanjka došlo do značajnog povećanja aktivnosti GST pri tretmanu s oba oblika Zn te pri tretmanu sa ZnEDTA u korijenu sorte Divana (Slika 8). Bittsánszky i suradnici (2005) utvrdili su da u listovima *Populus nigra* i *P. canescens* male koncentracije otopine $ZnSO_4$ (10^{-5} do 10^{-3} M) induciraju aktivnost GST, dok je velike koncentracije $ZnSO_4$ (10^{-2} i 10^{-1} M) inhibiraju. Povećanje aktivnosti GST u korijenu klijanaca rajčice pri tretmanu 100 μM otopinom $ZnSO_4$ utvrdili su i Sbartai i suradnici (2011). Aktivnost GST inducira se i pri tretmanu Ni (Gajewska i Skłodowska, 2005) Cd (Dixit i sur., 2001) i Cu (Nagalakshmi i Prasad, 2001).

Također teški metali (Cd, Co, Zn i Ni) pri malim koncentracijama induciraju ekspresiju gena osgstu4 i osgstu3 koji kodiraju tau porodicu GST u korijenu klijanaca riže (*Oryza sativa)* za koju se pretpostavlja da ima ulogu u detoksifikaciji teških metala i metaboličkih produkata nastalih kao posljedica oksidacijskog stresa (Moons, 2003). Također transgenične biljke uročnjaka s povećanom ekspresijom gena OsGSTU4 koji kodira GST pokazale su veću otpornost i smanjenu akumulaciju ROS-a na stres uzrokovan povišenim salinitetom (Sharma i sur., 2014). Kod kukuruza Cd inducira povećanu transkripciju gena Bz2 i to u obliku dvije mRNA molekule, jednu koja kodira GST i jednu koja nema domenu za GST aktivnost, ali ima

domene specifične za dimerizaciju i vezanje GSH. Stoga su rezultat takve transkripcije dva proteina, GST koji je odgovoran za prevođenje prekurzora za sintezu antocijanina u vakuolu i promijenjeni GST protein koji je uključen u transport teških metala i ulazak u vakuolu (Marrs i Walbot, 1997). Yang i suradnici (2009) su utvrdili da je ekspresija gena OsGSTU17 koji kodira tau porodicu GST različito eksprimiran u različitim biljnim organima uslijed različitih stresnih čimbenika (CDNB, vodikov peroksid i atrazin) što može objasniti i različite aktivnosti GST u korijenu i izdanki kod klijanaca u ovom istraživanju (Slika 8).

Mobilizirajući i kelirajući spojevi kao što je EDTA općenito povećavaju primanje metala i njihovu akumulaciju u biljkama stoga se često dodaju u tlo u kojem je bioraspoloživost metala neophodnih za rast i razvoj biljaka mala (Pastor i sur., 2007). Nasharty i suradnici (2013) su istraživali primjenu Zn kao $ZnSO_4$ i ZnEDTA i došli do zaključka da je povećanje koncentracije cinka veće kada se Zn primijeni kao ZnEDTA nego $ZnSO_4$. U ovom istraživanju je tretman ZnEDTA značajno povećao aktivnosti enzima GPX i GST u korijenu obje sorte pšenice, dok je tretman $ZnSO_4$ povećao aktivnosti samo kod sorte Srpanjka što može ukazivati na činjenicu da je Srpanjka otpornija na moguće toksično djelovanje oba oblika Zn jer su aktivnosti navedenih enzima dobri pokazatelji otpornosti biljaka na tretman teškim metalima. No, kako bi se dobio bolji uvid u razlike u antioksidacijskom odgovoru između ove dvije sorte na djelovanje Zn, u budućem istraživanju potrebno je odrediti koncentraciju primljenog Zn u korijenu i izdanku te odrediti glavne pokazatelje oksidacijskog stresa.

5. GLAVNI REZULTATI I ZAKLJUČCI

1. Tretman cinkom nije toksično djelovao na klijavost obje sorte pšenice, štoviše uzrokovao je značajno povećanje ukupne mase klijanaca sorte Divana. Kod sorte Srpanjka je tretman sa ZnEDTA uzrokovao značajno povećanje omjera mase korijena i izdanka što može biti od velikog značaja za preživljavanje mladih klijanaca u nepovoljnim uvjetima kao što su suša i niske temperature.

2. Aktivnost glutation-reduktaze nije imala značajnu ulogu u antioksidacijskom odgovoru klijanaca pšenice na tretman cinkom.

3. Tretman cinkom značajnije je djelovao na aktivnosti enzima glutation-peroksidaze i glutation-S-transferaze u korijenu obje sorte pšenice pri čemu je samo tretman ZnEDTA značajno povećao aktivnosti navedenih enzima kod obje sorte pšenice.

4. Budući da je u korijenu klijanaca sorte Srpanjka došlo do povećanja aktivnosti enzima glutation-peroksidaze i glutation-S-transferaze pri tretmanu s oba oblika cinka zaključujemo da je sorta Srpanjka otpornija od sorte Divana jer su navedeni enzimi važni pokazatelji otpornosti biljaka na oksidacijski stres uslijed djelovanja teških metala.

6. LITERATURA

Ahmad P, Prasad MNV. 2012. *Abiotic stress responses in plants. Plants Metabolism and Sustainbility.* Vol. 3 Abiotic Stress Responses in Plants: Metabolism to Productivity. Springer (Science+Business Media B.V.), NY, USA, 95 pp.

Alam S, Shereen A. 2002. Effect of different levels of zinc and phosphorus on seedling growth of wheat. *Asian Plant J Sci* 1: 364-366.

Alia, Prasad KVSK, Saradhi P. 1995. Zinc induced changes in the levels of free radicals and proline in *Brassica juncea* and *Cajanus cajan. Phytochemistry* 39: 45-47.

Allen RD. 1995. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol* 107: 1049-1054.

Alloway B. 1995. Heavy metals in soils. Blackie Academic, London 368 pp.

Alloway BJ. 2004. *Zinc in soils and crop nutrition.* International Zinc Association, Brussels, Belgium, 128 pp.

Alscher RG, Donahue JL, Cramer CL. 1997. Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. *Physiol Plant* 100: 224-233.

Anjum N, Umar S, Chan MT. 2010. *Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants*. Vol. 1 Regulatory Role of Components of Ascorbate - Glutathione Pathway in Plant Stress Tolerance. Springer (Science+Business Media B.V.), Dordrecht, Netherlands, 3 pp.

Anjum NA, Umar S, Iqbal M, Khan NA. 2011. Cadmium causes oxidative stress in moongbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] by affecting antioxidant enzyme systems and ascorbate-glutathione cycle metabolism. *Russ J Plant Physiol* 58: 92-99.

Anjum NA, Ahmad I, Mohmood I, Pacheco M, Duarte AC, Pereira E, Umar S, Ahmad A, Khan NA, Iqbal M, Prasad MNV. 2012. Modulation of glutathione and its related enzymes in plants` response to toxic metals and metalloids – A review. *Environ Exp Bot* 75: 307-324.

Apel K, Hirt A. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55: 373-399.

Aravind P, Prasad MNV. 2005. Cadmium and zinc interactions in a hydroponic system using *Ceratophylum demersum* L.: adaptive ecophysiology, biochemistry and molecular toxicology. *Braz J Plant Physiol* 17: 3-20.

Asadi M, Saadatmand S, Khavari-Nejad RA, Ghasem-Nejad M, Fotokian MH. 2012. Effect of zinc (Zn) on some physiological charateristics of rice seedlings. *Ind J Fund Appl Life Sci* 2: 89-96.

Berg JM, Shi Y. 1996. The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. *Science* 271: 1081-1085.

Bernal M, Cases R, Picorel R, Yruela I. 2007. Foliar and root Cu supply affect differently Fe- and Zn-uptake and photosynthetic activity in soybean plants. *Environ Exp Bot* 60: 145-150.

Bittsánszkya A, Kfmives T, Gullner G, Gyulai G, Kiss J, Heszky L, Radimszky L, Rennenberg H. 2005. Ability of transgenic poplars with elevated glutathione content to tolerate zinc($^{2+}$) stress. *Environ Int* 31: 251-254.

Bonnet M, Camares O, Veisseire P. 2000. Effect of zinc and influence of *Acremonium lolii* on growth parameters, chlorophyll a fluorescence, and antioxidant enzyme activities of ryegrass (*Lolium perenne* L. cv Apollo). *J Exp Bot* 51: 945-953.

Brennan RF, Armour JD, Reuter JD. 1993. *Diagnosis of Zinc Deficiency*. In Robson, A. D. Kluwer (ed). Zinc in soils and plants. Dordecht: Academic Publisher. 167-181 pp.

Brinch-Pedersen H, Borg S, Tauris B, Holm PB. 2007. Molecular genetic approaches to increasing mineral availability and vitamin content of cereals. *J Cereal Sci* 46: 308-326.

Broadley MR, White PJ, Hammond JP, Zelko I, Lux A. 2007. Zinc in plants. *New Phytol* 173: 677 – 702.

Brown PH, Çakmak I, Zhang Q. 1993. *Forms and function of zinc in plants*. Vol. 55 Developments in Plant and Soil Sciences. Kluwer Acad.Publ.: Dordrecht, The Netherlands. 93-106 pp.

Çakmak I. 2000. Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. *New Phytol* 146: 185-205.

Çakmak I. 2002. Plant nutrition research: priorities to meet human needs for food in sustainable ways. *Plant Soil* 247: 3-24.

Çakmak I. 2004. Identification and correction of widespread zinc deficiency in Turkey-a success story (a NATO-Science for Stability Project). *Proc Int Fertil Soc* 552: 1-26.

Çakmak I, Pfeiffer WH, McClafferty B. 2010. Biofortification of durum wheat with zinc and iron. *Cereal Chem* 87: 10-20.

Çakmak I, Sari N, Marschner H, Kalayci M, Yilmaz A, Eker S, Gulut KY. 1996. Dry matter production and distribution of zinc in bread and durum wheat genotypes differing in zinc efficiency. *Plant Soil* 180: 173-181.

Çakmak I, Torun B, Erenoglu L, Ozturk L, Marchner H, Kalayci M, Ekiz H, Yilmaz A. 1998. Morphological and physiological differences in the response of cereals to zinc deficiency. *Euphytic*a 100: 349-357.

Cataldo DA, Wildung RE. 1978. Soil and plant factors influencing the accumulation of heavy metals by plants. *Environ Health Pers* 27: 149-159.

Chandra R, Bharagava RN, Yadav S, Mohan D. 2009. Accumulation and distribution of toxic metals in wheat (*Triticum aestivum* L.) and Indian mustard (*Brassica campestris* L.) irrigated with distillery and tannery effluents. *J Hazard Mater* 162: 1514-1521.

Chaney RL. 1993. *Risks associated with the use of sewage sludge in agriculture*. Vol 1. Australian Wastewater Association Branch, West End, Queensland, Australia 7-31 pp.

Chang CC, Slesak I, Jorda L, Sotnikov A, Melzer M, Miszalski Z, Mullineaux PM. 2009. *Arabidopsis* chloroplastic glutathione peroxidases play a role in cross talk between photooxidative stress and immune responses. *Plant Physiol* 150: 670-683.

Chang HB, Lin CW, Huang HJ. 2005. Zinc-induced cell death in rice (*Oryza sativa* L.) roots. *Plant Growth Regul* 46: 261-266.

Colangelo EP, Guerinot ML. 2006. Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. *Curr Opin Plant Biol* 9: 322-330.

Creissen GP, Mullineaux PM. 1995. Cloning and characterization of glutathione reductase cDNAs and identificaton of two genes encoding the tobaco enzyme. *Planta* 197: 422-425.

Creissen GP, Reynolds H, Xuem Y, Mullineaux PM. 1995. Simultaneous targeting of pea glutathione reductase and of a bacterial fusion protein to chloroplasts and mitochondria in transgenic tobacco. *Plant J* 8: 167-175.

Creissen CP, Edwards EA, Mullineaux PM. 1994. *Glutathione reductase and ascorbate peroxidase*. Cause of Photoxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants. CRC Press, Boca Raton, 344-364 pp.

Cuypers A, Vangronsveld J, Clijsters H. 1999. The chemical behavior of heavy metals plays a prominent role in the induction of oxidative stress. *Free Rad Res* 31: 839-843.

Cuypers A, Vangronsveld J, Clijsters H. 2001. The redox status of plant cells (AsA and GSH) is sensitive to zinc imposed oxidative stress in roots and primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol Biochem* 39: 657-664.

D`Souza RM, Devaraj VR. 2012. Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in Hyacinth bean under zinc stress. *Afr Crop Sci J* 20: 17-29.

Das Gupta PR, Austenson HM. 1973. Analysis of interrelationships among seedling vigor, field emergence and yield in wheat. *Agronomy J* 65: 417-422.

Dat JF, Vandenabeele S, Vranova E, Van Montagu M, Inze D, Van Breusegem F. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci* 57: 779-795.

Davis DG, Swanson HR. 2001. Activity of stress-related enzymes in the perennial weed leafy spurge (*Euphorbia esula* L.). Environ Exp Bot 46: 95-108.

Dayer R, Fischer BB, Eggen R.I, Lemaire SD. 2008. The peroxiredoxin and glutathione peroxidase families in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* 179: 41-57.

del Río LA, Corpas FJ, Sandalio LM, Palma JM, Gómez M, Barroso JB. 2002. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *J Exp Bot* 53: 1255-1272.

Demidchik V, Bowen HC, Maathuis FJM, Shabala SN, Tester MA, White PJ, Davies JM. 2002. *Arabidopsis thaliana* root nonselective cation channels mediate calcium uptake and are involved in growth. *Plant J* 32: 799-808.

Dixit V, Pandey V, Shyam R. 2001. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *J Exp Bot* 52: 1101-1109.

Dixon D, Lapthorn A, Edwards R. 2002. Plant glutathione transferases. *Genome Biol* 3: 3004.1-3004.10.

Dixon DP, Cummins I, Cole DJ, Edwards R. 1998. Glutathione-mediated detoxificationsystems in plants. *Curr Opin Plant Biol* 1: 258-266.

Dixon DP, Edwards R. 2010. Glutathione transferases. *Arabidopsis Book* 8: 1-15.

Dobermann A, Fairhurst T. 2000. *Rice: Nutritional Disorders and Nutrient Management.* Potash and Phosphate Institute, Potash Institute of Canada, International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines, 192 pp.

Dong B, Rengel Z, Graham RD. 1995. Root morphology of wheat genotypes differing in zinc efficiency. *J Plant Nutrition* 18: 2761-2773.

Droog FNJ. 1997. Plant glutathione S-transferases, a tale of theta and tau. *J Plant Growth Regul* 16: 95-107.

Ebbs SD, Kochian LV. 1997. Toxicity of zinc and copper to *Brassica* species. Implications to phytoremediation. *J Environ Qual* 26: 776-781.

Edwards EA, Enard C, Creissen GP, Mullineaux PM. 1994. Synthesis and properties of glutathione reductase in stressed peas. *Planta* 192: 137- 143.

Edwards EA, Rawsthorne S, Mullineaux PM. 1990. Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* 180: 278-284.

Edwards R, Dixon DP, Walbot V. 2000. Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci* 5: 193-198.

Erenoglu B, Cakmak I, Römheld V, Derici R, Rengel Z. 1999. Uptake of zinc by rye, bread wheat and durum wheat cultivars differing in zinc efficiency. *Plant Soil* 209: 245-252.

Eshdat Y, Holland D, Faltin Z, Ben-Haygim G. 1997. Plant glutathione peroxidases. *Physiol Plant* 100: 234-240.

Fageria NK 2009. *The Use of Nutrient in Crop Plants*. BocaRaton,FL: CRCPress, 448 pp.

Flury T, Wagner E, Kreuz K. 1996. An inducible glutathione S-transferase in soybean hypocotyl is localized in the apoplast. *Plant Physiol* 112: 1185-1190.

Fontes RLF, Cox FR. 1995. Effects of sulfur supply on soybean plants exposed to zinc toxicity. *J Plant Nut* 18: 1893–1906.

Frova C. 2003. Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives. *Biomol Eng* 23: 149-169.

Gajewska E, Skłodowska M. 2005. Antioxidative responses and proline level in leaves and roots of pea plants subjected to nickel stress. *Acta Physiol Plant* 27: 329-339.

Gallego SM, Benavides MP, Tomaro ML. 1996. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Sci* 121: 151-159.

Gaullier JM, Lafontant P, Valla A, Bazin M, Giraud M, Santus R. 1994. Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities towards glutathione-derived antioxidants. *Biochem Biophys Res Commun* 203: 1668-1647.

Gecit HH, Emeklier HY, Ciftci CY, Unver S, Senay S. 1987. *The status of the root and shoots of the bread wheat in the first development stage*. Turkey Ceral Symposium Simpozyumu, Bursa 91-99 pp.

Genctan T, Baser I, Baharozu E. 1994. The studies on development of root and shoot at seedling stage of bread wheat. *J Tekirdag Agric Faculty* 3: 131-138.

Ghanii A. 2010. Toxic effects of heavy metals on plant growth and metal accumulation in maize (*Zea mays* L.). *Iran J Toxicol* 3(3): 325-334.

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

Greger M, Lofstedt M. 2004. Comparison of uptake and distribution of cadmium in different cultivars of bread and durum wheat. *Crop Sci* 44: 501-507.

Grotz N, Guerinot ML. 2006. Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Biochim Biophys Acta* 1763: 595-608.

Gupta Dutta S. 2011. *Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Higher Plants.* Vol 9. Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative system in plants (ed. Dubey R.) Published by Science Publishers, P.O. Box 699, Enfield, USA.

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249: 7130-7139.

Hafeez B, Khanif M, Saleem M. 2013. Role of zinc in plant nutrition- a review. *Am J Exp Agric* 3: 374-391.

Hall JL, Williams LE. 2003. Transition metal transporters in plants. *J Exp Bot* 54: 2601-2613.

Halliwell B, Foyer CH. 1978. Properties and physiological function of glutathione reductase purified from spinach leaves by affinity chromatography. *Planta* 139: 9-17.

Hansch R, Mendel RR. 2009. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Curr Opin Plant Biol* 12: 259-266.

Harmens H, Gusmao NGCPB, Den Hartog PR, Verkleij JAC, Ernst WHO. 1993. Uptake and transport of zinc in zinc-sensitive and zinc-tolerant Silene vulgaris L. *J Plant Physiol* 141: 309-315.

Haydon MJ, Cobbett CS. 2007. Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *New Phytol* 174: 499-506.

Herbette S, Lenne C, Leblanc N, Julien JL, Drevet JR, Roeckel-Drevet P. 2002. Two GPX-like proteins from *Lycopersicon esculentum* and *Helianthus annuus* are antioxidant enzymes with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and thioredoxin peroxidase activities. *Eur J Biochem* 269: 2414-2420.

Herbette S, Roeckel-Drevet P, Drevet JR.. 2007. Seleno-independent glutathione peroxidases: more than simple antioxidant scavengers. *FEBS J* 274: 2163-2180.

Hosseini Z, Poorakbar L. 2013. Zinc toxicity on antioxidative response in (*Zea mays* L.) at two different pH. *J Stress Physiol Biochem* 9: 66-73.

Ishimaru Y, Suzuki M, Kobayashi T, Takahashi M, Nakanishi H, Mori S, Nishizawa NK. 2005. OsZIP4, a novel zinc-regulated zinc transporter in rice. *J Exp Bot* 56: 3207-3214.

Ismail AM, Azooz MM. 2005. Effect of zinc supply on growth and some metabolic characteristic of safflower and sunflower plants. *Ind J Plant Physiol* 10: 260-266.

Ismail AM, Heuer S, Thomson MJ, Wissuwa M. 2007. Genetic and genomic approaches to develop rice germplasm for problem soils. *Plant Soil* 65: 547-570.

Jadia CD, Fulekar MH. 2008. Phytoremediation: the application of vermicomposto to remove zinc, cadmium, copper, nickel and lead by sunflower plant. *Environ Eng Man J* 7: 547-558.

Jain R, Srivastava S, Solomon S, Shrivastava AK, Chandra A. 2010. Impact of excess zinc on growth parameters, cell division, nutrient accumulation, photosynthetic pigments and oxidative stress of sugarcane (*Saccharum* spp.). *Acta Physiol Plant* 32: 979-986.

Jiménez A, Hernández JA, del Río LA, Sevilla F. 1997. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiol* 114: 175-284.

Jimenez A, Hernandez JA, Pastori G, del Rio LA, Sevilla F. 1998. Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. *Plant Physiol* 118: 1327-1335.

Kemper H, Gorres M, Frenzel B. 1997. Ti and Pb concentrations in rainwater–fed boga in Europe as indicators of past anthropogenic activities. *Water Air Soil Poll* 100: 367-377.

Khatun S, Ali MB, Hahn EJ, PEAK KY. 2008. Copper toxicity in *Withania somnifera*: Growth and antioxidant enzymes responses of *in vitro* grown plants. *Environ Exp* 64: 279.

Klug A, Rhodes D. 1987. `Zinc fingers' : a novel protein motif for nucleic acid recognition. *Trends Biochem Sci* 12: 464-469.

Kubota J, Allaway WH. 1972. Geographic distirbution of trace element poblems in micronutrients in agriculuture. *Soil Science Society of America*, 525.

Lee H, Jo J, Son D. 1998. Molecular cloning and characterization of the gene encoding glutathione reductase in *Brassica campestris*. *Biochem Biophys Acta* 1395: 309-314.

Li X, Yang Y, Jia L, Chen H, Wei X. 2013. Zinc-induce doxidative damage, antioxidant enzyme response and proline metabolism in roots and leaves of wheat plants. *Ecotoxicol Environ Saf* 89: 150-157.

Lin YF, Aarts M. 2012. The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants. *Cell Mol Life Sci* 69: 3187-3206.

Lomonte C, Sgherri C, Baker AJM, Kolev SD, Navari-Izzo F. 2010. Antioxidative response of *Atriplex codonocarpa* to mercury. *Environ Exp Bot* 69: 9-16.

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

Luna CM, Gonzalez CA. Trippi VS. 1994. Oxidative damage caused by an excess of copper in oat leaves. *Plant Cell Physiol* 35: 11-15.

Maksymiec W, Drazkiewicz M, Skórzynska-Polit E. 2008. *Responses of higher plants to heavy metal stress, abiotic stress and plant responses*. In: Nafees, A. K. and Singh, S. (Eds.). India: I.K. International, 139-163 pp.

Mano J, Ohno C, Domae Y, Asada K. 2001. Chloroplastic ascorbate peroxidase is the primary target of methyl viologen-induced photooxidative stress in spinach leaves: its relevance to monodehydroascorbate radical detected with in vivo ESR. *Biochim Biophys Acta* 504: 275-287.

Marques AP, Rangel AO, Castro PM. 2007. Zinc accumulation in plant species indigenous to a Portuguese polluted site: relation with soil contamination. *J Environ Qual* 36: 646-653.

Marrs KA. 1996. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 127-158.

Marrs K, Walbot V. 1997. Expression and RNA splicing of the maize glutathione S-transferase Bronz2 gene is regulated by cadmium and other stresses. *Plant Physiol* 113: 93-102.

Marrs KA, Alfenito MR, Lloyd AM, Walbot V. 1995. A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene Bronze-2. *Nature* 375: 397-400.

Marschner H. 1986. *Mineral nutrition of higher plants*. Chapter 12, Acad. Press, London, UK 391–407 pp.

Marschner H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. 2nd ed. Academic Press, San Diego, 862 pp.

Mauch F, Dudler R. 1993 Differential induction of distinct glutathione S-transferases of wheat by xenobiotics and by pathogen attack. *Plant Physiol* 102: 1193-1201.

McGonigle B, Keeler SJ, Lau SMC, Koeppe MK, O'Keefe DP. 2000. A genomics approach to the comprehensive analysis of the glutathione S-transferase gene family in soybean and maize. *Plant Physiol* 124: 1105-1120.

McMall PJ, Bouma D. 1973. Zinc deficiency, carbonic anhydrase and photosynthesis in leaves of spinach. *Plant Physiol* 52: 229-232.

Meyer A. 2009. The integration of glutathione homeostasis and redox signaling. *J Plant Physiol* 165: 1390-1403.

Milla MAR, Maurer A, Rodriguez HA, Gustafson JP. 2003. Glutathione peroxidase genes in *Arabidopsis* are ubiquitous and regulated by abiotic stresses through diverse signaling pathways. *Plant J* 36: 602-615.

Millar AH, Mittova V, Kiddle G. 2003. Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses. *Plant Physiol* 133: 443-447.

Miteva LPE, Ivanov SV, Alexieva VS. 2010. Alterations in Glutathione Pool and Some Related Enzymes in Leaves and Roots of Pea Plants Treated with the Herbicide Glyphosate. *Russ J Plant Physiol* 57(1): 131-136.

Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants, and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7: 405-410.

Moons A. 2003. Osgstu3 and osgtu4, encoding tau class glutathione S-transferases, are heavy metal- and hypoxic stress-induced and differentially salt stress-responsive in rice roots. *FEBS* 553: 427-432.

Mueller LA, Goodman CD, Silady RA, Walbot V. 2000. AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. *Plant Physiol* 123(4): 1561-1570.

Mullineaux PM, Creissen GP. 1997. *Glutathione reductase: regulation and role in oxidative stress.* In: Scandalios JG (ed) Oxidative stress and the molecular biology of antioxidants. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 667-713 pp.

Nagalakshmi N, Prasad MNV. 2001. Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. *Plant Sci* 160: 291-299.

Nan Z, Li J, Zhang J, Cheng G. 2002. Cadmium and zinc interactions and their transfer in soil-crop system under field conditions. *Sci Total Environ* 285: 187-195.

Nasharty AB, Rezk AI, Abou El-Nour EAA, Nofal OA. 2013. Utilization efficiency of zinc by some wheat cultivars under stress condition of zinc deficiency. *World App Sci J* 25: 1485-1489.

Noctor G, Gomez LA, Vanacker H, Foyer CH. 2002. Interactions between biosynthesis, comparmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling. *J Exp Bot* 53: 1283-1304.

Noctor G, Foyer CH. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Plant Mol Biol* 49: 249-279.

Nouairi I, Ammar WB, Youseff NB, Miled DDB, Ghorbal MH, Zarrouk M. 2009. Antioxidant defense system in leaves of Indian mustard (*Brassica juncea*) and rape (*Brassica napus*) under cadmium stress. *Acta Physiol Plant* 31: 237-247.

Obata H, Umebayashi M. 1988. Effect of zinc deficiency in protein synthesis in cultured tobacco plant cells. *Soil Sci Plant Nut* 34: 351-357.

Ozdener Y, Aydin BK. 2010. The effect of zinc on the growth and physiological and biochemical parameters in seedlings of *Eruca sativa* L. *Acta Physiol Plant* 32: 469-476.

Palmgren MG, Clemens S, Williams LE, Krämer U, Borg S, Schjørring JK, Sanders D. 2008. Zinc biofortification of cereals: problems and solutions. *Trends Plant Sci* 13: 464-473.

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

Pandey N, Pathak G, Pandey D, Pandey R. 2009. Heavy metals, Co, Ni. Cu, Zn and Cd produce oxidative damage and evoke differential antioxidant responses in spinach. *Braz J Plant Physiol* 21: 103-111.

Pastor J, Aparicio AM, Gutierrez-Maroto A, Hernandez AJ. 2007. Effects of two chelating agents (EDTA and DTPA) on the autochthonous vegetation of a soil polluted with Cu, Zn and Cd. *Sci Total Environ* 378: 114–118.

Peacok H, Hawkins S. 1970. Effect of seed source on seedling vigor yield and lint characteristics of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Crop Sci* 10: 667-670.

Pearson JN, Rengel Z, Jenner CF, Graham RD. 1995. Transport of zinc and manganese to developing wheat grains. *Physiol Plant* 95: 449-455.

Pearson JN, Rengel Z, Jenner CF, Graham RD. 1996. Manipulation of xylem transport affects Zn and Mn transport into developing wheat grains of cultured ears. *Physiol Plant* 98: 229-234.

Pearson JN, Rengel Z. 1994. Distribution and remobilization of Zn and Mn during grain development in wheat. *J Exp Bot* 45: 1829-1835.

Pearson JN, Rengel Z. 1995a. Uptake and distribution of ^{65}Zn and ^{54}Mn in wheat grown at sufficient and defficient levels of Zn and Mn. II. During grain development. *J Exp Bot* 46: 841-845.

Pearson JN, Rengel Z. 1995b. Uptake and distribution of ^{65}Zn and ^{54}Mn in wheat grown at sufficient and defficient levels of Zn and Mn. I. During vegetative growth. *J Exp Bot* 46: 833-839.

Pfeiffer WH, McClafferty B. 2007. HarvestPlus: Breeding crops for better nutrition. *Crop Sci* 47: 88-105.

Powell MJ, Davies MS, Francis D. 1986. The influence of zinc on the cell cycle in the root meristem of a zinc-tolerant and a non-tolerant cultivar of *Festuca rubra* L. *New Phytol* 102: 419-428.

Prasad KVSK, Saradhi PP, Sharmila P. 1999. Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in *Brassica juncea*. *Environ Exp Bot* 42: 1-10.

Prasad MNV. 2004. *Phytoremediation of metals and radionuclides in the environment: the case for natural hyperaccumulators, metal transporters, soil-amending chelators and transgenic plants*. *In:* M.N.V. Prasad. [ed.] Heavy Metal Stress in Plants: From Molecules to Ecosystems. Springer-Verlag, Berlin, 345-391 pp.

Prasad TNVKV , Sudhakar P, Sreenivasulu Y, Latha P, Munaswamy V, Raja Reddy K, Sreeprasad TS , Sajanlal PR , Pradeep T. 2012. Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of peanut. *J Plant Nutr* 35:905-927.

Quariti O, Gouia H, Ghorbal MH. 1997. Responses of bean and tomato plants to cadmium: growth, mineral nutrition, and nitrate reduction. *Plant Physiol Biochem* 35: 347-354.

Rao MKV, Sresty TVS. 2000. Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. *Plant Sci* 157: 113-128.

Remans T, Opdenakker K, Guisez Y, Carleer R, Schat H, Vangronsveld J, Cuypers A. 2012. Exposure of *Arabidopsis thaliana* to excess Zn reveals a Zn-specific oxidative stress signature. *Environ Exp Bot* 84: 61-71.

Ren F, Liu T, Liu H, Hu B. 1993. Influence of zinc on the growth, distribution of elements, and metabolism of one-year old American ginseng plants. *J Plant Nut* 16: 393-405.

Rengel Z, Graham RD. 1995. Wheat genotypes differ in zinc efficiency when grown in the chelate buffered nutrient solution. *J Exp Bot* 47: 217-226.

Rivelli AR, De Maria S, Puschenreiter M, Gherbin P. 2012. Accumulation of cadmium, zinc, and copper by *Helianthus annuus* L.: impact on plant growth and uptake of nutritional elements. *Int J Phytorem* 14: 320-334.

Rout GR, Das P. 2003. Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. Zinc. *Agronomie* 23: 3-11.

Roxas VP, Smith JR, Allen RK, Allen RD. 1997. Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nat Biotechnol* 15(10): 988-991.

Roy M, Couillard D. 1998. Metal leaching following sludge application to a deciduous forest soil. *Water Res* 32: 1642-1652.

Rudhe C, Clifton R, Chew O, Zeman K, Richter S, Lamppa G, Whelan J, Glaser E. 2004. Processing of the dual targeted precursor protein of glutathione reductase in mitochondria and chloroplasts. *J Mol Biol* 343: 639-647.

Santa Maria GE, Cogliatti DH. 1988**.** Bidirectional Zn-fluxes and compartmentation in wheat seedling roots. *J Plant Physiol* 132: 312-315.

Sbartai H, Djebar MR, Rouabhi R, Sbartai I, Berrebbah H. 2011. Antioxidative response in tomato plants *Lycopersicon esculentum* L. roots and leaves to zinc. *Am Eurasian J Toxicol Sci* 3: 41-46.

Schützendubel A, Polle A. 2002. Plant responses to abiotic stress: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Exp Bot* 53: 1351-1365.

Sharma R, Sahoo A, Devendran R, Jain M. 2014. Over-Expression of a Rice Tau Class Glutathione STransferase Gene Improves Tolerance to Salinity and Oxidative Stresses in *Arabidopsis*. PLoS ONE 9(3): 1-11.

Sharma CP. 2006. *Plant micronutrients*. CRC Press, 272 pp.

Sharma SS, Dietz KJ. 2008. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends Plant Sci* 14: 43-50.

Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. 2001. Structure, function andevolution of glutathione transferases: implications for classification of nonmammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J* 360: 1-16.

Simons PC, Vander Jagt DL. 1977. Purification of glutathione S-transferases from human liver by glutathione-affinity chromatography. *Anal Biochem* 82: 334-341.

Smeets K, Ruytinx J, Semane B, Van Belleghem F, Remans T, Van Sanden S, Vangronsveld J, Cuypers A. 2008. Cadmium-induced transcriptional and enzymatic alterations related to oxidative stress. *Environ Exp Bot* 63: 1.

Smith IK, Vierheller TL, Thorne CA. 1989. Properties and functions of glutathione reductase in plants. *Physiol Plant* 77:449-456.

Sonmez F. 2013. The effect of genotype and zinc on seedling growth in four wheat cultivars (*T. aestivum* L.). *Bulg J Agric Sci* 19: 117-125.

Steffens JC. 1990. The heavy metal-binding peptides of plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 41: 553-575.

Stevens RG, Creissen GP, Mullineaux PM. 2000. Characterization of pea cytosolic glutathione reductase expressed in transgenic tobacco. *Planta* 211: 537-545.

Suzuki M, Takahashi T, Tsukamoto T, Watanabe S, Matsuhashi S, Yazaki J, Kishimoto N, Kikuchi S, Nakanishi H, Mori S. 2006. Biosynthesis and secretion of mugineic acid family phytosiderophores in zinc-deficient barley. *Plant J* 48: 85-97.

Takkar PN, Walker CD. 1993. *The distribution and correction of zinc deficiency*. In Robson A.D. (Ed.), Zinc in Soils ans Plantss, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 151-165 pp.

Thomine S, Lelièvre F, Debarbieux E, Schroeder JI, Barbier-Brygoo H. 2003. AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *Plant J* 34: 685-695.

Toppo S, Vanin S, Bosello V, Tosatto SCE. 2008. Evolutionary and structural transport in plants. *Biochim Biophys Acta* 1465: 104-126.

Vallee BL, Falchuk KH. 1993. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev* 73: 79-118.

Van Assche F, Clijsters H. 1986. Inhibition of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* by treatment with toxic concentrations of zinc: effects on electron transport and photo-phosphorylation. *Physiol Plant* 66: 717-721.

Vangronsveld J, Clijsters H. 1994. *Toxic effects of metals*. In: Farago ME, editor. Plants and the Chemical Elements. Biochemistry, Uptake, Tolerance and Toxicity. VCH Publishers, Weinheim, Germany, 150-177 pp.

Vasconcelos M, Datta K, Oliva N, Khalekuzzaman M, Torrizo L, Krishan S, Oliveira M, Goto F, Datta SK. 2003. Enhanced iron and zinc accumulation in transgenic rice with the ferritin gene. *Plant Sci* 164: 371-378.

Vestena S, Cambraia J, Ribeiro C, Oliveira JA, Oliva MA. 2011. Cadmium-induced Oxidative Stress and Antioxidative Enzyme Response in Water Hyacinth and Salvinia. *Braz J Plant Physiol* 23(2): 131-139.

von Wirén N, Klair S, Bansal S, Briat J-F, Khodr H, Shioiri T, Leigh RA, Hider RC. 1999. Nicotianamine chelates both FeIII and FeII. Implications for metal transport in plants. *Plant Physiol* 119: 1107-1114.

Wang H, Zhong G, Shi G, Pan F. 2011. Toxicitiy of Cu, Pb and Zn on seed germination and young seedlings of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Comp Comput Technol Agric IV* 346: 231-240.

Welch RM, Graham RD. 2004. Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. *J Exp Bot* 55: 353-364.

White P, Broadley M. 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.

White PJ, Bowen HC, Demidchik V, Nichols C, Davies JM. 2002. Genes for calcium-permeable channels in the plasma membrane of plant root cells. *Biochim Biophys Acta (Biomembranes)* 1564: 299-309.

White PJ, Brown PH. 2010. Plant nutrition for sustainable development and global health. *Ann Bot* 105: 1073-1080.

White PJ, Whiting SN, Baker AJM, Broadley MR. 2002. Does zinc move apoplastically to the xylem in roots of *Thlaspi caerulescens*? *New Phytol* 153(2): 201-207.

Williams, L.E, Pittman J.K, Hall J.L. 2000. Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochim Biophys Acta* 1465: 104-126.

Xu F, Lagudah ES, Moose SP, Riechers DE. 2002. Tandemly duplicated Safener-induced glutathione S-transferase genes from *Triticum tauschii* contribute to genome- and organ-specific expression in hexaploid wheat. *Plant Physiol* 130(1): 362-373.

Yang X, Sun W, Jiang-Peng L, Yan-Jing L, Zeng Q-Y. 2009. Biochemical and physiological characterization of a tau class glutathione transferase from rice (*Oryza sativa*). *Plant Physiol Biochem* 47: 1061-1068.

Youssef MM, Azooz MM. 2013. Biochemical studies on the effects of zinc and lead on oxidative stress, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in okra (*Hibiscus esculentus* cv. *Hassawi*). *Sci Int* 1: 29-38.

Zettl R, Schell J, Palme K. 1994. Photoaffinity labeling of *Arabidopsis thaliana* plasma membrane vesicles by 5-azido-[7-3H]indole-3-acetic acid: identification of a glutathione S-transferase. *PNAS* 91: 689-693.