

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski studij biologije

Magdalena Grgić

BILJNE LIPOKSIGENAZE I NJIHOVA FIZIOLOŠKA ULOGA

Završni rad

Mentorica: prof.dr.sc.Elizabeta Has-Schön

Neposredna voditeljica: dr.sc.Rosemary Vuković

Osijek, 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju

Završni rad

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

Biljne lipoksigenaze i njihova fiziološka uloga

Magdalena Grgić

Mentorica: prof.dr.sc.Elizabeta Has-Schön

Neposredna voditeljica: dr.sc. Rosemary Vuković

Kratak sažetak završnog rada:

Selen kao mikronutrijent u biljkama može imati dvojno djelovanje. U malim količinama djeluje antioksidacijski, potičući aktivnost mnogih enzima koji sudjeluju u odgovoru na oksidacijski stres, dok u velikim količinama djeluje prooksidacijski i toksično. Cilj ovog rada bio je odrediti utjecaj različitih koncentracija selena u obliku selenita i selenata na ekspresiju lipoksigenaza (LOX) i razinu lipidne peroksidacije (LPO) u izdancima pšenice (*Triticum aestivum* L.). LOX su enzimi koji u biljci kataliziraju stvaranje hidroperoksida polinezasićenih masnih kiselina iz kojih daljnjim metaboličkim putevima nastaju oksilipini. Uloga oksilipina u stanici je značajna jer ih biljke sintetiziraju tijekom stresa, napada patogena ili biljojeda. Kada je biljka izložena stresu, količina LOX-a u biljci raste. U ovom istraživanju pšenica je tretirana različitim koncentracijama selena ($0.01 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$, $0.1 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ i $1 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$) u obliku selenita i selenata, te su nakon 15 dana u izdancima mjereni ekspresija LOX enzima i reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline (TBARS) kao pokazatelja razine LPO. Kod svih tretmana selenom, ekspresija LOX-a u izdancima bila je manja u odnosu na kontrolnu skupinu što ukazuje na negativni učinak selena na ekspresiju ovog enzima. Budući da količine TBARS-a u izdancima pšenice kod različitih tretmana nisu bile značajno veće u odnosu na kontrolu, možemo zaključiti da pri navedenim koncentracijama selen ni u jednom obliku ne izaziva pojačani oksidacijski stres u biljci.

Broj stranica: 20

Broj slika: 3

Broj tablica: 0

Broj literaturnih navoda: 52

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: biljne lipoksigenaze, lipidna peroksidacija, pšenica, selen

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Biology

Bachelor's thesis

Scientific Area: Natural Sciences

Scientific Field: Biology

Plant lipoxygenases and their physiological function

Magdalena Grgić

Supervisor: Ph. D. Elizabeta Has-Schön, professor

Assistant in charge: Ph.D. Rosemary Vuković

Short abstract:

As a micronutrient, selenium has a dual role in plants. At lower concentrations it acts as an antioxidant and stimulates oxidative stress response enzymes, whereas in higher concentrations it acts as a pro-oxidant and it is toxic. The aim of this study was to determine the effects of different forms and concentrations of selenium on the expression of plant lipoxygenases (LOX) and lipid peroxidation levels (LPO) in the wheat shoots (*Triticum aestivum* L.). LOX enzymes catalyze the formation of unsaturated fatty acid hydroperoxide from polyunsaturated fatty acids, from which in further metabolic pathways oxylipins are formed. Oxylipins have significant role in plants because they are synthesised in response to stress, pathogen or herbivore attack. In plants subjected to stress LOX levels are increased. In this research, wheat was treated with different concentrations ($0.01 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$, $0.1 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ i $1 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$) of selenite or selenate and after 15 days, expression of LOX and LPO levels, expressed as Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS), in shoots were measured. All plants treated with both selenium forms, selenite and selenate, showed decreased levels of LOX with respect to control, indicating negative correlation between selenium treatment and LOX expression. Since the level of TBARS in shoots were not statistically different compared to control, we can conclude that selenium in neither of its forms and applied concentrations induced stress response in plants.

Number of pages: 20

Number of figures: 3

Number of tables: 0

Number of references: 52

Original in: Croatian

Key words: plant lipoxygenases, lipid peroxidation, wheat, selenium

This is deposited in Library of Department of Biology, University of J. J. Strossmayer Osijek and in National University Library in Zagreb in electronic form. It is also available on the web site of Department of Biology, University of J.J. Strossmayer Osijek.

Sadržaj

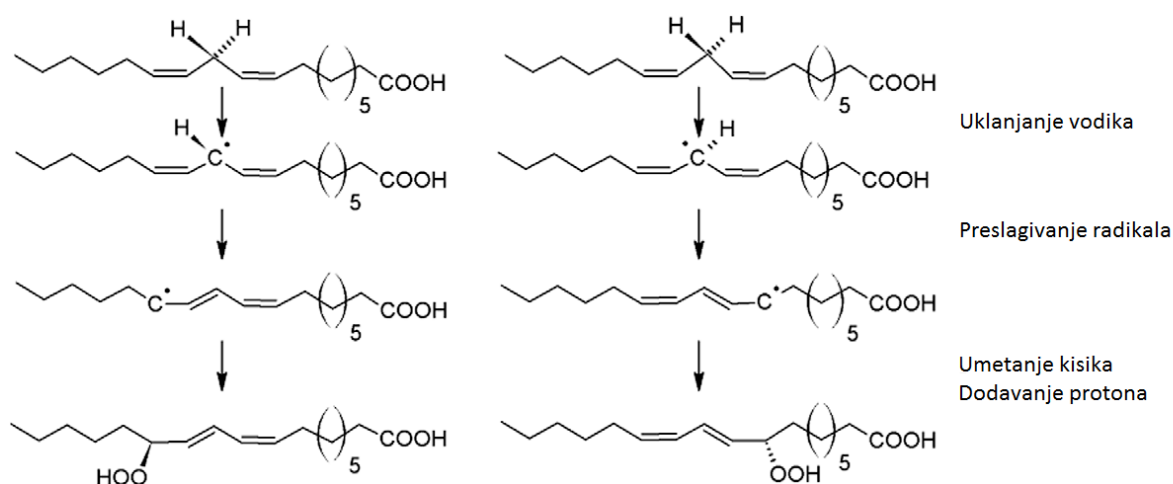
1. UVOD	1
1.1. Lipoksigenaze, građa i katalitička uloga.....	1
1.2. Fiziološke funkcije lipoksigenaza.....	3
1.3. Utjecaj selena na biljke.....	4
1.4. Cilj rada.....	5
2. MATERIJALI I METODE	6
2.1. Opis eksperimenta	6
2.2. Izolacija proteina	6
2.3. Mjerenje koncentracije proteina.....	6
2.4. Denaturirajuća elektroforeza u poliakrilamidnom gelu	7
2.5. Prijenos proteina na membranu.....	8
2.6. Bojanje proteina bojom Ponceau S.....	8
2.7. Imunodetekcija proteina na membrani.....	8
2.8. Detekcija proteina	9
2.9. Određivanje razine lipidne peroksidacije.....	9
2.10. Statistička obrada podataka.....	9
3. REZULTATI	11
3.1. Utjecaj selena na ekspresiju biljnih lipoksigenaza u izdancima pšenice.....	11
4. RASPRAVA	13
5. ZAKLJUČAK	15
6. LITERATURA	16

1. UVOD

1.1. Lipoksigenaze, građa i katalitička uloga

Prisutnost biljnih enzima koji kataliziraju oksidaciju masnih kiselina pomoću molekularnog kisika poznata je već dugi niz godina (André i Hou, 1932). Isprva su primijećeni samo u biljkama i sisavcima dok su nedavno otkriveni i u koraljima, gljivama i nekim skupinama bakterija (Andreou i sur., 2009a, Oliw, 2002). Lipoksigenaze (LOX) su porodica proteina koji sadrže ne-hemsko željezo (Brash, 1999). One kataliziraju nekoliko različitih reakcija no kod biljaka je najviše zastupljena reakcija dioksidacije (Liavonchanka i Feussner, 2006), tj. dodavanje molekularnog kisika na polinezasićene masne kiseline (PUFA) koje sadrže (Z,Z) – 1,4 – pentadiensku strukturu (u biljaka su to najčešće (9,12 ili 15)- nezasićene masne kiseline), prilikom čega nastaju hidroperoksidi polinezasićenih masnih kiselina. Iz hidroperoksida polinezasićenih masnih kiselina daljnjim metaboličkim putevima nastaju derivati koji se nazivaju oksilipini, a koji u biljnoj stanici osim na ovaj način mogu nastati i alternativnim reakcijama oksidacije. Uloga oksilipina u stanici je velika i značajna jer ih biljke sintetiziraju tijekom stresa, napada patogena ili biljojeda, te tijekom razvoja biljke. LOX enzimi su proteini veličine otprilike 95-100 kDa, koji sadrže dvije domene. Amino-terminalna domena je beta nabrana ploča oblika bačve i veličine 25-30 kDa, strukturno slična C2 domeni protein kinaze C α (PKC α) (Corbin i sur., 2007), dok je karboksi-terminalna domena veličine 55-65 kDa, a sastoji se uglavnom od alfa uzvojnica koje čine katalitičko mjesto enzima (Schneider i sur., 2007). Biljni LOX enzimi u aktivnom mjestu sadrže jedan atom željeza koji je oktaedarski koordiniran s pet aminokiselinskih ostataka (tri histidina, jedan asparagin i karboksi skupina karboksi-terminalnog izoleucina) i ligandom koji je obično voda ili molekula hidroksida. Postoji nekoliko načina prema kojima se klasificiraju biljni LOX enzimi: a) prema optimumu pH; b) prema mjestu na kojem se nalaze u stanici; c) prema izomeru koji nastaje oksigenacijom linolne kiseline (LA). Prema lokalizaciji unutar stanice mogu se nalaziti izvan i unutar plastida. LOX enzimi koji se nalaze izvan plastida imaju veliku sličnost proteinskih sekvenci (>75%) i oni se nazivaju tip 1 LOX enzimima, dok su oni koji se nalaze u kloroplastima klasificirani kao tip 2 i pripadaju potporodici 13-LOX enzima (Shibata i sur., 1994). Plastidni LOX enzimi na N-terminalnom kraju sadrže peptidnu sekvencu koja im omogućuje ulazak u kloroplaste te imaju nižu ukupnu sličnost sekvenci (>35%). Oksigenacija LA (C18) biljnim LOX enzimima može se odvijati na

devetom ili trinaestom ugljikovom atomu, pa tako nastaju 9-hidroperoksi i 13-hidroperoksi derivati LA (Liavonchanka i Feussner, 2006). Nastajanje ovih izomera ovisi o mjestu deprotonacije i reorganizaciji središnjih radikala, a kod C18 kiselina uklanjanje vodika je jedino moguće na jedanaestom ugljikovom atomu (Feussner i Kühn, 2000) (Slika 1).



Slika 1. Nastajanje položajnih izomera u reakcijama kataliziranim lipoksigenazama (preuzeto i modificirano prema Andreou i Feussner, 2009b).

Na orijentaciju i položaj supstrata u aktivnom mjestu utječe primarna građa proteina (Feussner i Kühn, 2000; Schneider i sur., 2007). Prema teoriji orijentacije supstrata (Liavonchanka i Feussner, 2006) masna kiselina može ući u aktivno mjesto orijentacijom glava-rep ili rep-glava pa nastaju linoleat 13-lipoksigenat odnosno linoleat 9-lipoksigenat ovisno o tome koja se aminokiselina nalazi na „dnu“ veznog mjesta. Kod gotovo svih biljnih 13-LOX enzima na veznom mjestu nalazi se histidinski ili fenilalaninski ostatak za razliku od 9-LOX enzima kod kojih je na veznom mjestu manji, valinski ostatak. Strukturnim modeliranjem interakcije enzim-supstrat gdje je histidin zamijenjen manjom aminokiselinom „odmaskira“ se pozitivno nabijen argininski ostatak što mu omogućuje stvaranje mosta s karboksilnom skupinom supstrata i favoriziranje glava-rep orijentacije (Hornung i sur., 1999). Osim aktivnog mjesta na položajnu specifičnost mogu utjecati i koncentracije supstrata (Kühn i sur., 1990), kemijska svojstva supstrata (Began i sur., 1999), pH (Gardner, 1989) i temperatura smjese (Georgalaki i sur., 1998). Do danas ne postoji jedinstveni koncept koji bi

objasnio utjecaj strukture proteina na nastajanje određenog izomera a koji bi bio primjenjiv za sve biljne LOX enzime. Bitno je napomenuti da neki LOX enzimi ne kataliziraju nastajanje samo jednog izomera kao i činjenicu da neki LOX enzimi isključivo kao supstrat koriste PUFA-e s određenim brojem ugljikovih atoma dok drugi ne (Andreou i sur., 2009c; Feussner i Kühn, 2000). Osim PUFA-e dokazano je da LOX enzimi mogu oksigenirati i druge molekule, kao što su fosfolipidi i galaktolipidi (Brash, 1999; Maccarrone i sur., 1994; Murray i Brash, 1988; Perez – Gilabert i sur., 1998) triacilgliceroli (Feussner i sur., 1997; 1998, Fuller i sur., 2001; Gerhardt i sur., 2005; Holtman i sur., 1997) i esteri kolesterola (Belkner i sur., 1991; 1998).

1.2. Fiziološke funkcije lipoksigenaza

Osim u odraslim biljkama, LOX enzimi su prisutni i u sjemenkama (Siedow, 1991), a ovisno o biljnoj vrsti, imaju različite uloge. LOX iz sjemenki krastavaca, koji kliju uzgajani u mraku, oksigeniraju skladišne masne kiseline koje se tada prvenstveno otpuštaju iz lipidnih tijela (Feussner i sur., 2001), dok u sjemenkama soje LOX enzimi ne sudjeluju u mobilizaciji lipida tijekom klijanja (Wang i sur., 1999). Također, osim tijekom razvoja sjemenki, LOX imaju ulogu i u vegetativnom razvoju biljke. U gomoljima krumpira LOX su uključeni u rast gomolja vjerojatno preko sinteze oksilipna koji kontroliraju njihov rast i razvoj (Kolomiets i sur., 2001), dok je tijekom sazrijevanja plodova rajčice aktivno nekoliko različitih izooblika LOX-a. Ekspresiju LOX-a potiču različiti faktori razvoja a moguće je i da su oni sami uključeni u stvaranje aldehida koji su zaslužni za specifičnu aromu i okus rajčice ili degradaciju tilakoidnih membrana u kloroplastima (Griffiths i sur., 1999). LOX enzimi su i jedan od vegetativnih skladišnih proteina. Mahune soje akumuliraju velike količine ovih proteina tijekom razvoja sjemenki a nakon što su one u potpunosti razvijene njegova količina značajno opada (Dubbs i Grimes, 2000). Funkcija LOX-a tijekom ranjavanja biljaka uglavnom je povezana sa sintezom spojeva koji služe kao signalne molekule, a jedna od najviše istraživanih signalnih molekula je jasmonična kiselina (JA) i njezin prekursor fitodienoična kiselina (OPDA) čije stvaranje katalizira hidroperoksid-dehidrataza (eng. *allene oxide synthase* - AOS) smještena na unutarnjoj membrani kloroplasta (Froehlich i sur., 2001). Nakon ranjavanja biljke koncentracije JA i OPDA značajno narastu (Creelman i Mulet, 1997, Parchmann i sur., 1997) a u istraživanju u kojem su biljke tretirane tim spojevima, došlo je do sinteze LOX-a (Porta i sur., 1999) i spojeva koji u biljci služe kao obrana od biljojeda (Creelman i Mulet, 1997). Zbog toga se može

pretpostaviti da ovakav mehanizam pozitivne povratne sprege može aktivirati stvaranje dodatnih količina LOX-a u stanici ali i drugih oksilipina koji imaju ulogu u odgovoru na ranjavanje biljke. Za razliku od LOX enzima na unutarnjoj strani kloroplasta koji surađuju s AOS, hidroperokside koje stvaraju LOX enzimi na vanjskoj strani membrane kloroplasta koristi protein hidroperoksid-liaza (HPL) (Froehlich i sur., 2001). HPL katalizira stvaranje hlapljivih komponenti tijekom ozljeda na biljkama koje stvaraju kukci, a njihova uloga je privlačenje prirodnih predatora kukaca koji napadaju biljku (Agrawal, 2000). Kod grahorice *Phaseolus lunatus*, koja je bila zaražena crvenim paukom (*Tetranychus urticae*) otkrivene su velike količine transkripta LOX-a i njihova povećana aktivnost. Nakon izlaganja listova nezaražene biljke hlapljivim tvarima iz zaražene, dobiven je isti rezultat, povećana aktivnost LOX-a i povećana količina transkripta LOX-a (Arimura i sur., 2000). Tijekom napada patogena na biljku dolazi do hipersenzitivnog odgovora biljke – stanične smrti na mjestu infekcije zbog gubitka integriteta membrane i stvaranja lipidnih peroksida. Listovi duhana koji su bili tretirani proteinskim elicitorom kriptogeinom imali su veće količine i 9-LOX-a i 13-LOX-a. Izooblik 13-LOX uključen je u put stvaranja JA, koja pak potiče aktivnost izooblika 9-LOX, odnosno oksidaciju lipida stanične membrane zbog čega dolazi do njezinog propadanja i na kraju same smrti stanice (Rustérucci i sur., 1999).

1.3. Utjecaj selena na biljke

Selen (Se) je kao mikronutrijent esencijalan za niže biljke dok nije dokazana njegova potreba u višim biljkama (Terry i sur., 2000). Apsorpcija selena u biljke ovisi o mnogo faktora: vrsti i razvojnom stadiju biljke, obliku i koncentraciji selena u tlu, svojstvima tla i sposobnosti biljke za njegovo metaboliziranje. Biljke unose selen apsorpcijom iz tla u dva anorganska oblika, selenit (SeO_3^{2-}) i selenat (SeO_4^{2-}). Ukoliko se selen unosi u obliku selenata, potrebna je njegova redukcija do selenita, koji se potom reducira do selenida a zatim ugrađuje u biljne proteine u obliku selenocisteina (Se-Cys) ili selenometionina (Se-Met). Učinak selena na biljku ovisi o njegovoj koncentraciji u tlu (Shankar, 2006), odnosno o stupnju apsorpcije u biljku. Singh i suradnici (1980) su u svojem istraživanju pokazali kako selen u malim količinama ($0.5 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1} \text{ Se}$) ima pozitivno djelovanje na rast i povećanje suhe tvari indijske gorušice, dok u velikim koncentracijama inhibira rast i klijanje zelene salate, rajčice i rotkvice (Carvalho i sur., 2003). Osim utjecaja na rast i razvoj biljaka, selen utječe i na antioksidacijsku sposobnost biljaka. Jedan od razloga tome je i to što je on

komponenta mnogih enzima koji sudjeluju u odgovoru na oksidacijski stres, među njima i glutation-peroksidaze (Hartikainen i sur., 2000, Rios i sur., 2009). Tijekom stresnog razdoblja uzrokovanog sušom, hladnoćom, UVB stresom i drugim biotičkim i abiotičkim čimbenicima selen potiče antioksidacijsku aktivnost biljaka (Hartikainen i Xue, 1999, Djanaguiraman i sur., 2005). Mnoga istraživanja su dokazala kako selen u niskim koncentracijama potiče antioksidacijsku aktivnost u stanici dok je njegova primjena u višim koncentracijama toksična za stanicu (Nowak i sur., 2004, Hartikainen i sur., 2000, Rios i sur., 2009).

1.4. Cilj rada

Cilj ovog rada bio je odrediti utjecaj različitih koncentracija selena u obliku selenita i selenata na ekspresiju biljnih LOX enzima i razinu lipidne peroksidacije (LPO) u izdancima pšenice (*Triticum aestivum* L.).

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Opis eksperimenta

Modelni organizam u ovom eksperimentu bila je pšenica, *Triticum aestivum* L. Pšenica je uzgajana 15 dana u plastičnim posudama dimenzija: dužina 19.5 cm, širina 17.5 cm, dubina 11 cm, volumen 2 L i ukupna površina od 0.034 m² u kojima se nalazilo 1.8 kg tla po posudi odnosno 1.6 kg suhog tla. Vlažnost tla bila je 11% a nakon zalijevanja otopinama selena 30%. U svaku posudu je zasađeno 100 zrna pšenice i dodano 20 gujavica te zaliveno sa 250 mL vode i 50 mL otopine selenita odnosno otopine selenata po posudi. Ukupno su bile 24 posude: 6 kontrolnih te 18 eksperimentalnih s po 3 posude za svaku od 3 koncentracije selenita odnosno selenata. Koncentracije selenita i selenata bile su jednake a iznosile su: 0.01 mg × kg⁻¹, 0.1 mg × kg⁻¹ i 1 mg × kg⁻¹. Pšenica je rasla u fitotronu na 20 °C, 70% vlage, te na 16/8 h ciklusu dana i noći tijekom 15 dana.

2.2. Izolacija proteina

Klijanci pšenice su usitnjeni u sitni prah u tekućem dušiku pomoću tučka i tarionika i suspendirani u 1 mL ekstrakcijskog pufera (100 mM natrij-fosfatni pufer, pH 7.0 i 1 mM EDTA). Homogenati su zatim centrifugirani 15 min na 22 000 g i +4 °C. Dobiveni su supernatanti služili za određivanje koncentracije proteina te određivanje ekspresije LOX-a.

2.3. Mjerenje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u tkivnim ekstraktima određena je metodom po Bradfordu (1967). Postupak se temelji na nespecifičnom vezanju anionskog oblika boje Coomassie briljant plavo G-250 (CBB G-250) za proteine u kiselom mediju, uslijed čega dolazi do stvaranja kompleksa protein – boja i pomaka maksimuma apsorbancije s 465 nm na 595 nm. Razrijeđeni proteinski ekstrakt (100 µL) pomiješan je s 1 mL Bradford reagensa (100 mg CBB G-250, 50 mL etanola, 100 mL 85% fosforne kiseline, dH₂O do 1 L) i inkubiran 5 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim je na spektrofotometru izmjeren intenzitet obojenja otopine pri valnoj duljini 595 nm. Za standardizaciju je korišten albumin goveđeg seruma (BSA) u području koncentracija 0.01 – 0.15 mg × mL⁻¹. Iz vrijednosti izmjerenih apsorbancija poznatih koncentracija BSA dobiva se standardna krivulja iz koje se potom određuje koncentracija proteina u ekstraktima.

2.4. Denaturirajuća elektroforeza u poliakrilamidnom gelu

Ukupni proteini izdanka pšenice razdvajani su diskontinuiranom natrijev dodecil sulfat – poliakrilamid-gel elektroforezom (engl. *Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE). Razdvajanje proteina provedeno je u 4%-tnom gelu za sabijanje i 12%-tnom gelu za razdvajanje metodom po Laemmliju (1970). Nakon pripreme je otopina gela za razdvajanje izlivena u kalup, kojeg čine dvije staklene ploče te je nadsvođena 20%-tnim etanolom kako bi se omogućila polimerizacija gela. Nakon što je polimerizirao, na donji je gel izliven gel za sabijanje u koji je zatim uronjen češalj kako bi se oblikovale jažice u koje nanosimo uzorke. Neposredno prije nanošenja na gel, proteinski su uzorci pomiješani s *Laemmli* puferom za denaturaciju (125 mM Tris (pH 6.8), 4% (w/v) SDS, 10% (v/v) β -merkaptoetanol, 32% (v/v) glicerol, kap bromfenola plavog) u omjeru 4:1 i zagrijavani 5 min u kupelji na +80 °C, kako bi se proteini denaturirali i povezali sa SDS-om. Nakon kratkog centrifugiranja uzorci su nanešeni u jažice, tako da je u svaku jažicu dodano 30 μ g proteina. U jednu jažicu nanešen je proteinski standard, koji služi za pokazivanje položaja proteina određene molekularne mase na gelu za vrijeme elektroforeze. Elektroforeza je provedena u kadici za vertikalnu elektroforezu *Mini-Protean Tetra system* (BIO-Rad) u 1 \times puferu za elektroforezu (25 mM Tris, 0.192 M, 10% (w/v) SDS, pH 8.3) pri uvjetima napona od 100 V tijekom prolaska proteina kroz gel za sabijanje (oko 15 minuta), nakon čega je slijedilo povećanje napona na 150 V. Elektroforeza je zaustavljena nakon što je fronta boje bromfenol plavo došla do ruba gela.

Gel za razdvajanje, 12% -tni

deH₂O - 1.675 mL

1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) - 1.25 mL

Akrilamid, 29.2%/Bis-akrilamid, 0.8% (30%AA/Bis) - 2 mL

SDS, 10 % - 50 μ L

APS - 25 μ L

TEMED - 5 μ L

Gel za sabijanje, 4% -tni

deH₂O - 1.525 mL

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) - 0.625 mL

Akrilamid, 29.2%/Bis-akrilamid, 0.8% (30%AA/Bis) - 333 μ L

SDS, 10 % - 25 μ L

APS – 12.5 μ L

TEMED - 5 μ L

2.5. Prijenos proteina na membranu

Nakon što su proteini izdanka pšenice razdvojeni SDS-PAGE elektroforezom proteini iz gela su preneseni na PVDF membranu „mokrim prijenosom“ u puferu za prijenos (25 mM Tris, 192 mM glicin, 20% metanol, pH 8.47). Dobiveni gel je prije prijenosa ispran u 100 mL pufera za prijenos kako bi se uklonile soli i detergentski, dok je membrana za prijenos ovlažena u metanolu (3 min), isprana vodom i ekvilibrirana u puferu za prijenos. Nakon pripreme membrane i gela, u kadici s puferom za prijenos slagana je kazeta za prijenos proteina: na dobro namočenu spužvicu, slaže se redom komad navlaženog filter papira (Whatman), gel, PVDF membrana, navlaženi filter papira (Whatman) te ponovno namočena spužvica. Kazeta je zatvorena pazeći da ne dođe do pomicanja slojeva. Prijenos je provođen u kadici za vertikalnu elektroforezu *Mini-Protean Tetra system* (BIO-Rad) do vrha napunjenoj puferom za prijenos, pri 100 V tijekom 2 sata. Po završetku, kazeta je pažljivo rastavljena a membrana je prije bojenja ispirana u 100 ml PBS pufera tijekom 10 min.

2.6. Bojanje proteina bojom Ponceau S

Nakon prijenosa proteina na membranu, kako bi se provjerila uspješnost prijenosa proteina, membrana je bojana otopinom boje Ponceau S (3% (m/v) trikloroetene kiseline, 3% (m/v) sulfosalicilne kiseline, 0.2% (m/v) Ponceau S). Membrana je inkubirana u 10 mL otopine Ponceau S oko 5 min uz zibanje, prilikom čega su se proteinske vrpce obojile u ružičasto.

2.7. Imunodetekcija proteina na membrani

Nakon prijenosa proteina na membranu i provjere prijenosa bojenjem s bojom Ponceau S, LOX enzimi se detektiraju pomoću specifičnih protutijela. Membrana je nakon odbojavanja inkubirana u reagensu za blokiranje (5% (m/v) nemasno mlijeko u prahu u 1x puferu PBS) tijekom 2-3 sata, kako bi se blokirala sva mjesta na membrani na kojima nema vezanih proteina. Nakon blokiranja, membrana je inkubirana u otopini s primarnim protutijelima (*Agrisera Antibodies, AS06 128*) razrijeđenih u reagensu za blokiranje u omjeru 1:1000. Inkubacija s primarnim protutijelima odvijala se uz lagano miješanje na orbitalnoj miješalici tijekom noći, na 4°C. Sljedeći dan membrana je 4 puta ispirana u 100 mL PBS pufera po 10 min. Nakon ispiranja, membrana je inkubirana tijekom 2 sata u otopini sekundarnih protutijela (*Santa Cruz Biotechnology, Inc., donkey anti-abbit IgG-HRP: sc-2313*) razrijeđenih u reagensu za blokiranje u omjeru 1:5000. Nakon inkubacije membrana je 3 puta po 10 min ispirana u 100 ml PBS pufera.

2.8. Detekcija proteina

Za detekciju proteina korištena je kolorimetrijska metoda za peroksidazu, prilikom čega se kao kromogeni supstrat koriste H_2O_2 i 3,3-diaminobenzidin tetrahidroklorid (DAB). Isprana membrana se inkubira u otopini H_2O_2 i DAB-a, koja je pripremljena otapanjem komercijalnog reagensa (*SIGMAFAST™ DAB with Metal Enhancer tablet*) u obliku tablete u vodi. Nekoliko minuta nakon inkubacije nastalo je tamno obojenje na mjestu reakcije. Bojenje je prekinuto prema vlastitoj procjeni nakon 10-15 min, a membrana ostavljena da se osuši na zraku. Membrana je nakon bojenja dokumentirana skeniranjem pomoću printera Canon MP280. Intenzitet vrpce kvantificiran je softverom Kodak 1-D image analysis (Eastman Kodak, New Haven, SAD) i normaliziran prema kontrolnoj skupini.

2.9. Određivanje razine lipidne peroksidacije

Razina LPO u izdancima pšenice određena je metodom po Vermau i Dubeyu (2003), mjerenjem reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline (TBARS). Smrznuti izdanci pšenice su usitnjavani u tekućem dušiku pomoću tučka i tarionika. Usitnjeno je tkivo (200 mg) 15 minuta ekstrahirano u 1 mL 0.1% (w/v) trikloroctene kiseline (TCA). Nakon centrifugiranja homogenata 5 minuta pri 6 000 g na +4 °C, na 0.5 mL dobivenog supernatanta dodan je 1 mL reagensa za određivanje MDA (0.5% (w/v) tiobarbituratna kiselina (TBA) u 20% (w/v) otopini TCA). Kao slijepa proba koristila se reakcijska smjesa (0.5 mL 0.1% TCA i 1 mL reagensa TCA/TBA). Reakcijska je smjesa inkubirana 30 minuta u vodenoj kupelji na +95 °C, nakon čega je reakcija zaustavljena hlađenjem u ledenoj kupelji te centrifugirana 15 minuta na 18 000 g i +4 °C. Tijekom zagrijavanja kisele reakcijske smjese lipidni peroksidi se raspadaju, pri čemu nastaje MDA koji reagira s TBA, a intenzitet nastalog crvenog obojenja određen je spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije pri 532 nm i 600 nm. Apsorbancija pri 600 nm oduzima se od apsorbancije pri 532 nm zbog korekcije za nespecifičnu reakciju. Količina TBARS-a izračunata je na temelju ekstinkcijskog koeficienta ($\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) i izražena u nmol po gramu svježe tvari ($\text{nmol} \times \text{g}^{-1} \text{ sv.tv.}$).

2.10. Statistička obrada podataka

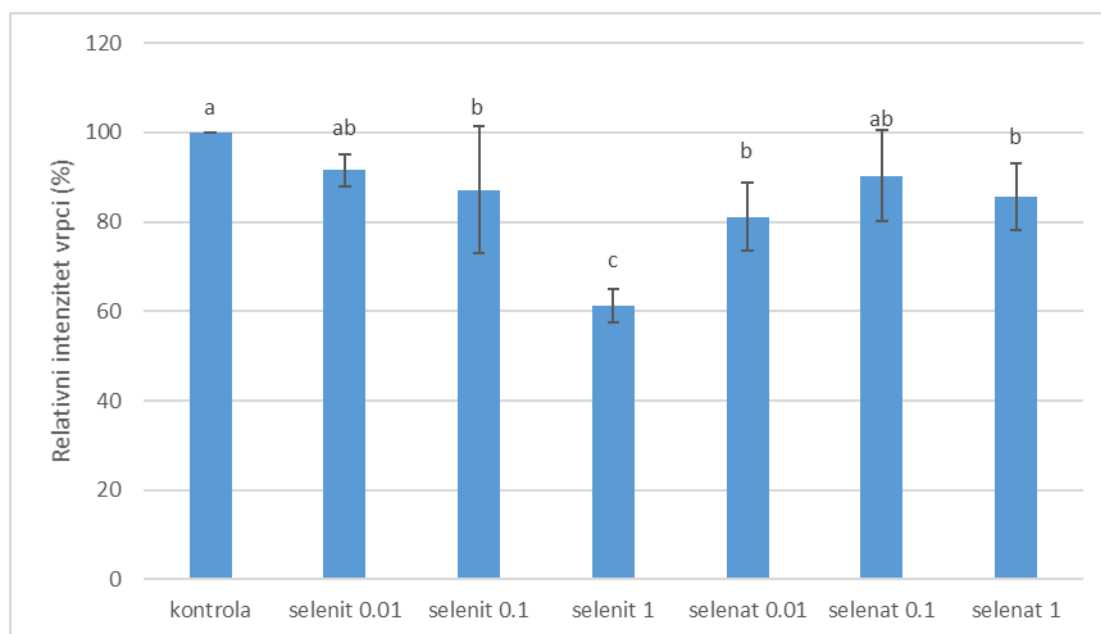
Unutar svake skupine uzorkovano je 6 replika tkiva, po dvije replike iz svake uzgojne posude. Podaci dobiveni u ovom radu obrađeni su u statističkom

programu STATISTICA 12.0 (Statsoft, Inc, Tulsa, SAD). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija (SD). Razlike između srednjih vrijednosti skupina (kontrola i različiti tretmani) utvrđene pomoću analize varijance s jednim promjenjivim faktorom (one-way ANOVA). Nakon što je utvrđeno postojanje razlika, provedeno je post hoc testiranje pomoću LSD testa. Svi testovi provedeni su uz razinu značajnosti od 5%.

3. REZULTATI

3.1. Utjecaj selena na ekspresiju biljnih lipoksigenaza u izdancima pšenice

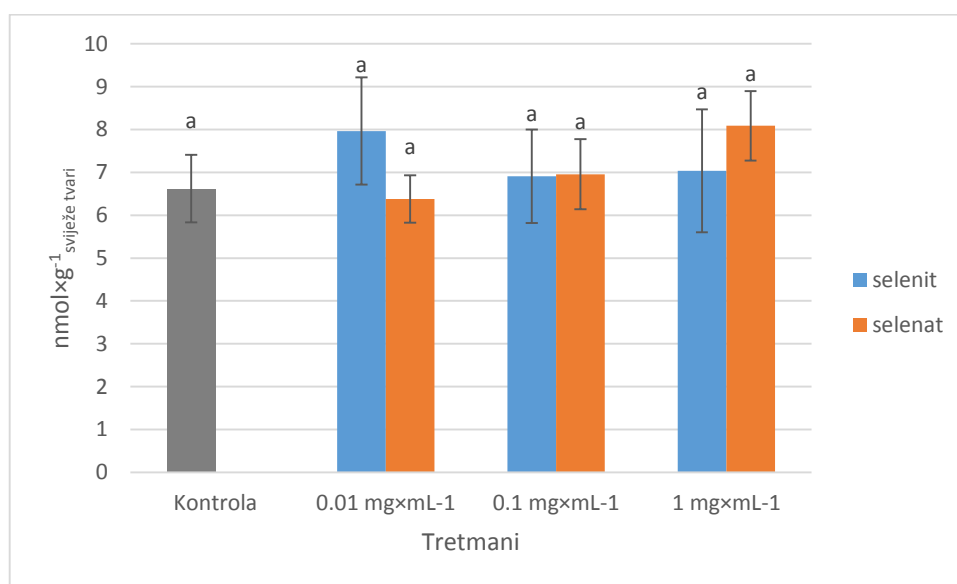
U odnosu na kontrolnu skupinu primjećuje se kako porastom koncentracije selenita opada intenzitet vrpca, odnosno ekspresija LOX-a u odnosu na kontrolnu skupinu. Najmanju ekspresiju LOX-a ima skupina tretirana najvećom koncentracijom selenita ($1 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$). Kod izdanaka pšenice tretiranih selenatom, ekspresija LOX-a također značajno opada u odnosu na kontrolu kod tretmana koncentracijama 0.01 i $1 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$, dok kod tretmana koncentracijom selenata od $0.1 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$ ima trend opadanja, ali ta razlika u odnosu na kontrolu nije statistički značajna (Slika 2.)



Slika 2. Relativni intenzitet vrpca lipoksigenaze 15 dana nakon tretmana otopinama različitih koncentracija selenita i selenata (0.01 , 0.1 i $1 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$). Intenzitet vrpca kvantificiran je softverom Kodak 1-D image analysis (Eastman Kodak, New Haven, SAD) i normaliziran prema kontrolnoj skupini. Razlike između skupina testirane su LSD *post hoc* testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($P < 0.05$).

3.2. Utjecaj selena na razinu lipidne peroksidacije u izdancima pšenice

Slika 3 prikazuje količinu TBARS-a u izdancima pšenice 15 dana nakon tretmana trima različitim koncentracijama selenita i selenata (0.01 , 0.1 i $1 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$). Koncentracija TBARS-a nakon tretmana selenitom i selenatom ostaje nepromijenjena u odnosu na kontrolnu skupinu tretiranu vodom. Iako veće koncentracije selenata imaju tendenciju povećanja količine TBARS-a, te razlike nisu statistički značajne.



Slika 3. Količina TBARS-a u izdancima pšenice 15 dana nakon tretmana trima različitim koncentracijama selenita i selenata (0.01 , 0.1 i $1 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$). Kontrolni izdanci su tretirani vodom. Rezultati ($n=6$) su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SD. Razlike između srednjih vrijednosti kontrole i tretmana (više skupina podataka) utvrđene pomoću analize varijance s jednim promjenjivim faktorom (one-way ANOVA).

4. RASPRAVA

Selen kao mikronutrijent u biljku se apsorbira kroz korijen u obliku selenita i selenata. Primanje selenata u biljku je znatno brže u odnosu na selenit, te se lakše prenosi do listova, dok selenit ima tendenciju zadržavanja u korijenu (Zayed i sur., 1998). Od selena koji se kroz korijen apsorbirao u obliku selenata, 84% i više se translocira prema listu dok je kod selenita taj postotak 47% ili više (Hopper i Parker, 1999). Hartikainen i suradnici (2000) su dokazali dvostruku ulogu koju primjena selena može imati na biljke. U nižim koncentracijama (0.1 i $1.0 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ tla) selen se ponaša kao antioksidans i smanjuje stupanj LPO dok pri višim koncentracijama (10.0 i $30.0 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ tla) ima prooksidativan učinak, odnosno u biljkama izaziva stres. Kao pouzdani pokazatelji stresa u biljci mogu se mjeriti stupanj LPO biljaka izražen kao aktivnost LOX-a i koncentracija MDA koji nastaje raspadanjem lipidnih peroksida. LOX enzimi kataliziraju stvaranje lipidnih hidroperoksida iz kojih nastaju spojevi koji mogu potaknuti odgovor biljke na stres. Pri koncentracijama selena u ovom istraživanju (0.01 , 0.1 i $1 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$) ekspresija LOX-a u pšenici je u svim uzorcima bila manja u odnosu na kontrolnu skupinu, pa je i njezina aktivnost bila manja. Kod uzoraka tretiranih selenitom s povećanjem koncentracije ekspresija LOX-a se smanjuje, dok je pri koncentraciji od $1 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$ ekspresija najmanja u odnosu na kontrolu. U tretmanima selenatom najveću ekspresiju izazvala je koncentracija selena od $0.1 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$, no to je i dalje manja ekspresija u odnosu na kontrolu. To upućuje na zaključak da selen pri ovim koncentracijama ne izaziva odgovor na stres kod biljke, iako na neki način utječe na smanjenje ekspresije LOX-a. Tome u prilog idu i izmjerene količine TBARS-a u stanci koje pokazuju kako između skupina koje su imale različite tretmane nema statistički značajne razlike. Tijekom stresa, pod utjecajem različitih abiotičkih i biotičkih faktora u stanici dolazi do nakupljanja H_2O_2 koji može kao ostali reaktivni kisikovi spojevi oštetiti lipidnu membranu. U istraživanju Rios i suradnika (2009) ispitivan je utjecaj različitih koncentracija (5 , 10 , 20 , 40 , 60 , 80 i $120 \mu\text{M}$) selenita i selenata na količine H_2O_2 u stanicama zelene salate (*Lactuca sativa*) a kao pokazatelj stupnja lipidne peroksidacije mjerili su količinu MDA i aktivnost LOX-a. Svi primijenjeni tretmani su uzrokovali porast aktivnosti LOX-a, količine MDA i koncentracije H_2O_2 . Također, zanimljiv je podatak da je kod svih biljaka primjena selenita izazvala veću aktivnost LOX-a, količinu MDA i koncentraciju H_2O_2 u odnosu na one biljke tretirane selenatom. Dobiveni rezultati pokazali su da je selen u obliku selenata manje toksičan iako se selenat u većoj mjeri prenosi do listova. Slične rezultate koji pokazuju da je količina mjerenog MDA veća

kod primjene selenita nego selenata dobili su Lee i Park (1998). Vodeći se rezultatima ovih istraživanja moglo bi se očekivati da će stupanj LPO u skupinama tretiranim selenitom biti veći nego u onim tretirani selenatom što se pokazalo neispravnim. Između tretmana nije bilo statistički značajne razlike u izmjerenim količinama TBARS-a u stanici, dakle u ovom slučaju nije dokazano da jedan od oblika selena unesen u biljku izaziva jači stres. Veće koncentracije selena u tretmanima (5, 10, 20, 30, 40, 60, 80 i 120 μM) koje su korištene u ranijim istraživanjima (Rios i sur., 2009, Hartikainen i sur., 2000) bi uzrokovale veći stres pa time i potaknule jači odgovor stanice, izražen kao količina LOX-a i stupanj LPO.

5. ZAKLJUČAK

Izdanci pšenice nisu pokazali da se nalaze u stanju povišenog oksidacijskog stresa, budući da različiti oblici selena pri različitim koncentracijama nisu utjecali na povećanje razine LPO. Ekspresija LOX-a, koji sudjeluju u sintezi spojeva koji potiču biljni odgovor na stres je kod svih tretmana selenom bila manja u odnosu na kontrolnu skupinu, što ukazuje na negativni učinak selena na ekspresiju ovog enzima. Stvaranje većih količina LOX enzima i povećanje stupnja LPO kao pokazatelja povećanog stresa u biljci izazvale bi koncentracije selenita i selenata veće od primijenjenih u ovom pokusu (npr. 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80 i 120 μM koje su korištene u istraživanju Rios i sur., 2009).

6. LITERATURA

Agrawal AA. 2000. Mechanisms, ecological consequences and agricultural implications of tri-trophic interactions. *Curr Opin Plant Biol* 3: 329–335.

Andre E, Hou KW. 1932. The presence of a lipoid oxidase in soybean, *Glycine soya*, Lieb. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 194:645-47.

Andreou AZ, Brodhun F, Feussner I. 2009a. Biosynthesis of oxylipins in nonmammals. *Prog. Lipid Res.* doi:10.1016/j.plipres.2009.1002.1002.

Andreou A, Feussner I. 2009b. Lipoxygenases – Structure and reaction mechanism. *Phytochemistry* 70 1504–1510.

Andreou AZ, Hornung E, Kunze S, Rosahl S, Feussner I. 2009c. On the substrate binding of linoleate 9-lipoxygenases. *Lipids* 44, 207–215.

Arimura G, Ozawa R, Shimoda T, Nishioka T, Boland W, Takabayashi J. 2000. Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. *Nature* 406: 512–515.

Began G, Sudharshan E, Rao AGA. 1999. Change in the positional specificity of lipoxygenase 1 due to insertion of fatty acids into phosphatidylcholine deoxycholate mixed micelles. *Biochemistry* 38, 13920–13927.

Belkner J, Wiesner R, Kühn H, Lankin VZ. 1991. The oxygenation of cholesterol esters by the reticulocyte lipoxygenase. *FEBS Lett.* 279, 110–114.

Belkner J, Stender H, Kühn H. 1998. The rabbit 15-lipoxygenase preferentially oxygenates LDL cholesterol esters, and this reaction does not require vitamin E. *J. Biol. Chem.* 273, 23225–23232.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.

Brash AR. 1999. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J. Biol. Chem.* 274, 23679–23682.

- Carvalho KM, Gallardo-Wilhams MT, Benson RF, Martin DF. 2003. Effects of selenium supplementation on four agricultural crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 704-709.
- Corbin JA, Evans JH, Landgraf KE, Falke JJ. 2007. Mechanism of specific membrane targeting by C2 domains: localized pools of target lipids enhance Ca²⁺ affinity. *Biochemistry* 46, 4322–4336.
- Creelman RA, Mullet JE. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 355–381.
- Djanaguiraman M, Devi DD, Shanker AK, Sheeba A, Bangarusamy U. 2005. Selenium-an antioxidative protectant in soybean during senescence. *Plant Soil*, 272: 77-86.
- Dubbs WE, Grimes HD. 2000. The mid-pericarp cell layer in soybean pod walls is a multicellular compartment enriched in specific lipoxygenase isoforms. *Plant Physiol* 123: 1281–1288.
- Feussner I, Balkenhohl TJ, Porzel A, Kühn H, Wasternack C. 1997. Structural elucidation of oxygenated storage lipids in cucumber cotyledons – implication of lipid body lipoxygenase in lipid mobilization during germination. *J. Biol. Chem.* 272, 21635–21641.
- Feussner I, Bachmann A, Höhne M, Kindl H. 1998. All three acyl moieties of trilinolein are efficiently oxygenated by recombinant His-tagged lipid body lipoxygenase in vitro. *FEBS Lett.* 431, 433–436.
- Feussner I, Kühn H. 2000. Application of lipoxygenases and related enzymes for the preparation of oxygenated lipids. In: Bornscheuer, U.T. (Ed.), *Enzymes in Lipid Modification*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, pp. 309–336.
- Feussner I, Kühn H, Wasternack C. 2001. Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. *Trends Plant Sci* 6: 268–273.
- Froehlich JE, Itoh A, Howe GA. 2001. Tomato allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase, two cytochrome P450s involved in oxylipin metabolism, are targeted to different membranes of chloroplast envelope. *Plant Physiol* 125: 306–317.

- Fuller MA, Weichert H, Fischer AM, Feussner I, Grimes HD. 2001. Activity of soybean lipoxygenase isoforms against esterified fatty acids indicates functional specificity. *Arch. Biochem. Biophys.* 388, 146–154.
- Gardner HW. 1989. Soybean lipoxygenase-1 enzymatically forms both 9(S)- and 13(S)-hydroperoxides from linoleic acid by a pH-dependent mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 1001, 274–281.
- Georgalaki MD, Bachmann A, Sotiroudis TG, Xenakis A, Porzel A, Feussner I. 1998. Characterization of a 13-lipoxygenase from virgin olive oil and oil bodies of olive endosperms. *Fett/Lipid* 100, 554–560.
- Gerhardt B, Fischer K, Balkenhohl TJ, Pohnert G, Kühn H, Wasternack C, Feussner I. 2005. Lipoxygenase-mediated metabolism of storage lipids in germinating sunflower cotyledons and β -oxidation of (9Z,11E,13S)-13-hydroxy-octadeca-9,11-dienoic acid by the cotyledonary glyoxysomes. *Planta* 220, 919–930.
- Griffiths A, Barry C, Alpuche-Solis AG, Grierson D. 1999. Ethylene and developmental signals regulate expression of lipoxygenase genes during tomato fruit ripening. *J Exp Bot* 50: 793–798.
- Hartikainen H, Xue T. 1999. The promotive effect of selenium on plant growth as triggered by ultraviolet irradiation. *Journal of Environmental Quality* 28: 1272-1275.
- Hartikainen H, Xue T, Piironen V. 2000. Selenium as an anti-oxidant and pro-oxidant in ryegrass. *Plant and Soil* 225: 193-200.
- Holtman WL, Vredenburg-Heistek JC, Schmitt NF, Feussner I. 1997. Lipoxygenase-2 oxygenates storage lipids in embryos of germinating barley. *Eur. J. Biochem.* 248, 452–458.
- Hopper JL, Parker DR. 1999. Plant availability of selenite and selenate as influenced by the competing ions phosphate and sulfate. *Plant and Soil*, 210, 199–207.
- Hornung E, Walther M, Kühn H, Feussner I. 1999. Conversion of cucumber linoleate 13-lipoxygenase to a 9-lipoxygenating species by site-directed mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 4192–4197.
- Kolomiets MV, Hannapel DJ, Chen H, Tymeson M, Gladon RJ. 2001. Lipoxygenase is involved in the control of potato tuber development. *Plant Cell* 13: 613–626.

- Kühn H, Sprecher, H, Brash AR. 1990. On singular or dual positional specificity of lipoxygenases. The number of chiral products varies with alignment of methylene groups at the active site of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 265, 16300– 16305.
- Lee GP, Park KW. 1998. Effect of Selenium concentration in the Nutrient solution on the Growth and internal quality of Endive. *Journal Korean of Society and Horticultural Science*, 39, 391–396.
- Liavonchanka A, Feussner I. 2006. Lipoxygenases: occurrence, functions and catalysis. *J. Plant Physiol.* 163, 348–357.
- Maccarrone M, Van Aarle PGM, Veldink GA, Vliegthart JFG. 1994. In vitro oxygenation of soybean biomembranes by lipoxygenase-2. *Biochim. Biophys. Acta* 1190, 164–169.
- Murray JJ, Brash AR. 1988. Rabbit reticulocyte lipoxygenase catalyzes specific 12(S) and 15(S) oxygenation of arachidonoyl-phosphatidylcholine. *Arch. Biochem. Biophys.* 265, 514–532.
- Nowak J., Kaklewski K, Ligocki M. 2004. Influence of selenium on oxidoreductive enzymes activity in soil and in plants. *Soil Biology & Biochemistry* 36: 1553-1558.
- Oliw EH. 2002. Plant and fungal lipoxygenases. *Prostag. Oth. Lipid Mediators* 68– 69, 313–323.
- Parchmann S, Gundlach H, Mueller MJ. 1997. Induction of 12-oxophytodienoic acid in wounded plants and elicited plant cell cultures. *Plant Physiol* 115: 1057–1064.
- Perez-Gilabert M, Veldink GA, Vliegthart JFG. 1998. Oxidation of dilinoleoyl phosphatidylcholine by lipoxygenase 1 from soybeans. *Arch. Biochem. Biophys.* 354, 18–23.
- Porta H, Rueda-Benítez P, Campos F, Colmenero-Flores JM, Colorado JM, Carmona MJ, Covarrubias AA, Rocha-Sosa M. 1999. Analysis of lipoxygenase mRNA accumulation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during development and under stress conditions. *Plant Cell Physiol* 40: 850–858
- Ríos JJ, Blasco B, Cervilla LM. 2009. Production and detoxification of H₂O₂ in lettuce plants exposed to selenium. *Annals of Applied Biology* 154:107-116.

- Ruste'rucci C, Montillet J-L, Agnel J-P, Battesti C, Alonso B, Knoll A, Bessoule J-J, Etienne P, Suty L, Blein J-P. 1999. Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogein of tobacco leaves. *J Biol Chem* 274: 36446–36455.
- Schneider C, Pratt DA, Porter NA, Brash AR. 2007. Control of oxygenation in lipoxygenase and cyclooxygenase catalysis. *Chem. Biol.* 14, 473–488.
- Shankar AK. 2006. Countering UV-B stress in plants: does selenium have a role? *Plant and Soil* 282: 21-26.
- Shibata D, Slusarenko A, Casey R, Hildebrand D, Bell E. 1994. Lipoxygenases. *Plant Mol. Biol. Rep.* 12, S41–S42.
- Siedow JN. 1991. Plant lipoxygenase: structure and function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42: 145–188.
- Singh M, Singh H, Bhandari DK. 1980. Interaction of selenium and sulphur on the growth and chemical composition of raya. *Soil Science* 129: 238-244.
- Terry N, Zayed AM, de Souza MP, Tarun AS. 2000. Selenium in higher plants. *The Annual Review of Plant Biology and Plant Molecular Biology* 51: 401-432.
- Wang C, Croft KPC, Ja'rlfors U, Hildebrand DF. 1999. Subcellular localization studies indicate that lipoxygenases 1 to 6 are not involved in lipid mobilization during soybean germination. *Plant Physiol* 120: 227–235.
- Zayed A, Lytle CM, Terry N. 1998. Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants. *Planta*. Vol 206, Issue 2, p. 284-292.