Učinak kadmija na ekspresiju gena antioksidativnih enzima

Dombi, Mira

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

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:181:519184

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

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

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski studij biologije

Mira Dombi

Učinak kadmija na ekspresiju gena antioksidativnih enzima

Završni rad

Mentorica: dr. sc. Ivna Štolfa Čamagajevac, docent

Neposredna voditeljica: dr. sc. Rosemary Vuković

Osijek, 2016. godina

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Završni rad

Odjel za biologiju

Preddiplomski studij biologije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

UČINAK KADMIJA NA EKSPRESIJU GENA ANTIOKSIDATIVNIH ENZIMA

Mira Dombi

Rad je izrađen: Laboratorij za biokemiju, Odjel za biologiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 2015./2016. godine

Mentorica: dr. sc. Ivna Štolfa Čamagajevac, docent

Neposredna voditeljica: dr.sc. Rosemary Vuković

Akumulacija kadmija u biljkama uzrokuje različite fiziološke, biokemijske i strukturne promjene, dok selen koji se često koristi u postupku biofortifikacije biljaka, može znatno promijeniti odgovor biljke na tretman kadmijem. Glavi cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utjecaj kadmija na ekspresiju gena antioksidativnih enzima u korijenu i izdancima klijanaca dvije sorte pšenice (Divana i Srpanjka) obogaćene selenom. Određivanje utjecaj kadmija na gene koji kodiraju glutation S-transferazu, superoksid-dismutazu i katalazu. Učinak kadmija na ekspresiju gena antioksidativnih enzima ovisio je o sorti pšenice, te o vrsti biljnog organa (korijen i izdanak).Tretman kadmijem najviše je utjecao na smanjenje ekspresije gena za glutation S-transferazu. Učinak kadmija na smanjenje ekspresije gena bio je intenzivniji u korijenu nego u izdancima. Sorta Divana pokazala se osjetljivijom na tretman kadmijem od sorte Srpanjka.

Broj stranica: 40

Broj slika: 11

Broj tablica: 2

Broj literaturnih navoda: 65

Jezik izvornika: Hrvatski

Ključne riječi: kadmij, selen, *Triticum aestivum*, antioksidativni enzimi

DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

BSc thesis

Department of Biology

Undergraduate Study of Biology

Scientific Area: Natural science

Scientific Field: Biology

THE EFFECT OF CADMIUM ON ANTIOXIDANT ENZYME GENE EXPRESSION

Mira Dombi

Thesis performed at: Laboratory of Biochemistry, Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, 2015./2016. year

Supervisior: Ph. D. Ivna Štolfa Čamagajevac, Assistant Professor

Assistant in charge: Ph. D. Rosemary Vuković

The accumulation of cadmium in plants cause a variety of physiological, biochemical and structural changes, while selenium that is often used in the process of biofortification of plants can significantly change the plants response to cadmium treatment. The main aim of this study was to determine the effect of cadmium on antioxidant enzyme gene expression in the roots and shoots of two varieties of wheat (Divana and Srpanjka) seedlings enriched with selenium. Enzymes that were observed in this study were glutathione S-transferase, Cu, Zn-Superoxid-Dismutase and catalase The effect of cadmium on antioxidant enzyme gene expression depended on the type of cultivar and the type of plant organ (root or shoot). Cadmium treatment affected the expression of glutathione S-transferase the most.The effect of cadmium on decrease in antioxidant enzyme gene expression was much more visible in the roots than in the shoots. Variety Divana was shown to be more sensitive to cadmium treatment than variety Srpanjka.

Number of pages: 40

Number of figures: 11

Number of tables: 2

Number of references: 65

Original in: Croatian

Key words: cadmium, selenium, *Triticum aestivum*, antioxidative enzymes

Sadržaj:

1. UVOD 1

1.1. Selen i biofortifikacija selenom 2

1.2. Kadmij 4

1.3. Oksidativni stres uzrokovan kadmijem 5

1.4. Cilj 5

2. MATERIJALI I METODE 6

2.1. Materijali 7

2.1.1. Biljni materijal 7

2.1.2. Oligonukleotidne početnice 7

2.2. Metode 8

2.2.1. Priprema i sterilizacija sjemenki 8

2.2.3. Izdvajanje genomske DNA 8

2.2.4. Izdvajanje ukupne RNA 9

2.2.5. Određivanje količine i kakvoće RNA 9

2.2.6. Obrnuto prepisivanje mRNA u cDNA 10

2.2.7. Lančana reakcija polimerazom (PCR) te određivanje eksponencijalne faze PCR reakcijegena za SOD, CAT i GST 10

2.2.8. Semi-kvantitativni RT-PCR 11

3. REZULTATI 13

3.1. Izdvojena ukupna RNA iz izdanaka i korijena klijanaca pšenice 14

3.2. Eksponencijalna faza umnažanja gena za ADP-ribozilacijski faktor 15

3.3. Eksponencijalna faza umnažanja gena za SOD 16

3.4. Eksponencijalna faza umnažanja gena za GST 17

3.5. Eksponencijalna faza umnažanja gena za CAT 18

3.6. Razina ekspresije gena za SOD u izdanku i korijenu klijanaca pšenice 19

3.7. Razina ekspresije gena za GST u izdanku i korijenu klijanaca pšenice 21

3.8. Razina ekspresije gena za CAT u izdanku klijanaca pšenice 23

4. RASPRAVA 24

5. GLAVNI REZULTATI I ZAKLJUČCI 28

6. LITERATURA 30

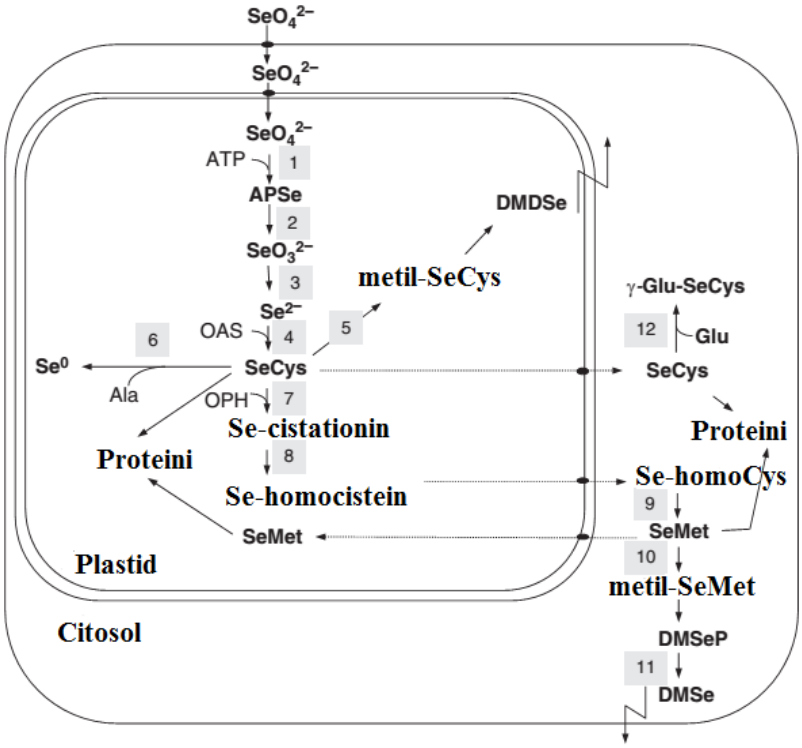
1. UVOD

1.1.Selen i biofortifikacija selenom

Kemijski element selen (Se) kemijski je sličan sumporu (S) i kao rezultat toga, biljke kao i drugi organizmi često akumuliraju i metaboliziraju selen putem sumpornih transportera i biokemijskih puteva. Budući da zamjena sumpora selenom u proteinima i drugim kemijskim spojevima koji sadrže sumpor onemogućava njihovu funkciju, selen je za veliki broj organizama toksičan u većim količinama. Na primjer, prehrana koja sadrži 1 mg kg^{-1} suhe tvari (DW) selena, može dovesti do kroničnog trovanja selenom kod ljudi i životinja, a unošenje biljnog materijala koji sadrži 1 000 mg kg^{-1} DW selena može dovesti do akutnog trovanja selenom i smrti (Draize i Beath 1935, Rosenfeld i Beath 1964, Wilber 1980). S druge strane, selen je esencijalni element u tragovima za mnoge organizme uključujući sisavce, mnoge bakterije i zelene alge (Stadtman 1990, 1996, Fu i sur. 2002). Ovi organizmi sadrže takozvane selenoproteine koji u svom aktivnom mjestu imaju selenocistein (SeCys). Organizmi koji zahtijevaju selen mogu također sadržavati i selen-tRNA (Mihara i Esaki 2002). Selenoproteini imaju antioksidativnu funkciju, uključujući i hvatanje reaktivnih kisikovih jedinki (eng. *Reactive Oxygen Species* – ROS). U vezi s tim, manjak selena povezan je s povećanom mogućnošću razvoja raka ili virusne infekcije, kao i neplodnošću kod muškaraca (Ellis i sur. 2004, Diwadkar-Navsariwala i sur. 2006, White i Broadley 2009). Ekstremni manjak selena može dovesti do bolesti bijelih mišićnih vlakana kod stoke i Keshan bolesti kod ljudi, koja je dobila naziv po pokrajini u Kini gdje je ova bolest česta (Whanger 1989). Razlika između količine selena koja je dovoljna kao nutrijent i one koja je toksična je mala, te je kao rezultat toga i manjak selena i njegova toksičnost vrlo čest problem u svijetu (Terry i sur. 2000). Poznato je da je za više biljke selen blagotvoran nutrijent, ali istraživanja pokazuju kako nije esencijalan (Hartikainen 2005, Lyons i sur. 2009, Pilon-Smits i sur. 2009). Biljni homolozi gena koji kodiraju selenoproteine u drugim organizmima, kao što su glutation-peroksidaza (GPX), umjesto SeCys u aktivnom mjestu imaju samo cistein (Cys) (Novoselov i sur. 2002). Temeljene na *in silico* analizama postavljene su hipoteze kako je esencijalni metabolizam selena primitivna osobina koja se tijekom evolucije izgubila kod viših biljaka i drugih organizama kojima nije potreban selen. S druge strane, ne može se isključiti činjenica kako neke biljke posttranslacijski mogu promijeniti aminokiselinu serin u SeCys, te tako proizvesti selenoproteine na drugi način. Također, tretmani selenom kod biljaka u niskim koncentracijama djeluju pozitivno na poboljšanje rasta, povećavaju antioksidativnu aktivnost, smanjuju nastanak ROS-a i peroksidaciju lipida, djeluju pozitivno na akumulaciju škroba i šećera, odgađaju senescenciju i poboljšavaju rast starijih sjemenki

(Xue i sur. 2001, Hartikainen i sur. 2000,Turakainen i sur. 2004). Zbog svoje kemijske sličnosti sa sumporom, selen se u biljkama apsorbira i metabolizira istim putem kao i sumpor, te dolazi do inkorporacije u molekule i specifične zamjene selenocisteina za selenometionin (SeMet) (Sors i sur. 2005, Gratão i sur. 2005). Anorganski selenat (SeO_4^{2-}) se reducira i asimilira u organski selen. Prvi organski oblik selena koji se proizvede je SeCys. Ova se aminokiselina može nespecifično inkorporirati u proteine umjesto aminokiseline Cys što može dovesti do tokičnosti. Alternativni put SeCys je njegova koverzija u SeMet koji se također može inkorporirati u proteine, ali s manje štetnim posljedicama. SeMet se također može konvertirati u promjenjivi dimetilselenid (DMSe) koji služi za uklanjanje suviška selena u biljkama (Lewis i sur. 1966). SeCys se može i metilirati tvoreći tako metil-SeCys. Ovaj oblik selena se može akumulirati u biljkama budući da se ne inkorporira u proteine (Neuhierl i sur. 1999) (Slika 1).

Vezano uz problem niskih koncentracija mikrohraniva u zrnu žitarica, često se spominje pojam biofortifikacije, koji se odnosi na povećanje poželjnih elemenata u jestivim dijelovima biljke (Eđed 2011). Biofortifikacija se odnosi na povećanje koncentracije i balansiranje esencijalnih hraniva u jestivim dijelovima biljaka uz pomoć odgovarajuće ishrane bilja i agrotehnike. Usjevi se mogu opskrbiti potrebnim hranivima na nekoliko načina: aplikacijom hraniva u tlo ili na površinu tla, fertigacijom, folijarnom prihranom, tretiranjem sjemena ili kombinirano sa sredstvima za zaštitu bilja. Svaka od opcija ima određene prednosti i nedostatke ovisno o hranivu, usjevu i svojstvima tla. Budući da je pšenica glavni izvor selena u ljudskoj prehrani, provode se brojna istraživanja kojima se želi utvrditi utječe li i u kojem intenzitetu biofortifikacija pšenice selenom na unos i povećanje koncentracije selena u ljudskom organizmu konzumacijom pšeničnih proizvoda. Selen je važna komponenta funkcionalne hrane. U mnogim dijelovima svijeta, nedostatak selena se u ljudskoj prehrani povezuje s povećanim rizikom od virusnih oboljenja i bolesti krvožilnog sustava (Beck i sur. 2003). Razlog tomu je velika količina obradivih površina s niskim koncentracijama selena što posljedično dovodi do smanjenog unosa selena u ljudski organizam (Combs 2001). Agronomska biofortifikacija žitarica selenom dokazano povećava unos selena u ljudski organizam i obogaćuje ljudsku ishranu (Hartikainen 2005). Raspon koncentracija od nedostatka do toksičnosti selena je relativno malen, te se u slučaju biofortifikacije trebaju pažljivo pratiti količine selena u konačnom proizvodu kako bi se izbjegla njegova toksičnost (White i Broadley 2009).



Slika 1. Shematski prikaz metabolizma selenau biljkama. APSe: Adenozin-fosfoselenat, SAT: serin-acetiltransferaza, OAS: *O*-acetilserin, OPH: *O*-fosfohomoserin, SeCys: selenocistein, SeMet: selenometionin, DMSeP: dimetilselenoproprionat, DMSe: dimetilselenid, DMDSe: dimetildiselenid. (1) ATP-sulfurilaza, (2) Fosfoadenilil-sulfat-reduktaza, (3) Sulfit-reduktaza, (4) O-acetil-serin (tiol)-liaza, (5) SeCys-metiltransferaza, (6) SeCys-liaza, (7) Cistationin γ-sintaza, (8) Cistationin β-liaza, (9) Metionin-sintaza, (10) Metionin-metiltransferaza, (11) DMSP-liaza, (12) γ-glutamil-cistein-sintaza. Preuzeto i modificirano prema Quinn i Pilon-Smits (2010).

1.2.Kadmij

U tlo kadmij (Cd) dolazi uglavnom iz antropogenih izvora: industrijski otpad iz procesa kao što su galvanizacija, proizvodnja plastičnih materijala, proizvodnja legiranog čelika, baterija koje sadrže kadmij, tretmani biljaka i upotreba poljoprivrednih fungicida, te iz rudnika (Adriano 2001, Cordero i sur. 2004).Kadmij je toksičan metal s dugim vremenom poluraspada kojeg biljke lako apsorbiraju. Kao posljedica apsorpcije kadmija događaju se različite biokemijske, fiziološke i strukturne promjene (Khan i sur. 2006). Nekontrolirana oksidacija inducirana ili stimulirana kadmijem može se smanjiti aktivacijom antioksidativnog

obrambenog mehanizma koji uključuje različite enzime poput superoksid-dismutaze (SOD) koja katalizira dismutaciju superoksida u kisik i vodikov peroksid (H_2O_2). Povećana razina H_2O_2 razgrađuje se do vode pomoću enzima kao što su askorbat-peroksidaza (APX) i katalaza (CAT), ali također i neenzimskim putevima detoksikacije pomoću askorbata, glutationa (GSH), organskih kiselina, prolina, flavonoida, alkaloida i karotenoida (Hippler i sur. 2015, Liu i sur. 2015, Roychoudhury i sur. 2012).

1.3.Oksidativni stres uzrokovan kadmijem

Prema Hossain-u i suradnicima (2012), toksičnost teških metala očituje se stimulacijom prekomjernog stvaranja ROS-a i metilglioksala (MG) autooksidacijom i Fentonovom reakcijom ili modifikacijom antioksidativnogi glioksilatnog sustava. Uslijed vezanja teških metala za tiolne, histidilne i karboksilne skupine proteina može doći do inaktivacije i/ili oštećenja strukture enzima. Kadmij pokazuje tri puta jači afinitet za tiolne skupine od bakra te se stoga veže za strukturne proteine i enzime koji sadrže takve skupine smanjujući njihovu katalitičku aktivnost (Furini 2012, Hall 2002). Određeni teški metali, npr. bakar i željezo mogu biti toksični zbog sudjelovanja u redoks reakcijama kao što su Fentonova i Haber-Weissova reakcija. Suprotno, kadmij je nereducirajući metal koji nije sposoban izvršiti reakciju prijenosa elektrona i ne sudjeluje direktno u sintezi ROS-a, ali izaziva oksidativni stres modifikacijom antioksidativnog odgovora (Benavides i sur. 2005,Gratão i sur. 2005). Izlaganje kadmiju uzrokuje brzu akumulaciju peroksida i trošenje GSH te vodi prema redoks neravnoteži (Gill i Tuteja 2011). Manje količine ROS-a neophodne su u mnogim biokemijskim procesima uključujući i unutarstaničnu signalizaciju pri diferencijaciji i apoptozi stanica, te obrani od mikroorganizama (Ghosh i Myers 1998). Velike količine ROS-a i/ili neučinkovit antioksidativni obrambeni sustav rezultira pojavom oksidativnog stresa. Oksidativni stres se definira kao pomak ravnoteže u staničnim oksidativno-reduktivnim reakcijama u smjeru oksidacije što u konačnici može dovesti do oštećenja staničnih struktura (Kawanishi i sur. 2001).

1.4.Cilj

Cilj ovog rada bio je odrediti učinak kadmija na ekspresiju gena antioksidativnih enzima (CAT, SOD i GST) u korijenu i izdanku dvije sorte ozime pšenice, Divane i Srpanjke, obogaćene selenom, te utvrditi postoje li razlike u ekspresiji gena ovih enzima u dvije navedene sorte, te u izdanku i korijenu.

2. MATERIJALI I METODE

2.1.Materijali

2.1.1. Biljni materijal

U istraživanju su korištene dvije sorte ozime pšenice (*Triticum aestivum*), Divana i Srpanjka. Uz kontrolno sjeme navedenih sorti, korištene su i sjemenke obogaćene sa selenomu procesu biofortifikacije. Sjeme nam je ustupio prof. dr. sc. Zdenko Lončarić s Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku.

2.1.2. Oligonukleotidne početnice

U tablici 1. navedene su korištene početnice s oligonukleotidnim slijedom i očekivanom veličinom PCR produkata.

Tablica 1. Sljedovi oligonukleotidnih početnica korišteni za umnažanje odsječaka gena za ADP-ribozilacijski faktor (Ta2291), Cu,ZnSOD (GI1572626), CAT (GI5711144;D86327) i GST (TtGSTU1) lančanom reakcijom polimeraze.

Početnice	Oligonukleotidni slijed	Veličina PCR produkta
FW-Ta-ADP-ribozilacijski faktor	5’-GCTCTCCAACAACATTGCCAAC-3’	165 pb
REV-Ta-ADP-ribozilacijski faktor	5’-GCTTCTGCCTGTCACATACGC-3’	
1-Cu,ZnSOD (pšenica GI1572626)	5’-CGCTCAGAGCCTCCTCTTT-3’	98 pb
2- Cu,ZnSOD (pšenica GI1572626)	5’-CTCCTGGGGTGGAGACAAT-3’	
1-CAT (pšenica GI5711144)	5’-CCATGAGATCAAGGCCATCT-3’	103 pb
2-CAT (pšenica GI5711144)	5’-ATCTTACATGCTCGGCTTGG-3’	
FW-GST TtGSTU1	5'-GGAGATGACCTGAAGCTGCTC-3'	660 pb
REV-GST TtGSTU1	5'-CTCTCGTGCCTTGGCAAAC-3'	

2.2.Metode

2.2.1. Priprema i sterilizacija sjemenki

Sjemenke Divane i Srpanjke (kontrolne sjemenke i sjemenke obogaćene selenom u procesu biofortifikacije) kratko su ispirane 96%-tnim etanolom. Nakon ispiranja etanolom sjemenke su sterilizirane miješanjem tijekom 8 min u otopini izosana (10 g L^{-1}) u koji je dodana otopina Tweena (1 μL u 100mL). Nakon toga, sjemenke su temeljito isprane u destiliranoj vodi i ostavljene u sterilnoj vodi 24 sata na +4 °C kako bi došlo do procesa bubrenja.

2.2.2. Opis pokusa

Nakon 24 sata bubrenja, sjemenke su stavljene na klijanje u sterilne plastične Petrijeve zdjelice sa sterilnom vatom i filter papirom, i to 50 sjemenki po Petrijevci, u 5 ponavljanja za svaki tretman. Skupine sjemenki koje su korištene u eksperimentu su sjemenke Srpanjke (Srp) i Divane (Div), te sjemenke Srpanjke (Srp-Se) i Divane (Div-Se) obogaćene selenom u procesu biofortifikacije. Četiri navedene skupine sjemena tretirane su vodom te predstavljaju kontrolne skupine (Srp-kontrola, Div-kontrola, Srp-Se-kontrola i Div-Se-kontrola), te 100 μM otopinom kadmijeva acetata ($Cd(CH_3COO)_2$) (Srp-Cd, Div-Cd, Srp-Se-Cd, Div-Se-Cd). Tijekom samog naklijavanja, sjemenke su zalivene s 15 mL odgovarajuće otopine (vodom ili otopinom kadmija), te postavljene u inkubator na klijanje na temperaturi od 25 ^oC. Peti dan klijanja, klijanci su zalijevani s još 10 mL odgovarajuće otopine (voda ili otopina kadmija).

2.2.3. Izdvajanje genomske DNA

Izolacija genomske DNA iz tkiva pšenice napravljena je prema modificiranom protokolu (Alleman i sur. 1999). Oko 50 mg izdanka pšenice usitnjeno je sterilnim štapićem u mikroepruveti volumena 1.5 ml pomoću tekućeg dušika. Usitnjenom tkivu dodano je 1 mL pufera za ekstrakciju (20 mM Tris, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8.0, 10% SDS). Nakon miješanja na vrtložnoj miješalici, homogenat je centrifugiran 10 min na 5 000 g i 25 °C. Dobiveni supernatant je prebačen u sterilnu mikroepruvetu volumena 1.5 mL, te mu je dodan 1 mL fenol:kloroform:izoamilnog alkohola u omjeru 12:12:1. Takva smjesa ponovno je miješana na vrtložnoj miješalici, te centrifugirana10 min na 5 000 g i 25 °C. Vodena faza pažljivo je otpipetirana u mikroepruvetu, te je dodan jednaki volumen otopine kloroform:izoamilnog alkohola omjera 24:1. Sadržaj u mikroepruveti je promiješan inverznim okretanjem nakon čega je uslijedilo centrifugiranje10 min na 5 000 g i 25 °C. Dobivena

vodena faza prebačena je u novu mikroepruvetu, čemu je dodan jednak volumen izopropanola, promiješana i centrifugirana 30 min na 15 000 g, pri +4 ^{o}C. Supernatant je dekantiran, te je dobiveni talog ispran s 500 μL 70% ledeno-hladnog etanola nakon čega je centrifugiran 10 min na 15 000 g, pri +4 ^{o}C. Talog u mikroepruveti sušen je na sobnoj temperaturi, nakon čega je otopljenu 50 μL sterilne deionizirane vode. Koncentracija nukleinskih kiselina mjerena je pomoću nanofotometra NanoPhotometer P-Class P330-30 (Implen, Germany).

2.2.4. Izdvajanje ukupne RNA

Izdvajanje ukupne RNA iz izdanka i korijenja pšenice (Srp-kontrola, Srp-Cd, Srp-Se-kontrola, Srp-Se-Cd, Div-kontrola, Div-Cd, Div-Se-kontrola, Div-Se-Cd) učinjeno je pomoću komercijalnog reagensa *TRI Reagent* (*TRI Reagent® Solution, Sigma-Aldrich)*), koji je monofazna otopina fenola i gvanidin-izocijanata koja istovremeno otapa biološki materijal i denaturira proteine. Dijelovi izdanaka i korijena pšenice (50 mg) usitnjavani su pomoću sterilnog štapića u sterilnim mikroepruvetama smrzavanjem tkiva u tekućem dušiku, te uz dodatak 1 mL reagensa *TRI Reagent.* Homogenizirano tkivo je inkubirano 5 min na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije homogenatu je dodano 200 μL kloroforma, pri čemu je homogenat miješan na vrtložnoj miješalici, te je uslijedila ponovna desetominutna inkubacija na sobnoj temperaturi. Homogenati su zatim centrifugirani 15 min na 12 000 g i +4 ^{o}C. Dobiveni supernatanti tj. vodena faza je prebačena u novu sterilnu mikroepruvetu, te je dodano 500 μL izopropanola. Nakon inkubacije od 10 min na sobnoj temperaturi, precipitat RNA je centrifugiran 8 min na 12 000 g i +4 ^{o}C. Talog RNA je ispran s 1 mL 75% etanola, nakon čega je uslijedilo ponovno centrifugiranje 5 min na 7 500 g i +4 ^{o}C. Supernatant je uklonjen, te je talog RNA ostavljen na sušenje pri sobnoj temperaturi. Talog je otopljen u 50 μL deionizirane H_2O, te je uzorak ukupne RNA pohranjenna -80 ^{o}C do korištenja.

2.2.5. Određivanje količine i kakvoće RNA

Masena koncentracija RNA i DNA mjerena je pomoću instrumenta NanoPhotometer P-Class P330-30 (Implen, Germany). Mjerenjem omjera A_{260}/A_{280} i A_{260}/A_{230} dobivena je informacija o čistoći RNA. Ukupna RNA i PCR produkti analizirani su horizonalnom elektroforezom na agaroznom gelu. Agarozni gel (1 i 2%, w/v) pripremljen je otapanjem agaroze u 0.5× TBE puferu (45 mM Tris-borat, 1 mM EDTA, pH 8.3). Neposredno prije izlijevanja gela u kadicu za horizontalnu elektroforezu dodana je boja za vizualizaciju nukleinskih kiselina *SYBR® Safe DNA Gel Stain*. Uzorci su prije nanošenja na gel pomiješani

s puferom za nanošenje uzoraka na gel *Blue/Orange Loading dye* (6×). Kao standardi za određivanje duljine odsječaka korišteni su: *100 bp DNA Ladder* (*Invitrogen* ^{TM}) i *50 bp DNA Ladder Dye Plus (Takara).* Elektroforezom se RNA i DNA razdvaja na vrpce koje su vizualizirane pomoću UV transiluminatora i dokumentirane fotografiranjem pomoću kamere Kodak EDAS 290 (Eastman Kodak, New Haven, SAD).

2.2.6. Obrnuto prepisivanje mRNA u cDNA

Izdvojena ukupna RNA je upotrijebljena za obrnuto prepisivanje (engl. *Reverse Transcription*, RT) u komplementarnu DNA (cDNA). Obrnuto prepisivanje u cDNA izvedeno je korištenjem paketa za reverznu transkripciju *GoScript^{TM} Reverse Transcription System*. Dio reakcijske smjese za obrnuto prepisivanje mRNA, koji se sastojao od izdvojene ukupne RNA (3μg), 0.5 μg oligo $d(T)_{15}$ početnice i sterilne vode bez prisutnosti nukleaza inkubiran je 5 min na +70 ^{o}C kako bi se denaturirale početnice i sekundarne strukture unutar molekula RNA. Nakon denaturacije smjesa je naglo ohlađena na ledu tijekom 5 min, te joj je dodan ostatak reakcijske smjese koji je sadržavao 1× reakcijski pufer GoScript^{TM}, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.5 mM smjesu svakog dNTP-a, 20 U inhibitora Rnaza (*Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor*) i 1 μL reverzne transkriptaze (*GoScript™ Reverse Transcriptase*). Mikroepruvete (0.2 mL) s reakcijskom smjesom stavljene su u PCR uređaj na obnuto prepisivanje koje se odvijalo pri slijedećim uvjetima: sparivanje početnica odvijalo se 5 min pri 25 ^{o}C, sinteza cDNA tijekom 60 min na 42 ^{o}C, te inaktivacija reverzne transkriptaze i denaturacija RNA/DNA hibrida 15 min na 70 ^{o}C. Reakcije su se odvijale u uređaju za PCR Applied Biosystems Gene Amp PCR System 2700.

2.2.7. Lančana reakcija polimerazom (PCR) te određivanje eksponencijalne faze PCR reakcijegena za SOD, CAT i GST

Dobivena cDNA umnažana je metodom lančane reakcije polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) umnažanjem odsječka gena za ADP-ribozilacijski faktor (Ta2291) veličine 165 pb, Cu,ZnSOD (GI1572626) veličine 98 pb, CAT (GI5711144 ;D86327) veličine 103 pb i GST (TtGSTU1) veličine 660 pb. Genomska DNA, izdvojena iz izdanka pšenice sorte Srpanjka poslužila je kao kontrola kontaminacije genomskom DNA. Reakcijska smjesa ukupnog volumena 25 μL sastojala se od 0.5 μL kalupa DNA, 0.2 μM svake početnice, 12.5 μL komercijalne smjese *EmeraldAmp® GT PCR Master Mix* i 11 μL sterilne vode bez prisutnosti nukleaza. Sljedovi oligonukleotidnih početnica navedeni su u Tablici 1. Reakcija PCR odvijala se 35 ciklusa, a uvjeti reakcije navedeni su u Tablici 2.

Kako bismo odredili eksponencijalnu fazu PCR reakcije za svaki istraživani gen, PCR reakcija za svaki gen se provodila kroz različit broj ciklusa (20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36 i 38). Dobiveni PCR produkti su nanošeni na 2% agarozni gel, te se nakon provedene elektroforeze vizualizacija i intenzitet vrpci PCR produkata kvantificirao pomoću softvera *Kodak 1-D image analysis* (Eastman Kodak, New Haven, SAD). Na temelju grafičkog prikaza rezultata određena je eksponencijalna faza PCR reakcije za svaki pojedini gen.Uspješnost obrnutog prepisivanja provjerena je umnažanjem gena za ADP-ribozilacijski faktor koji je poslužio kao kontrola budući da je uvijek eksprimiran u biljnim stanicama u stalnoj količini (tzv. *housekeeping gene*). Razlika u veličini odsječka gena za ADP-ribozilacijski faktor s prisutnim intronom i njegove cDNA je također poslužila za dokazivanje odsutnosti kontaminacije genomskom DNA.

Tablica 2. Uvjeti reakcije PCR za umnažanje gena ADP-ribozilacijski faktor (Ta2291), Cu,ZnSOD (GI1572626), CAT (GI5711144;D86327) i GST (TtGSTU1).

Uvjeti reakcije PCR	Temperatura	Vrijeme
Početna denaturacija	95 ^{o}C	3 min
35 ciklusa :		
Denaturacija	95 ^{o}C	45 s
Sparivanje početnica	59 ^{o}C(SOD, GST, ADP-ribozilacijski faktor) 55 ^{o}C(CAT)	45 s
Produljivanje lanaca DNA	72 ^{o}C	1 min
Završno produljivanje lanaca DNA	72^{o}C	5 min

2.2.8. Semi-kvantitativni RT-PCR

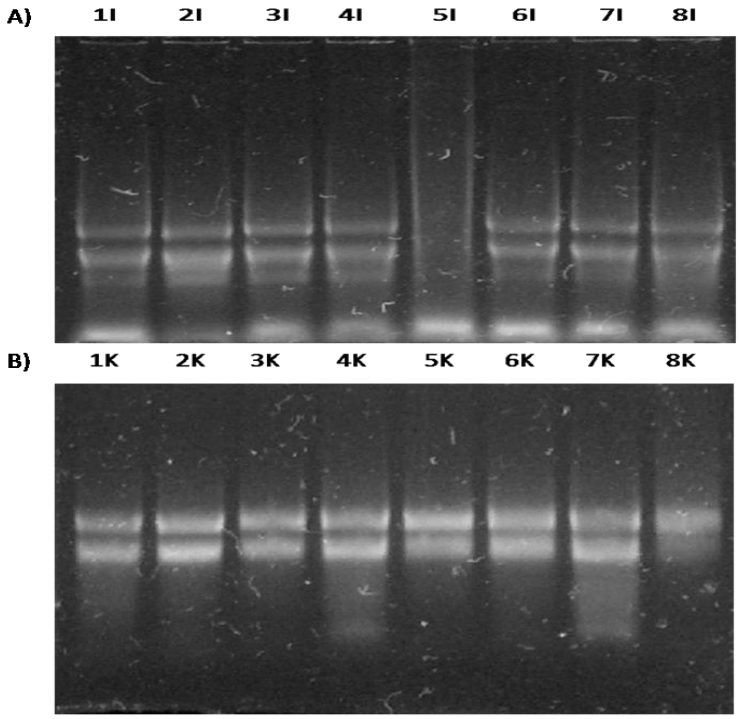
Razina ekspresije gena za CAT, GST i SOD procijenjena je semi-kvantitativnim RT-PCR-om. cDNA umnažana je reakcijom PCR korištenjem četiri seta početnica, za odsječak gena koji kodiraju CAT, GST, SOD i ADP-ribozilacijski faktor.Optimalni broj ciklusa umnožavanja, pri kojima se reakcija PCR za pojedini gen nalazi u eksponecijalnoj fazi, određeni su u preliminarno napravljenim eksperimentima. Reakcijom PCR umnažana je cDNA sva četri gena u konačnim volumenima reakcijske smjese 25 μL koja se sastojala od 0.5 μL cDNA, 0.2μM svake početnice, 12.5 μL smjese za PCR EmeraldAmp® GT PCR

Master Mix i 11 μL sterilne vode bez prisutnosti nukleaza. Slijedovi oligonukleotidnih početnica navedeni su u Tablici 1. Reakcije su prekinute u eksponencijalnim fazama umnažanja, u 27. ciklusu za GST, SOD i ADP-ribozilacijski faktor i u 28. ciklusu za CAT. Nakon elektroforeze intenzitet vrpci je kvantificiran softverom *Kodak 1-D image analysis* (Eastman Kodak, New Haven, SAD).

3. REZULTATI

3.1.Izdvojena ukupna RNA iz izdanaka i korijena klijanaca pšenice

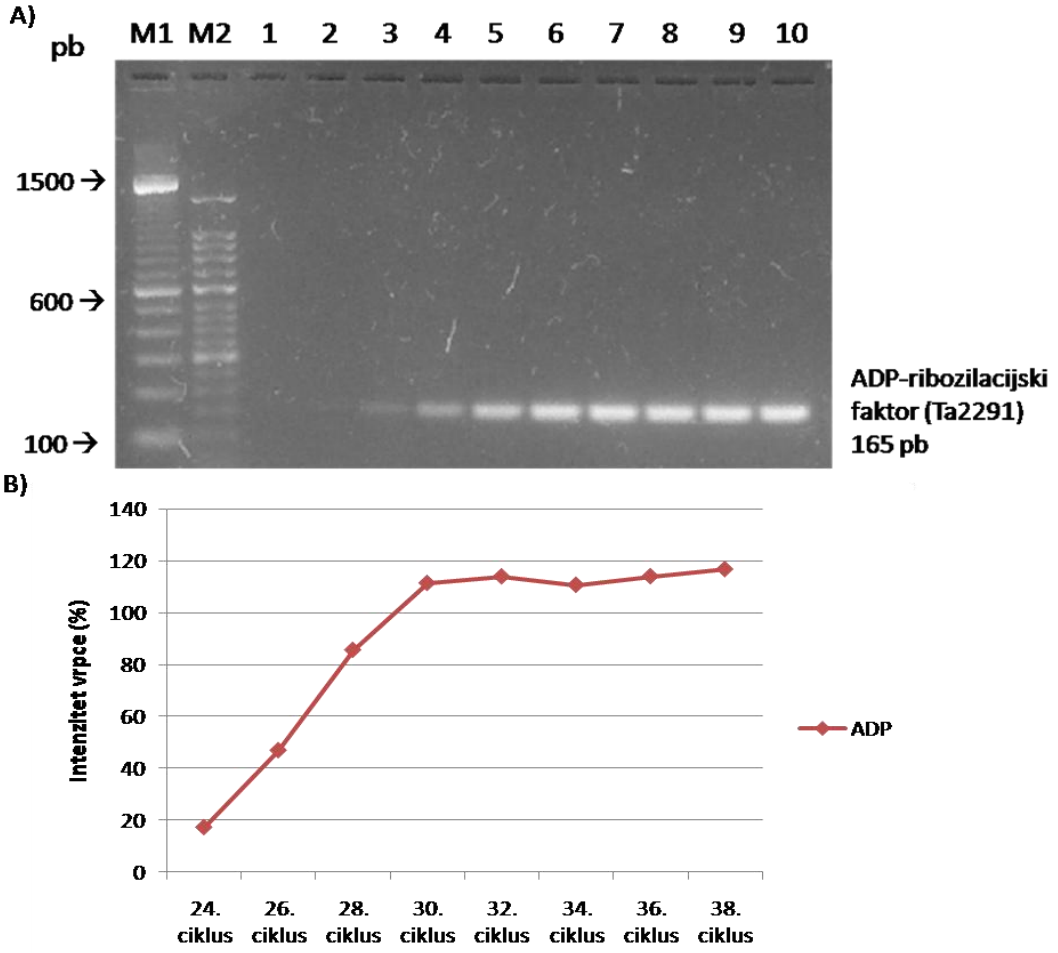
S ciljem određivanja ekspresije gena antioksidativnih enzima izdvojena je ukupna RNA iz izdanka (Slika 2A) i korijenja (Slika 2B) klijanaca dvije sorte ozime pšenice, Divane i Srpanjke: iz kontrolnih skupina tretiranih vodom (Div-kontrola, Srp-kontrola, Div-Se, Srp-Se) te iz skupina tretiranih 100 μM otopinom kadmija (Div-Cd, Srp-Cd, Div-Se-Cd, Srp-Se-Cd). Na 1% agarozni gel za elektroforezu nanošeno je 5 μL uzorka. Elektroforezom se provjeravala kvaliteta izdvojene RNA. Na gelu nije uočena kontaminacija s genomskom DNA. Ukupna RNA razdvojila se na dva benda koji predstavljaju 28S rRNA i 18S rRNA, te jedan ne tako oštar bend kojeg čine molekule tRNA.



Slika 2. Izdvajanje molekule RNA iz korijena i izdanka dvije sorte ozime pšenice (*Triticum aestivum*), Divane i Srpanjke. I-izdanak, K-korijen. A) 1I-Srpanjka (kontrola), 2I-Srpanjka tretirana 100 μM otopinom $Cd(CH_3COO)_2$, 3I-Srpanjkaobogaćena Se, 4I-Srpanjka obogaćena Se i tretirana 100 μM otopinom $Cd(CH_3COO)_2$, 5I-Divana (kontrola), 6I-Divana tretirana 100μM otopinom $Cd(CH_3COO)_2$, 7I-Divana obogaćena Se, 8I-Divana obogaćena Se i tretirana 100μM otopinom $Cd(CH_3COO)_2$. B) 1K-Srpanjka (kontrola), 2K-Srpanjka tretirana 100μM otopinom $Cd(CH_3COO)_2$, 3K-Srpanjka obogaćena Se, 4K-Srpanjka obogaćena Se i tretirana 100μM otopinom $Cd(CH_3COO)_2$, 5K-Divana (kontrola), 6K-Divana tretirana 100 μM otopinom $Cd(CH_3COO)_2$, 7K-Divana obogaćena Se, 8K-Divana obogaćena Se i tretirana 100 μM otopinom $Cd(CH_3COO)_2$.

3.2.Eksponencijalna faza umnažanja gena za ADP-ribozilacijski faktor

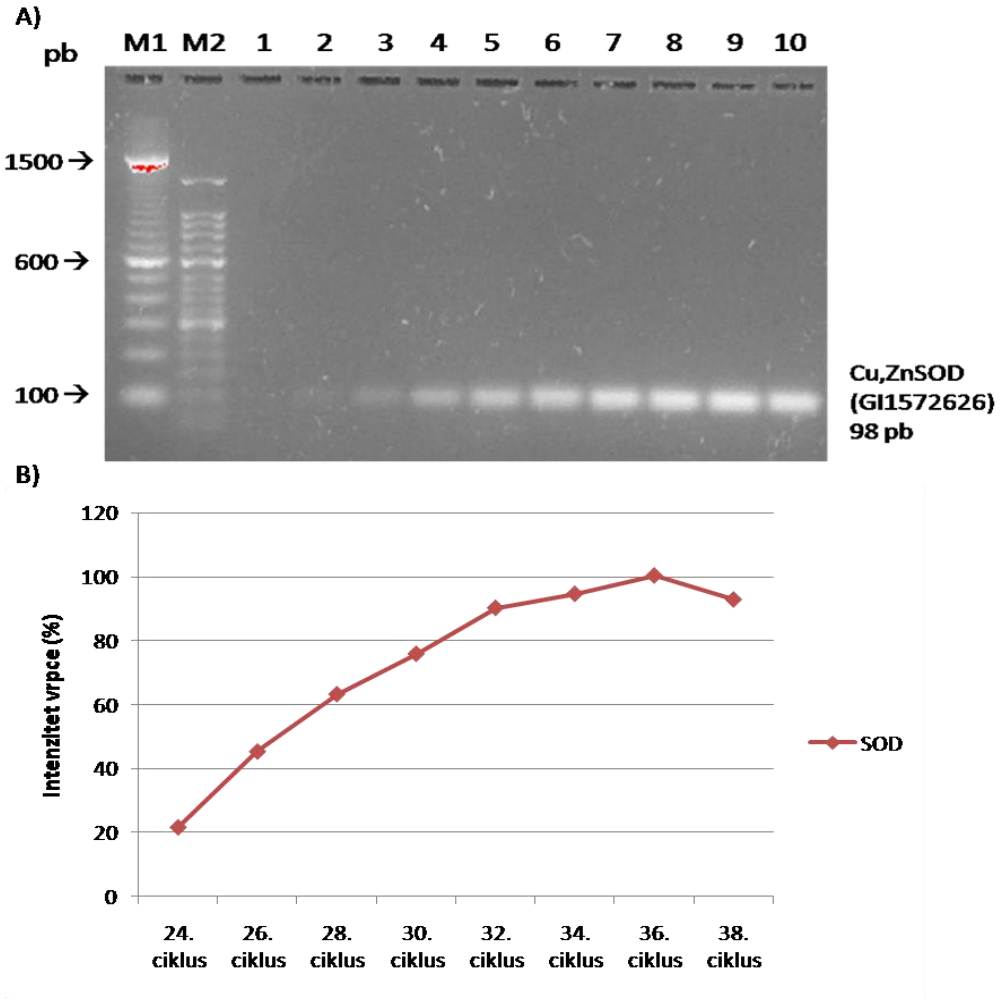
Optimalni broj ciklusa umnažanja, pri kojima se reakcija PCR nalazi u eksponencijalnoj fazi, određeni su za PCR reakciju gena za ADP-ribozilacijski faktor koji se koristi kao referentni gen za semi-kvantitativni RT-PCR (Slika 3A). Eksponencijalna faza umnažanja gena za ADP-ribozilacijski faktor traje od 24. do 30. ciklusa (Slika 3B). Nakon 30. ciklusa umnažanja PCR reakcija ulazi u fazu zasićenja. Optimalni broj ciklusa PCR reakcije za ADP-ribozilacijski faktor iznosi 27.



Slika 3. Određivanje eksponencijalne faze PCR reakcije gena za ADP-ribozilacijski faktor. A) Na 2% agarozni gel nanesenoje po 10 µL produkta PCR reakcije koje su prekidane pri različitom broju ciklusa. B) Dijagram intenziteta vrpci PCR produkata dobivenih prekidanjem reakcije pri različitom broju ciklusa. M1: standard duljine odsječaka *100 bp DNA Ladder* (*Invitrogen* ^{TM} *).* M2: standard duljine odsječaka *50 bp DNA Ladder Dye Plus (Takara).* 1: 20. ciklus. 2: 22. ciklus. 3: 24. ciklus. 4: 26. ciklus. 5: 28. ciklus. 6: 30. ciklus. 7: 32. ciklus. 8: 34. ciklus. 9: 36. ciklus. 10: 38. ciklus

3.3.Eksponencijalna faza umnažanja gena za SOD

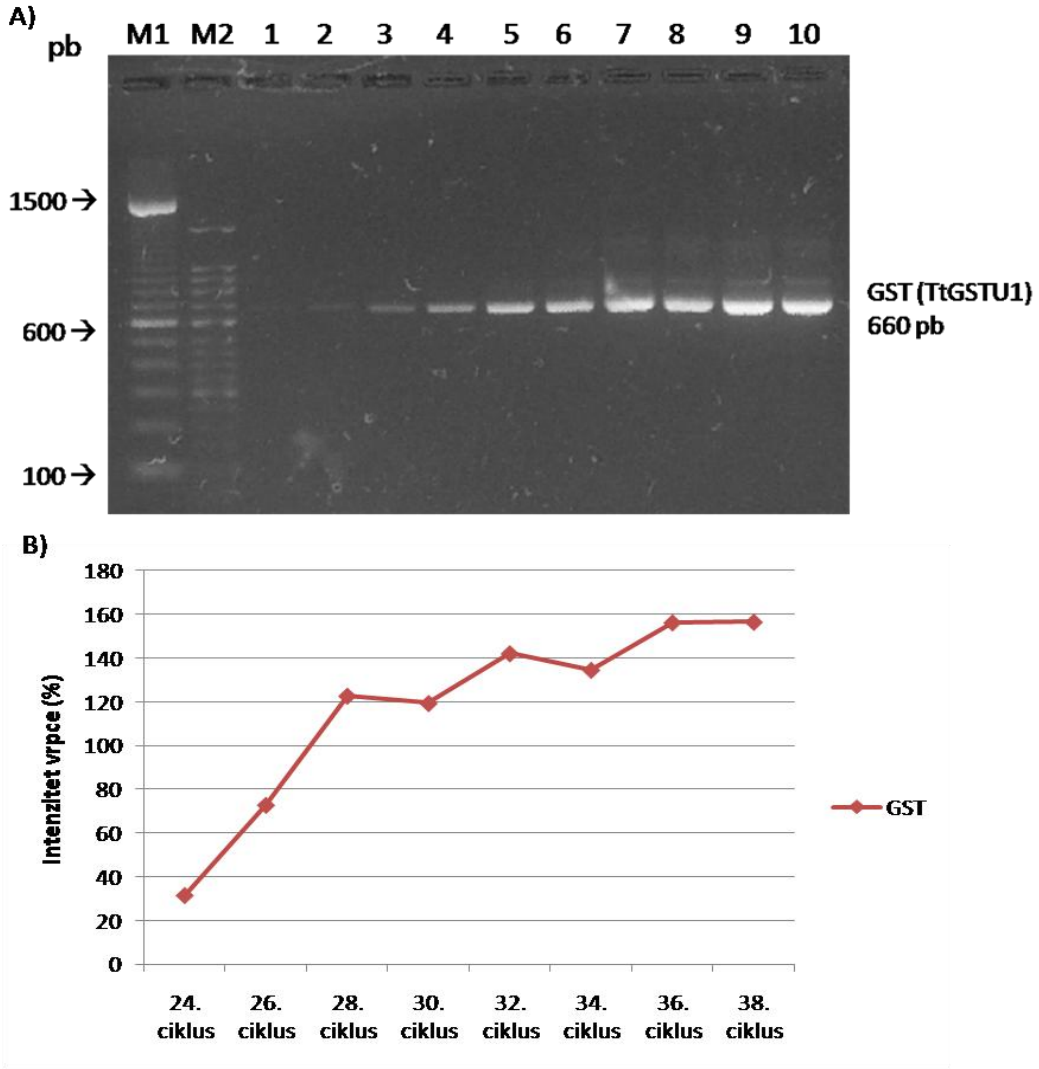
Optimalni broj ciklusa umnažanja, pri kojima se reakcija PCR nalazi u eksponencijalnoj fazi, određeni su za PCR reakciju gena za SOD (Slika 4A). Eksponencijalna faza umnažanja gena za SOD traje od 24. do 32. ciklusa (Slika 4B). Nakon 32. ciklusa umnažanja PCR reakcija ulazi u fazu zasićenja. Optimalni broj ciklusa PCR reakcije za SOD iznosi 27.



Slika 4. Određivanje eksponencijalne faze PCR reakcije gena za SOD. A) Na 2% agarozni gel naneseno je po 10 µL produkta PCR reakcije koje su prekidane pri različitombroju ciklusa. B) Dijagram intenziteta vrpci PCR produkata dobivenih prekidanjem reakcije pri različitom broju ciklusa. M1: standard duljine odsječaka *100 bp DNA Ladder* (Invitrogen ™). M2: standard duljine odsječaka *50 bp DNA Ladder Dye Plus (Takara).* 1: 20. ciklus. 2: 22. ciklus. 3: 24. ciklus. 4: 26. ciklus. 5: 28. ciklus. 6: 30. ciklus. 7: 32. ciklus. 8: 34. ciklus. 9: 36. ciklus. 10: 38. ciklus

3.4.Eksponencijalna faza umnažanja gena za GST

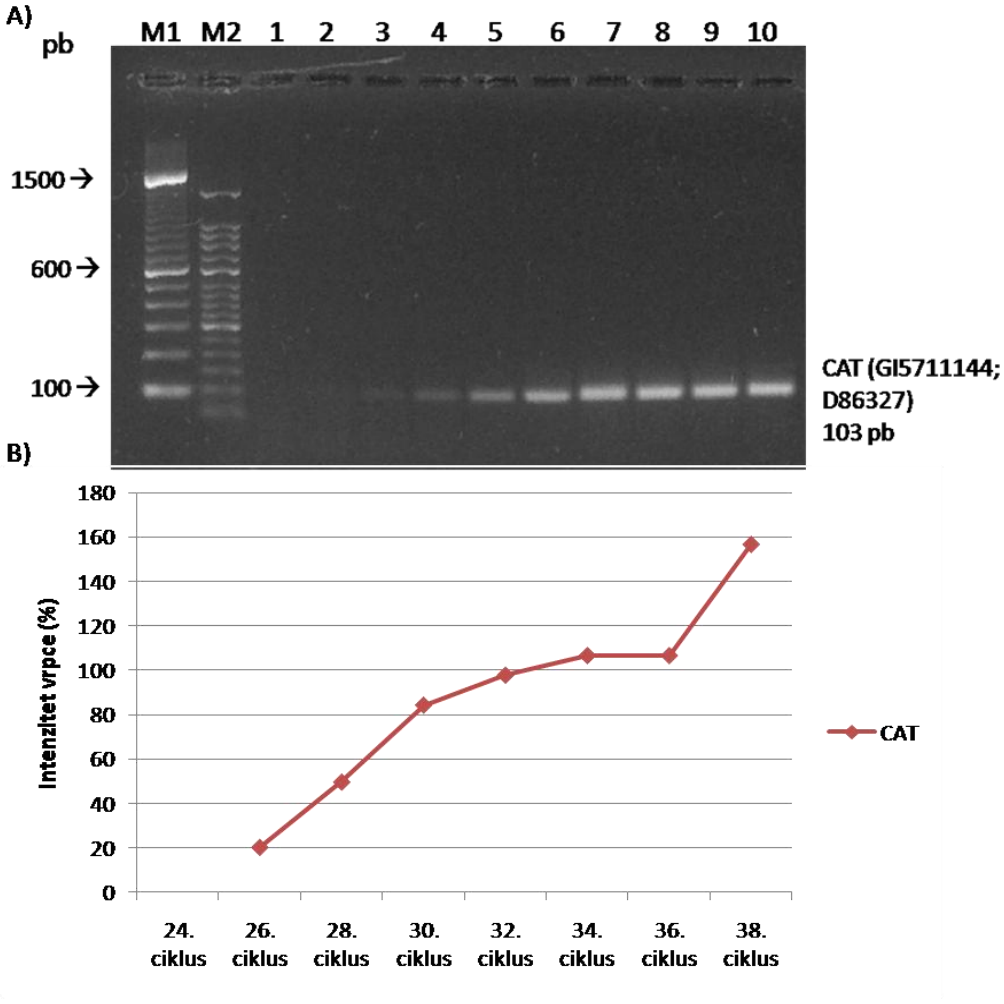
Optimalni broj ciklusa umnažanja, pri kojima se reakcija PCR nalazi u eksponecijalnoj fazi, određeni su za PCR reakciju gena za GST (Slika 5A). Eksponencijalna faza umnažanja gena za GST traje od 24. do 28. ciklusa (Slika 5B). Nakon 28. ciklusa umnažanja PCR reakcija ulazi u fazu zasićenja. Optimalni broj ciklusa PCR reakcije za GST inosi 27.



Slika 5. Određivanje eksponencijalne faze PCR reakcije gena za GST. A) Na 2% agarozni gel naneseno je po 10 µL produkta PCR reakcije koje su prekidane prirazličitom broju ciklusa. B) Dijagram intenziteta vrpci PCR produkata dobivenih prekidanjem reakcije pri različitom broju ciklusa. M1: standard duljine odsječaka *100 bp DNA Ladder* (Invitrogen ™). M2: standard duljine odsječaka *50 bp DNA Ladder Dye Plus (Takara).* 1: 20. ciklus. 2: 22. ciklus. 3: 24. ciklus. 4: 26. ciklus. 5: 28. ciklus. 6: 30. ciklus. 7: 32. ciklus. 8: 34. ciklus. 9: 36. ciklus. 10: 38. ciklus

3.5.Eksponencijalna faza umnažanja gena za CAT

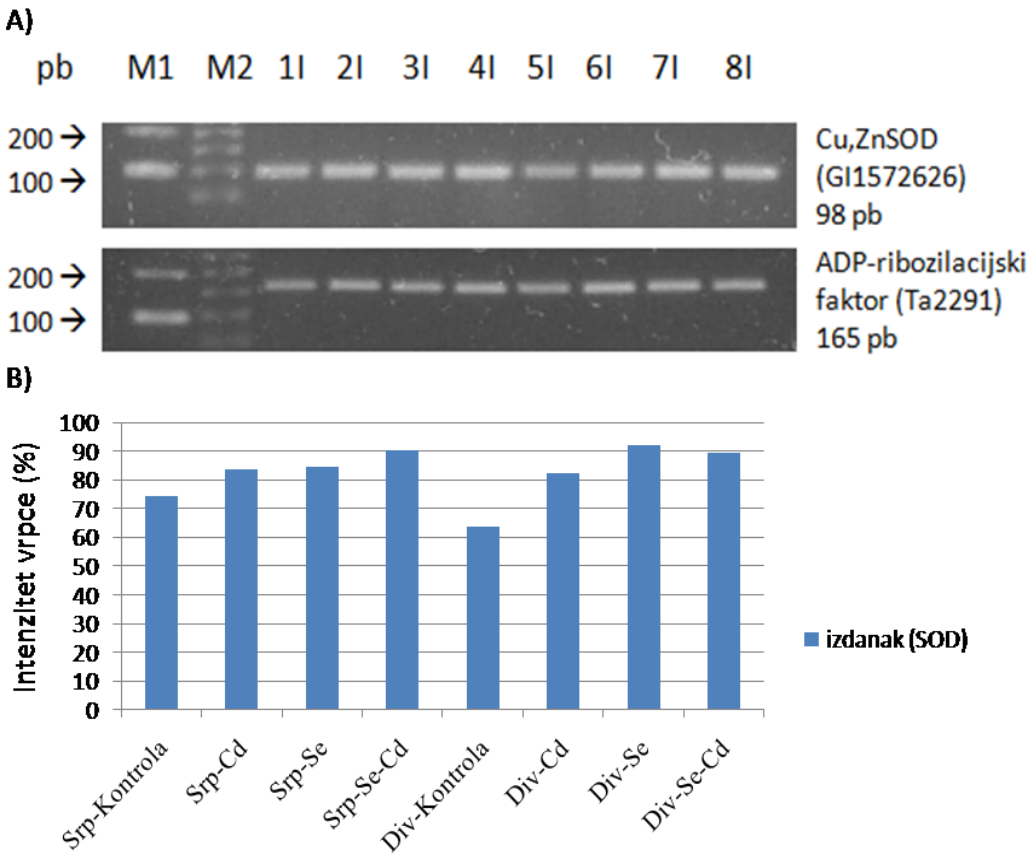
Optimalni broj ciklusa umnažanja, pri kojima se reakcija PCR nalazi u eksponencijalnoj fazi, određeni su za PCR reakciju gena za CAT (Slika 6A). Eksponencijalna faza umnažanja gena za CAT traje od 26. do 30. ciklusa (Slika 6B). Nakon 30. ciklusa umnažanja PCR reakcija ulazi u fazu zasićenja. Optimalni broj ciklusa PCR reakcije za CAT iznosi 28.



Slika 6. Određivanje eksponencijalne faze PCR reakcije gena za CAT. A) Na 2% agarozni gel naneseno je po 10 µL produkta PCR reakcije koje su prekidane pri različitom broju ciklusa. B) Dijagram intenziteta vrpci PCR produkata dobivenih prekidanjem reakcije pri različitom broju ciklusa. M1: standard duljine odsječaka *100 bp DNA Ladder* (*Invitrogen* ^{TM}). M2: standard duljine odsječaka *50 bp DNA Ladder Dye Plus (Takara).* 1: 20. ciklus. 2: 22. ciklus. 3: 24. ciklus. 4: 26. ciklus. 5: 28. ciklus. 6: 30. ciklus. 7: 32. ciklus. 8: 34. ciklus. 9: 36. ciklus. 10: 38. ciklus.

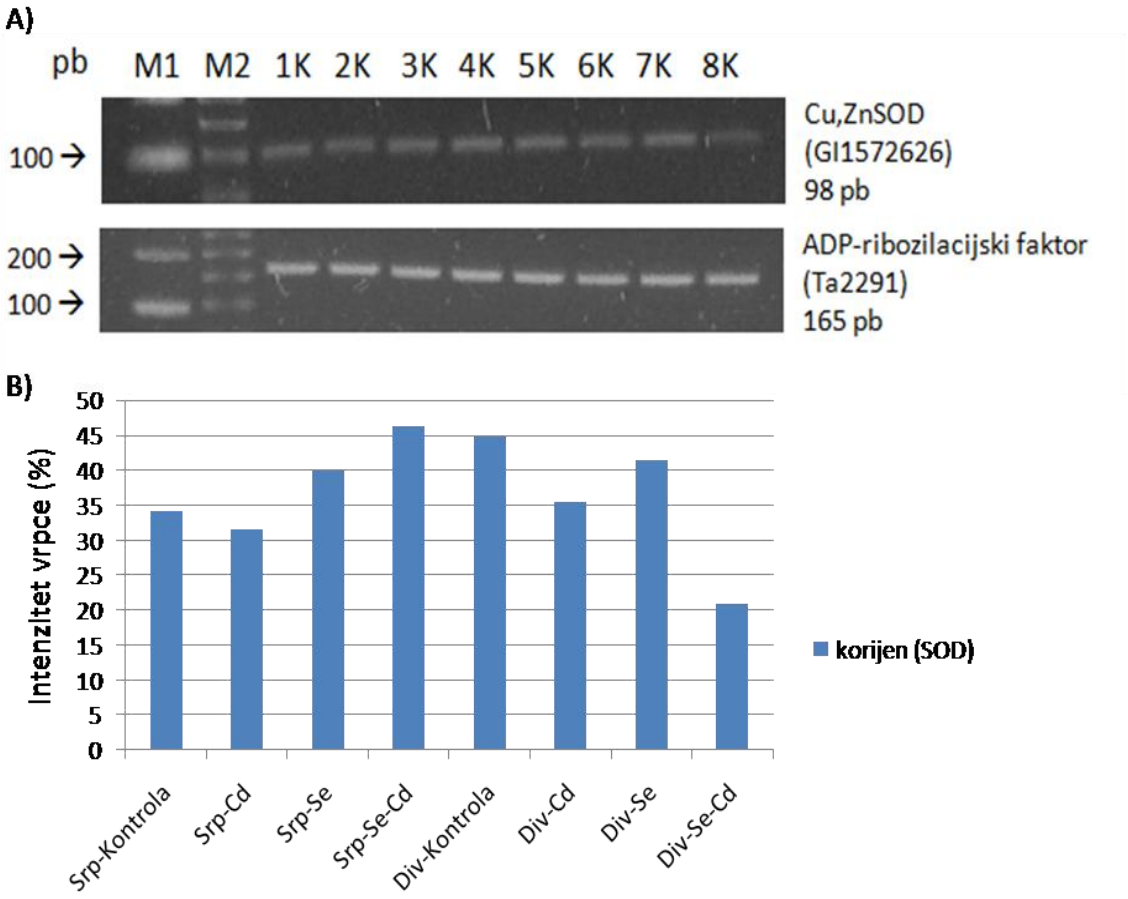
3.6.Razina ekspresije gena za SOD u izdanku i korijenu klijanaca pšenice

Najveća razina ekspresije gena Cu,ZnSOD u izdancima zabilježena je kod sorte Divana biofortificirane selenom (Div-Se), a najmanja kod sorte Divana (Div-kontrola). Kod sorte Srpanjka tretman kadmijem je uzrokovao neznatno višu ekspresiju gena, i kod kontrolne sorte (Srp-Cd) i kod biofortificirane selenom (Srp-Se-Cd) u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine (Srp-kontrola i Srp-Se). Kod sorte Divana, kod skupine Div-Cd tretman kadmijem uzrokovao je dosta veću ekspresiju gena u odnosu na kontrolu (Div-kontrola), dok je kod skupine biofortificirane selenom (Div-Se-Cd) ekspresija gena neznatno manja nego u kontrolnoj skupini (Div-Se).Kontrolne skupine seleniziranih klijanaca su imale znatno veću ekspresiju gena za SOD u odnosu na kontrolno sjeme.



Slika 7. Razina ekspresije gena za SOD u izdankuprocijenjena RT-PCR-om. A) Na 2% agarozni gel naneseno je po 10 µL produkta PCR reakcije. B) Dijagram intenziteta vrpci PCR produkata kvantificiran softverom *Kodak 1-D image analysis* (Eastman Kodak, New Haven, SAD). M1: standard duljine odsječaka *100 bp DNA Ladder* (*Invitrogen*^{TM}). M2: standard duljine odsječaka *50 bp DNA Ladder Dye Plus (Takara).* 1I-Srp-kontrola, 2I-Srp-Cd, 3I-Srp-Se, 4I-Srp-Se-Cd, 5I-Div-kontrola, 6I-Div-Cd, 7I-Div-Se, 8I-Div-Se-Cd.

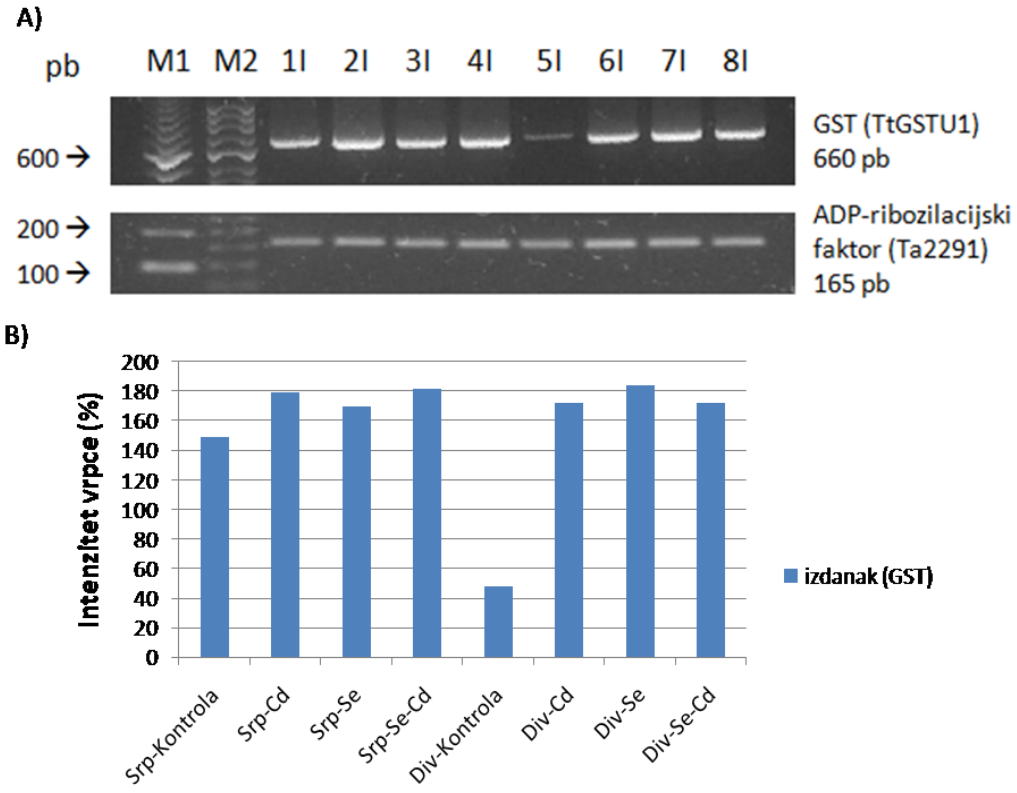
Najveća razina ekspresije gena Cu,ZnSODu korijenu zabilježena je kod sorte Srpanjka biofortificirane selenom i tretirane kadmijem (Srp-Se-Cd), a najmanja kod sorte Divana biofortificirane i tretirane kadmijem (Div-Se-Cd).Kod sorte Srpanjka tretman kadmijem je uzrokovao neznatno manju ekspresiju gena SOD u odnosu na kontrolu (Srp-kontrola), dok je kod skupine biofortificirane selenom (Srp-Se-Cd) uzrokovao višu ekspresiju gena u odnosu na kontrolnu skupinu (Srp-Se).Kod sorte Divana tretman kadmijem je uzrokovao dosta nižu ekspresiju gena, i kod kontrolne sorte (Srp-Cd) i kod biofortificirane selenom (Srp-Se-Cd) u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine (Srp-kontrola i Srp-Se).



Slika 8. Razina ekspresije gena za SOD u korijenu procijenjena RT-PCR-om. A) Na 2% agarozni gel naneseno je po 10 µL produkta PCR reakcije. B) Dijagram intenziteta vrpci PCR produkata kvantificiran softverom *Kodak 1-D image analysis* (Eastman Kodak, New Haven, SAD). M1: standard duljine odsječaka *100 bp DNA Ladder* (*Invitrogen*^{TM}). M2: standard duljine odsječaka *50 bp DNA Ladder Dye Plus (Takara).* 1I-Srp-kontrola, 2I-Srp-Cd, 3I-Srp-Se, 4I-Srp-Se-Cd, 5I-Div-kontrola, 6I-Div-Cd, 7I-Div-Se, 8I-Div-Se-Cd.

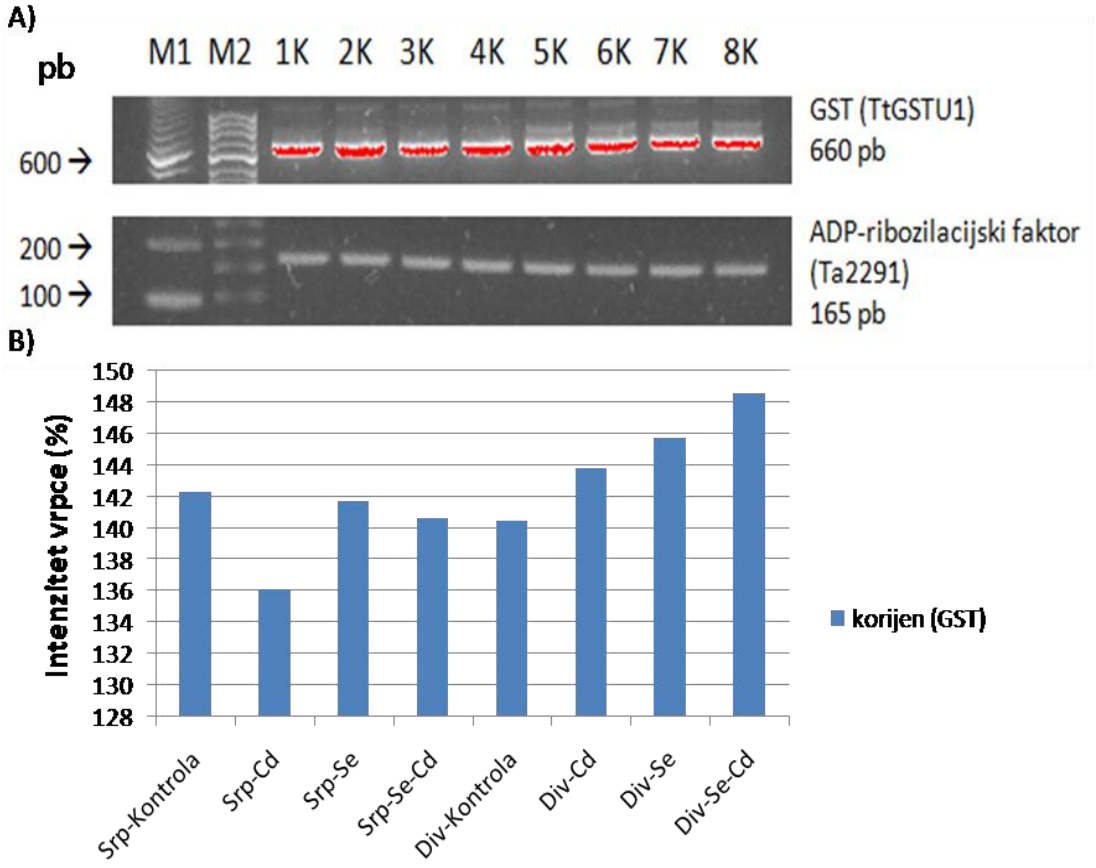
3.7.Razina ekspresije gena za GST u izdanku i korijenu klijanaca pšenice

Najveća ekspresija gena za GST u izdancima zabilježena je kod sorte Divana biofortificirane selenom (Div-Se), a najmanja kod sorte Divana (Div-kontrola). Kod sorte Srpanjka tretman kadmijem je uzrokovao višu ekspresiju gena, i kod kontrolne sorte (Srp-Cd) i kod skupine biofortificirane selenom (Srp-Se-Cd) u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine (Srp-kontrola i Srp-Se). Kod sorte Divana, kod skupine Div-Cd tretman kadmijem uzrokovao je dosta veću ekspresiju gena u odnosu na kontrolu (Div-kontrola), dok je kod skupine biofortificirane selenom (Div-Se-Cd) ekspresija gena za GST neznatno manja u odnosu na kontrolnu skupinu (Div-Se). Kontrolne skupine seleniziranih klijanaca su imale znatno veću ekspresiju gena za GST u odnosu na kontrolno sjeme.



Slika 9. Razina ekspresije gena za GST u izdanku procijenjena RT-PCR-om. A) Na 2% agarozni gel naneseno je po 10 µL produkta PCR reakcije. B) Dijagram intenziteta vrpci PCR produkata kvantificiran softverom *Kodak 1-D image analysis* (Eastman Kodak, New Haven, SAD). M1: standard duljine odsječaka *100 bp DNA Ladder* (*Invitrogen*^{TM}). M2: standard duljine odsječaka *50 bp DNA Ladder Dye Plus (Takara).* 1I-Srp-kontrola, 2I-Srp-Cd, 3I-Srp-Se, 4I-Srp-Se-Cd, 5I-Div-kontrola, 6I-Div-Cd, 7I-Div-Se, 8I-Div-Se-Cd.

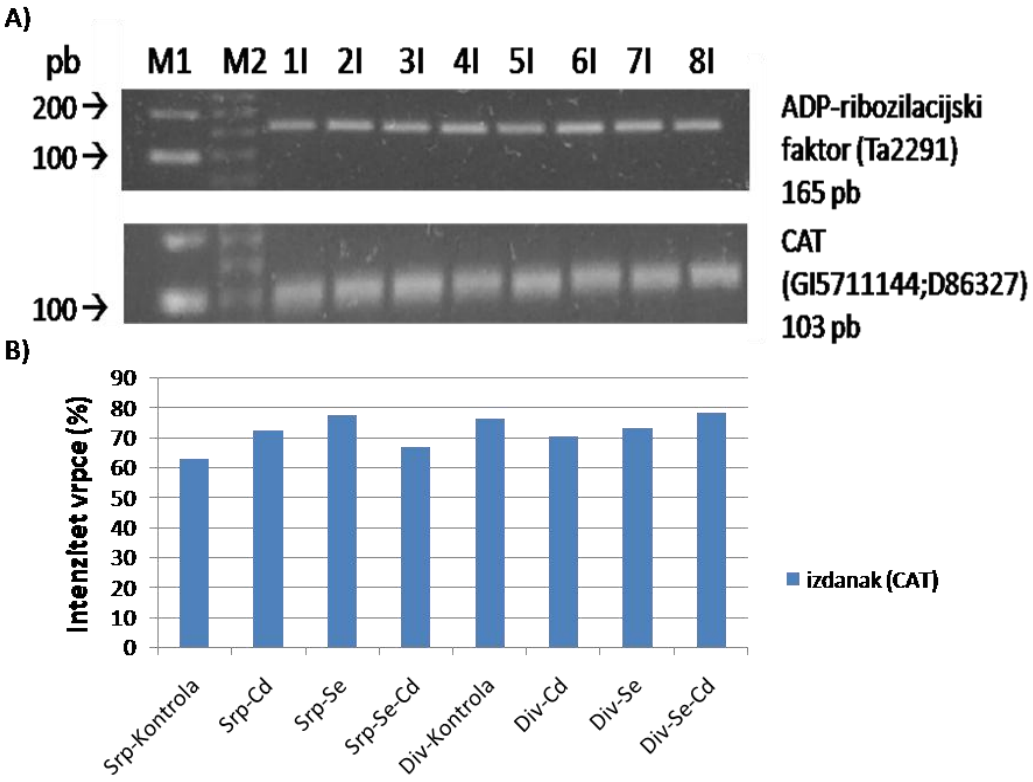
Najveća ekspresija gena GST u korijenu zabilježena je kod sorte Divana biofortificirane selenom i tretirane kadmijem (Div-Se-Cd), a najmanja kod sorte Srpanjka tretirane (Srp-Cd).Kod sorte Srpanjka, kod skupine Srp-Cd tretman kadmijem uzrokovao je dosta nižu ekspresiju gena u odnosu na kontrolu (Srp-kontrola), dok je kod skupine biofortificirane (Srp-Se-Cd) ekspresija gena za GST neznatno manja u odnosu na kontrolnu skupinu (Srp-Se).Kod sorte Divana tretman kadmijem je uzrokovao višu ekspresiju gena, i kod kontrolne sorte (Div-Cd) i kod skupine biofortificirane selenom (Div-Se-Cd) u odnosu na odgovarajuće kontrolne skupine (Div-kontrola i Div-Se).



Slika 10. Razina ekspresije gena za GST u korijenu procijenjena RT-PCR-om. A) Na 2% agarozni gel naneseno je po 10 µL produkta PCR reakcije. B) Dijagram intenziteta vrpci PCR produkata kvantificiran softverom *Kodak 1-D image analysis* (Eastman Kodak, New Haven, SAD). M1: standard duljine odsječaka *100 bp DNA Ladder* (*Invitrogen*^{TM}). M2: standard duljine odsječaka *50 bp DNA Ladder Dye Plus (Takara).* 1I-Srp-kontrola, 2I-Srp-Cd, 3I-Srp-Se, 4I-Srp-Se-Cd, 5I-Div-kontrola, 6I-Div-Cd, 7I-Div-Se, 8I-Div-Se-Cd.

3.8.Razina ekspresije gena za CAT u izdanku klijanaca pšenice

Najveća ekspresija gena za CATu izdancima zabilježena je kod sorte Divana biofortificirane selenom i tretirane kadmijem (Div-Se-Cd), a najmanja kod sorte Srpanjka pri istim uvjetima (Srp-Se-Cd). Kod sorte Srpanjka tretman kadmijem uzrokovao je neznatno povećanje ekspresije gena, dok je kod skupine biofortificirane selenom (Srp-Se) uzrokovao smanjenje ekspresije gena u odnosu na kontrolu (Srp-Se). Kod sorte Divana, kod skupine Div-Cd, tretman kadmijem uzrokovao je smanjenu ekspresiju gena, dok je kod skupine biofortificirane selenom (Div-Se-Cd) uzrokovao povećanje ekspresije gena u odnosu na odgovarajuće kontrole (Div-kontrola i Div-Se).



Slika 11. Razina ekspresije gena za CAT u izdanku procijenjena RT-PCR-om. A) Na 2% agarozni gel naneseno je po 10 µL produkta PCR reakcije. B) Dijagram intenziteta vrpci PCR produkata kvantificiran softverom *Kodak 1-D image analysis* (Eastman Kodak, New Haven, SAD). M1: standard duljine odsječaka *100 bp DNA Ladder* (*Invitrogen*^{TM}). M2: standard duljine odsječaka *50 bp DNA Ladder Dye Plus (Takara).* 1I-Srp-kontrola, 2I-Srp-Cd, 3I-Srp-Se, 4I-Srp-Se-Cd, 5I-Div-kontrola, 6I-Div-Cd, 7I-Div-Se, 8I-Div-Se-Cd.

4. RASPRAVA

Akumulacija kadmija u korijenu i izdancima ovisi o vezanju kadmija na izvanstanični matriks i učinkovitosti transporta između različitih biljnih dijelova. Izlaganje povećanim koncentracijama kadmija dovodi do inhibicije rasta, poremećaja unosa minerala i redoks sustava stanice te stimulacije sekundarnog metabolizma što u konačnici može dovesti do smrti stanice (Schützendübel i Polle 2002, Hasan i sur. 2009, Zembala i sur. 2010).Toksični učinci kadmija na morfološke i fiziološke procese u biljkama su intenzivno proučavani na različitim vrstama biljaka ili različitim kultivarima iste biljne vrste (Sanita di Toppi i Gabbrielli 1999, Wu i sur. 2007, Ekmekçi i sur. 2008) pri čemu sam genotip značajno utječe na odgovor biljaka.

Teški metali uzrokuju oksidativni stres u biljkama izravnim ili neizravnim putem, stvarajući ROS, te promjene u metabolizmu (unos nutrijenata, sastav pigmenta, proteina, sinteza klorofila, koncentracija enzima). Određeni teški metali, npr. bakar i željezo mogu biti toksični zbog sudjelovanja u redoks reakcijama kao što su Fentonova i Haber-Weissova reakcija. Suprotno, kadmij je nereducirajući metal koji nije sposoban izvršiti reakciju prijenosa elektrona i ne sudjeluje direktno u sintezi ROS-a, ali izaziva oksidativni stres modifikacijom antioksidativnog odgovora (Benavides i sur. 2005, Gratão i sur. 2005). Kloroplasti, glavna sastavnica fotosintetskog aparata su posebno osjetljivi na oštećenja uzrokovana kadmijem (Sandalio i sur. 2001). ROS se također stvara u normalnim okolnostima u reakcijama s O_2 koji se nalazi u kloroplastima i elektronima koji izlaze iz fotosintetskog lanca transporta elektrona. Kadmij sprječava fotoaktivaciju fotosustava II (PSII) inhibirajući prijenos elektrona (Sigfridsson i sur. 2004). Na taj način kadmij neizravno utječe na stvaranje ROS-a uzrokujući neravnotežu unutar kloroplasta. Također, istraživanja pokazuju kako kadmij stimulira proizvodnju ROS-a u lancu transporta elektrona u mitohondrijima (Heyno i sur. 2008). Povećane koncentracije ROS-a aktiviraju antioksidativne enzime kao što su SOD, CAT i GST i uzrokuju akumulaciju neenzimskih antioksidanta kao što su GSH, tokoferol, askorbat, fenoli, flavonoidi i prolini (Ahmad 2012).

U ovom je istraživanju tretman kadmijem uzrokovao veću ekspresiju gena za GST u izdancima u odnosu na kontrolne skupine tretirane vodom, osim kod sorte Divana obogaćene selenom (Div-Se-Cd), što se može objasniti činjenicom da tretmani selenom kod biljaka u niskim koncentracijama djeluju pozitivno na poboljšanje rasta, povećavaju antioksidativnu aktivnost, smanjuju nastanak ROS-a i peroksidaciju lipida, djeluju pozitivno na akumulaciju škroba i šećera, odgađaju senescenciju i poboljšavaju rast starijih sjemenki (Xue i sur. 2001, Hartikainen i sur. 2000, Turakainen i sur. 2004). Ekspresija gena za GST u korijenu je manja

kod skupina tretiranih kadmijem u odnosu na kontrolne skupine tretirane vodom kod sorte Srpanjka što se može objasniti činjenicom da je prva barijera za ulaz kadmija u području korijena, gdje se kadmij imobilizira u staničnoj stijenci (Nishizono i sur. 1989) i izvanstaničnom matriksu. Kod sorte Divana, ekspresija gena za GST veća je kod skupina tretiranih kadmijem nego kod kontrolnih skupina tretiranih vodom. Akumulacija metala u biljci ovisna je o kapacitetu unosa metala u biljku i količini veznih mjesta unutar stanica. Na akumulaciju metala utječe koncentracija i afinitet kelirajućih molekula te prisutnost i selektivnost transportnih mehanizama (Clemens i sur. 2002) što ukazuje na to da postoje razlike u ovim parametrima između dvije sorte.

U ovom istraživanju pokazalo se kako je ekspresija gena za SOD i u izdancima i u korijenu svih skupina bila izrazito manja od ekspresije gena za GST. Ovo se može objasniti činjenicom da se cink (Zn) prenosi pomoću ZIP skupine metalnih prijenosnika, za koje se smatra da su uključeni u transport kadmijaiz tla u stanice korijena, kao i transport iz korijena u vršne dijelove biljke (Krämer i sur. 2007) pa je moguće da se kadmijvezao za ZIP skupine metalnih prijenosnika umjesto Zn. Ekspresija gena za SOD u izdancima je bila veća kod svih skupina tretiranih kadmijem, osim kod sorte Divana obogaćene selenom (Div-Se-Cd) gdje je ekspresija gena za SOD bila neznatno veća kod kontrolne skupine. U korijenu sorte Srpanjka (Srp-Cd) tretman kadmijem uzrokovao je neznatno smanjenu ekspresiju gena za SOD, no isti tretman je kod sorte Srpanjka biofortificirane selenom (Srp-Se-Cd) uzrokovao povećanu ekspresiju gena za SOD. U korijenu sorte Divana (Div-Cd) tretman kadmijem uzrokovao je smanjenu ekspresiju gena za SOD. Kod sorte Divana biofortificirane selenom (Div-Se-Cd) tretman kadmijem također je uzrokovao manju ekspresiju gena za SOD, no ona je bila znatno manja nego u kontrolnoj skupini.

Katalaza je oksidoreduktaza koja uklanja H_2O_2 i jedan je od ključnih enzima zaduženih za uklanjanje toksičnih peroksida (Shah i sur. 2001). Pojačano stvaranje H_2O_2 u kloroplastima i drugim staničnim dijelovima u apoplastu prisutno je kada je biljka izložena stresnim uvjetima (Foyer i sur. 1997).U izdancima sorte Srpanjka (Srp-Cd) tretman kadmijem je povećao ekspresiju gena za CAT u odnosu na kontrolnu skupinu. Kod sorte Srpanjka biofortificirane selenom (Srp-Se-Cd) tretman kadmijem je uzrokovao smanjenje ekspresije gena za CAT u odnosu na kontrolu. Puertos i sur. (2007.) zabilježili su kako je tretman s 50 μM kadmijem u listovima graška uzrokovao smanjenu ekspresiju i aktivnost CAT. Slični su rezultati dobiveni i u istraživanjima drugih biljnih vrsta poput *Secale cereale* (Streb i sur. 1993.), *Lemna minor* (Mohan i Hosetti 1997.), *Pinus silvestris* (Schutzendubel i sur. 2001.) i

Capsicum annuun (Leon i sur. 2002). Suprotno, analiza transkripta CAT pokazala je povećanu ekspresiju ovog gena kao rezultat na tretman kadmijem. Ovi rezultati pokazuju kako kadmij sudjeluje u posttranslacijskim modifikacijama proteina. Povećanje ekspresije gena za CAT pod utjecajem kadmija može biti posljedica povećanje proizvodnje H_2O_2 (Romero-Puertas i sur. 1999, 2002, 2004) budući da askorbinska kiselina može djelomično spriječiti akumulaciju CAT transkripata (Guan i Scandalios, 2000). Kod sorte Divana (Div-Cd), tretman kadmijem je smanjio ekspresiju gena za CAT u odnosu na kontrolnu skupinu. Kod sorte Divana biofortificirane selenom (Div-Se-Cd) tretman kadmijem je uzrokovao neznatno povećanje ekspresije gena za CAT. Obogaćivanje sjemenki selenom pomoglo je pri antioksidativnom odgovoru na tretman kadmijem, te tako smanjilo ekspresiju gena za CAT kod sorte Srpanjka, no nije utjecalo na ekspresiju gena kod sorte Divana. Zembala i sur. (2010) zabilježili su kako je kod pšenice i repe koje su bile izložene stresu zbog djelovanja kadmija, selen pozitivno utjecao na promjene u unosu nutrijenata, smanjio peroksidaciju lipida i pozitivno djelovao na stabilnost stanične membrane.

5. GLAVNI REZULTATI I ZAKLJUČCI

- Tretman kadmijem uzrokovao je promjene u ekspresije gena za GST u klijancima pšenice pri čemu je taj odgovor ovisio o sorti pšenice i vrsti biljnog organa.
- Tretman kadmijem uzrokovao je povećanu ekspresiju gena za SOD u izdancima klijanaca obje sorte pšenice, osim kod sorte Divana obogaćene selenom.
- Tretman kadmijem uzrokovao je smanjenuekspresiju gena za SOD u korijenu obje skupine sorte Divana.
- Tretman kadmijem u izdancima klijanaca pšenice sorte Srpanjka uzrokovao je pojačanu ekspresiju gena za CAT, no smanjenu ekspresiju gena za CAT kod sorte Srpanjka obogaćene selenom.
- Tretman kadmijem u izdancima klijanaca pšenice sorte Divana uzrokovao je smanjenu ekspresiju gena za CAT, no povećanu ekspresiju gena za CAT kod sorte Divana biofortificirane selenom.
- Postoje sortne razlike u razini ekspresijegena za GST, SOD i CAT kao odgovor na tretman kadmijem.

6. LITERATURA

Adriano DC. 2001. Trace Elements in Terrestrial Environments. Biogeochemistry, Bioavailability, and Risks of Metals. *Springer-Verlag*, New York. 867 pp.

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

Allemann C, Hoegger P, Heiniger U, Rigling D. 1999. Genetic variation of *Cryphonectria* hypoviruses (CHV1) in Europe, assessed using restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. *Molecular Ecology* 8: 843–854.

Beck MA, Levander O, Handy J. 2003. Selenium deficiency and viral infection. *J Nutr* 2133: 1463-67.

Benavides MP, Gallego SM, Tomaro ML. 2005. Cadmium toxicity in plants. *Braz J Plant Physiol* 17: 21-34.

Benavides MP, Gallego SM, Tomaro ML. 2005. Cadmium toxicity in plants. *Braz J Plant Physiol* 17: 21-34.

Clemens S, Palmgreen MG, Kramer U. 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends Plant Sci* 7: 309-315.

Combs GF. 2001. Selenium in global food systems. *Br J Nutr* 85: 517-547.

Cordero B, Lodeiro P, Herrero R, Esteban Sastre de Vicente M. 2004. Biosorption of cadmium by *Fucus spiralis*. *Environmental Chemistry* 1: 180–187

Diwadkar-Navsariwala V, Prins GS, Swanson SM, Birch LA, Ray VH, Hedayat S, Lantvit DL, Diamond AM . 2006. Selenoprotein deficiency accelerates prostate carcinogenesis in a transgenic model. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:8179–8184

Draize JH, Beath OA. 1935. Observation on the pathology of “blind staggers” and “alkalidisease”. *Am Vet Med Assoc J* 86:53–763

Eđed A. 2011. Sortna specifičnost akumulacije cinka, kadmija i željeza u zrnu ozime pšenice (*Triticum aestivum* L.). Doktorski rad. Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijek,

Institut Ruđer Bošković u Zagrebu, Sveučilište u Dubrovniku, Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij "Molekularne bioznanosti"

Ekmekçi Y, Tanyolac D, Ayhan B. 2008. Effect of cadmium on antioxidant enzyme and photosynthetic acitivities in leaves of two maize cultivars, *J Plant Phyiol* 165: 600-611.

Ellis DR, Sors TG, Brunk DG, Albrecht C, Orser C, Lahner B, Wood KV, Harris HH, Pickering IJ, Salt DE. 2004. Production of Se-methylselenocysteine in transgenic plants expressing selenocysteine methyltransferase. *BMC Plant Biol* 4:1–11

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

Fu L-H, Wang X-F, Eyal Y, She Y-M, Donald LJ, Standing KG, Ben-Hayyim G. 2002. Aselenoprotein in the plant kingdom: Mass spectrometry confirms that an opal codon (UGA) encodes selenocysteine in *Chlamydomonas reinhardtii* glutathione peroxidase. *J. Biol Chem* 277: 25983–25991

Furini A. 2012. Plants and Heavy Metals. Vol 1. Heavy Metal Toxicity in Plants. *Springer (Science+Business Media B.V.)*, Dordrecht, Netherlands 6 pp.

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

Gill SS, Khan NA, Tuteja N. 2011. Differential cadmium stress tolerance in five Indian mustard (*Brassica juncea* L.) cultivars, an evaluation of the role of antioxidant machinery. *Plant Signal Behav* 6: 293-300.

Gratão PL, Polle A, Lea P, Azevedo R. 2005. Making the life of heavy metal-stresses plants a little easier. *Funct Plant Biol* 32: 481- 494.

Guan LM, Scandalios J. 2000. Catalase transcript accumulationin response to dehydration and osmotic stress inleaves of maize viviparous mutants. *Redox Rep*5:377–83.

Hall JL. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot* 53: 1-11.

Hartikainen H, Xue TL, Piironen V. 2000. Selenium as an anti-oxidant and prooxidant in ryegrass. *Plant Soil* 225: 193–200.

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

Hasan SA, Fariduddin Q, Ali B, Hayat S, Ahmad A. 2009. Cadmium: toxicity and tolerance in plants. *J Environ Biol* 30: 165-174.

Heyno E, Klose C, Krieger-Liszkay A. 2008. Origin of cadmium-induced reactive oxygen species production: mitochondrial electron transfer versus plasma membrane NADPH oxidase. *New Phytol* 179(3): 687-99.

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

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

Kawanishi S, Inoue S, Oikawa S, Yamashita N, Toyokuni S, Kawanishi M, Nishino K. 2001.Oxidative DNA damage in cultured cells and rat lungs by carcinogenic nickel compounds. *Free Rad Biol Med* 31: 108-116.

Khan N, Ahmad I, Singh S, Nazar R. 2006. Variation in growth. Photosynthesis and yield of five wheat cultivars exposed to cadmium stress. *World J Agri Sci* 2: 223-226.

Krämer U, Talke IN, Hanikenne M. 2007. Transition Metal Transport. *FEBS Lett* 581: 2263-2272

Leon AM, Palma JM, Corpas FJ, Gomez M, Romero-Puertas MC, Chatterjee D. 2002. Antioxidative enzymesin cultivars of pepper plants with different sensitivity to cadmium. *Plant Physiol Biochem* 40: 813–20

Lewis BG, Johnson CM, Delwiche CC. 1966. Release of volatile selenium compounds by plants:collection procedures and preliminary observations. *J Agric Food Chem* 14: 638–640

Liu SL, Yang RJ, Ma MD, Dan F, Zhao Y, Jiang P, Wang MH. 2015. Effects of exougenous NO on the growth, mineral nutrient content, antioxidant system, and ATPase activities of *Trifolium repens* L. plants under cadmium stress. *Acta Physiol Plant* 37: 1721

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

Mihara H, Esaki N. 2002. Bacterial cysteine desulfurases: their function and mechanisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 12–23

Mohan BS, Hosetti BB. 1997. Potential phytotoxicity of lead andcadmium toLemna minorgrown in sewage stabilization pods. *Environ Pol* 98: 233–8

Neuhierl B, Thanbichler M, Lottspeich F, Bock A. 1999. A family of S-methylmethionine dependent thiol/selenol methyltransferases. Role in selenium tolerance and evolutionary relation. *J Biol Chem* 274: 5407–5414

Nishizono H, Kubota K, Suzuki S, Ishii F. 1989. Accumulation of heavy metals in cell walls of *Polygonum cuspidatum* roots from metalliferous habitats. *Plant Cell Physiol* 30: 595-598.

Novoselov SV, Rao M, Onoshko NV, Zhi H, Kryukov GV, Xiang Y, Weeks DP, Hatfield DL,Gladyshev VN. 2002. Selenoproteins and selenocysteine insertion system in the model plant system,*Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO J* 21: 3681–3693

Pilon-Smits EAH, Quinn CF. 2010. Selenium Metabolism in Plants. *Cell Biology of Metals and Nutrients* pp. 225-241.

Pilon-Smits EAH, Quinn CF, Tapken W, Malagoli M, Schiavon M. 2009. Physiological functions of beneficial elements. *Curr Opin Plant* Biol pp. 267-274

Romero-Puertas M, Palma JM, Gomez M, del Rio LA,Sandalio LM. 2002. Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant Cell Environ* 25: 677–86.

Romero-Puertas MC, Corpas JF, Rodriguez –Serrano M, Gomez M, del Rio LA, Sandalio LM. 2007. Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea plants. *Journal of Plant Physiology* 164: 1346—1357.

Romero-Puertas MC, McCarthy I, Sandalio LM, Palma JM, Corpas FJ, Gomez M, 1999. Cadmium toxicity andoxidative metabolism of pea leaf peroxisomes. *Free Rad Res* 31(Suppl):25–32.

Romero-Puertas MC, Rodriguez-Serrano M, Corpas FJ,Go´mez M, del Rio LA, Sandalio LM. 2004. Cadmium-induced subcellular accumulation of O_2 and H_2O_2 in pealeaves. *Plant Cell Environ* 27:1122–34.

Rosenfeld I, Beath OA. 1964. Selenium, geobotany, biochemistry, toxicity, and nutrition.*Academic Press*, New York

Roychoudhury A, Basu S, Sengupta DN. 2012. Antioxidants and stress-related metabolites in the seedlings of two indica rice varieties exposed to cadmium chloride toxicity. *Acta Physiol Plant* 34:835–84

Sandalio LM, Dalurzo HC, Gómez M, Romero-Puertas MC, del Río LA. 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J Exp Bot.* 52(364):2115-26.

Sanita di Toppi L, Gabbrielli R. 1999. Response to cadmum in higher plants. *Environ Exp Bot* 41: 105-130.

Schützendübel A, Nikolova P, Rudolf C, Polle A. 2002. Cadmium and H_2O_2 -induced stress in Populus 3 canescens roots. *Plant Physiol Biochem* 40: 577-584.

Schutzendubel A, Schwanz P, Teichmann T, Gross K,Langenfeld-Heyser R, Godbold DL, Polle A. 2001. Cadmium-induced changes in antioxidative systems,hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots. *Plant Physiol* 75:887–98.

Shah K, Kumar RG, Verma V, Dubey RS. 2001. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Sci* 161: 1135-1144.

Sigfridsson KGV, Bernát G, Mamedov F, Styring S. 2004. Molecular interference of Cd^{2+} with photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 1659:19–31.

Sors TG, Ellis DR, Salt DE. 2005. Selenium uptake, translocation, assimilation and metabolic fate in plants. *Photosynth Res* 86:373–389

Stadtman TC. 1990. Selenium biochemistry. *Annu Rev Biochem* 59:111–127

Stadtman TC. 1996. Selenocysteine. *Annu Rev Biochem* 65:83–100

Streb P, Michael-Knauf A, Feierabend J. 1993. Preferential photoinactivation of catalase and photoinhibition of photosystem II are common early symptoms undervarious osmotic and chemical stress conditions.*Physiol Plant* 88:590–8

Terry N, Zayed AM, de Souza MP, Tarun AS. 2000. Selenium in higher plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51:401–432

Turakainen M, Hartikainen H, Seppanen MM. 2004. Effects of selenium treatments on potato (*Solanum tuberosum* L.) growth and concentrations of soluble sugars and starch. *J Agric Food Chem* 52: 5378-5382.

Whanger PD. 1989. China, a country with both selenium deficiency and toxicity: some thoughts and impressions. *J Nutr* 119:1236–1239

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

Wilber CG. 1980. Toxicology of selenium: a review. *Clin Toxicol* 17:171–230

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

Zembala M, Filek M, Walas S, Mrowiec H, Kornaś A, Miszalski Z, Hartikainen H. 2010. Effect of Selenium on Macro- and Microelement Distribution and Physiological Parameters of Rape and Wheat Seedlings Exposed to Cadmium Stress. *Plant Soil* 329: 457-468.