UTJECAJ SELENA NA ANTIOKSIDACIJSKI ODGOVOR KLIJANACA PŠENICE TRETIRANIH KADMIJEM

Dragičević, Gabrijela

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:845674

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

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

ODJEL ZA BIOLOGIJU

Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni

Dragičević Gabrijela

UTJECAJ SELENA NA ANTIOKSIDACIJSKI ODGOVOR KLIJANACA PŠENICE TRETIRANIH KADMIJEM

Diplomski rad

OSIJEK, 2015.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

UTJECAJ SELENA NA ANTIOKSIDACIJSKI ODGOVOR KLIJANACA PŠENICE TRETIRANIH KADMIJEM

Gabrijela Dragičević

Rad je izrađen: Laboratorij za biokemiju, Odjel za biologiju, Sveučilište Josipa Jurja Strosmayera u Osijeku

Mentor: dr. sc. *Ivna Štolfa*, docent
Neposredni voditelj: dr.sc. *Rosemary Vuković*, viši asistent

Kratak sažetak diplomskog rada

Akumulacija kadmija u biljkama uzrokuje različite fiziološke, biokemijske i strukturalne promjene. Selen je mikronutrijent koji u niskim koncentracijama djeluje pozitivno na poboljšanje rasta i povećava antioksidacijsku sposobnost biljke tijekom izlaganja različitim vrstama okolišnog stresa. Glavni cilj ovog istraživanja bio je utvrditi kako obogaćivanje sjemenki selenom utječe na antioksidacijski odgovor u korijenu i izdancima klijanaca dvije sorte pšenice (Divana i Srpanjka) tretiranih različitim koncentracijama kadmija. Pozitivan učinak obogaćivanja sjemenki selenom na ukupnu masu klijanaca i enzime askorbat-glutationskog ciklusa u klijancima tretiranim kadmijem bio je sortno-specifičan.
Obogaćivanje sjemenki selenom značajno je povećalo aktivnosti katalaze u korijenu klijanaca obje sorte pšenice tretiranih najvećom koncentracijom kadmija. S obzirom da je aktivnost katalaze biološki pokazatelj otpornosti pšenice na toksičan učinak kadmija, obogaćivanje sjemenki pšenice selenom može se primijeniti kao uspješna metoda povećanja otpornosti pšenice na oksidacijski stres uzrokovan kadmijem.

Broj stranica: 60
Broj slika: 12
Broja tablica: 3
Broj literaturnih navoda: 190
Jezik izvornika: Hrvatski

Ključne riječi: selen, kadmij, *Triticum aestivum*, antioksidacijski odgovor

Datum obrane: 25.09.2015.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. **Dr.sc. *Ljiljana Krstin*, docent, predsjednica**
2. **Dr.sc. *Ivna Štolfa*, docent, mentor, član**
3. **Dr.sc. *Janja Horvatić*, izvanredni profesor, član**

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 **Master Thesis**
Department of Biology
Graduate university study programme in Biology

Scientific Area: Natural science
Scientific Field: Biology

THE EFFECT OF SELENIUM ON THE ANTIOXIDANT RESPONSE OF WHEAT SEEDLINGS TREATED WITH CADMIUM

Gabrijela Dragičević

Thesis performed at: Laboratory of Biochemistry, Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Supervisor: Ph. D. *Ivna Štolfa*, Assistant Professor
Assistant in charge: Ph. D. *Rosemary Vuković*, Assistant

Short abstract
The accumulation of cadmium in plants cause a variety of physiological, biochemical and structural changes. Selenium is a micronutrient that in low concentrations has a positive effect on improving growth and antioxidant capacity of plants exposed to different types of environmental stress. The aim of this study was to determine how the enrichment of seeds with selenium affects the antioxidant response in the roots and shoots of two varieties of wheat (Divana and Srpanjka) seedlings treated with different concentrations of cadmium. The positive effect of selenium enrichment of seeds on the the total weight of seedlings and enzymes of ascorbate-glutathione cycle in seedlings treated with cadmium was cultivar-dependent. Enrichment of seeds with selenium significantly increased catalase activity in the roots of both wheat cultivars treated with the highest concentration of cadmium. The activity of catalase is a biological indicator of wheat resistance to cadmium toxic effects, so selenium enrichment of wheat seeds can be used as a successful method of increasing wheat resistance to oxidative stress caused by cadmium.

Number of pages: 60
Number of figures: 12
Number of tables: 3
Number of references: 190
Original in: **Croatian**

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

Date of the thesis defence: 25.09.2015.

Reviewers :
1. Ph. D. *Ljiljana Krstin*, Assistant Professor
2. Ph. D. *Ivna Štolfa*, Assistant Professor
3. Ph. D. *Janja Horvatić*, Associate Professor

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

Doc.dr.sc. Ivni Štolfa zahvaljujem na stručnom vodstvu, savjetima, uputama, ispravcima,beskonačnom stpljenju i velikoj pomoći tijekom pisanja rada. Uz svu profesionalnost i stručnost u našoj suradnji, najdublju zahvalnost osjećam prema Vašem razumijevanju i prijateljskom odnosu.

Zahvaljujem se na razumijevanju svim članovima Laboratorija za biokemiju, Odjela za biologiju, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, a posebno i veliko hvala dr.sc. Rosemary Vuković na susretljivosti, savjetima te nesebičnoj i velikoj pomoći tijekom eksperimentalnog dijela rada.

Od srca hvala mojoj obitelji na strpljenju i neizmjernoj podršci tijekom studiranja i izrade ovog rada.

Veliko hvala dragim prijateljima na pomoći proteklih godina i nezaboravnim studentskim danima. Tihani hvala na pomoći tijekom izrade ovoga rada.

SADRŽAJ:

1. UVOD 1

1.1. Selen 2

1.2. Kadmij 4

1.2.1. Toksičnost kadmija 5

1.2.2. Mehanizmi akumulacije i detoksifikacije kadmija 6

1.2.3. Oksidacijski stres uzrokovan kadmijem 7

1.3. Antioksidacijski enzimi 7

1.3.1. Askorbat-peroksidaza 8

1.3.2. Glutation-reduktaza 9

1.3.3. Katalaza 10

1.3.4. Glutation S-transferaza 11

1.4. Utjecaj makro i mikronutrijenata na toksično djelovanje kadmija 12

1.5. Cilj rada 16

2. MATERIJALI I METODE 17

2.1. Materijali 18

2.1.1. Priprema i sterilizacija sjemenki: 18

2.2. Metode rada: 18

2.2.1. Priprema enzimskih ekstrakata 19

2.2.2. Određivanje aktivnosti enzima askorbat-peroksidaze (EC 1.11.1.11) 19

2.2.3. Određivanje aktivnosti enzima glutation-reduktaze (EC 1.6.4.2) 19

2.2.4. Određivanje aktivnosti enzima katalaze (EC 1.11.16) 20

2.2.5. Određivanje aktivnosti enzima glutation S-transferaze (EC 2.5.1.18) 20

2.3. Statistička obrada podataka 20

3. REZULTATI 21

3.1. Klijavosti i mase klijanaca 22

3.1.1. Utjecaj obogaćivanja sjemenki selenom na klijavost različitih sorti ozime pšenice tretiranih otopinama različitih koncentracija kadmija 22

3.1.2. Utjecaj obogaćivanja sjemenki selena na ukupnu masu klijanaca različitih sorti ozime pšenice tretiranih otopinama različitih koncentracija kadmija 22

3.2. Ukupna aktivnost enzima askorbat-peroksidaze 23

3.2.1 Utjecaj obogaćivanja sjemenki selena na aktivnost enzima askorbat-peroksidaze u izdanku klijanaca različitih sorti ozime pšenice tretiranih otopinama različitih koncentracija kadmija 23

3.2.2. Utjecaj obogaćivanja sjemenki selena na aktivnost enzima askorbat-peroksidaze u korijenu klijanaca različitih sorti ozime pšenice tretiranih otopinama različitih koncentracija kadmija 24

3.3. Ukupna aktivnost enzima glutation-reduktaze 25

3.3.1. Utjecaj obogaćivanja sjemenki selena na aktivnost enzima glutation-reduktaze u izdanku klijanaca različitih sorti ozime pšenice tretiranih otopinama različitih koncentracija kadmija 25

3.3.2. Utjecaj obogaćivanja sjemenki selena na aktivnost enzima glutation-reduktaza u korijenu klijanaca različitih sorti ozime pšenice tretiranih otopinama različitih koncentracija kadmija 26

3.4. Ukupna aktivnost enzima katalaze 27

3.4.1. Utjecaj obogaćivanja sjemenki selena na aktivnost enzima katalaze u izdanku klijanaca različitih sorti ozime pšenice tretiranih otopinama različitih koncentracija kadmija 27

3.4.2 Utjecaj obogaćivanja sjemenki selena na aktivnost enzima katalaze u korijenu klijanaca različitih sorti ozime pšenice tretiranih otopinama različitih koncentracija kadmija 28

3.5. Ukupna aktivnost enzima glutation S-transferaze 29

3.5.1 Utjecaj obogaćivanja sjemenki selena na aktivnost enzima glutation S-transferaze u izdanku klijanaca različitih sorti ozime pšenice tretiranih otopinama različitih koncentracija kadmija 29

3.5.2. Utjecaj obogaćivanja sjemenki selena na aktivnost enzima glutation S-transferaze u korijenu klijanaca različitih sorti ozime pšenice tretiranih otopinama različitih koncentracija kadmija 30

4. RASPRAVA 32

5. GLAVNI REZULTATI I ZAKLJUČCI 39

6. LITERATURA 41

1. UVOD

1.1. Selen

Elementarni Se je netopljiv i veoma stabilan. U reducirajućim uvjetima stvara se iz selenita i selenata. U nekim tlima, oba kemijska oblika mogu biti nedostupna biljakama. Selen može reagirati s metalima i dati im jedan elektron čime se stvara ionska komponenta koja sadrži selenidni ion (Se^{2-}). Metalni selenidi su široko rasprostranjeni u prirodi i najčešći su mineralni oblik selena. Nedostatak Se u tlu može se nadoknaditi dodatkom Se fertilizatorima ili direktnim apliciranjem Se u tlo. Udio Se u određenoj vrsti tla je određen uglavnom geokemijskim faktorima, osobito prirodom matične stijene, procjednosti tla i površinskim vodama te klimatskim elementima. Najvažniji izvor Se u mnogim tlima predstavljaju seleniti. U kiselim uvjetima seleniti se vežu snažno za čestice gline i komplekse željeza (Fe), što bitno smanjuje njihovu dostupnost biljkama (Reilly, 2006). U biljke, Se se unosi na dva načina, kao selenat (SeO_4^{2-}) i selenit (SeO_3^{2-}). Pretpostavka je kako se nakon unosa prenosi u kloroplaste putem prijenosnika za sulfate, metabolizira na isti način kao i sulfati, te se reducira i ugrađuje u organske komponente (Ellis i Salt, 2003; Tamaoki i sur., 2008). Arvy (1993) postavlja hipotezu kako se seleniti u biljku unose putem pasivne difuzije, dok Li i suradnici (2008) pretpostavlja kako je unos selenita povezan s transportom fosfata. Zbog svoje kemijske sličnosti sa suporom (S), Se u biljkama se apsorbira i metabolizira istim putem kao S te dolazi do inkorporacije u molekule i specifične zamjene cisteina za Se-cistein i metionina za Se-metionin (Sors i sur., 2005; Gratão i sur., 2005).

Većina biljaka nije sposobna tolerirati veće koncentracije Se, te se javlja potreba za akumuliranjem Se kod viših biljaka prekomjernom ekspresijom ključnih enzima uključenih u metabolizam Se i S (Van Huysen i sur., 2004; Van Hoewyk i sur., 2005). Selen je esencijalan element za ljude, životinje, bakterije i zelenu algu *Chlamydomonas reinhardtii*, jer je strukturna komponenta određenih selenoproteina i seleno-tRNA-za, dok se Se ne smatra esencijalnim elementom za biljke (Hartikainen, 2005). Sastavni je dio selenoenzima kao što je glutation-peroksidaza (GSH-Px), tioredoksin-reduktaza (TR), proteina uključenih u transport Se (selenoprotein P) i još uvijek nedovoljno istraženih proteina koji su uključeni u održavanje redoks potencijala stanice (Rayman, 2000; Kryukov i sur., 2003). Selenoproteini sadrže SeCys u aktivnom mjestu te često posjeduju redoks funkciju što im omogućava hvatanje slobodnih radikala koji u suvišku uzrokuju oksidacijski stres. Kod viših biljaka nisu pronađene umetnute SeCys sekvence, nego su pronađeni biljni homolozi selenoproteina (glutation-peroksidaza) koji sadrže Cys umjesto SeCys u aktivnom mjestu. Aminokiseline koje sadrže Se nisu pronađene kod viših biljaka, iako su pristune kod nekih algi (Lobanov i

sur., 2007) .

Kod biljaka, Se u niskim koncentracijama djeluje pozitivno na poboljšanje rasta, povećava antioksidacijsku aktivnost, smanjuje nastanak reaktivnih kisikovih jedinki (eng. *Reactive Oxygen Species* - ROS) i peroksidaciju lipida, djeluje pozitivno na akumulaciju škroba i šećera, odgađa senescenciju i poboljšava rast starijih sjemenki (Xue i sur., 2001; Hartikainen i sur., 2000; Turakainen i sur., 2004). Stimulirajući utjecaj folijarne primjene Se na prinos utvrđen je kod plodova bundeve u biljaka dodatno izloženih štetnom djelovanju UV svjetlosti (Germ i sur., 2005). Slični rezultati pozitivnog učinka djelovanja Se na prinos utvrđeni su kod salate (Xue i sur., 2001) gdje Se dodatno održava razinu tokoferola i povećava aktivnost antioksidacijskog enzima superoksid-dismutaze, dok je u istraživanju na krumpiru zabilježena veća koncentracija škroba kod mladih biljaka koje su tretirane Se i dokazana uloga Se kod usporavanja starenja gomolja i korijena (Turakainen i sur., 2004). Hartikainen i sur. (2000) utvrdili su pozitivni učinak Se na prinos kod ljulja, kao i na smanjenje lipidne peroksidacije i povećanje aktivnosti antioksidacijskog enzima glutation-peroksidaze. Zahedi i suradnici (2009) i Pazoki i suradnici (2010) utvrdili su da folijarna primjena Se poboljšava prinos uljane repice izložene sušnom stresu. Se interferira s primanjem teških metala u biljku kao što su arsen, živa i olovo te na taj način smanjuje njihovu toksičnost (Ebbs i sur., 2001; He i sur., 2004; Yathavakilla i sur., 2007). Također, Se ima ulogu u zaštiti biljaka od biotičkog stresa uslijed djelovanja širokog spektra biljojeda i gljivičnih infekcija (Quinn i sur., 2007). Dokazano je kako tretmani Se reguliraju stvaranje jasmonske kiseline i etilena u biljkama, kao i proizvodnju proteina uključenih u obranu i regulaciju unosa sulfata i selenata (Tamaoki i sur., 2008).

Se je u višim koncentracijama toksičan za biljke i ostale organizme. Istraživanja na ljulju (*Lolium perenne*) pokazuju da se Se ponaša kao prooksidans u koncentracijama $\geq$ 10 mg Se kg^{-1} značajno inhibirajući klijavost sjemenki, povećavajući peroksidaciju lipida i dehidraciju izdanaka te smanjujući aktivnosti superoksid-dismutaze (SOD) (Hartikainen i sur., 2000). Smanjenje aktivnosti SOD i koncentracije tokoferola uslijed tretmana povišenim koncentracijama Se u listovima salate (*Lactuca sativa*) utvrdili su Xue i suradnici (2001).

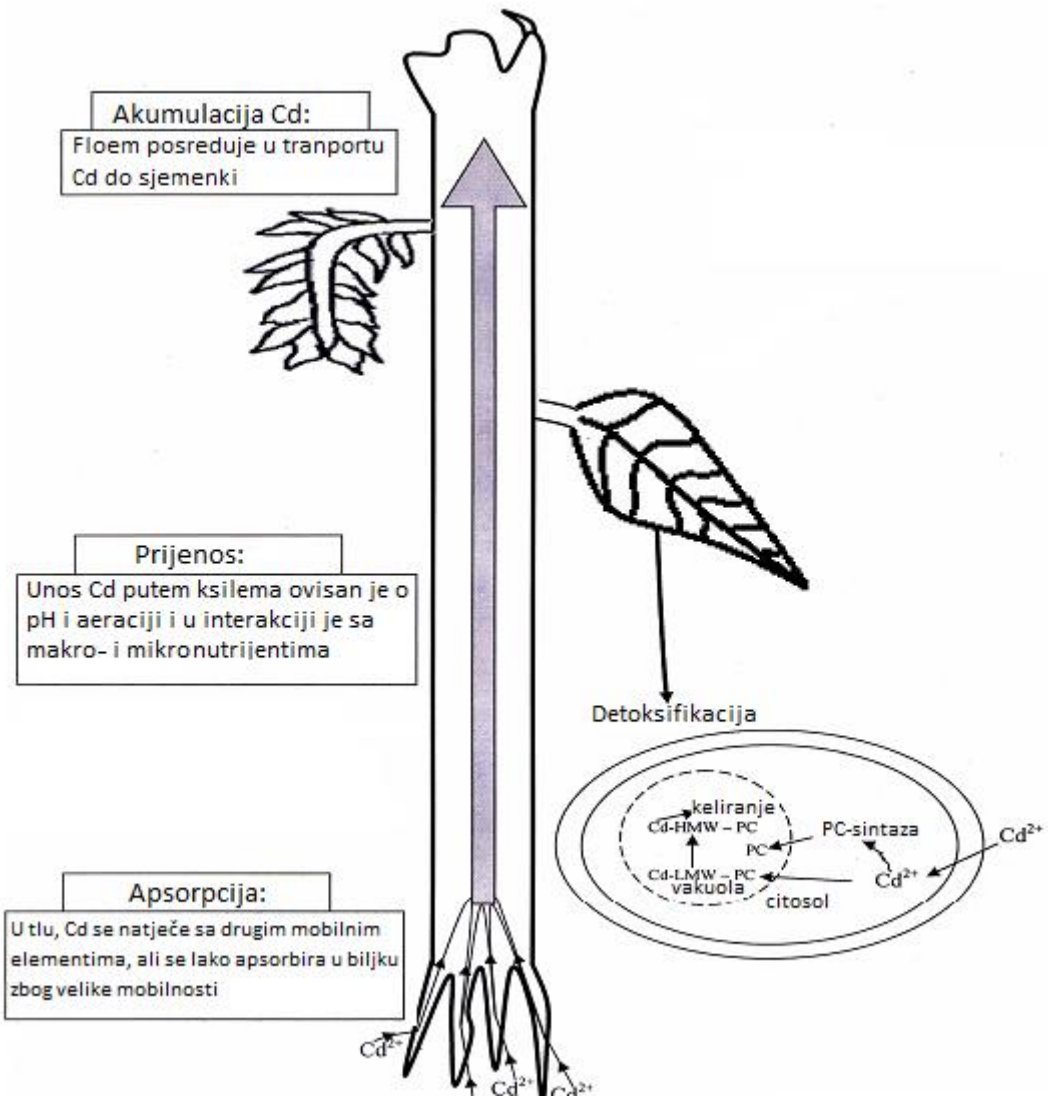
Se je važna komponenta funkcionalne hrane. U mnogim dijelovima svijeta, nedostatak Se u ljudskoj prehrani povezuje se s povećanim rizikom od virusnih oboljenja i bolesti krvožilnog sustava (Beck i sur., 2003). Razlog tomu je velika količina obradivih površina s niskim koncentracijama Se što posljedično dovodi do smanjenog unosa Se u ljudski organizam (Combs, 2001). Agronomska biofortifikacija žitarica Se dokazano povećava unos Se u ljudski organizam i obogaćuje ljudsku ishranu (Hartikainen, 2005). Raspon koncentracija

od nedostatka do toksičnosti Se je relativno malen, te se u slučaju biofortifikacije trebaju pažljivo pratiti količine Se u konačnom proizvodu kako bi se izbjegla njegova toksičnost (White i Broadley, 2009).

1.2. Kadmij

Kadmij (Cd) je neesencijalni element koji ima negativan učinak na rast i razvoj biljaka. Uobičajeno se pojavljuje u malim koncentracijama u tlu (Wagner, 1993). U tlo Cd dolazi uglavnom iz antropogenih izvora: utjecaj industrije, urbani otpad, rudnici, baterije koje sadržavaju Cd, tretmani biljaka i poljoprivredni fungicidi (Moradi i sur., 2005). Prepoznat je kao značajan polutant zbog svoje toksičnosti i velike topljvosti u vodi (Gallego i sur., 2012). Tla u kojima koncentracija Cd varira od 0,32 do 1 mM nazivaju se zagađenima (Sanita di Toppi i Gabbrielli, 1999). Cd iz okoliša može se uklopiti u biološke strukture i postati znatan ekološki problem.

Glavni put kojim teški metali ulaze u biljke je korijenov sustav (Hentz i sur., 2012) (Slika 1). Zbog svoje velike mobilnosti i topljivosti u vodi Cd brzo ulazi u korijen, dolazi do ksilema apoplastnim i /ili simplastnim putem, uglavnom u kompleksu s organskim kiselinama ili fitokelatinima (DalCorso i sur., 2008). Unatoč različitoj mobilnosti iona metala u biljkama, udio metala je u pravilu veći u korijenu nego u tkivima iznad zemlje (Ramos i sur., 2002; Harris i Taylor, 2001). Udio Cd u biljkama smanjuje se navedenim redom: korijen > stabljika > listovi > plod > sjemenka (Blum, 1997). Stupanj do kojega su biljke sposobne unijeti Cd ovisi o njegovoj koncentraciji u tlu i biodostupnosti. Biodostupnost Cd modelirana je prisutnošću organskih tvari, pH, redoks potencijalom, temperaturom i koncentracijom ostalih elemenata kao što su kalcij, cink i željezo u tlu (Benavides i sur., 2005). Unos Cd iona je u kompeticiji s istim transmembranskim prijenosnikom nutrijenata kao što su kalij (K), kalcij (Ca), magnezij (Mg), željezo (Fe), mangan (Mn), bakar (Cu), cink (Zn) i nikal (Ni) (Herren i Feller, 1997). Diatloff i suradnici (2006) su utvrdili kako kationski prijenosnik LCT1, koji je zaslužan za prijenos Ca u pšenici, također sudjeluje u prijenosu Cd kod vrste *Pichia pastoris*. Lee i sur. (2003) su povezali gen *ZntA* kod uročnjaka, koji ima ulogu kod transporta Zn s transportom Cd iona od korijena prema izdancima.



Slika 1. Pregled apsorpcije, prijenosa, akumulacije i detoksifikacije Cd u biljci. Preuzeto i modificirano prema Nazar i sur. (2012).

1.2.1. Toksičnost kadmija

Akumulacija Cd u biljkama uzrokuje različite fiziološke, biokemijske i strukturalne promjene (Khan i sur., 2006). Simptomi toksičnosti Cd su otpadanje listova, kloroza, poremećaj unosa vode i zatvaranja puči (Watanabe i Suzuku 2002; Lin i sur., 2007). Kloroza može biti znak nedostatka Fe, nedostatka fosfora ili smanjenja transporta Mn (Haghiri, 1973). Općenito, dokazano je da Cd interferira s unosom i transportom nekoliko elemenata kao što su Ca, Mg, P i K te utječe na vodeni status u biljkama (Das i sur., 1997). Na staničnoj razini, Cd oštećuje fotosintetski aparat, osobito fotosustav II, te uzrokuje smanjenje sadržaja klorofila i karotenoida (DalCorso i sur. 2010; Mobin i Khan, 2007; Shi i sur., 2010) te također može

uzrokovati poremećaj u metabolizmu biljnih hormona (Pasternak i sur., 2005). Teški metali mogu uzrokovati oksidaciju i povezivanje tiolnih skupina u proteinima, inhibiciju membranskih proteina kao što je H^+-ATPaza ili promjenu fluidnosti staničnih lipida (Meharg, 1993). Kadmij značajno djeluje na sastav lipida u biomembranama (Hernández i Cooke, 1997) te također smanjuje aktivnost ATP-aze u staničnoj membrani pšenice i suncokreta (Fodor i sur., 1995).

1.2.2. Mehanizmi akumulacije i detoksifikacije kadmija

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). Prva barijera za ulaz Cd je u području korijena gdje se Cd imobilizira u staničnoj stijenci (Nishizono i sur., 1989) i izvanstaničnom matriksu (Verkleij i Schat, 1990; Wagner, 1993). Kadmij se može vezati za pektine i histidilne skupine u staničnoj stijenci (Leita i sur., 1996) ili akumulirati u vakuoli (Blaudez i sur., 2000). Učinkovitost navedenih mehanizama smanjivanja toksičnosti Cd varira ovisno o koncentraciji Cd u mediju, vrsti biljke i vremenu izlaganja (Sanitá di Toppi i Gabrielli, 1999).

Keliranje je jedan od najvažnijih mehanizama detoksifikacije teških metala u biljkama, ali i drugim organizmima. Keliranje obuvaća vezanje metala za ligand te u konačnici odlaganje kompleksa metal-ligand u vakuolu što sprječava slobodnu cirkulaciju metalnih iona u citosolu (Sanitá di Toppi i Gabrielli, 1999), a sam proces uključuje ABC prijenosnike (Hall, 2002). Ligandi koji vežu metale su organske kiseline, aminokiseline, peptidi i polipeptidi. Polipetidi koji su uključeni u keliranje i vezanje teških metala su mali polipetidi, bogati cisteinom, koji se nazivaju metalotioneini (MTs) te fitokelatini (PCs) koji su također bogati cisteinskim ostacima, ali se za razliku od MTs sintetiziraju enzimatski (Rauser, 1999). Metalotioneini su prvi otkriveni Cd-vezujući proteini, a otkriveni su u tkivu sisavaca (Cobbett i Goldsbrough, 2002). Prvotno se smatralo kako su PCs ekvivalent MTs u biljkama, ali daljnjim strukturnim analizama dokazano je da biljke sadrže oba metal-vezujuća liganda koji imaju različite neovisne funkcije u detoksifikaciji metala (Cobbett i Goldsbrough, 2002). Supstrat za sintezu PCs je glutation (GSH), a glavni enzim je fitokelatin-sintaza koja se aktivira u prisutnosti teških metala, osobito Cd, Ag, Cu, Hg, Zn, Sn i As (Cobbett, 2000; Cobbett i Goldsbrough 2002).

1.2.3. Oksidacijski stres uzrokovan kadmijem

Prema Hossain-u i suradnicima (2012), toksičnost teških metala očituje se se stimulacijom prekomjernog stvaranja ROS-a i metilglioksala (MG) autooksidacijom i Fentonovom reakcijom ili modifikacijom antioksidacijskog i 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 strukturalne proteine i enzime koji sadrže takve skupine smanjujući njihovu katalitičku aktivnost (Furini, 2012 ; Hall, 2002). Određeni teški metali, npr. Cu i Fe mogu biti toksični zbog sudjelovanja u redoks reakcijama kao što su Fenton-ova i Haber-Weiss-ova reakcija. Suprotno, Cd je nereducirajući metal koji nije sposoban izvršiti reakciju prijenosa elektrona i ne sudjeluje direktno u sintezi ROS-a, ali izaziva oksidacijski stres modifikacijom antioksidacijskog odgovora (Benavides i sur., 2005; Gratão i sur., 2005). Izlaganje Cd uzrokuje brzu akumulaciju peroksida i trošenje glutationa (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 antioksidacijski obrambeni sustav rezultira pojavom oksidacijskog stresa. Oksidacijski stres se definira kao pomak ravnoteže u staničnim oksidacijsko-redukcijskim reakcijama u smjeru oksidacije što u konačnici može dovesti do oštećenja staničnih struktura (Kawanishi i sur., 2001).

1.3. Antioksidacijski enzimi

Prvi proces u obrani stanica od oksidacijskog stresa je sprječavanje njegovog nastanka, drugi predstavljaju detoksifikacijski mehanizmi koji uklanjaju ROS i treći je popravak oštećenih makromolekula. Povećane koncentracije ROS-a aktiviraju antioksidacijske enzime kao što su superoksid-dismutaza (SOD), askorbat-peroksidaza (APX), glutation-peroksidaza (GPX), katalaza (CAT), monodehidroaskorbat-reduktaza (MDAR), i uzrokuju akumulaciju neenzimatskih antioksidanasa kao što su glutation, tokoferol, akorbat, fenoli, flavonoidi i prolini (Ahmad, 2012).

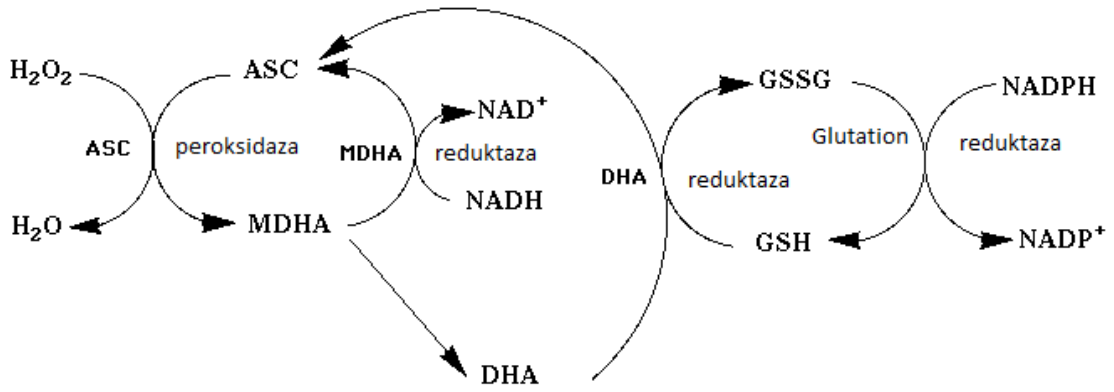
1.3.1. Askorbat-peroksidaza

Askorbat-peroksidaza (APX) je intracelularna peroksidaza koja pripada peroksidazama razreda I koje posjeduju hem skupinu u aktivnom centru (Welinder, 1992). Uloga APX-a je uklanjanje viška H_2O_2, organskih hidroperoksida i lipidnih peroksida u biljnim stanicama prema slijedećoj jednadžbi:

$$H_2O_2 + 2 \text{ askorbat (AA)} \longrightarrow 2H_2O + 2 \text{ monodehidroaskorbat (MDHA)}$$

Porodica APX-a sastoji se od 5 izoformi, koje se razlikuju u slijedu aminokiselina i smještaju unutar stanice (citosolna, mitohondrijska, peroksisomna i kloroplastna). Kloroplaste izoforme mogu biti stromalne (topljive) i tilakoidne (tAPX) (Das i Raychaodhury, 2014). Barem jedna polovica APX-a u kloroplastima je tAPX, ali je udio tilakoidnih i stromalnih izoformi promjenjiv ovisno o vrsti biljke i starosti lista. APX za razliku od enzima katalaze ima velik afinitet za H_2O_2 (Asada, 1999).

APX detoksificira H_2O_2 kroz askorbat-glutationski ciklus (AsA-GSH) (Slika 2) pri čemu APX koristi askorbat kao elektron donor (del Río i sur., 2006). U AsA-GSH ciklusu, APX katalizira redukciju H_2O_2 u H_2O, oksidirajući askorbat (AA) u monodehidroaskorbat (MDA). Nastali MDA može se direktno reducirati natrag u AsA-GSH ciklus enzimom monodehidroaskorbat-reduktaza (MDHAR) ili se prvo konvertira u dehidroaskorbat (DHA), a zatim reducira dehidroaskorbat-reduktazom (Ahmad i Prasad, 2012). AsA-GSH je važan obrambeni mehanizam koji ima važnu ulogu u sprečavanju oksidacijskog stresa uslijed štetnog djelovanja Cd (Cuypers i sur., 2010). Brojna istraživanja pokazala su promjene aktivnosti APX-a tijekom izlaganja Cd koja uključuju povećanje ili smanjenje aktivnosti te bifazni odgovor kod kojeg se aktivnost prvo povećava, a zatim smanjuje pri čemu sam odgovor ovisi o biljnoj vrsti, organu i koncentraciji i dužini izlaganja Cd (Tablica 1).



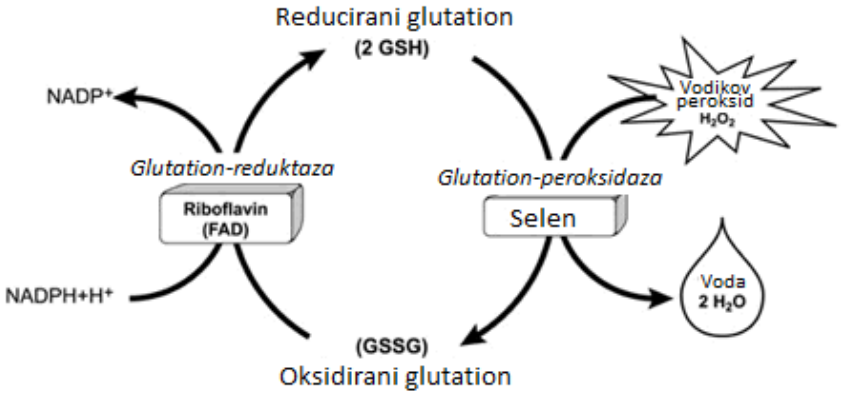
Slika 2. Shema askorbat - glutationskog ciklusa u biljkama, kojeg nalazimo u citosolu, kloroplastima i mitohondrijama i peroksisomima. Glavnu ulogu imaju enzimi APX i GR: glutation-reduktaza. ASC: askorbat; GSH: reducirani glutation; GSSG: oksidirani glutation; DHA: dehidroaskorbat; MDHA: monodehidroaskorbat (preuzeto i modificirano prema Anjum i sur., 2010).

1.3.2. Glutation-reduktaza

Glutation-reduktaza (GR) je flavoenzim iz skupine oksidoreduktaza. Enzim je funkcionalan jedino kao homodimer koji pomaže u održavanju reducirane sredine unutar stanice održavajući visok razinu reduciranog glutationa (GSH), a nisku oksidiranog (GSSG) (Slika 3).

$$GSSG + NADPH \longrightarrow 2\,GSH + NADP^{+} + H^{+}$$

Različite izoforme GR pronađene su u citosolu, matriksu mitohondrija i kloroplastima (Deponte, 2013; Romero-Puertas i sur., 2007).). Kloroplastni izoenzimi odgovorni su za gotovo 80% aktivnosti GR-a u listovima čime se osigurava visok omjer GSH/GSSG, neophodan u zaštiti fotosintetskih enzima od oksidacijskih oštećenja (Halliwell i Foyer, 1978). GR osigurava dovoljnu količinu reduciranog GSH za normalno funkcioniranje askorbat-glutationskog ciklusa (Foyer i Halliwell, 1976). Cd smanjuje količinu GSH i veže se za tiolne skupine GR-a (Creissen i Mullineaux, 1995). Utjecaj Cd na aktivnost GR prvenstveno ovisi i biljnoj vrsti, organu i dužini izlaganja i koncentraciji Cd što pokazuju i brojna istraživanja (Tablica 1).



Slika 3. Molekula vodikovog peroksida reducira se pomoću dvije molekule vode, dok se dvije molekule glutationa (GSH) oksidiraju u reakciji kataliziranoj selenoenzimom, glutation-peroksidazom (GPX). Oksidirani glutation (GSSG) se zatim reducira FAD ovisnim enzimom, glutation-reduktazom (GR) i vraća u reducirani oblik (GSH) (preuzeto i modificirano prema Beck i sur., 2003).

1.3.3. Katalaza

Katalaza (CAT) je enzim koji sadrži hem skupinu i služi za zaštitu stanica od toksičnih učinaka vodikovog peroksida, katalizirajući njegovu razgradnju u molekularni kisik i vodu bez nastajanja slobodnih radikala (Mittler, 2002):

$$2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$$

U usporedbi s ostalim peroksidazama ima znatno manji afinitet za H_2O_2 jer je za učinkovito odvijanje reakcija potrebno simultano vezanje dvije molekule H_2O_2 u aktivno mjesto enzima (Willekens i sur., 1995). U biljnoj stanici CAT je prisutna prvenstveno u peroksisomima i glioksisomima gdje održava redoks ravnotežu. Peroksisomi su izvor stvaranja H_2O_2 u procesu beta-oksidacije masnih kiselina i fotorespiracije (Das i Roychoudhury, 2014; Corpas, 2001). Prisutnost CAT u kloroplastima još nije utvrđena, a H_2O_2 nastao u kloroplastima uklanja se putem askorbat-glutation ciklusa (Foyer i Noctor, 2003). Kadmij različito utječe na aktivnost CAT, što je ovisno o koncentraciji kojoj je biljka izložena i vrsti biljke i vrsti biljnog organa (Tablica 1).

1.3.4. Glutation S-transferaza

Glutation S-transferaze (GST) su velika porodica enzima koja katalizira konjugaciju elektrofilnih ksenobiotika s tripeptidom glutationom (Dixon i sur., 2010). GST katalizira uklanjanje lipidnih peroksida, metilglioksala i herbicida pomoću GSH ili konjugacijom GSH sa širokim krugom elektrofilnih metabolita ksenobiotika. Nastali konjugati se kasnije transportiraju u vakuolu (Coleman i sur., 1997; Moons, 2005). Zajedno s GR, GPX i SOD stvara uspješan sustav za zaštitu biljke od štetnog djelovanja ROS-a tijekom stresnih stanja u biljci (Mittler, 2002).

Primarno se nalaze u citosolu, a osim citosolnih izoformi, pronađene su u kloroplastima, peroksisomima i plazma membrani (Sheehan i sur., 2001; Dixon i sur., 2009). Skoro sve poznate citosolne GST pojavljuju se kao homo- ili heterodimeri s podjedinicama molekulske mase od 23-29 kDa. Svaka podjedinica posjeduje GSH-vezno mjesto i susjedno elektrofilno vezno mjesto za supstrat (Anjum i sur., 2012). Stresna stanja uzrokovana različitim okolišnim čimbenicima na različite načine induciraju ekspresiju GST-a (Shahrtash, 2013). Tretman kadmijem uglavnom povećava aktivnosti GST što je utvrđeno kod više biljnih vrsta (Dixit i sur., 2001, Ianneli i sur., 2002; Tablica 1).

Tablica 1. Utjecaj Cd na antioksidacijske enzime kod različitih biljnih vrsta.

Vrsta biljke	metal	koncentracija	organ	enzim	izvor
Phaseolus vulgaris	Cd	5 μM	korijen	APX ↑, CAT↓	Chaoui i sur., 1997
Phaseolus vulgaris	Cd	5 μM	list	APX↑, GR↓ CAT↓	Chaoui i sur., 1997
Helianthus annuus	Cd	50 μM	list	APX↑ GR↑	pi i sur., 1999
Helianthus annuus	Cd	500 μM	list	APX↓	Gallego i sur., 1999
Nicotiana tabacum	Cd	5000 μM	kultura BY2 stanica	APX↑, CAT↓	Piqueras i sur., 1999
Helianthus annuus	Cd	500 μM	list	GR↓, CAT↑	Patra i Panda, 1998
Hordeum vulgare	Cd	50 μM	list	CAT↑	Gallego i sur.,1999
Arabidopsis thaliana	Cd	5, 10, 20 μM	list	APX ↑↓, GR ↓ , CAT=	Smeets i sur., 2008
Brassica juncea	Cd	10, 25, 50 μM	list	APX ↓, GR =, CAT ↑,	Nouairi i sur., 2009)
Brassica juncea	Cd	10, 30, 50, 100 μM	list	APX ↑↓, GR ↑↓, CAT ↓,	Markovska i sur., 2009
Brassica napus	Cd	10, 25, 50 μM	list	APX ↓, GPOD ↑, CAT ↓, GR ↑↓	Nouairi i sur., 2009
Matricaria				GR ↑, CAT ↑	Kovácik i

chamomilla	Cd	3, 60, 120 μM	korijen		Backor, 2008
Matricaria chamomilla	Cd	3, 60, 120 μM	list	GR ↑, CAT ↑	Kovácik i Backor, 2008
Typha angustifolia	Cd	1 mM	list	APX=, CAT =	Bah i sur., 2011
Zea mays	Cd	300, 600, 900 μM	list	APX↑↓, GR ↑↓	Ekmekçi i sur., 2008
Glycine max	Cd	50 μM	korijen	APX↑, GR ↑, CAT =	Balestrasse i sur., 2001
Glycine max	Cd	100 μM	korijen	APX↑, GR ↓, CAT ↓	Balestrasse i sur., 2001
Triticum aestivum	Cd	100 μM	korijen	CAT ↓,	Dandan i sur., 2011
Arachis hypogaea	Cd	25,50,100 μM	list	APX↑, GR ↑, CAT ↑	Dinakar i sur., 2008
Arachis hypogaea	Cd	25,50,100 μM	korijen	APX↑, GR ↑, CAT ↑	Dinakar i sur., 2008
Zea mays	Cd	0.3 mM – 0.6 mM	korijen	APX↑, GR ↑	Ekmekçi i sur., 2008
Zea mays	Cd	0.6 mM- 0.9 mM	korijen	APX ↓, GR ↑↓	Ekmekçi i sur., 2008
Hordeum vulgare	Cd	1mM	korijen	APX=, GST↑	Tamás i sur., 2008
Groenlandia densa	Cd	0.05-0.5 mg L^{-1}	cijela biljka	APX↑, GR ↑, CAT ↑, GST↑	Yilmaz i Parlak, 2011
Groenlandia densa	Cd	5-20 mg L^{-1}	cijela biljka	APX=, GR=↓, CAT ↑↓, GST↑↓	Yilmaz i Parlak, 2011

1.4. Utjecaj makro i mikronutrijenata na toksično djelovanje kadmija

Za rast i razvoj biljaka pod optimalnim ili stresnim uvjetima, potrebna je ravnoteža nutrijenata. Nedostatak minerala ili njihova neravnoteža, mogu dovesti do pretjerane toksičnosti Cd što zatim utječe na primanje i distribuciju određenih drugih elemenata u biljci. Kako bi spriječile negativni utjecaj Cd, biljke sprječavaju akumulaciju Cd ili pojačavaju mehanizme otpornosti na povišenu koncentraciju Cd. Velika toksičnost Cd može se smanjiti optimalnim količinama drugih nutrijenata, koji su u mogućnosti smanjiti akumulaciju teških metala i/ili inducirati određene fiziološke procese u biljci (Benavides i sur., 2005). Minerali i nutrijenti koji induciraju određene fiziološke procese za ublažavanje toksičnog djelovanja Cd prikazani su u Tablici 2 i 3.

Dodatak dušika (N) biljkama izloženim štetnom djelovanju Cd dovodi do povećanja otpornosti na Cd i povećavanja fotosintetske učinkovitosti biljke. Pankovic i sur. (2000) su dokazali da optimalno razina N (75mM) smanjuje inhibitorni utjecaj Cd na fotosintezu kod

suncokreta povećavajući sadržaj enzima Rubisco-a ili povećavajući sadržaj topljivih proteina. Smanjenje toksičnosti Cd ovisi i o izvoru N. Tako primjena NH_4^+-N smanjuje koncentraciju Cd u listovima riže izložene Cd, dok NO_3^--N povećava količinu Cd, te se zaključuje da između i NH_4^+-N i Cd antagonistički odnos, a između NO_3^--N i Cd sinergistički odnos (Jalloh i sur., 2009). Tijekom izlaganja Cd biljke sintetiziraju niz metabolita kao što su prolin, GSH i fitokelatini koji sadrže N, a imaju značajnu ulogu u otpornosti biljaka na stres uzrokovan Cd (Sharma i Dietz, 2006). Fosfor (P) neutralizira toksični učinak Cd povećanjem rasta i prinosa biljaka (Sarwar i sur., 2010). Dodavanje fosfatnih gnojiva smanjuje mobilnost Cd u tlu mijenjajući mobilni u imobilni, Cd-fosfat oblik. Drugi mehanizam djelovanja P na smanjenje stresa uslijed djelovanja Cd je povećanje sadržaja GSH u biljci i sprečavanjem oštećenja biomembrana (Wang i sur., 2009). Poboljšanje ishrane biljaka pomoću kalija (K) sprečava oksidacijsko oštećenje stanica smanjujući stvaranje ROS-a tijekom fotosinteze i djelovanjem NADPH-oksidaze (Shen i sur., 2000).

Sumpor (S) povećava sposobnost biljke za preživljavanjem u okolišu zagađenom povišenim koncentracijama Cd (Wangeline i sur., 2004). Istraživanja pokazuju kako ATP-sulfurilaza i serin acil-transferaze imaju važnu ulogu u smanjenju akumulacije Cd i povećavanju otpornosti biljaka na stres uzrokovan Cd (Khan i sur., 2007; Wangeline i sur., 2004; Howarth i sur., 2003). Anjum i suradnici (2008) utvrdili su da dodatak 40 mg Skg^{-1} u tlo rezultira smanjenim toksičnim djelovanjem Cd u gorušici zbog povećanja sadržaja AsA i GSH u listu. Nocito i suradnici (2006) su također dokazali da S poboljšava obrambeni odgovor na štetno djelovanje Cd jer pomaže u sintezi GSH i fitokelatina budući da je induciranje fitokelatina je jedan od glavnih načina detoksifikacije Cd (Zhang i sur., 2010). Kalcij (Ca) smanjuje toksičnost Cd smanjujući njegov unos u biljku, budući da za primanje u biljku koriste iste transportne proteine, dok je primarna uloga magnezija (Mg) poboljšanje antioksidacijskog statusa biljke (Nazar i sur., 2012).

Tablica 2. Utjecaj makronutrijenata na smanjenje stresa uzrokovanog Cd.

Nutrijent	Vrsta biljke	Fiziološki odgovor na Cd	Izvor
N	*Helianthus annuus*	Aktivira Rubisco	Pankovic i sur., 2000
	Triticum aestivum	Smanjuje akumulaciju Cd	Landberg i Greger, 2003
P	*Trema micrantha*	Smanjuje koncentraciju Cd	Soares i sur., 2007

	Elodea nuttallii	Povećava aktivnost peroksidaze i katalaze	Wang i sur., 2009
K	*Brassica juncea*	Inhibira unos Cd iz hranidbenog medija	Umar i sur., 2008
S	*Oryza sativa*	Detoksificira Cd potičući stvaranje Cd-vezujućih proteina	Hassan i sur., 2006
	Triticum aestivum	Povećava aktivnost ATP- sulfurilaze-S	Khan i sur., 2007
	Brassica juncea	Povećava količinu GSH	Khan i sur., 2009; Anjum i sur., 2008
Ca	*Arabidopsis thaliana*	Smanjuje sadržaj Cd	Suzuki, 2005
	Trifolium repens	Smanjuje akumulaciju Cd	Wang i Song, 2009
Mg	*Oryza sativa*	Smanjuje ekspresiju gena uključenih u prijenos Cd	Chou i sur., 2011

Cink (Zn) se prenosi pomoću ZIP skupine metalnih prijenosnika, za koje se smatra da su uključeni u transport Cd iz tla u stanice korijena, kao i transport iz korijena u vršne dijelove biljke (Krämer i sur., 2007). Dodatak Zn utječe na smanjenje stresa uslijed djelovanja Cd kod raznih biljnih vrsta (Tablica 3). Željezo (Fe) ograničava unos i translokaciju Cd u biljci i povećava rast biljke, akumulaciju fotosintetskih pigmenata i intenzivira odvijanje procesa fotosinteze (Zornoza i sur., 2010). Selen stvara komplekse s metalima i smanjuje dostupnost Cd biljkama, stoga njegova primjena smanjuje štetan utjecaj Cd na ultrastrukturu i funkciju kloroplasta, djelujući na aktivnost antioksidacijksih enzima (Filek i sur., 2008). Kod pšenice i repe koje su bile izložene stresu zbog djelovanja Cd, Se je pozitivno utjecao na promjene u unosu nutrijenata, smanjio peroksidaciju lipida i pozitivno djelovao na stabilnost stanične membrane (Zembala i sur., 2010).

Tablica 3. Utjecaj mikronutrijenata na smanjenje stresa uzrokovanog Cd.

Nutrijent	**Vrsta biljke**	**Fiziološki odgovor na kadmij**	**Izvor**
Fe	*Brassica juncea*	Fe stabilizira proteine i osiguarava stabilnost kloroplasta pod Cd stresom	Qureshi i sur., 2010
	Lupinus albus	Štiti fotosintetska tkiva	Zornoza i sur., 2010

Zn	*Triticum durum*	Dodatak Zn tlu smanjuje koncentraciju Cd u usjevima	Choudhary i sur., 1995
	Oryza sativa	Inhibira unos Cd	Nwugo i Huerta, 2008
	Brassica chinensis	Smanjuje unos Cd i prijenos od korijena do izdanaka	Song i sur., 2009
	Arachis hypogaea	Smanjuje akumuliranje Cd u izdanku i potiče rad antioksidativnih enzima	Shi i sur., 2010
Se	*Brassica napus*	Inhibira akumuliranje Cd u stanicama i aktivira antioksidativni sustav	Filek i sur., 2008
	Brassica oleracea	Smanjuje unos Cd u plodove i listove, ali povećava unos Cd u korijen	Pedrero i sur., 2008
	Gracilaria dura	Smanjuje unos Cd i razinu MDA i ROS, a povećava količinu klorofila i karotenoida	Kumar i sur., 2012

1.5. Cilj rada

Ciljevi ovoga rada su:

- utvrditi kako različite koncentracije kadmija utječu na antioksidacijski sustav kod dvije različite sorte ozime pšenice, te istražiti postoji li razlika u antioksidacijskom odgovoru u izdanku i korijenu.
- utvrditi kako obogaćivanje sjemenki selenom utječe na antioksidacijski odgovor klijanaca dviju sorti pšenice tretiranih različitim koncentracijama kadmija.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Materijali

U istraživanju su korištene dvije sorte ozime pšenice (*Triticum aestivum*), Divana i Srpanjka. Uz kontrolno sjeme navedenih sorti, korištene su i sjemenke obogaćene selenom u procesu biofortifikacije. Sve analize obavljene su u biokemijskom laboratoriju Odjela za biologiju, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

2.1.1. Priprema i sterilizacija sjemenki

Za sterilizaciju korištena je otopina izosana (10g/L) i 96 % etanol. U otopinu izosana dodana je i otopina Tweena (1 μL/100mL). Sjemenke Divane i Srpanjke (kontrola i sjemenke obogaćene Se) postavljene su u 4 različite posude i ispirane 96% etanolom. Nakon ispiranja etanolom tretirane su 8 min otopinom izosana. Nakon toga su temeljito isprane u destiliranoj vodi i ostavljene u sterilnoj vodi 24 sata kako bi došlo do procesa bubrenja. Nakon 24 sata sjemenke su stavljene na klijanje u sterilne plastične Petrijeve zdjelice i to 50 sjemenki po uzorku, u 4 ponavljanja.

Osim kontrolnih uzoraka koji su tretirani vodom, sjemenke su tretirane različitim koncentracijama kadmija (10, 25, 50 i 100 μM). Tijekom samoga naklijavanja, sjemenke su zalijevane s 15 ml otopine, te postavljene u inkubator na klijanje na temperaturi od 25 ºC. Peti dan klijanja, klijanci su zalijevani s još 10 ml otopine. Nakon 7 dana određen je % klijavosti te je mjerena ukupna masa klijanaca te su pripremljeni enzimski ekstrakti.

2.2. Metode rada

Tijekom istraživanja određeno je:

- Klijavost sjemenki
- Prosječna ukupna masa klijanaca
- Aktivnost enzima glutation S-transferaze
- Aktivnost enzima glutation-reduktaze
- Aktivnost enzima katalaze
- Aktivnost enzima askorbat-peroksidaze

2.2.1. Priprema enzimskih ekstrakata

Dijelovi izdanka i korijena različitih sorti pšenice usitnjavani su u tarioniku pomoću tekućeg dušika uz dodatak polivinilpolipirolidina (PVP). Iz usitnjenog tkiva (200 mg), enzimi su ekstrahirani uz pomoć 1 mL hladnog ekstrakcijskog pufera (100 mM KH_2PO_4, 100 mM K_2HPO_4, 1 mM EDTA, pH 7.0) 15 minuta na ledu. Homogenati su zatim centrifugirani 15 minuta na 20 000 g i +4 ºC. Dobiveni supernatanti smrznuti su u tekućem dušiku i korišteni za spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima askorbat-peroksidaze (APX), glutation-reduktaze (GR), katalaze (CAT) i glutation S-transferaze (GST).

2.2.2. Određivanje aktivnosti enzima askorbat-peroksidaze (EC 1.11.1.11)

Aktivnost enzima askorbat-peroksidaze mjerena je prema metodi koju su opisali Nakano i Asada (1981). Reakcijska smjesa sastojala se od 50 mM kalij-fosfatnog pufera (pH =7.0), 0,1 mM EDTA, 50 mM askorbinske kiseline i 12 mM H_2O_2. Vodikov peroksid (10 µL) dodan je u reakcijsku smjesu neposredno prije mjerenja. U 820 µL reakcijske smjese dodano je 180 µL enzimskog ekstrakta. Enzimska aktivnost mjerena je spektrofotometrijski pri valnoj duljini 290 nm u UV-kiveti svakih 10 sekundi tijekom 2 minute. Ukupna aktivnost askorbat-peroksidaze (APX-u) izražena je u enzimskim jedinicama (U) kao količina enzima potrebna za razgradnju 1 µmola askorbata u minuti pri 25 ºC i pH 7.5 po g svježe tvari.

2.2.3. Određivanje aktivnosti enzima glutation-reduktaze (EC 1.6.4.2)

Aktivnost glutation-reduktaze u enzimskim ekstraktima određena je prema metodi koju su opisali Halliwel i Foyer (1978). Metoda se temelji na principu redukcije oksidiranog oblika glutationa (GSSG) u prisutnosti GR uz NADPH kao reducens. U UV-kivetu dodano je 400 µL 100 mM kalij-fosfatnog pufera (pH 7.5) koji je sadržavao 1 mM otopinu EDTA, 500 µL 2 mM otopine GSSG, 50 µL enzimskog ekstrakta te 50 µL 2 mM otopine NADPH. Smanjenje apsorbancije, uslijed oksidacije NADPH, praćeno je pri valnoj duljini od 340 nm svakih 10 sekundi tijekom 2 minute. Ukupna aktivnost GR izražena je u enzimskim jedinicama (U) koje predstavljaju količinu enzima koji katalizira oksidaciju 1 µmola NADPH u minuti pri 25 ºC i pH 7.5 po g svježe tvari.

2.2.4. Određivanje aktivnosti enzima katalaze (EC 1.11.16)

Aktivnost katalaze je mjerena metodom po Aebi-u (1984). Reakcijski pufer za mjerenje aktivnosti katalaze sastojao se od 50 mM kalij-fosfatnog pufera (pH=7,0) i 10 mM H_2O_2. Razgradnja H_2O_2 katalazom uzrokuje pad apsorbancije. Reakcija je započeta dodavanjem 50 µl uzorka u 1950 µl reakcijske smjese. Pad apsorbancije uslijed razgradnje H_2O_2 praćen je svakih 10 sekundi tijekom 2 minute pri valnoj duljini od 240 nm u UV-kiveti. Ukupna aktivnost CAT izražena je u enzimskim jedinicama (U) koje predstavljaju količinu enzima koja katalizira razgradnju 1 µmola H_2O_2 u minuti pri 25 ºC i pH 7.5 po g svježe tvari.

2.2.5. Određivanje aktivnosti enzima glutation S-transferaze (EC 2.5.1.18)

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

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

2.3. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka obavljena je softverskim paketima Statistica i SAS for Windows 9.1.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Provedena je analiza varijance (ANOVA) uz test najmanje značajne razlike (LSD).

3. REZULTATI

3.1. Klijavosti i mase klijanaca

3.1.1. Utjecaj obogaćivanja sjemenki selenom na klijavost različitih sorti ozime pšenice tretiranih otopinama različitih koncentracija kadmija

Ukupni postotak klijavosti sjemenki sorte Divana iznosio je 89%, dok je klijavost sjemenki obogaćenih selenom iste sorte iznosila 90%. Kod tretmana sa otopinama Cd od 10, 25, 50 i 100 μM ukupni postotak klijavosti kreće se od 90-94%, dok klijavost sjemenki obogaćenih Se iznosi od 91-97%.

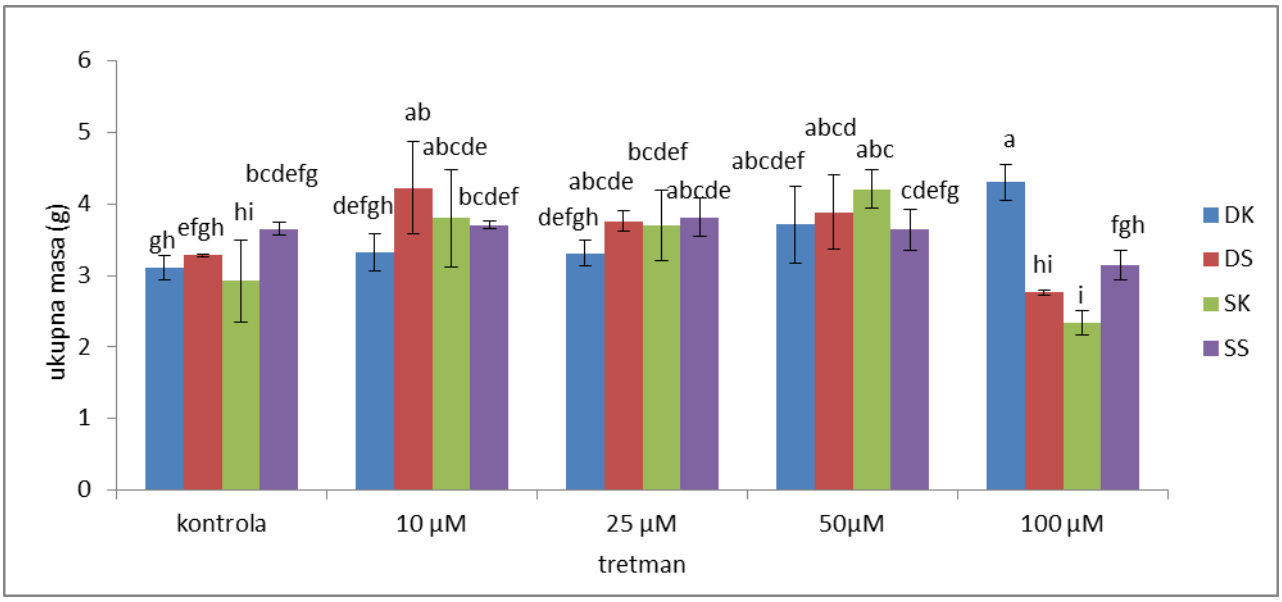
Ukupni postotak klijavosti sjemenki sorte Srpanjka iznosi 91%, dok ukupni postotak klijavosti sjemenki Srpanjke obogaćene Se iznosi 87%. Kod tretmana sa otopinama Cd od 10, 25, 50 i 100 μM ukupni postotak klijavosti kreće se od 89-98%, dok klijavost sjemenki obogaćenih Se iznosi od 92-96%.

Rezultati za ukupnu klijavost nisu pokazivali statistički značajne razlike.

3.1.2. Utjecaj obogaćivanja sjemenki selena na ukupnu masu klijanaca različitih sorti ozime pšenice tretiranih otopinama različitih koncentracija kadmija

Tretman s 50 i 100 μM otopinom Cd uzrokovao je značajno povećanje ukupne mase klijanaca sorte Divana od 19%, odnosno 38% u odnosu na kontrolu, dok je kod klijanaca iste sorte obogaćenih Se najveće povećanje ukupne mase od 29% u odnosu na kontrolu zabilježeno pri tretmanu s najnižom koncentracijom Cd. Pri najvišoj koncentraciji Cd je ukupna masa klijanaca sorte Divana značajno veća kod kontrolnih biljaka u odnosu na one obogaćene Se (Slika 4).

Kod sorte Srpanjka povećanje ukupne mase klijanaca utvrđeno je pri tretmanu koncentracija 10, 25 i 50 μM Cd, dok klijanci obogaćeni Se iste sorte nisu pokazali statistički značajnu razliku ukupne mase klijanaca u odnosu na kontrolu (Slika 4). Pri najvećoj koncentraciji Cd masa klijanaca obogaćenih Se sorte Srpanjka bila je značajno veća u odnosu na klijance kontrolnih biljaka iste sorte (Slika 4).



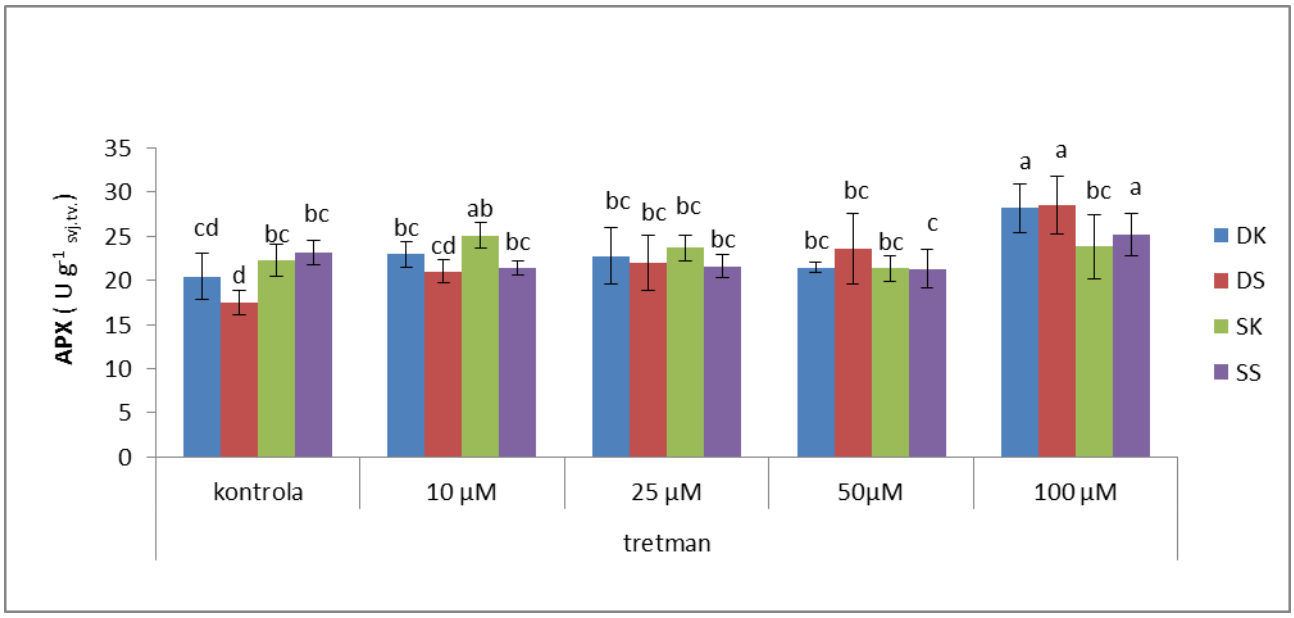
Slika 4. Utjecaj obogaćivanja sjemenki Se na ukupnu masu klijanaca različitih sorti ozime pšenice tretiranih otopinama različitih koncentracija Cd. DK-kontrolni klijanci sorte Divana, DS-klijanci sorte Divana obogaćeni Se; SK- kontrolni klijanci sorte Srpanjka, SS- klijanci sorte Srpanjka obogaćeni Se. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Prosječne vrijednosti označene su istim slovom i ne razlikuju se prema LSD testu; $p<0.05$.

3.2. Ukupna aktivnost enzima askorbat-peroksidaze

3.2.1 Utjecaj obogaćivanja sjemenki selena na aktivnost enzima askorbat-peroksidaze u izdanku klijanaca različitih sorti ozime pšenice tretiranih otopinama različitih koncentracija kadmija

Tretman manjim koncentracijama Cd kod sorte Divana nije značajno utjecao na aktivnost enzima APX u izdanku klijanaca, dok je tretman 100 µM otopinom Cd uzrokovao značajno povećanje aktivnosti enzima od 38% u odnosu na kontrolne biljke. Kod klijanaca obogaćenih Se pri tretmanu s različitim koncentracijama Cd aktivnost enzima nije se značajno razlikovala od kontrolnih biljaka pri istim kncentracijama Cd (Slika 5).

Kod sorte Srpanjka tretman svim koncentracijama Cd nije značajno utjecao na aktivnost enzima APX u izdanku klijanaca u odnosu na kontrolne biljke, dok je kod klijanaca obogaćenih Se jedino tretman s 100 µM Cd značajno povećao aktivnost APX u izdanku klijanaca u odnosu na kontrolne biljke pri istoj koncentraciji Cd (Slika 5).

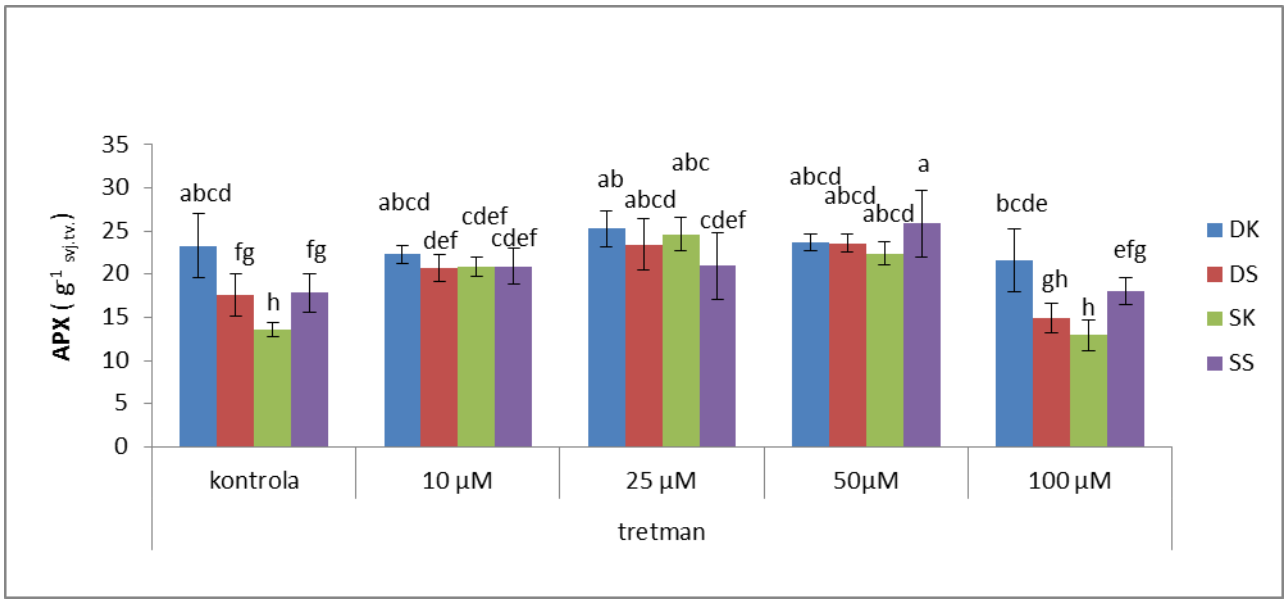


Slika 5. Utjecaj obogaćivanja sjemenki Se na aktivnost enzima APX u izdancima klijanaca različitih sorti ozime pšenice tretiranih otopinama različitih koncentracija Cd. DK-kontrolni klijanci sorte Divana, DS-klijanci sorte Divana obogaćeni Se; SK- kontrolni klijanci sorte Srpanjka, SS- klijanci sorte Srpanjka obogaćeni Se. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Prosječne vrijednosti označene su istim slovom i ne razlikuju se prema LSD testu; $p<0.05$.

3.2.2. Utjecaj obogaćivanja sjemenki selena na aktivnost enzima askorbat-peroksidaze u korijenu klijanaca različitih sorti ozime pšenice tretiranih otopinama različitih koncentracija kadmija

Tretman svim koncentracijama Cd kod sorte Divana nije značajno utjecao na aktivnost enzima APX u korijenu klijanaca, dok je pri tretmanima s 100 µM Cd aktivnost enzima APX u korijenu klijanaca obogaćenih Se bila manja nego kod kontrolnih biljaka pri istoj koncentraciji Cd (Slika 6).

Kod sorte Srpanjka povećanje aktivnosti enzima APX u korijenu klijanaca utvrđeno je kod tretmana otopinama Cd koncentracija 10, 25 i 50 µM i to za 54%, 81% i 65% u odnosu na kontrolu, dok je u korijenu klijanaca iste sorte obogaćenih Se povećanje aktivnosti APX u odnosu na kontrolne biljke utvrđeno pri tretmanu s 50 i 100 µM Cd (Slika 6).



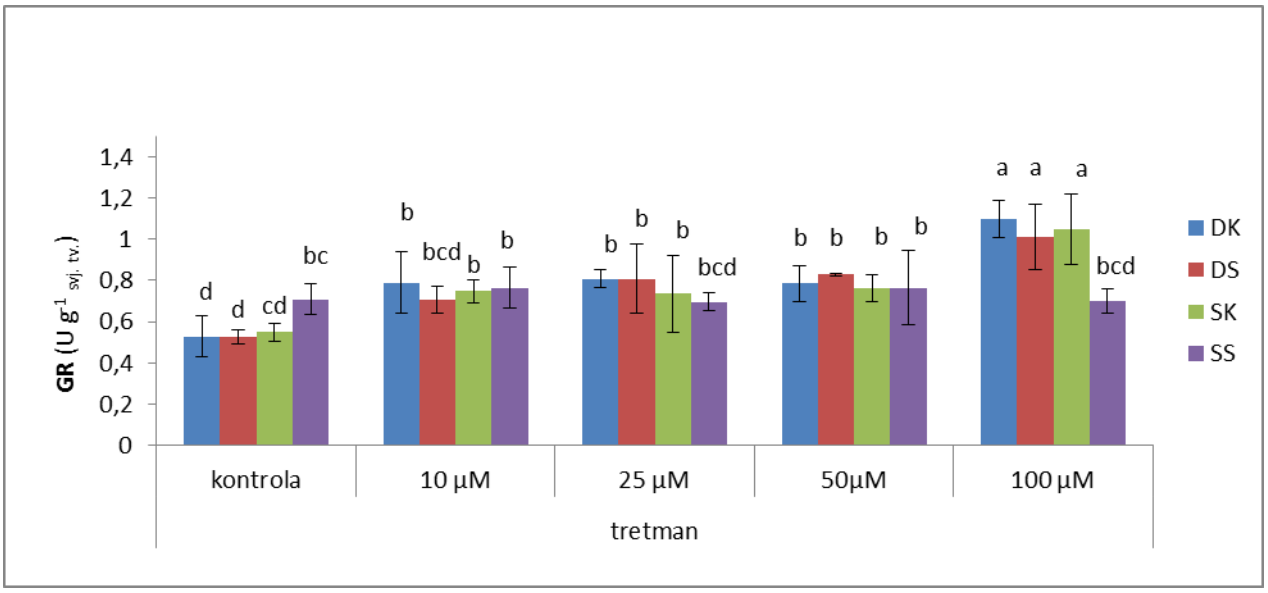
Slika 6. Utjecaj obogaćivanja sjemenki Se na aktivnost enzima APX u korijenu klijanaca različitih sorti ozime pšenice tretiranih otopinama različitih koncentracija Cd. DK-kontrolni klijanci sorte Divana, DS-klijanci sorte Divana obogaćeni Se; SK- kontrolni klijanci sorte Srpanjka, SS- klijanci sorte Srpanjka obogaćeni Se. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Prosječne vrijednosti označene su istim slovom i ne razlikuju se prema LSD testu; $p<0.05$

3.3. Ukupna aktivnost enzima glutation-reduktaze

3.3.1. Utjecaj obogaćivanja sjemenki selena na aktivnost enzima glutation-reduktaze u izdanku klijanaca različitih sorti ozime pšenice tretiranih otopinama različitih koncentracija kadmija

U izdancima klijanaca sorte Divana značajno povećanje aktivnosti enzima GR u zabilježeno je pri svim koncentracijama Cd pri čemu je najveće povećanje aktivnosti enzima GR u izdancima utvrđeno kod tretmana 100 µM Cd i iznosi 108%. Se nije značajno utjecao na aktivnost GR reduktaze u izdancima sorte Divana tretiranim Cd (Slika 7).

Kod sorte Srpanjka također su svi tretmani Cd uzrokovali povećanje aktivnosti GR u izdancima klijanaca u odnosu na kontrolu. Selen nije uzrokovao značajne promjene u aktivnosti GR, osim pri najvećoj koncentraciji Cd kada je aktivnost GR bila manja u izdancima obogaćenim Se od kontrolnih biljaka pri istoj koncentraciji Cd (Slika 7).

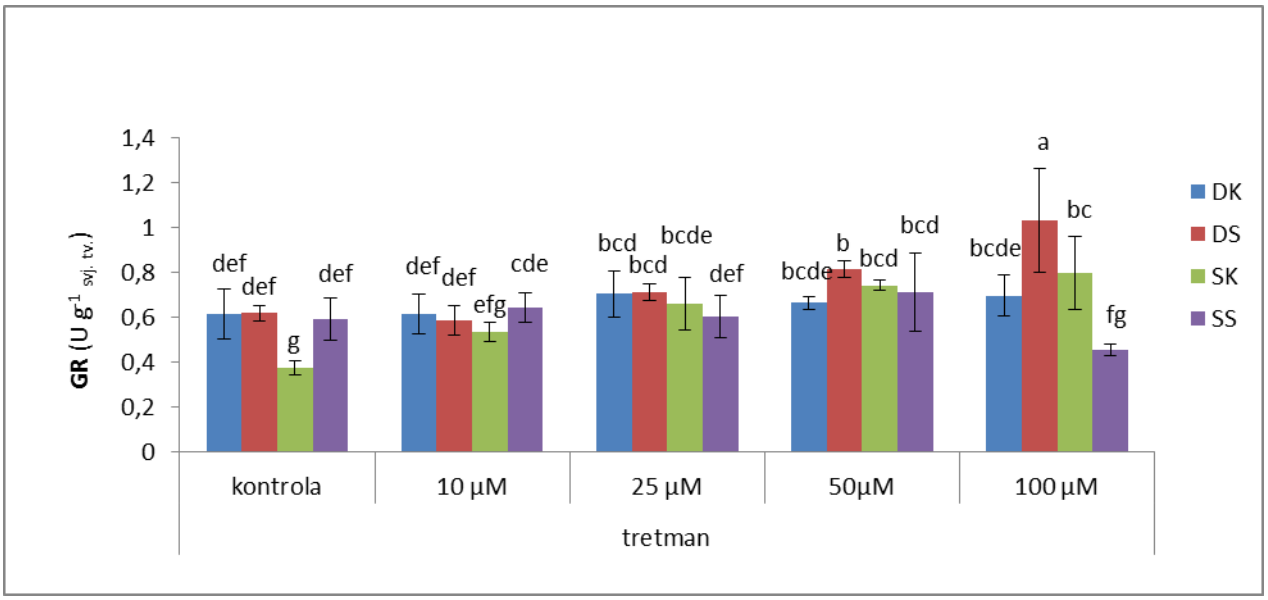


Slika 7. Utjecaj obogaćivanja sjemenki Se na aktivnost enzima GR u izdanku klijanaca različitih sorti ozime pšenice tretiranih otopinama različitih koncentracija Cd. DK-kontrolni klijanci sorte Divana, DS-klijanci sorte Divana obogaćeni Se; SK- kontrolni klijanci sorte Srpanjka, SS- klijanci sorte Srpanjka obogaćeni Se. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Prosječne vrijednosti označene su istim slovom i ne razlikuju se prema LSD testu; $p<0.05$.

3.3.2. Utjecaj obogaćivanja sjemenki selena na aktivnost enzima glutation-reduktaza u korijenu klijanaca različitih sorti ozime pšenice tretiranih otopinama različitih koncentracija kadmija

Tretmani različitim koncentracijama Cd nisu značajno utjecali na aktivnost enzima GR u korijenu klijanaca sorte Divana, dok je kod klijanaca obogaćenih Se utvrđeno značajno povećanje aktivnosti u odnosu na kontrolne biljke pri najvećoj koncentraciji Cd (Slika 8).

Kod sorte Srpanjka utvrđeno je povećanje aktivnosti enzima GR u korijenu klijanaca kod tretmana s koncentracijama 25, 50 i 100 µM Cd koje iznosi 76%, 98%, odnosno 113% u odnosu na kontrolu, dok kod klijanaca obogaćenih Se značajno smanjenje aktivnosti GR u odnosu na kontrolu utvrđeno kod tretmana 100 µM Cd (Slika 8).



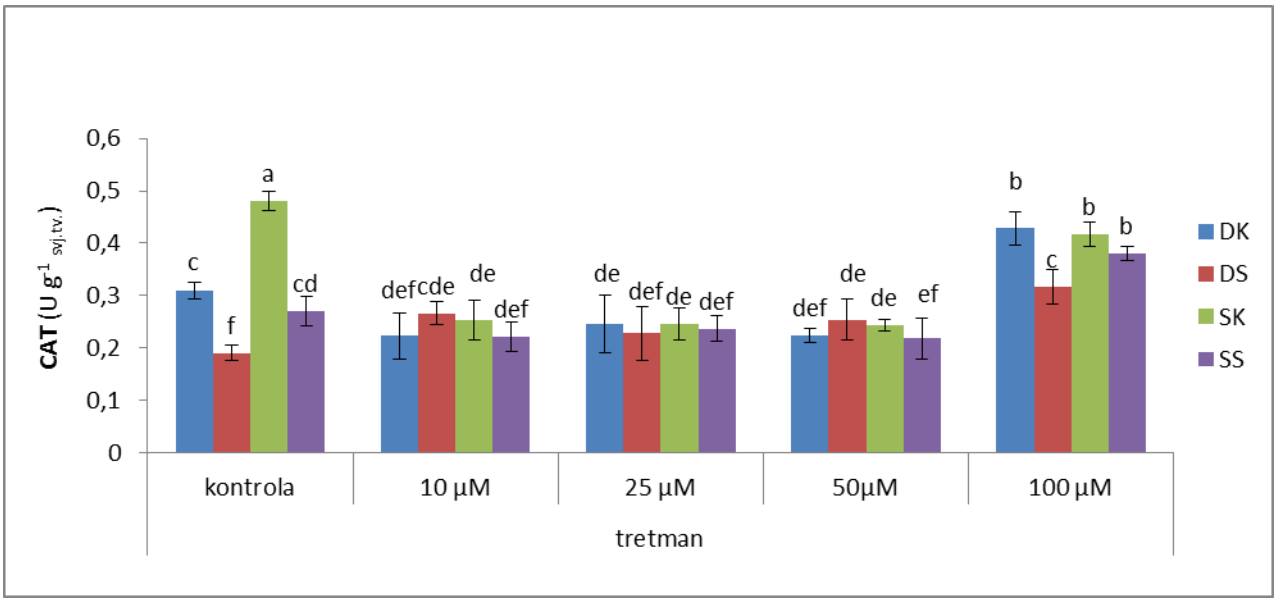
Slika 8. Utjecaj obogaćivanja sjemenki Se na aktivnost enzima GR u korijenu klijanaca različitih sorti ozime pšenice tretiranih otopinama različitih koncentracija Cd. DK-kontrolni klijanci sorte Divana, DS-klijanci sorte Divana obogaćeni Se; SK- kontrolni klijanci sorte Srpanjka, SS- klijanci sorte Srpanjka obogaćeni Se. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Prosječne vrijednosti označene su istim slovom i ne razlikuju se prema LSD testu; $p<0.05$.

3.4. Ukupna aktivnost enzima katalaze

3.4.1. Utjecaj obogaćivanja sjemenki selena na aktivnost enzima katalaze u izdanku klijanaca različitih sorti ozime pšenice tretiranih otopinama različitih koncentracija kadmija

Tretmani koncentracijama 10, 25 i 50 µM Cd značajno su smanjili aktivnost CAT u izdanku klijanaca sorte Divana, dok je pri tretmanu koncentracijom 100 µM Cd aktivnost enzima CAT u izdanku značajno porasla za 38% u odnosu na kontrolu. Kod klijanaca obogaćenih Se značajno smanjenje aktivnosti CAT u odnosu na kontrolu utvrđeno je smao pri najvećoj koncentraciji Cd (Slika 9).

Kod sorte Srpanjka utvrđeno je smanjenje aktivnosti enzima CAT u izdancima klijanaca pri tretmanu svim koncentracijama Cd, pri čemu Se nije značajno utjecao na aktivnost CAT u izdancima iste sorte tretiranim Cd (Slika 9).

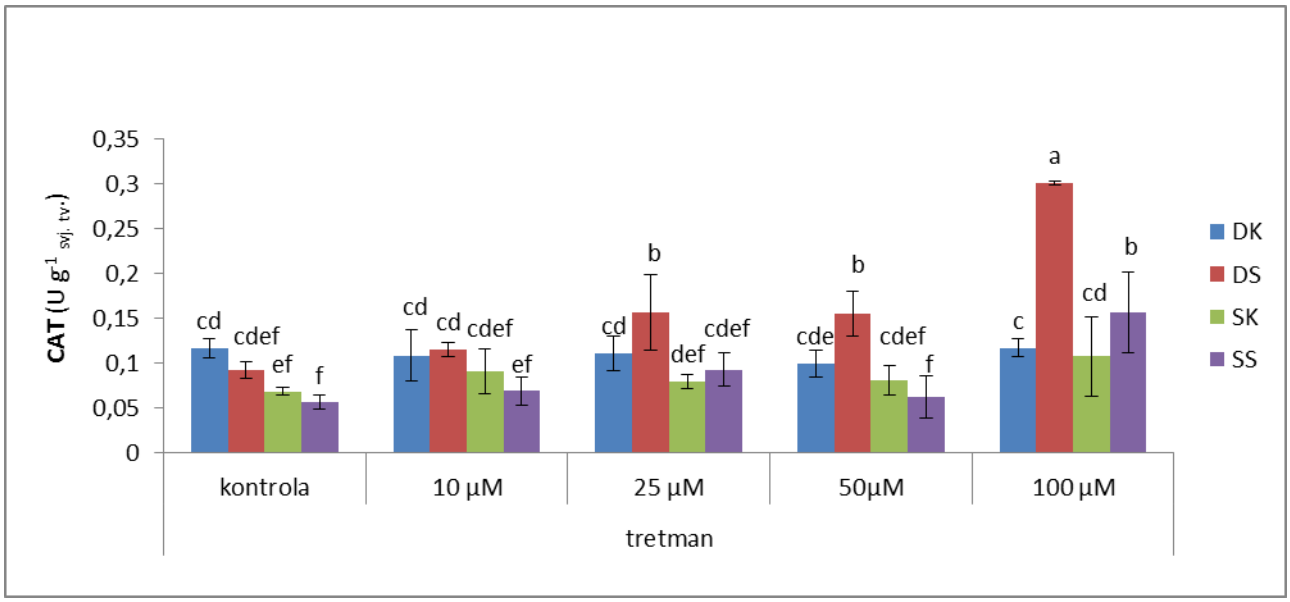


Slika 9. Utjecaj obogaćivanja sjemenki Se na aktivnost enzima CAT u izdancima klijanaca različitih sorti ozime pšenice tretiranih otopinama različitih koncentracija Cd. DK-kontrolni klijanci sorte Divana, DS-klijanci sorte Divana obogaćeni Se; SK- kontrolni klijanci sorte Srpanjka, SS- klijanci sorte Srpanjka obogaćeni Se. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Prosječne vrijednosti označene su istim slovom i ne razlikuju se prema LSD testu; $p<0.05$.

3.4.2 Utjecaj obogaćivanja sjemenki selena na aktivnost enzima katalaze u korijenu klijanaca različitih sorti ozime pšenice tretiranih otopinama različitih koncentracija kadmija

Tretmani različitim koncentracijama Cd nisu značajno utjecali na aktivnost enzima CAT u korijenu klijanaca sorte Divana, dok je kod klijanaca obogaćenih Se značajno povećanje od aktivnosti u odnosu na kontrolu zabilježeno kod 25, 50 i 100 µM Cd (Slika 10).

Kod sorte Srpanjka utvrđeno je značajno povećanje aktivnosti enzima CAT u korijenu klijanaca od 57% u odnosu na kontrolu kod tretmana otopinom Cd koncentracije 100 µM, dok kod klijanaca obogaćenih Se pri istoj koncentraciji Cd je aktivnost CAT bila značajno veća (Slika 10).



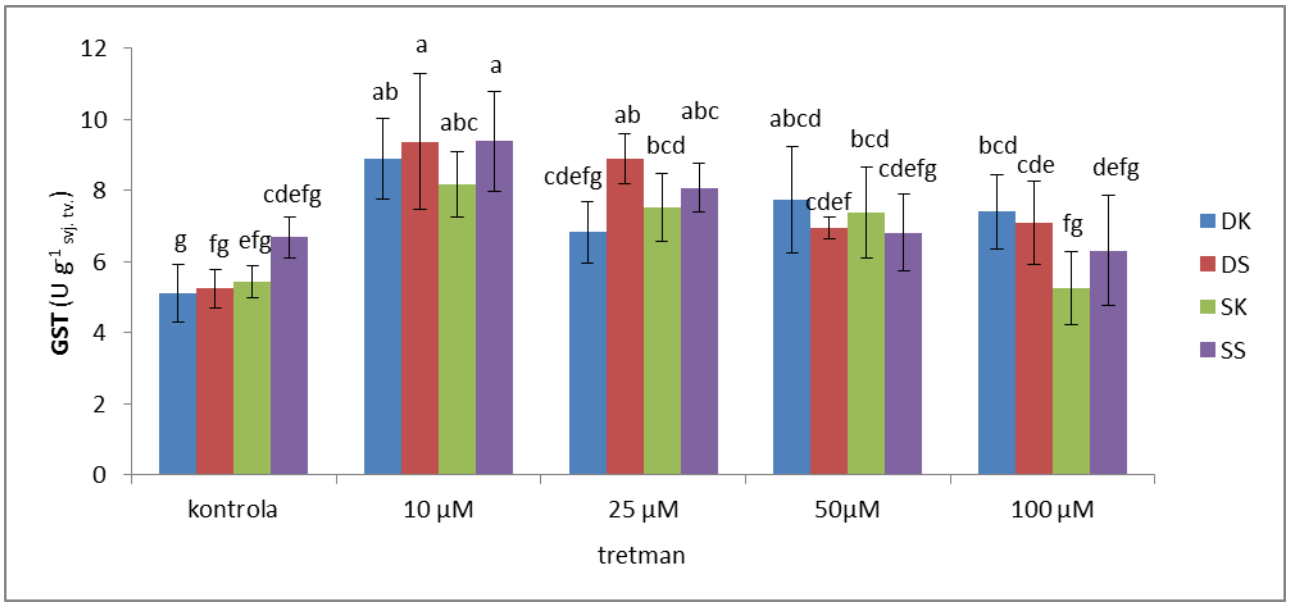
Slika 10. Utjecaj obogaćivanja sjemenki Se na aktivnost enzima CAT u korijenu klijanaca različitih sorti ozime pšenice tretiranih otopinama različitih koncentracija Cd. DK-kontrolni klijanci sorte Divana, DS-klijanci sorte Divana obogaćeni Se; SK- kontrolni klijanci sorte Srpanjka, SS- klijanci sorte Srpanjka obogaćeni Se. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Prosječne vrijednosti označene su istim slovom i ne razlikuju se prema LSD testu; $p<0.05$.

3.5. Ukupna aktivnost enzima glutation S-transferaze

3.5.1 Utjecaj obogaćivanja sjemenki selena na aktivnost enzima glutation S-transferaze u izdanku klijanaca različitih sorti ozime pšenice tretiranih otopinama različitih koncentracija kadmija

Kod sorte Divana do povećanja aktivnosti enzima GST u izdancima klijanaca dolazi kod tretmana 10, 50 i 100 µM Cd, a kod klijanaca obogaćenih Se veće aktivnosti CAT u odnosu na kontrolne biljke utvrđene su samo pri 25 µM Cd (Slika 11).

Tretman s 10, 25 i 50 uzrokovao je značajno povećanje aktivnosti enzima GST u izdanku sorte Srpanjka, dok tretman sa 100 µM Cd nije uzrokovao značajno povećanje aktivnosti enzima u odnosu na kontrolu. Obogaćivanje sjemenki sorte Srpanjka Se nije značajno utjecalo na aktivnost GST u izdanku klijanaca tretiranih Cd (Slika 11).

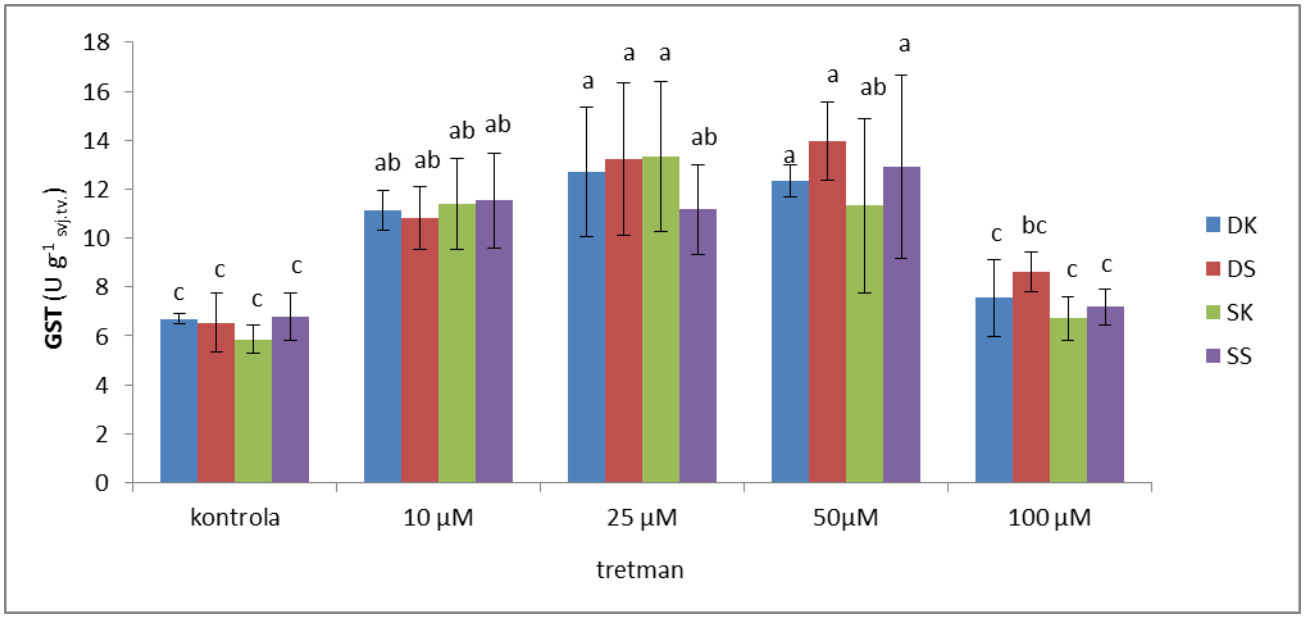


Slika 11. Utjecaj obogaćivanja sjemenki Se na aktivnost enzima GST u izdanku klijanaca različitih sorti ozime pšenice tretiranih otopinama različitih koncentracija Cd. DK-kontrolni klijanci sorte Divana, DS-klijanci sorte Divana obogaćeni Se; SK- kontrolni klijanci sorte Srpanjka, SS- klijanci sorte Srpanjka obogaćeni Se. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Prosječne vrijednosti označene su istim slovom i ne razlikuju se prema LSD testu; $p<0.05$

3.5.2. Utjecaj obogaćivanja sjemenki selena na aktivnost enzima glutation S-transferaze u korijenu klijanaca različitih sorti ozime pšenice tretiranih otopinama različitih koncentracija kadmija

Kod sorte Divana povećanje aktivnosti enzima GST u korijenu klijanaca utvrđeno je kod tretmana 10, 25 i 50 µM Cd i to za 65%, 101% i 114% u odnosu na kontrolu, dok tretman sa 100 µM Cd nije značajno utjecao na aktivnost GST. Obogaćivanje sjemenki sorte Divana Se nije značajno utjecalo na aktivnost GST u korijenu klijanaca tretiranih Cd (Slika 12).

Isti trend povećanja aktivnosti uslijed tretmana Cd utvrđen je i u korijenu klijanaca sorte Srpanjka i to za 94%, 128% i 93% u odnosu na kontrolu. Također, obogaćivanje sjemenki sorte Srpanjka Se nije značajno utjecalo na aktivnost GST u korijenu klijanaca tretiranih Cd (Slika 12).



Slika 12. Utjecaj obogaćivanja sjemenki Se na aktivnost enzima GST u korijenu klijanaca različitih sorti ozime pšenice tretiranih otopinama različitih koncentracija Cd. DK-kontrolni klijanci sorte Divana, DS-klijanci sorte Divana obogaćeni Se; SK- kontrolni klijanci sorte Srpanjka, SS- klijanci sorte Srpanjka obogaćeni Se. Podaci su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Prosječne vrijednosti označene su istim slovom i ne razlikuju se prema LSD testu; $p<0.05$

4. RASPRAVA

Kadmij često ograničava produktivnost usjeva širom svijeta jer se akumulira u biljnim organima i negativno utječe na osnovne fiziološke procese u biljkama (Gill i sur., 2011). Akumulacija Cd u korijenu i listovima ovisi o vezanju Cd na izvanstanični matriks i učinkovitosti transporta između različitih biljnih dijelova. Izlaganje povećanim koncentracijama Cd 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 Cd 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.

Klijanje sjemena i mladi klijanci su osjetljiviji na stres uzrokovan teškim metalima jer obrambeni mehanizmi još uvijek nisu dovoljno razvijeni, a osjetljivost mladih biljaka se povezuje i s propustljivosti sjemene lupine prema metalnim ionima (Liu i sur., 2005). Također, tretman Cd značajno smanjuje aktivnost amilaze što može biti uzrok smanjenja klijavosti sjemenki (Amirjani, 2012) budući da je proces razgradnje škroba neophodan u samom procesu klijanja (Juliano i Varner, 1969). Jedan od mogućih razloga smanjenja klijavosti uslijed djelovanja Cd je i inhibicija diobe stanica i elongacijskog rasta stanica koji se uglavnom događa zbog inhibicije protonske pumpe odgovorne za taj proces (Aidid i Okamoto, 1993).

U ovom istraživanju tretman Cd nije uzrokovao značajne promjene u klijavosti sjemenki obje sorte pšenice, štoviše tretman s 50 i 100 μM otopinom Cd uzrokovao je značajno povećanje ukupne mase klijanaca sorte Divana za 19%, odnosno za 38% u odnosu na kontrolu, dok kod sorte Srpanjka tretman Cd nije značajno utjecao na ukupnu masu klijanaca (Slika 4). Amirjani (2012) je utvrdila da izlaganje pšenice povećanim koncentracijama $CdCl_2$ tijekom 7 dana smanjuje klijavost sjemena, masu klijanaca i elongaciju korijena i izdanaka. Iako se Cd smatra visoko toksičnim elementom koji u visokim koncentracijama ima negativan utjecaj na rast i razvoj biljaka (Maksymiec i sur., 2007), kod riže, soje i ječma utvrđeni su i pozitivni učinci niskih koncentracija Cd na rast biljaka. Stimulacijski učinak Cd na rast pšenice utvrdili su Lin i suradnici (2007) pri čemu je svježa masa korijena i izdanaka porasla za 18,5–44,5% odnosno 25,4–67,9%, dok je duljina izdanaka porasla za 0,2–17,7% u odnosu na kontrolu. Stolt i suradnici (2003) su utvrdili da tretman nižim koncentracijama Cd poboljšava rast pšenice, dok veće koncentracije Cd dovode do inhibicije rasta. Pozitivan utjecaj nižih koncentracija teških metala (Cu, Cd i Zn) na

klijavost biljke *Linum usitatissimum* utvrdili su Kavuličova i suradnici (2012). Pozitivni učinci Cd i općenito teških metala na rast biljaka su slabo obrazloženi u literaturi i mehanizmi nisu još uvijek razjašnjeni. Učinak se često povezuje sa hormetičkim učinkom (Aina i sur., 2007). Također, utjecaj Cd na masu klijanaca pšenice ovisi o samoj sorti pšenice što je dobiveno u ovom istraživanju, a sličan rezultat su u svom istraživanju utvrdili i Ci i suradnici (2009).

Obogaćivanje sjemenki Se nije značajno utjecalo na ukupnu masu klijanaca sorte Divana u ovom istraživanju, dok je Se značajno povećao ukupnu masu klijanaca sorte Srpanjka (Slika 4). Pri najvećoj koncentraciji Cd masa klijanaca obogaćenih Se sorte Srpanjka bila je značajno veća u odnosu na klijance kontrolnih biljaka iste sorte, dok je ukupna masa klijanca obogaćenih Se sorte Divana pri istoj koncentraciji Cd bila značajno manja (Slika 4) što ukazuje da je pozitivno djelovanje Se na masu klijanaca pri tretmanu Cd sortno specifično. Selen nije esencijalan za više biljke (Terry i sur., 2000), ali istraživanja potvrđuju kako u malim koncentracijama Se ima pozitivne učinke na biljku, uključujući poticanje rasta biljke (Hartikainen i Xue, 2000; Terry i sur., 2000; Turakainen i sur., 2004). Pennanen i suradnici (2002) te Xue i suradnici (2001) smatraju da Se može poticati rast kao rezultat povećane akumulacije škroba u kloroplastima. Chen i suradnici (2014) utvrdili su da Se(VI) stimulira rast riže i povećava suhu masu korijenu i izdanaka kod biljaka koje su izlagane Cd budući da Se blokira translokaciju Cd i time smanjuje njegovu toksičnost kod klijanaca riže. Pozitivan učinak Se na rast utvrđen je i kod ostalih biljnih vrsta kao što su *Chenopodium album* (Dhillon i Dhillon, 2009), pšenica (Yao i sur. (2009) i salata (Ramos i sur., 2011). Pozitivan učinak Se na rast biljaka tretiranih Cd povezuje se s ulogom Se u unosu nutrijenata (Shanker i sur., 1996), stomatalnoj regulaciji (Djanaguiraman i sur., 2010) i povećanju fotosintetske učinkovitosti (Malik i sur., 2012). Uloga Se u smanjenju toksičnosti teških metala i povećanju mase biljke ovisi o ionskoj obliku primijenjenog Se, njegovoj koncentraciji te vrsti biljke (Liang i sur., 2012).

Oksidacijski stres rezultat je neravnoteže u proizvodnji ROS-a i aktivaciji mehanizama antioksidacijskog odgovora (Gratão i sur., 2005). Akumulacija Cd povezana je s pojačanom proizvodnjom H_2O_2 u biljnim stanicama te u staničnim kulturama (Olmos i sur., 2003). Kao odgovor na oksidacijski stres uzrokovan teškim metalima, biljne stanice su razvile antioksidacijske mehanizme uključene u detoksifikaciju ROS-a (Mishra i sur., 2006; Verma i Dubey, 2003). Ovisno o koncentraciji, Cd može inhibirati ili stimulirati aktivnost određenih antioksidacijskih enzima prije pojave vidljivih simptoma toksičnosti (Correa i sur., 2006). U nodulima i korijenu soje, manje koncentracije Cd (50 μM) potiču antioksidacijski odgovor,

dok umjerene (100 μM) i velike koncentracije Cd (200 μM) uzrokuju oksidacijski stres (Balestrasse i sur., 2001).

APX, enzim askorbat-glutationskog ciklusa (zajedno s GR), smješten je uglavnom u kloroplastima i citoplazmi i uključen u kontroliranje redoks stanja stanice, osobito kada je stanica izložena teškim metalima (Singh i sur. 2010). U ovom istraživanju je tretman samo najvećom koncentracijom Cd uzrokovao povećanje aktivnosti APX u izdanku sorte Divana, dok je u izdanku sorte Srpanjka izostao učinak Cd na aktivnost APX (Slika 5). U korijenu Srpanjke tretman Cd je, osim najveće koncentracije, povećao aktivnosti APX, dok je kod sorte Divana taj učinak izostao (Slika 6). U istraživanju Yilmaz i Parlak (2011) tretman Cd inducira aktivnost APX u *Groenlandia densa* te je taj rast proporcionalan s rastom koncentracije Cd. U korijenu graška, Cd je snažno stimulirao APX aktivnost uglavnom pri većim Cd koncentracijama (Chaoui i sur., 2004; Dixit i sur., 2001). Aktivnost APX porasla je kod graha, boba i uročnjaka tretiranih sa Cd (Chaoui i sur., 1997; Ünyayar i sur., 2010; Drazkiewicz i sur., 2003). Također, povećana APX aktivnost pod Cd stresom utvrđena je kod vrste *Brassica juncea* (Mobin i Khan i sur., 2007), vrste *Triticum aestivum* (Khan i sur., 2006) i *Vigna mugo* (Singh i sur., 2008). Kovácik i sur. (2009) su utvrdili da je kod kamilice aktivnost APX porasla samo u korijenu pri tretmanu 120 mM Cd, dok koncentracija 60 mM nije utjecala na aktivnost enzima. Kao primarno mjesto i uloga APX navode se kloroplasti, odnosno hvatanje i uklanjanje H_2O_2 nastalog tijekom fotosinteze (Nakano i Asada 1981; Mittler i Zilinskas 1991). Pošto su klijanci u ovom istraživanju uzgajani u uvjetima tame i nije bilo odvijanja fotosinteze, manje aktivnosti APX su očekivani rezultati.

Kao komponenta AsA-GSH puta, GR igra važnu ulogu u detoksifikaciji ROS-a, regeneraciji glutationa i pridonosi toleranciji biljaka na abiotički stres (Gill i Anjum, 2013). GR održava koncentraciju staničnog reduciranog glutationa katalizirajući redukciju GSSG u GSH oksidacijom NADPH (Anjum i sur., 2010; Contour-Ansel i sur., 2006). Kada je biljni organizam izložen niskim koncentracijama Cd, unutarstanični GSH se brzo troši zbog indukcije sintezu fitokelatina i/ili aktivacije enzima koji koriste GSH (Schützendübel i sur., 2002; Corticeiro i sur., 2006).

U našem istraživanju tretman svim koncentracijama Cd dovodi do značajnog povećanja aktivnosti GR u izdancima obje sorte (Slika 7) pri čemu je najveće povećanje od 108% kod sorte Divana i 92% kod sorte Srpanjka utvrđeno pri najvećoj koncentraciji Cd. S druge strane u korijenu je do povećanja aktivnosti GR u odnosu na kontrolu došlo samo kod sorte Srpanjka i to pri većim koncentracijama Cd (Slika 6), dok se u korijenu sorte Divana aktivnost GR nije promijenila. Povećanje GR aktivnosti kao posljedica izlaganja Cd utvrđena

je kod vrste *Brassica juncea* (Qadir i sur., 2004), vrste *Phaseolus vulgaris* (Smeets i sur., 2005) i vrste *Bacopa monnieri* L. (Mishra i sur., 2006). Yannarelli i suradnici (2007) su zaključili da je indukcija GR izoformi i povećana GR aktivnost u korijenu pšenice zaštitila biljku od oksidacijskog stresa uzrokovanog Cd. Isti autori su utvrdili da Cd različito utječe na aktivnost enzima GR i izoforme u listovima i korijenu pšenice, gdje listovi nisu pokazali promjene u aktivnosti GR. Slične rezultate dobili su Dixit i suradnici (2001) koji su utvrdili da GR ima veću aktivnost u korijenu graška nego u listovima tijekom tretmana Cd. Pretpostavlja se kako GSH, GSSG ili promjena omjera GSH i GSSG može djelovati kao signal za aktivaciju i ekspresiju odgovornih gena i biti okidač za sintezu enzima GR u stresnim situacijama. U listovima pšenice tijekom tretmana Cd dokazana je postojanost dviju različitih izoformi GR (Yannarelli i sur., 2007). Autori smatraju da različita vremenska aktivacija i indukcija različitih izoformi enzima može rezultirati modifikacijom ukupne GR aktivnosti, te rezultirati većim stupnjem recikliranja glutationa tijekom dužeg perioda stresa, no potvrđivanje ove hipoteze zahtijeva dodatna istraživanja.

Selen je pri najvećoj koncentraciji Cd povećao aktivnost APX u korijenu i izdanku sorte Srpanjka u odnosu na kontrolne biljke pri istoj koncentraciji Cd, dok je kod sorte Divana taj učinak izostao u izdancima, a u korijenu Se obogaćenih klijanaca je aktivnost GR bila manja nego kod kontrolnih biljaka (Slike 5 i 6). Suprotno tomu, Se je kod sorte Srpanjka pri 100 μmol Cd smanjio aktivnosti GR i u korijenu i u izdanku, dok je kod sorte Divana povećao aktivnost GR u korijenu u odnosu na kontrolne biljke pri istoj koncentraciji Cd (Slika 5 i 6). Do sada je napravljen vrlo mali broj istraživanja o utjecaju Se na aktivnosti enzima uključenih u AsA-GSH ciklus. Lin i suradnici (2012) utvrdili su da je tretman Se povećao APX u listu riže tek nakon 15 d tretmana 50 μmol otopinom $CdCl_2$ odnosu na biljke tretirane samo Cd , dok nije djelovao na aktivnost APX u korijenu riže. Poboljšanje aktivnosti GR i APX zbog predtretmana Se u listovima klijanaca suncokreta tretiranih 20 μmol otopinom Cd utvrdili su Saidi i suradnici (2014) te aktivnosti APX u korijenu klijanaca kukuruza (Sun i sur., 2013). U ovom istraživanju pozitivan učinak Se na aktivnost enzima AsA-GSH ciklusa je bio sortno specifičan te je različit odgovor utvrđen u izdanku i korijenu klijanaca. Razlike u odgovoru aktivnosti ova dva enzima također se mogu objasniti različitim mehanizmima njihove stimulacije budući da APX aktivira H_2O_2, a GR jasmonska kiselina (Xiang i Oliver, 1998).

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 pristuno je kada je biljka izložena stresnim uvjetima (Foyer i sur., 1997). U biljkama izloženima toksičnim koncentracijama

teških metala kao što su Cu, Pb, Zn, Cd zabilježeno je povećanje aktivnosti CAT (Prasad i sur. 1999; Vos i Shat 1991). U ovom istraživanju aktivnost CAT u izdancima obje sorte bila je inhibirana pri tretmanu Cd, osim pri najvećoj koncentraciji Cd koja je uzrokovala povećanje aktivnosti CAT kod sorte Divana za 38% (Slika 9). U korijenu sorte Divana aktivnost CAT se nije mijenjala pod utjecajem tretmana Cd, dok je kod sorte Srpanjka pri tretmanu sa 100 μmol Cd porasla za 57% u odnosu na kontrolne biljke koje nisu bile tretirane Cd (Slika 10). Romero-Puertas i suradnici (2007) pokazali su da tretman Cd uzrokuje redukciju aktivnosti CAT u listovima graška, ali istovremeno uzrokuje indukciju CAT transkripata. Stoga oni smatraju da Cd uzrokuje posttranslacijske modifikacije CAT. To povećanje u sadržaju mRNA za CAT može biti inducirano povećanim koncentracijama H_2O_2 do kojeg dolazi u listovima u uvjetima povećane koncentracije Cd (Romero-Puertas i sur., 2004). Također, smanjenje aktivnosti CAT može se pripisati i inhibiciji sinteze tog enzima budući da neki teški metali mogu zamijeniti Fe u hem skupini CAT što može utjecati na njenu aktivnost (Das i sur., 1978; Siedlecka i Krupa 1999). Aktivnost CAT usko je povezana s otpornošću biljaka na povećane koncentracije Cd i može poslužiti kao biološki indikator toksičnosti Cd u pšenici zbog njezine velike osjetljivosti (Ci i sur., 2009).

Obogaćivanje sjemenki obje sorte Se značajno je povećalo aktivnosti CAT u korijenu sorte Divana pri većim koncentracijama Se i korijenu sorte Srpanjka pri najvećoj koncentraciji Cd (Slika 10). Kod sorte Divana aktivnosti CAT kod klijanaca obogaćenih Se je porasla za 226% , a kod sorte Srpanjka za 178% pri najvećoj koncentraciji Cd u odnosu na kontrolu. Do sličnih rezultata pozitivnog djelovanja Se na smanjenje toksičnog učinka Cd dobili su Saidi i suradnici (2014) kod klijanaca suncokreta. S druge strane, Filek i suradnici (2008) utvrdili su da Se u kombinaciji s Cd značajno smanjuje aktivnost CAT i u nadzemnim dijelovima i u korijenu klijanaca uljane repice.

Glutation-S-transferaze su velika skupina enzima koja katalizira konjugaciju elektrofilnih ksenobiotika sa tripeptidom glutationom (Dixon i sur., 2010), a dokazana je njihova uloga u odgovoru biljaka na biotički i abiotički stres, djelovanje hormona i razvojne promjene (Dixon i sur., 2002; Frova, 2006; Moons, 2005). Osim poznatih funkcija u metabolizmu herbicida i detoksifikaciji ksenobiotika, pokazalo se da izloženost teškim metalima također može inducirati GST kod različitih vrsta (Anjum i sur., 2012; Tamás i sur., 2008). Aktivnost GST, kao stabilniji i učinkovitiji odgovor, se inducira u uvjetima pojačanog oksidacijskog stresa kada se bazalni antioksidacijski enzimi iscrpe (Hossain i sur., 2010). Chun-hua i Ying (2008) utvrdili su kako je GST uključena u stvaranje GSH-Cd kompleksa, čime se smanjuje koncentracija slobodnog Cd u stanicama i tako umanjuje njegovo toksično

djelovanje. Također, GST može funkcionirati i kao glutation-peroksidaza te sudjelovati u uklanjanju H_2O_2 (Marrs, 1996).

U ovom istraživanju u izdancima obje sorte utvrđeno je povećanje aktivnosti GST pri manjim koncentracijama Cd, pri čemu je najveći porast aktivnosti bio pri tretmanu s 10 μmol Cd (Slika 11). Isti trend povećanja aktivnosti GST utvrđen je i u korijenu obje sorte pšenice, pri čemu pri najvišoj koncentraciji Cd aktivnosti GST nisu se značajno razlikovale od kontrolnih vrijednosti (Slika 12). Samo obogaćivanje sjemenki Se nije značajno utjecalo na promjenu u aktivnosti GST u klijancima obje sorte pšenice tretiranih Cd (Slike 11 i 12). Utvrđeno je da izloženost kadmiju uzrokuje povećanu aktivnost GST u listovima zlatnog graha (*Vigna radiata*) (Hossain i sur., 2010). Haluškova i sur. (2009) u svojem istraživanju pokazali su da povećana aktivnost GST kod ječma (*Hordeum vulgare*) može biti inducirana različitim metalima (Singh i sur., 2010), te navode da je GST uključena u kontroliranje redoks stanja stanice. Hana i sur. (2008) utvrdili su povećanje GST aktivnosti u korijenu klijanaca rajčice i to pri tretmanu manjim koncentracijama Cd (20-40 μM), dok je pri višim koncentracijama Cd (100 μM) aktivnost GST bila inhibirana što se podudara s našim rezultatima.

Iako je poznato da Se vraća u ravnotežu oksidacijska oštećenja uzrokovana Cd, sam molekularni mehanizam odgovoran za interakcije između Cd i Se još uvijek nije u potpunosti razjašnjen, a novija istraživanja govore kako međusobne interakcije ovise o istraživanoj vrsti (Filek i sur., 2008; Zembala i sur., 2010; Pedrero i sur., 2008).

5. GLAVNI REZULTATI I ZAKLJUČCI

- Tretman najvećom koncentracijom kadmija značajno je povećao ukupnu masu klijanaca pšenice sorte Divana, no nije značajno utjecao na ukupnu masu klijanaca sorte Srpanjka. Obogaćivanje sjemenki selenom nije značajno utjecalo na ukupnu masu klijanaca sorte Divana tretiranih najvećom koncentracijom kadmija, dok je značajno povećao ukupnu masu klijanaca sorte Srpanjka.

- Tretman kadmijem uzrokovao je promjene aktivnosti enzima askorbat-glutationskog ciklusa u klijancima pšenice pri čemu je taj odgovor ovisio o koncentraciji kadmija, sorti pšenice i vrsti biljnog organa.

- Tretman manjim koncentracijama kadmija značajno je povećao aktivnost glutation S-transferaze kod obje sorte pšenice, dok obogaćivanje selenom nije značajno utjecalo na aktivnost tog enzima.

- Tretman manjim koncentracijama kadmija uzrokovao je inhibiciju aktivnosti katalaze u izdancima obje sorte pšenice, dok se aktivnost u korijenu nije značajno promijenila. Obogaćivanje sjemenki selenom značajno je povećalo aktivnosti katalaze u korijenu klijanaca obje sorte pšenice tretiranih najvećom koncentracijom kadmija.

- Aktivnost katalaze biološki je pokazatelj otpornosti pšenice na toksično djelovanje kadmija, stoga obogaćivanje sjemenki pšenice selenom može biti vrlo uspješna metoda povećanja otpornosti pšenice na oksidacijski stres uzrokovan kadmijem. Pozitivno djelovanje selena na masu klijanaca pšenice pri tretmanu kadmijem je sortno specifično.

6. LITERATURA

.

Aebi H. 1984. Catalase in Vitro. *Method Enzym* 105: 121-126.

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

Aidid SB, Okamoto H. 1993. Responses of elongation growth rate, turgor pressure and cell wall extensibility of stem cells of *Impatiens balsamina* to lead, cadmium and zinc. *Biometals* 6: 245-249.

Aina R, Labra M, Fumagalli P, Vannini C, Marsoni M. 2007. Thiol-peptide level and proteomic changes in response to cadmium toxicity in *Oryza sativa* L. roots. *Environ Exp Bot* 59: 381-392.

Amirjani MR. 2012. Effects of Cadmium on Wheat Growth and Some Physiological Factors. *Int J Forest Soil Erosion* 22: 50-58.

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

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

Anjum NA, Umar S, Ahmad A, Iqbal M, Khan NA. 2008. Sulphur Protects Mustard (*Brassica campestris* L.) from Cadmium Toxicity by Improving Leaf Ascorbate and Glutathione. *Plant Growth Regulation* 54: 271-279.

Arvy MP. 1993. Selenate and selenite uptake and translocation in bean plants (*Phaseolus vulgaris*). *J Exp Bot* 44: 1083-1087.

Bah AM, Dai H, Zhao J, Sun H, Cao F, Zhang G, Wu F. 2011. Effects of cadmium, chromium and lead on growth, metal uptake and antioxidative capacity in *Typha angustifolia*. *Biol Trace Elem Res* 142: 77-92.

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

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.

Blaudez D, Botton B, Chalot M. 2000. Cadmium uptake and subcellular compartmentation in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Microbiology* 146: 1109-1117.

Blum W. 1997. Cadmium uptake by higher plants. Proceedings of extended abstract from the Fourth International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements. University of California, Berkeley, USA 109-110.

Chaoui A, Mazhoudi S, Ghorbal MH, El Ferjani E,. 1997. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Sci* 127: 139-147.

Chen M, Cao L, Song X, Wang X, Qian Q, Liu W. 2014. Effect of iron plaque and selenium on cadmium uptake and translocation in rice seedlings (*Oryza sativa*) grown in solution culture. *Int J Agric Biol* 16: 1159-1164.

Chou TS, Chao YY, Huang WD, Hong CY, Kao CH. 2011 Effect of Magnesium Deficiency on Antioxidant Status and Cadmium Toxicity in Rice Seedlings. *J Plant Physiol* 168: 1021-1030.

Choudhary M, Bailey LD, Grant CA, Leisle D. 1995. Effect of Zn on the Concentration of Cd and Zn in Plant Tissue of Two Durum Wheat Lines. *Can J Plant Sci* 75: 445-448.

Chun-hua, GE Ying GE. 2008. Response of Glutathione and Glutathione S-transferase in Rice Seedlings Exposed to Cadmium Stress. *Rice Science* 15: 73-76.

Ci D, Jiang D, Dai T, Jing Q, Cao W. 2009. Effects of cadmium on plant growth and physiological traits in contrast wheat recombinant inbred lines differing in cadmium tolerance. *Chemosphere* 77: 1620-1625.

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

Cobbett C i Goldsbrough P. 2002. Phytochelatins and Metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 53: 159-82.

Cobbett CS. 2000. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol* 123: 825-832.

Coleman JOD, Blake-Kalff M, Davies E. 1997. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends Plant Sci* 2: 144-151.

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

Contour-Ansel D, Torres-Franklin ML, Cruz DECMH, D'Arcy-Lameta A, Zuily-Fodil Y. 2006. Glutathione reductase in leaves of cowpea: cloning of two cDNAs, expression and enzymatic activity under progressive drought stress, desiccation and abscisic acid treatment. *Ann Bot* 98: 1279-1287.

Corpas FJ. 2001. Peroxisomes as a source of reactiveoxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Sci* 6: 145-150.

Correa da Rosa XA, Rubi Rörig L, Verdinelli MA, Cotelle S, Farard JF, Radetsky MC. 2006. Cadmium phytotoxicity: Quantitative sensitivity relationships between classical endpoints and antioxidative enzyme biomarkers. *Sci oTot Environ* 357: 120-127.

Corticeiro SC, Lima AIG, de Almeida Paula Figueira EM. 2006. The importance of glutathione in oxidative status of Rhizobium leguminosarum biovar viciae under Cd exposure. *Enzyme Microb Technol* 40: 132-137.

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

Cuypers A, Plusquin M, Remans T, Jozefczak M, H, Opdenakker K, Ravindran Nair A, Munters E, Artois TJ, Nawrot T, Vangronsveld J, Smeets K. 2010. Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals* 23: 927-40.

Dal Corso G, Farinati S, Furini A. 2010. Regulatory networks of cadmium sress in plants, *Plant Signal Behav* 5: 663-667.

DalCorso G, Farinati S, Maistri S, Furini A. 2008. How Plants Cope with Cadmium: Staking All on Metabolism and Gene Expression. *J Integr Plant Biol* 10: 1268-1280.

Dandan L, Dongmei Z, Peng W, Nanyan W, Xiangdong Z. 2011. Subcellular Cd distribution and its correlation with antioxidant enzymatic activities in wheat (*Triticum aestivum*) roots. *Ecotoxicol Environ Saf* 74: 874-881.

Das K, Roychoudhury A. 2014. Reactive oxygen species (ROS) and response of antiooxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front Environ Sci* 2: 1-13.

Das P, Samantaray S, Rout GR. 1997. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environ Pollution* 98: 29-36.

del Río LA, Sandalio LM, Corpas FJ, Palma JM, Barroso JB. 2006. Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species in Peroxisomes. Production, Scavenging, and Role in Cell Signaling. *Plant Physiol* 141: 330-335.

Das PK, Kar M, Mishra D. 1978. Nickel nutrition of plants. 1. Effects of nickel on some oxidase activities during rice (*Oryza sativa* L.) seed germination. *Z Pflanzenphysiol* 90: 225-223

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

Dhillon KS, Dhillon SK. 2009. Selenium concentrations of common weeds and agricultural crops grown in the seleniferous soils of northwestern India. *Sci Total Environ* 407*:* 6150-6156.

Diatloff E, Forde BG, Roberts SK. 2006. Expression and transport characterisation of the wheat low-affinity cation transporter (LCT1) in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Bichem Biophys Res Comm* 344: 807-813.

Dinakar N, Nagajyothi PC, Suresh S, Udaykiran Y, Damodharam T. 2008. Phytotoxicity of cadmium on protein, proline and antioxidant enzyme activities in growing *Arachis hypogaea* L. seedlings. *J Environ Sci* 20: 199-206.

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

Dixon DP, Davis BG, Edwards R. 2002. Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants-identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabisopsis thaliana*. *J Biol Chem* 277: 30859-30869.

Dixon DP, Edwards R. 2009. Selective binding of glutathione conjugates of fatty acid derivatives by plant glutathione transferases. *J Biol Chem* 2848: 21249-21256.

Dixon DP, Skipsey M, Edwards R. 2010. Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 71: 338‑350.

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

Drazkiewicz M, Skorzynska-Polit E, Krupa Z. 2003. Response of the ascorbate-glutathione cycle to excess copper in *Arabidopsis thaliana* (L.) *Plant Sci* 164: 195-202.

Ebbs S, Leonard W. 2001. Alteration of selenium transport and volatilization in barley (*Hordeum vulgare*) by arsenic. *J Plant Physiol* 158: 1231-1233.

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, Salt DE. 2003. Plants, selenium and human health. *Curr Opin Plant Biol* 6: 273-279.

Filek M , Hartikainen K , Szarejko I , Janiak A , Miszalski Z, Golda A. 2008. The protective role of selenium in rape seedlings subjected to cadmium stress. *J Plant Physiol* 165: 833-844.

Fodor A, Szabó-Nagy A, Erdei L. 1995. The effects of cadmium on the fluidity and H^+-ATPase activity of plasma membrane from sunflower and wheat roots. *J Plant Physiol* 14: 787-792.

Foyer CH, Halliwell B. 1976. The presence of Glutathione and Glutathione reductase in Chloroplasts: A proposed role in Ascorbic Acid Metabolism. *Planta* 133: 21-25.

Foyer CH, Noctor G. 2003. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol Plant* 119: 355-364.

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.

Frova C. 2006. Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. *Biomol Eng* 23: 149-169.

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

Gallego SM, Benavides MP, Tomaro ML. 1999. Effect of cadmium ions on antioxidative defense system in sunflower cotyledons. *Biol Plant* 42: 49-55.

Gallego SM, Pena LB, Barcia RA, Azpilicueta CE, Iannone MF, Rosales EP. 2012. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: insight into regulatory mechanisms. *Environ Exp Bot* 83: 33-46.

Germ M, Kreft I, Osvald J. 2005. Influence of UV-B exclusion and selenium treatment on photochemical efficiency of photosystem II, yield and respiratory potential in pumpkins (*Cucurbita pepo* L.). *Plant Physiol. Biochem* 43: 445-448.

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

Gill SS, Anjum N. 2013. Glutathione and glutathione reductase: A boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiol Biochem* 70: 204-212

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.

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

Haghiri F. 1973. Plant uptake of cadmium as influenced by cation exchange capacity, organic matter, zinc and soil temperature. *J Environ Qual* 2: 93-96.

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

Halliwell B, Foyer CH. 1978. Properties and Physiological Functions of a Glutathione Reductase Purified from Spinach Leaves by Affinity Chromatography. *Planta* 139: 9-17.

Halušková L, Valentovičová K, Huttová J , Mistrík I, Tamás L. 2009.Effect of abiotic stresses on glutathione peroxidase and glutathione S-transerase activity in barley root tips. *Plant Physiol Biochem* 47:1 069-1074.

Hana S, Rachid R, Ibtissem S, Houria B, Reba MD. 2008. Induction of antioxidant enzymes by cadmium stress in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Afric J Plant Sci* 2: 072-076.

Harris N, Taylor GJ. 2001. Remobilization of cadmium in maturing shoots of near isogenic lines of durum wheat that differ in grain cadmium accumulation. *J Exp Bot 52*: 1473-1481.

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.

Hassan MJ, Zhu Z, Ahmad B, Mahmood Q. 2006. Influence of Cadmium Toxicity on Rice Genotypes as Affected by Zinc, Sulfur and Nitrogen Fertilizers. *Casp J Environ Sci* 4: 1-8.

He PP, Lv XZ, Wang GY. 2004. Effects of Se and Zn supplementation on the antagonism against Pb and Cd in vegetables. *Environ Int* 30: 167-172.

Hentz S, McComb J, Miller G, Begonia M, Begonia G. 2012. Cadmium uptake, growth and phytochelatin contents of *Triticum Aestivum* in response to various concentrations of cadmium. *World Environment* 2: 44-50.

Hernández LE, Cooke DT. 1997. Modification of the roots plasma membrane lipid composition of cadmium-treated *Pisum sativum*. *J Exp Bot* 48: 1375-1381.

Herren T, Feller U. 1997. Transport of cadmium via xylem and phloem in maturing wheat shoots: comparison with the translocation of zinc, strontium and rubidium, *Ann Bot* 623-8.

Hossain MA, Fujita M. 2010. Evidence for a role of exogenous glycinebetaine and proline in antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems in mung bean seedlings under salt stress. M. *Physiol Mol Bio Plants* 16: 1.

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.

Howarth JR, Domínguez-Solís JR, Gutíerrez-Alcalá G, Wray JL, Romero LC, Gotor C. 2003. The Serine Acetyltransferase Gene Family in *Arabidopsis thaliana* and the Regulation of Its Expression by Cadmium. *Plant Mol Biol* 51: 589-598.

Iannelli MA, Pietrini F, Fiore L, Petrilli L, Massacci A. 2002. Antioxidant response to cadmium in *Phragmites australis* plants. *Plant Physiol Biochem* 40: 977-982

Jalloh MA, Chen J, Zhen F i Zhang G. 2009. Effect of Different N Fertilizer Forms on Antioxidant Capacity and Grain Yield of Rice Growing under Cd Stress. *J Hazard Mater* 162: 1081-1085.

Juliano BO, Varner JE. 1969. Enzymic degradiation of starch granules in the cotyledons of germinating peas. *Plant Physiol* 44: 886-892

Kavuličova J, Kadukova J, Ivanova D. 2012. The evaluation in heavy metal toxicity in plants using the biochemical tests. *Nova Biotechnol Chim* 11: 87-175

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.

Khan NA, N. A. Anjum, R. Nazar and N. Iqbal. 2009. Increased Activity of ATP-Sulfurylase and Increased Contents of Cysteine and Glutathione Reduce High Cadmium-Induced Oxidative Stress in Mustard Cultivar with High Photosynthetic Potential. *Russ J Plant Physiol* 56: 670-677.

Khan NA, Samiullah S, Singh S and Nazar R. 2007. Activities of Antioxidative Enzymes, Sulphur Assimilation, Photosynthetic Activity and Growth of Wheat (*Triticum aestivum*) Cultivars Differing in Yield Potential under Cadmium Stress. *J Agric Crop Sci* 193: 435-444.

Kovácik J, Klejdus B, Kadukova J, Backor M. 2009. Physiology of Matricaria chamomilla exposed to nickel excess. *Ecotoxicol Environ Saf* 72: 603-609.

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

Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigo R, Gladyshev VN. 2003. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* 300: 1439-1443.

Kumar M, Bijo AJ, Baghel RS, Reddy CRK, Jha B. 2012. Selenium and spermine alleviate cadmium induced toxicity in the red seaweed *Gracilaria dura* by regulating antioxidants and DNA methylation. *Plant Physiol Biochem* 51: 129-138.

Landberg T, Greger M. 2003. Influence of N and N Supplementation on Cd Accumulation in Wheat Grain. 7th International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements, Uppsala‘03, Uppsala. pp. 90-91.

Lee S, Moon JS, Ko TS, Petros D, Peter B. Goldsbrough PB, and Korban SS. 2003. Overexpression of Arabidopsis Phytochelatin Synthase Paradoxically Leads to Hypersensitivity to Cadmium Stress. *Plant Physiol* 131: 656-663.

Leita L, De Nobili M, Cesco S, Mondini C. 1996. Analysis of intercellular cadmium forms in roots and leaves of bush bean. *J Plant Nutr* 19: 527-533.

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

Liang J, Yang Z, Tang L, Xu Y, Wang S, Chen F. 2012. Growth performance and tolerance responses of jatropha (*Jatrophacurcas*) seedling subjected to isolated or combined cadmium and lead stresses. *Int J Agric Biol* 14: 861-869.

Lin L, Zhou W, Dai H, Cao F, Zhang G, Wu F. 2012. Selenium reduces cadmium uptake and mitigates cadmium toxicity in rice. *J Hazard Mater* 236: 343-351.

Lin R, Wang X, Luo Y, Du W, Guo H, Yin D. 2007. Effects of soil cadmium on growth, oxidative stress and antioxidant system in wheat seedlings (*Triticum aestivum L.*). *Chemosphere* 69: 89-98.

Liu X, Zhang S, Shan, Zhu YG. 2005. Toxicity of arsenate and arsenite on germination, seedling growth and amylolytic activity of wheat. *Chemosphere* 61: 293-301.

Lobanov AV, Fomenko DE, Zhang Y, Sengupta A, Hatfield DL,Gladyshev VN. 2007. Evolutionary dynamics of eukaryotic selenoproteomes: large selenoproteomes may associate with aquatic life and small with terrestrial life. *Genome Biol* 8: R198.

Maksymiec W, Wojcik M, Krupa Z. 2007. Variation in oxidative stress and photochemical activity in *Arabidopsis thaliana* leaves subjected to cadmium and excess copper in the presence or absence of jasmonate and ascorbate. *Chemosphere* 66: 421-427.

Malik JA, Goel S, Kaur N, Sharma S, Singh I, Nayyar H. 2012. Selenium antagonises the toxic effects of arsenic on mungbean (*Phaseolus aureus* Roxb) plants by restricting its uptake and enhancing the antioxidative and detoxification mechanisms. *Environ Exp Bot* 77: 242-248.

Markovska YK, Gorinova NI, Nedkovska MP, Miteva KM. 2009. Cadmium induced oxidative damage and antioxidant response in *Brassica juncea* plants. *Biol Plant* 53: 151-154.

Marrs K A. 1996. The functions and regulation of glutathione S-transferase in plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 127-158

Meharg AA. 1993. The role of plasmalemma in metal tolerance in angiosperms. *Physiol Plant* 88: 191-198.

Mishra S, Srivastava S, Tripathi RD, Govindarajan R, Kuriakose SC, Prasad MNV. 2006. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa mannier* L. *Plant Physiol Biochem* 44: 25-37.

Mittler R, Zilinskas BA. 1991. Purification and characterization of pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Plant Physiol* 97: 962-968.

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

Mobin M, Khan NA. 2007. Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassica juncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress. *J Plant Physiol* 164: 601-610.

Moons A. 2005. Regulatory and functional interactions of plant growth regulators and plant glutathione S-transferases (GSTS). *Plant Horm* 72: 155-202.

Moradi A, Addaspour KC, Afyuni M. 2005. Modelling field-scale cadmium transport below the root zone of a sewage sludge amended soil in a arid region in Central Iran. *J Cont Hydrol* 79: 187-206.

Nakano Y, Asada K. 1981. Hydrogen and peroxide is scavenged by Ascorbate-specific peroxidase in Spinach Chloroplast. *Plant Cell Physiol* 22: 867-880.

Nazar R, Khan N, Iqbal N, Massod A, Syeed S, Iqbal Khan MR. 2012. Cadmium toxicity in plants and role of mineral nutrients in its allevation. *Am J Plant Sci* 3: 1476-1489.

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.

Nocito FF, Lancilli C, Crema B, Fourcroy P, Davidian JC , Sacchi GA. 2006. Heavy Metal Stress and Sulfate Uptake in Maize Roots. *Plant Physiol* 141: 1138-1148.

Nouairi I, Ammar WB, Youssef NB, Miled DDB, Ghorbal MH, Zarrouk M. 2009. Antioxidant defense system in leaves of Indian mustard (*Brassica juncea*) and rape (*Brassica napus*) under cadmium stress. *Acta Phys Plant* 31: 237-24.

Nwugo CC, Huerta AJ. 2008. Silicon-Induced Cadmium Resistance in Rice (*Oryza sativa*). *J Plant Nutr Soil Sci* 171: 841-848.

Olmos E, Mart´ınez-Solano E, Piqueras JR, Heln AE. 2003. Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2line). *J Exp Bot* 54: 291-301.

Pankovic D, Plesnicar M, Arsenijeevic-Maksimovic I, Petrovic N, Sakac Z, Kastori R. 2000. Effects of Nitrogen Nutrition on Photosynthesis in Cd-Treated Sunflower Plants. *Ann Bot* 86: 841-847.

Pasternak T, Rudas V, Potters G, Jansen MAK. 2005. Morphogenic effects of abiotic stress: reorientation of growth in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Environ Exp Bot* 53: 299-314.

Patra J, Panda B. 1998. A comparison of biochemical response to oxidative and metal stress in seedlings of barley, *Hordeum vulgare* L. *Environ Poll* 101: 99-105.

Pazoki AR, Shirani-Rad AH, Habibi D, Paknejad F, Kobraee S, Hadayat N. 2010. Effect of drought stress and selenium spraying on superoxide dismotase activity of winter rapeseed (*Brassica napus* L.) cultivars. *World Acad Sci Eng Technol* 68: 678-681.

Pedrero Z, Madrid Y, Hartikainen H, Cámara C. 2008. Protective effect of selenium in broccoli (*Brassica oleracea*) plants subjected to cadmium exposure. *J Agric Food Chem* 56: 266-27.

Pennanen A, Xue TL, Hartikainen H. 2002. Protective role of selenium in plant subjected to severe UV irradiation stress. *J Appl Bot-Angew Bot* 76: 66-76.

Piqueras A, Olmos E, Martinez-Solano JR, Hellin E. 1999. Cd-induced oxidative burst in tobacco BY2 cells: time-course, subcellular location and antioxidant response. *Free Radic Res* 31: 33-38.

Qadir S, Qureshi MI, Javed S, Abdin MZ. 2004. Genotypic variation in phytoremediation potential of *Brassica juncea* cultivars exposed to Cd stress. *Plant Sci* 167: 1171.

Quinn CF, Galeas ML, Freeman JL, Pilon-Smits EAH. 2007. Selenium: Deterrence, toxicity, and adaptation. *Integr Environ Assess Man* 3: 460-462.

Qureshi MI, D'Amici GM, Fagioni M, Rinalducci Sand, Zolla L. 2010. Iron Stabilizes Thylakoid Protein-Pigment Complexes in Indian Mustard during Cd-Phytoremediation as Revealed by BN-SDS-PAGE and ESI-MS/MS. *J Plant Physiol* 167: 761-770.

Ramos I, Hernandez E, Olguin EJ. 2002. The Effect of Both Different Light Conditions and the pH Value ont he Capacity of *Salvinia minima* BAKER for Removing Cadmium, Lead and Chromium. *Acta Biotehnol* 22: 121-131.

Ramos SJ, Rutzke MA, Hayes RJ, Faquin V, Guilherme LRG, Li L. 2011. Selenium accumulation in lettuce germplasm. *Planta* 233: 649-660.

Rauser WE. 1999. Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin and metallothioneins. *Cell Biochem Biophys* 31: 19-48.

Rayman MP. 2000. The importance of selenium to human health. *Lancet* 356: 233-241.

Reilly C 2006. *Selenium in food and health*, Vol. 1,2 Introduction, The biology of selenium. Springer (Science+Business Media), NY, USA, 5-26 pp.

Romero-Puertas MC, Corpas FJ, Rodriguez-Serrano M, Gomez M, Del Rio LA, Sandalio LM. 2007. Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea plants. *J Plant Physiol* 164: 1346-1357.

Romero-Puertas MC, Rodríguez-Serrano M, Corpas F, Gomez M, del Rio L, Sandalio LM. 2004. Cadmium-induced subcellular accumulation of $O_2^{\bullet-}$ and H_2O_2 in pea leaves. *Plant Cell Environ* 27: 1122-1134.

Saidi I, Chtourou Y, Djebali W. 2014. Selenium alleviates cadmium toxicity by preventing oxidative stressin sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. *J Plant Physiol* 171: 85-9.

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

Sarwar N, Saifullah S, Malhi S, Zia MH, Naeem A, Bibi S, Farida G. 2010. Role of Mineral Nutrition in Minimizing Cadmium Accumulation by Plants. *J Sci Food Agric* 90: 925-937.

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.

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

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.

Shahrtash M. 2013. Plant glutathione S-transferases function during environmental stresses: a review article. *Rom J Biol – Plant Biol* 58: 19-25.

Shanker K, Mishra S, Srivastava S, Srivastava S, Daas S, Prakash S. 1996. Effect of selenite and selenate on plant uptake and cadmium by maize (*Zea mays*). *Bull Environ Contam Toxicol* 56: 419-24

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

Shen W, Nada K, Tachibana S. 2000. Involvement of Polyamines in the Chilling Tolerance of Cucumber Cultivars. *Plant Physiol* 124: 431-439.

Shi G, Liu C, Cai Q, Liu Q, Hou C. 2010. Cadmium accumulation and tolerance of two safflower cultivars in relation to photosynthesis and antioxidative enzymes. *Bull Environ Contam Toxicol* 85: 256-263.

Siedlecka A, Krupa Z. 1999. Cd/Fe interactions in higher plants – Its consequences for the photosynthetic apparatus. *Photosynth Res* 36: 321-331.

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

Singh R, Singh DP, Kumar N, Bhargava SK, Barman SC. 2010. Accumulation and translocation of heavy metals in soil and plants from fly ash contaminated area. *J Environ Biol* 32: 421-430.

Singh S, Anjum NA, Khan NA, Nazar R. 2008. Metal-binding peptidesand antioxidant defense system in plants: Significance in cadmium tolerance. In: *Abiotic stress and plant responses*. pp. 159-189.

Smeets K, Cuypers A, Lambrechts A, Semane B, Hoct P, Laere AV. 2005. Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaeolus vulgaris* after Cd application. *Plant Physiol Biochem* 43: 437-444.

Smeets K, Ruytinx J, Semane B, Van Belleghem F, Remans T, Van Sanden S, Vangronsveld J, Cuypers A. 2008. Cadmium-induced transcriptional and enzymatic alterations related to oxidative stress. *Environ Exp Bot* 63: 1-8.

Soares CRF, Oswaldo JO, de Carvalho JG, Guilherme GR. 2007. Phosphate Nutrition and Arbuscular Mycorrhiza on Amelioration of Cadmium Toxicity in Trema (*Trema micrantha* (L.) Blum.). *Revista Árvore* 31: 783-792.

Song A, Li Z, Zhang J, Xue G, Fan F, Liang Y. 2009. Silicon-Enhanced Resistance to Cadmium Toxicity in *Brassica chinensis* L. is Attributed to Si-suppressed Cadmium Uptake and Transport and Si-Enhanced Antioxidant Defense Capacity. *J Hazard Mater* 172: 74-83.

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

Stolt JP, Sneller FEC, Bryngelsson T, Lundborg T, Schat H. 2003. Phytochelatin and cadmium accumulation in wheat. *Environ Exp Bot* 49: 21-28.

Sun HY, Wang XY, Dai HX, Zhang GP, Wu FB. 2013. Effect of Exogenous Glutathione and Selenium on Cadmium-Induced Changes in Cadmium and Mineral Concentrations and Antioxidative Metabolism in Maize Seedlings. *Asian J Chem* 25: 2970-2976.

Suzuki N. 2005. Alleviation by Calcium of Cd-Induced Root Growth Inhibition in Arabidopsis Seedling. *Plant Biotechnol* 22: 19-25.

Tamaoki M, Freeman JL, Pilon-Smits EAH. 2008. Cooperative ethylene and jasmonic acid signaling regulates selenite resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 146: 1219-1230.

Tamás L, Dudíková J, Ďurčeková K, Halušková L, Huttová J, Mistrík I, Olle M. 2008. Alterations of the gene expression, lipid peroxidation, proline and thiol content along the barley root exposed to cadmium. *J Plant Physiol* 165: 1193-203.

Terry N, Zayed AM, de Souza MP, and Tarun AS. 2000. Selenium in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51: 401-32.

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.

Umar S, Diva I, Anjum NA and M. Iqbal M. 2008. Research Findings II: Potassium Nutrition Reduces Cadmium Accumulation and Oxidative Burst in Mustard (*Brassica campestris* L.) No. 16.

Ünyayar S, Güzel A, Deger, Çelik A, Çekic FÖ, Çevik S. 2010. Cadmium-induced antioxidant status and sister-chromatidexchanges in *Vicia faba* L. *Turk J Biol* 34: 413-422.

Van Hoewyk D, Garifullina GF, Ackley AR, Abdel-Ghany SE, Marcus MA, Fakra S, Ishiyama K, Inoue E, Pilon M, Takahashi H, Pilon-Smits EAH. 2005. Overexpression of AtCpNifS enhances selenium tolerance and accumulation in Arabidopsis. *Plant Physiol* 139: 1518-1528.

Van Huysen T, Terry N, Pilon-Smits EAH. 2004. Exploring the Selenium phytoremediationpotential of transgenic *Brassica juncea* boverexpressing ATP sulfurylase or cystathionine g-synthase. *Int J Phytoremed* 6: 111-118.

Verkleij JAC, Schat H. 1990. Mechanisms of metal tolerance in higher plants. Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects, pp. 179-193.

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

Wagner G. 1993. Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Adv Agron* 51: 173-212.

Wang H, Zhao SC, Liu RL, Zhou W, Jin YJ. 2009. Changes of Photosynthetic Activities of Maize (*Zea mays* L.) Seedlings in Response to Cadmium Stress *Photosynthetica* 47: 277-283.

Wang Q, Song H. 2009. Calcium Protects *Trifolium repens* L. Seedlings against Cadmium Stress. *Plant Cell Reports* 28: 1341-1349.

Wangeline AL, Burkhead JL, Hale KL, Lindblom SD, Terry N, Pilon M, Pilon-Smits EAH. 2004. Overexpression of ATP Sulfurylase in Indian Mustard: Effects on Tolerance and Accumulation of Twelve Metals. *J Environ Qual* 33: 54-60

Watanabe M, Suzuku T. 2002. Involvement of reactive oxygen stress in cadmium-induced cellular damage in Euglena gracilis. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmaco*l 131: 491-500.

Welinder KG. 1992. Superfamily of plants, fungal and bacterial peroxidases. *Curr Opin Struct Biol* 2: 388-393.

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.

Willekens H, Inze D, Van Montagu M, Van Camp W. 1995. Catalases in plants. *Mol Breed* 1: 207-228.

Xiang C, Oliver DJ. 1998. Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1539-1550.

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

Yannarelli GG, Fernández-Alvarez AJ, Santa-Cruz DM, Tomaro ML. 2007. Glutathione reductase activity and isoforms in leaves and roots of wheat pants subjected to cadmium stress. *Phytochemistry* 68: 505-512.

Yao XQ, Chu JZ, Wang GY, 2009. Effects of selenium on wheat seedlings under drought stress. *Biol Trace Elem Res* 130: 283-290.

Yathavakilla S, Caruso J. 2007. A study of Se–Hg antagonism in *Glycine max* (soybean) roots by size exclusion and reversed phase HPLC–ICPMS. *Anal Bioanal Chem* 389: 715-723.

Yılmaz DD, Parlak UK. 2011. Changes in proline accumulation and antioxidative enzyme activities in *Groenlandia densa* under cadmium stress. *Ecol Indic* 11: 417-423.

Zahedi H, Noormohammadi G, Shirani-Rad AH, Habibi D, Boojar MMA. 2009. Effect of zeolite and foliar application of selenium on growth, yield and yield component of three canola cultivar under drought stress. *World Appl Sci* 7: 255-262.

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.

Zhang ZC, Chen BX, Qiu BS. 2010. Phytochelatin Synthesis Plays a Similar Role in Shoots of the Cadmium Hyperaccumulator Sedum alfredii as in Non-Resistant Plants. *Plant Cell Environ* 33: 1248-1255.

Zornoza A, Sánchez-Pardo B, Carpena RRO. 2010. Interaction and Accumulation of Manganese and Cadmium in the Manganese Accumulator *Lupinus albus*. *J Plant Physiol* 167: 1027-1032.