

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Neža KENDA

**PORAZDELITEV SELENA V RAZLIČNIH DELIH
ŠENTJANŽEVKE (*Hypericum perforatum* L.)**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Neža KENDA

**PORAZDELITEV SELENA V RAZLIČNIH DELIH
ŠENTJANŽEVKE (*Hypericum perforatum* L.)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**SELENIUM DISTRIBUTION IN DIFFERENT PARTS OF ST.
JOHN'S WORT (*Hypericum perforatum* L.)**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija agronomije. Opravljeno je bilo na Institutu Jožef Stefan, na oddelku za znanost o okolju, kjer sem ugotavljala vsebnost selena v vzorcih.

Študijska komisija oddelka za agronomijo je za mentorico diplomskega dela imenovala izr. prof. dr. Vekoslavo Stibilj, za somentorja pa akademika prof. dr. Ivana Krefta.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Katja VADNAL
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: izr. prof. dr. Vekoslava STIBILJ
Institut Jožef Stefan, Odsek za znanosti o okolju

Član: akademik. prof. dr. Ivan KREFT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Franc BATIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani veziji.

Neža KENDA

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 633.88:631.816.35:546.23(043.2)
- KG šentjanževka / zdravilna zelišča/ selen / foliarno gnojenje / UV-B sevanje
- KK AGRIS F04
- AV KENDA, Neža
- SA STIBILJ, Vekoslava (mentorica) / KREFT, Ivan (somentor)
- KZ SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
- LI 2010
- IN PORAZDELITEV SELENA V RAZLIČNIH DELIH ŠENTJANŽEVKE
(*Hypericum perforatum* L.)
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP IX, 31, [1] str., 7 pregl., 6 sl., 49 vir.
- IJ sl
- JI sl / en
- AI Selen je esencialen element za ljudi in živali, njegov glavni vir je hrana. Nezadostna količina tega elementa v prehrani privede do znakov pomanjkanja, ob vnosu prevelikih količin pa selen deluje toksično. Težavam, ki jih povzroči nezadostna količina selena v prehrani, se lahko izognemo tudi z uporabo prehranskih dopolnil. V naši raziskavi smo za poskus izbrali šentjanževko (*Hypericum perforatum* L.), ki je dobro raziskana zdravilna rastlina, široko razširjena po Evropi in drugih kontinentih na različnih naravnih rastiščih. Namen našega dela je bil ugotoviti, v kolikšni meri se s foliarnim dodajanjem selena poveča njegova vsebnost v različnih delih rastline, ter kako na vsebnost selena vpliva izpostavljenost rastlin različnim intenzitetam UV-B sevanja. Rastline smo gojili v Botaničnem vrtu Univerze v Ljubljani, v Ljubljani, od maja do septembra. Rasle so na prostem pri različnih intenzitetah UV-B sevanja (naravno, zmanjšano in povečano). Naključno izbrane rastline smo junija poškropili z raztopino natrijevega selenata (10 mgSe/L). Rastline smo septembra vzorčili in posušili na zraku, ločili na posamezne dele in zmleli. Vsebnost selena v posameznih delih rastlin smo izmerili z metodo hidridne tehnike atomske fluorescenčne spektrometrije (HG-AFS). Ugotovili smo, da je kontrolna skupina vsebovala malo selena (od 17 do 119 ng/g suhe snovi), največ v listih in cvetovih, najmanj pa v steblih. Vsebnost selena v rastlinah, ki so bile foliarno škropljene se je povečala v vseh delih rastlin, najbolj pa v listih, ki so bile izpostavljene zmanjšanemu UV-B sevanju in sicer 84 na 14000 ng/g SS. V obeh skupinah smo opazili podobno porazdelitev selena v posameznih delih rastlin ne glede na razmere gojenja. Šentjanževka, obogatena s selenom, bi lahko bila primerna kot prehransko dopolnilo, potrebna pa bi bila kontrola foliarnega gnojenja ter spremljanje koncentracije selena, predvsem v listih rastlin.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 633.88:631.816.35:546.23(043.2)
- CX St. John's wort / medicinal plants/ selenium / foliar application / UV-B radiation
- CC AGRIS F04
- AU KENDA, Neža
- AA STIBILJ, Vekoslava (supervisor) / KREFT, Ivan (co-supervisor)
- PP SI- 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University in Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
- PY 2010
- TI SELENIUM DISTRIBUTION IN DIFFERENT PARTS OF ST. JOHN'S WORT
(*Hypericum perforatum* L.)
- DT Graduation Thesis (university studies)
- NO IX, 31, [1] p., 7 tab., 6 fig., 49 ref.
- LA sl
- AL sl / en
- AB Selenium is an essential element, it's primary source for humans and animals is food. Insufficient doses of selenium in nutrition can result in deficiency, while overdoses can cause toxic reactions. Deficiency problems can be avoided by consumption of selenium enriched plants. We chose St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) as our experimental plant. The aim of work was to find out how foliar spraying of selenium affects it's content in different parts of the plant and how different intensities of UV-B radiation can affect the selenium content. St. John's wort plants were grown outdoors from May to September in Botanical garden in Ljubljana under reduced, ambient and enhanced UV-B radiation levels. We sprayed plants with sodium selenate (10 mgSe/L). Plant samples were air dried and milled. Total selenium content in different plant parts was analyzed by hydride generation atomic fluorescence spectrometry (HG-AFS). Results show that plants in control group had low selenium content (from 17 to 119 ngSe/g dry matter), the highest concentration of selenium was found in leaves and flowers, the least in stems. After foliar spraying selenium content was higher in all plant parts. We noticed the highest difference in concentration in leaves in UV-B reduced group (from 84 without foliar addition to 14000 ng/g dry matter). Otherwise we can see similar distribution of selenium in plant parts in both control and treated group. St. John's wort plants, enriched with selenium, could possibly be used as supplement to human diet. If used in this way, we should control foliar spraying and monitor selenium content, specially in leaves and in the diet.

KAZALO VSEBINE

	Str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key Words Documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	IX
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA IN NAMEN DIPLOMSKE NALOGE.....	2
1.2 DELOVNA HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ŠENTJANŽEVKA	3
2.2 SELEN.....	4
2.2.1 Pomen selena za ljudi	5
2.2.1.1 Metabolizem selena pri ljudeh.....	6
2.2.1.2 Znaki pomanjkanja selena pri ljudeh.....	6
2.2.1.3 Toksičnost selena pri ljudeh	7
2.2.1.4 Prehranska dopolnila	7
2.2.2 Selen v tleh in njegova razpoložljivost	7
2.2.3 Selen in rastline	8
2.2.3.1 Toksičnost selena pri rastlinah	8
2.2.3.2 Obrambni mehanizmi pri rastlinah.....	9
2.2.4 Rastline, obogatene s selenom	9
2.2.5 Ugotavljanje selena v rastlinskih vzorcih	10
2.2.5.1 Vzorčenje in razkroj vzorcev.....	10
2.2.5.2 Metode detekcije selena.....	10
2.2.5.3 Hidridna tehnika atomske fluorescenčne spektrometrije (HG-AFS)	11
2.2.6 Vpliv UV-B sevanja na rastline	12
2.2.6.1 Obrambni mehanizmi rastlin pred UV-B sevanjem	12
3 MATERIALI IN METODE	13
3.1 MATERIAL	13
3.1.1 Postavitev poskusa	113
3.1.2 Aplikacija selena	14
3.1.3 Reagenti in aparature	14
3.1.3.1 Reagenti.....	14
3.1.3.2 Aparature	14
3.2 METODE DELA.....	15
3.2.1 Vzorci	15
3.2.2 Mletje in tehtanje vzorcev	15
3.2.3 Razkroj vzorcev	16
3.2.4 Detekcija selena s HG-AFS	16

3.2.5	Pravilnost in ponovljivost metode	17
3.3	STATISTIČNA ANALIZA	18
4	REZULTATI	19
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	22
5.1	RAZPRAVA	22
5.2	SKLEPI	25
6	POVZETEK	26
7	VIRI	27
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Vsebnost selena v nekaterih izbranih živilih in skupinah živil (Reilly, 1998).....	5
Preglednica 2:	Vnos selena s hrano v nekaterih državah (Smrkolj in sod., 2005).....	6
Preglednica 3:	Najpogosteje uporabljene metode detekcije selena v živilih (cit. po Smrkolj, 2003).....	11
Preglednica 4:	Poskusne skupine rastlin šentjanževke.....	15
Preglednica 5:	Vsebnost selena v posameznih delih šentjanževke iz kontrolne skupine izpostavljene naravnemu UV-B sevanju (UV0), zmanjšanemu UV-B sevanju (UV-) ter povečanemu UV-B sevanju (UV+).....	19
Preglednica 6:	Koncentracija selena v posameznih delih šentjanževke s selenom obogatene in izpostavljene naravnemu (Se(UV0)), zmanjšanemu (Se(UV-)) ter povečanemu (Se(UV+)) UV-B sevanju.....	21
Preglednica 7:	Primerjava koncentracije selena pri različnih rastlinah, ki so bile obogatene s selenom in gojene pri različnih intenzitetah UV-B sevanja.....	24

KAZALO SLIK

Slika 1:	Šentjanževka, različni deli rastline	3
Slika 2:	Shema atomskega fluorescenčnega spektrometra AFS	11
Slika 3:	Shema pretočnega sistema HG-AFS	17
Slika 4:	Določitve selena v certificiranem referenčnem materialu	18
Slika 5:	Vsebnost selena (ng/g) v posamezih delih rastlin šentjanževke pri različnih UV-B obravnavanjih	20
Slika 6:	Vsebnost selena (mg/kg) v posameznih delih s selenom obogatene šentjanževke, ki smo ji dodali selen, pri različnih UV-B obravnavanjh	21

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Met	metionin
SeMet	selenometionin
Cys	cistein
SeCys	selenocistein
AFS	atomska fluorescenčna spektrometrija
HG-AFS	hidridna tehnika atomske fluorescenčne spektrometrije
CRM	certificiran referenčni material
SS	suha snov
CRM	certificiran referenčni material
GPx	družina glutation peroksidaz
D	družina jodotiron reduktaz
TrxR	družina tiredoksin reduktaz
STDEV	standardni odmik
stdev/a	standardni odmik (št. določitev > 2)/ absolutna napaka (št. določitev ≤ 2)
p.a	pro analysi
konc.	koncentracija
razt.	raztopina
cit.	citiat

1 UVOD

Selen (Se) je esencialen kemijski element za ljudi in živali, prisoten pa je v sledovih oziroma ga v naravnem okolju največkrat najdemo v zelo nizkih koncentracijah (100 ng/g). Njegovo pomanjkanje lahko povzroča strukturne in fiziološke spremembe pri ljudeh in živalih, v prevelikih koncentracijah pa je toksičen in pri vnosu, večjem od 3200 µg/dan povzroča selenozo (Reid in sod., 2004).

Pomembnost selena za živali sta leta 1957 prvič dokazala Schwarz in Folz (1957), leta 1973 pa so odkrili vezavo Se v encimu glutation peroksidazi (Rotruck in sod., 1973). Selen je sestavni del številnih selenoproteinov, med drugim tudi selenoaminokislin, selenometionina in selenocisteina.

Vsebnost selena v rastlinah je različna, predvsem pa odvisna od vsebnosti selena v tleh in od sposobnosti rastline za privzem le-tega. Od privzema rastlin je odvisna tudi količina selena v prehrani ljudi in živali, saj je hrana primarni vir selena za ljudi in živali. Priporočljiv dnevni vnos je med 55 in 70 µg/dan za odrasle ženske in moške (Elles in sod., 2000), dejanski dnevni vnos pa je pogosto tudi veliko manjši. Pri premajhnih dnevni odmerkih, manjših od 11 µg/dan, se pojavijo znaki pomanjkanja (Letavayova in sod., 2006). Zato je pomembno zaužiti primerne količine tega elementa. Večje koncentracije selena vsebujejo predvsem živila z veliko vsebnostjo beljakovin, precej manj pa ga je v žitih, mlečnih izdelkih ter sadju in zelenjavi (Reilly, 1998). V zadnjem času se na trgu pojavljajo prehranska dopolnila s selenom, kot alternativa sintetičnim preparatom, s povečano količino naravno prisotnega selena. Z zaužitjem le-teh lahko zadostimo priporočenemu dnevni vnosu Se.

Esencialnost selena za rastline ni dokazana. Znano pa je, da ima v določenih primerih selen pozitivne učinke na rast in obrambo rastlin pred stresom. UV-B sevanje lahko pri rastlini povzroči oksidativni stres. V zadnjem času je vse več indikacij, da selen v majhnih koncentracijah igra pozitivno vlogo pri zmanjšanju oksidativnega stresa, povzročenega z UV-B sevanjem, da torej deluje antioksidativno (Germ in sod., 2007).

Večina raziskav vpliva UV-B sevanja je osredotočena na gojene rastline, večkrat naletimo tudi na podatke o rastlinah iz naravnih ekosistemov. Šentjanževka (*Hypericum perforatum* L.) spada med bolje raziskane rastline naravnih rastišč zaradi potreb farmacevtske industrije pa tudi poznavanja in uporabe v ljudskem zdravilstvu. Znani so njeni pozitivni učinki pri izboljšanju počutja, deluje protivnetno in blaži bolečine. V zadnjem času veliko pozornosti posvečajo delovanju šentjanževke pri zdravljenju različnih depresij, pa tudi pri rakavih obolenjih. Učinkovina hiperforin deluje tudi antiseptično (Toplak Galle, 2000), rutin pa je ena od učinkovin, ki ščiti rastlino pred poškodbami zaradi UV žarkov (Breznik in sod., 2005).

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA IN NAMEN DIPLOMSKE NALOGE

Šentjanževka (*Hypericum perforatum* L.) je dobro raziskana zdravilna rastlina, ki se pogosto uporablja kot naravni antidepresiv, pri zdravljenju nekaterih rakavih obolenj in ima protivnetne učinke. Selen je esencialni mikroelement. Zaradi njegovega pogostega pomanjkanja v tleh lahko ugotovimo tudi majhne vsebnosti selena v rastlinah, zato bi bilo smiselno razvijati tehnike obogatitve rastlin, v našem primeru šentjanževke, s tem esencialnim elementom. Deli šentjanževke so lahko primerni za izdelavo prehranskih dopolnil.

Namen diplomske naloge je ugotoviti, v kolikšni meri se s foliarnim dodajanjem selena poveča njegova vsebnost v posameznih delih gojene šentjanževke (listi, stebela, cvetovi in živice), ter kako se ta koncentracija spreminja pri različnih stopnjah UV-B sevanja.

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Predvidevali smo, da se bo koncentracija selena po foliarni aplikaciji s tem elementom povečala v vseh delih rastline. Sklepamo, da se bo selen različno porazdelil v posamezne dele šentjanževke. Rastline, gojene pri različnih intenzitetah UV-B sevanja, bodo vsebovale različne množine selena.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ŠENTJANŽEVKA

Šentjanževko (*Hypericum perforatum* L., slika 1), uvrščamo v družino krčničevk (Hypericaceae). Je zelnata trajnica s 30 do 100 cm visokimi stebli, ki se dvigajo iz poleglega ukoreninjajočega se dna. Stebla imajo dva razločna robova. Listi so navzkrižno nameščani, jajčasti do črtalasti, sedeči ali zelo kratko pecljati, neizrazito mrežasto žilnati s prosojnimi pikami. Socvetja so mnogocvetna. Časni listi so suličasti ali podolgovati, koničasti ali tudi resasti, navadno celi, redko s temnimi pegami. Prašniki so številni v treh snopičih pred venčnimi listi. Plod je glavica, ki se odpira s 3 do 5 loputami. Cveti od junija do avgusta. Razmnožuje se vegetativno, (živice ali stoloni poženejo pri dnu stebela in se širijo pod zemljo) ali s semeni.



Slika 1: Šentjanževka, (*Hypericum perforatum* L.) (Sturm in Sturm, 1796)

V Evropi je splošno razširjena, raste pa tudi v Aziji, Severni Afriki, Kanarskih otokih in kot neofit v Severni Ameriki, na Havajih, v Avstraliji in na Novi Zelandiji (Seliškar in Wraber, 1996). Raste po suhih travnatih pobočjih, posekah, med grmovjem, po nasipih po celi Sloveniji (Toplak Galle, 2000) do nadmorske višine 1400 metrov.

Šentjanževka je zelo dobro raziskana zdravilna rastlina. V cvetovih in listih so rdeče obarvani naftodiantroni, predvsem hipericin, ki se kopiči v temnih pikah na robu zelenih listov in posebno pogosto v venčnih listih. Pomembni so tudi flavonski in flavonolni glikozidi, predvsem glikozidi kvercetina (rutin, kvercitrin, izokvercitrin). V cvetovih so biflavonoidi, ki jih v drugih delih rastline ni, prav tako pa tudi ne v nobeni drugi vrsti šentjanževke. V žlezah listov, ki so videti kot prozorne pike, je hlapno olje, v katerem so našli metilbutanol, v svežih rastlinskih delih, predvsem v zrelih plodovih, pa najdemo na primer hiperforin, ki deluje antibiotično (Toplak Galle, 2000).

Flavonoidi, hipericin in drugi sekundarni metaboliti so tudi UV-B absorbirajoče snovi, ki rastlino ščitijo pred UV-B sevanjem. Germ in sodelavci (2010) so preučevali šentjanževko, ki je bila izpostavljena različnim intenzitetam UV-B sevanja. Ugotovili so, da se je s povečanjem intenzitete UV-B sevanja povečala tudi koncentracija flavonoidov v listih šentjanževke.

Zaradi vsebnosti zdravilnih snovi je posebno zanimiva za farmacevtsko industrijo, široko znana pa je tudi v ljudskem zdravilstvu. Različnih velikocvetnih vrst šentjanževke, ki se jih goji po vrtovih ali parkih kot okrasno rastlino, nikoli ne uporabljamo v zdravilstvu. Zdravila s suhim ekstraktom šentjanževke so v medicini znana po antidepresivnem delovanju, suha zel pa je lahko tudi sestavina čajev za izboljšanje počutja. V ljudskem zdravilstvu se pripravke šentjanževke (čaj in čajne mešanice, tinktura ali olje) pogosto uporablja za zdravljenje depresije, živčnih obolenj, zdravljenje površinskih ran, opeklin, ozeblin ter drugih kožnih težav. Sveža rastlina je za živino škodljiva, saj povzroča hipericizem - preobčutljivost na svetlobo (Toplak Galle, 2000).

2.2 SELEN

Selen se nahaja v šesti skupini periodnega sistema in spada med metaloide, ker ima tako lastnosti kovin kot nekovin. Selen ima podobne lastnosti kot žveplo (Reilly, 1998).

Je precej redek element, pogosto ga najdemo skupaj s telurjem (Te) v sulfidnih mineralih. V naravi je šest naravnih izotopov selena (^{74}Se , ^{76}Se , ^{77}Se , ^{78}Se , ^{80}Se in ^{82}Se) (Brenčič in Lazarini, 1995). V anorganskih spojinah ima lahko različna oksidacijska števila: -2 (selenid), 0 (elementarni Se), +4 (selenit) in +6 (selenat). Je tudi hlapnih in nehlapnih organskih spojinah (Pyrzynska, 1996), med katerimi ima pomembno mesto aminokislina selenocistein (SeCys), ki je sestavni del selenobeljakovin. Selenobeljakovine, ki imajo biološko vlogo v organizmu, so (Roy in sod., 2005):

- glutation peroksidaze (GPx), so antioksidativni encimi, odstranjujejo H_2O_2 , lipidne in fosfatne hiperoksidante
- jodotironin dejodinaze (D), kontrolirajo metabolizem hormonov žleze ščitnice;
- tiredoksin reduktaze (TrxR), regulirajo redoks procese v celici;
- selenofosfat sintetaza sodeluje pri biosintezi SeCys.

2.2.1 Pomen selena za ljudi

Selen je za življenje živali in ljudi nujno potreben, esencialen element. Po letu 1957, ko je bila prvič ugotovljena njegova esencialna vloga, so odkrili še veliko bolezni, ki so povezane s pomanjkanjem selena. V zadnjih letih je v ospredju zanimanje za zaščitne učinke selena v zvezi z rakom oziroma za selen v glutation peroksidazi, ki ščiti DNK in druge dele celice pred oksidativnim stresom (Letavayova in sod., 2006).

Preskrbljenost s selenom se lahko ocenjuje na različne načine, lahko tudi na podlagi celodnevne obroka. V večini evropskih držav je preskrbljenost s selenom nekoliko manjša od priporočene (Combs, 2001), vendar so znaki hudega pomanjkanja vseeno redki. Priporočeni dnevni vnos selena, ki je potreben za optimalno sintezo selenoproteinov, pri zdravih odraslih osebah je 55 $\mu\text{gSe/dan}$, otroci ga potrebujejo nekoliko manj, nosečnice pa nekoliko več (60 $\mu\text{gSe/dan}$). Dnevni vnosi, ki so manjši od 11 $\mu\text{gSe/dan}$, na daljši rok povzročajo znake pomanjkanja, medtem ko so vnosi večji od 3200-5000 $\mu\text{gSe/dan}$ toksični in povzročajo selenozo (Reid in sod., 2004).

Preskrbljenost s selenom je odvisna tudi od njegove biorazpoložljivosti, ki se poveča s prisotnostjo antioksidantov in primerno količino metionina v prehrani (Foster in Sumar, 1997). Rastlini s slabo biorazpoložljivostjo sta na primer soja in koruza, z dobro razpoložljivostjo pa pšenica in nekatera druga žita. Preglednica 1 prikazuje nekatera izbrana živila, ki vsebujejo večje koncentracije selena.

Preglednica 1: Vsebnost selena v nekaterih izbranih živilih in skupinah živil (Reilly, 1998)

Skupina živil:	Vsebnost selena ($\mu\text{g/g}$ sveže snovi)
Žitarice	0,01-0,55
Meso, ribe, jajca	0,01-0,36
Mleko, mlečni izdelki	<0,001-0,17
Sadje in zelenjava	<0,001-0,022
Nekatera izbrana živila z veliko vsebnostjo Se:	
Goveje ledvice	0,78-1,45
Brazilski orešček	0,85-53
Brokoli	<0,001-0,46
Raki	0,028-1,26
Jastog	0,08-4,43
Gobe	0,01-1,40

Smrkolj in sod. (2005) so preučevali vsebnost selena v celodnevem obroku hrane slovenskih vojakov in ugotovili, da z uravnoteženo prehrano lahko zadostimo dnevnim potrebam po seleno, medtem ko podatki za nekatere slovenske domove za starejše občane kažejo pomanjkanje selena v prehrani starostnikov (Smrkolj in sod. 2005). Najvišje koncentracije selena so, pričakovano, ugotovili v posameznih živilih, ki so bogata z beljakovinami (meso, jajca in ribe). Pograjc in sod. (2010) prav tako navajajo podatke, ki govorijo o zadostni količini dnevno zaužitega selena pri slovenskih vojaki.

Preglednica 2 prikazuje vsebnost selena v celodnevem obroku hrane v Sloveniji v primerjavi z vsebnostjo selena v celodnevem obroku hrane v nekaterih drugih evropskih državah. V Sloveniji, Švici in na Nizozemskem je vnos selena s hrano ustrezal

priporočenemu dnevnu vnosu, medtem ko na Hrvaškem, Poljskem, v Avstriji in Turčiji lahko opazimo pomanjkanje selena.

Preglednica 2: Vnos selena s hrano v nekaterih državah (Smrkolj in sod., 2005)

Država	Vnos selena ($\mu\text{gSe}/\text{dan}$)
Slovenija	87 ± 28^a (34-163); 40^b ; 30^b
Avstrija	42,9
Hrvaška	27,3; 33,9
Nizozemska	67
Poljska	30-40, 19-32
Španija	32,9
Švica	70
Turčija	30

^a Podatki za slovenske vojake

^b Podatki iz domov za starejše občane

Selena primanjkuje tudi na Finskem, Angliji, medtem ko so na nekaterih predelih Kitajske tudi območja s selenozo (Smrkolj, 2003).

2.2.1.1 Metabolizem selena pri ljudeh

Glavni vir selena za človeka je živež, pri raznovrstni prehrani pa sta selenoaminokislini selenometionin in selenocistein najbolj pogosti obliki selena, ki jih zaužijemo. Razpoložljivost selena je odvisna od oblike, v kateri se nahaja, bolj dostopen pa je v organskih oblikah. Znano je, da je meso vir dobro razpoložljivega selena, ker vsebuje ta element večinoma v obliki selenocisteina in selenometionina. Absorpcija selena v intestinalnem traktu je zelo dobra, približno 80 % selena, ki ga dobimo z živežem, se absorbira v tankem črevesju (Navarro-Alarcon in Cabrera-Vique, 2008). Selenometionin se lahko pretvori v selenocistein ali pa se nespecifično vgradi v beljakovine, selenocistein pa se pretvori do H_2Se , ki je vmesni produkt pri metabolizmu selena. Selenove zvrsti se po telesu transportirajo s krvjo in odlagajo v telesnih organih. Pri zadostni preskrbljenosti s selenom največ selena vsebujejo jetra in ledvice, manj pa vranica in trebušna slinavka. Selenove spojine se pretvorijo v selenit oziroma naprej reducirajo do selenidov (Reilly, 1996).

2.2.1.2 Znaki pomanjkanja selena pri ljudeh

S pomanjkanjem selena sta povezani predvsem dve bolezni. Prva je Keshanova bolezen ali kardiomiopatija, za katero so značilne predvsem težave s srcem, druga pa je Keshan-Beckova bolezen, ki prizadane predvsem sklepe in mišice. Ti dve bolezni sta pogosti predvsem na območjih, kjer beležijo pomanjkanje selena v tleh, posledično pa tudi v prehrani ljudi. Pomanjkanje selena je močno povezano tudi z rakavimi obolenji, oslabljenim imunskim sistemom in napredovanjem nekaterih virusnih bolezni (HIV in AIDS), povečano možnostjo spontanih splavov ter zmanjšano plodnostjo, motenim

delovanjem ščitnice, kardiovaskularnimi obolenji in drugimi boleznimi (Letavoyeva in sod., 2006).

2.2.1.3 Toksičnost selena pri ljudeh

Selen je v prevelikih odmerkih toksičen. Prevelike koncentracije selena povzročajo poškodbe DNK in dodatne oksidativne poškodbe. Tipični znaki zaužitja prevelikih količin selena so morfološke spremembe nohtov in izguba las, pri hudi zastrupitvi tudi degeneracija jeter in ledvic, miokardialna kongestija in druge težave (Letavoyeva in sod., 2006). Zato moramo biti pri uporabi prehranskih dopolnil in drugih s selenom obogatenih izdelkov previdni.

2.2.1.4 Prehranska dopolnila

Prehranska dopolnila so živila, katerih namen je dopolnjevati prehrano. So koncentrirani viri posameznih ali kombiniranih hranil ali drugih snovi s hranilnim ali fiziološkim učinkom. Vsebujejo lahko vitamine, minerale, aminokisliline, maščobne kisline, vlaknine, rastline ali rastlinske izvlečke, mikroorganizme ter druge snovi s hranilnim ali fiziološkim učinkom pod pogojem, da je njihova varnost znanstveno utemeljena. Prehranska dopolnila, ki vsebujejo rastlinske izvlečke, morajo biti v skladu s predpisom, ki ureja razvrstitev zdravih rastlin (Pravilnik o prehranskih dopolnilih, 2003).

V zadnjem času se v kmetijstvu vedno bolj uporablja pristope, ki vodijo k izboljšanju učinkovitosti hrane. Nekatere rastline imajo sposobnost zadrževanja večjih količin življenjsko pomembnih elementov, ki jih v človeški prehrani po navadi primanjkuje, na primer selen, železo in cink. Uporaba takšnih rastlin oziroma prehranskih dopolnil v vsakodnevni prehrani se zdi učinkovita in enostavna, težava pa je v tem, da je vsebnost zelenih elementov v rastlinah, ki rastejo v naravnem okolju, precej variabilna, kar predstavlja precejšnjo oviro.

2.2.2 Selen v tleh in njegova razpoložljivost

Količina, porazdelitev in dostopnost selena v tleh vpliva na količino tega elementa v rastlinah in posledično v prehranjevalni verigi. Porazdelitev selena v tleh je zelo neenakomerna in odvisna od klimatskih razmer, narave in izvora tal (Kabata-Pendias, 2004).

Najpomembnejši vir selena v okolju je preperevanje kamnin. Večje vsebnosti selena ima skrilavec (0,6 mg/kg), medtem ko ga apnenec in peščenjak vsebujeta manj (<0,1 mg/kg). Tla, ki so nastala na sedimentnih kamninah, vsebujejo več selena kot tista, ki so nastala na magmatskih kamninah (granit). Pirit in nekateri drugi minerali, ki vsebujejo veliko žvepla, vsebujejo tudi selen (Wu, 2004).

Poleg vsebnosti selena v tleh je, posebno za rastline, pomembna predvsem njegova dostopnost, ki jo pogojuje oblika, v kateri se ta element nahaja. Najpomembnejši talni dejavniki, ki vplivajo na dostopnost selena, so procesi fiksacije, pH, zbitost tal, klimatske razmere, prisotnost drugih elementov in mikrobiološka aktivnost. Pomembno vlogo pri

zadrževanju oziroma vezavi selena imajo glineni minerali, zato lahko glinasta tla vsebujejo več selena kot peščena tla. Veliko sposobnost vezave selena, večjo kot glineni minerali, ima tudi organska snov. Selen v organski snovi najdemo v kompleksnih oblikah, vezanega v proteine s pomočjo mikroorganizmov in rastlin (Wu, 2004).

Na dostopnost selena, poleg železa (Fe), na katerega se selen lahko veže, kar zmanjša dostopnost, vpliva tudi prisotnost žvepla (S), saj med njima obstaja kompetitivno razmerje zaradi fizikalno-kemijske podobnosti, posebno če sta prisotna v obliki sulfata in selenata. Selenat tekmuje s sulfatom za vezavo na aktivna mesta permeaze, ki je odgovorna za črpanje sulfata. Selenat za vezavna mesta tekmuje tudi s kloridom, nitratom in fosfatom, pomembna pa je tudi vsebnost organske snovi v tleh, saj se selen lahko veže na organske komponente in tako postane manj dostopen (Johnsson, 1991).

2.2.3 Selen in rastline

Vsebnost selena v rastlinah je odraz vsebnosti selena v tleh. Danes ni popolnoma jasno, ali je selen nujno potreben za rast rastlin, znano pa je, da pri rastlinah pospešuje antioksidacijsko aktivnost, zavira procese, ki so povezani s staranjem in omili stres zaradi močne svetlobe in tudi suše. Kljub temu, da selen ni priznan kot neobhoden element za rastline, pa ima vseeno ugodne učinke na rastline (Germ in Stibilj, 2007).

Odvzem selena in njegova akumulacija v rastlini je odvisna od kemične oblike, v kateri je selen v tleh, njegove koncentracije, pH, zasoljenosti, količine in oblike organske snovi in drugih talnih dejavnikov (Kabata-Pendias, 2001). Privzem selena je odvisen tudi od temperature, saj rastline privzemajo večje količine selena pri temperaturi nad 20 °C kot pri temperaturah pod 15 °C.

Rastline se med seboj razlikujejo po sposobnosti absorpcije selena iz tal in kopičenju v svoja tkiva. Rastline navadno vsebujejo več selena v nadzemnih delih, predvsem v listih oziroma v aktivno rastočih tkivih, manj pa v koreninah (Smrkolj in sod., 2006a).

Večina rastlin v listih vsebuje manj kot 25 µgSe/gSS, nekatere rastline, ki jih pogosto najdemo na tleh, bogatih s selenom, pa so sposobne akumulirati mnogo večje količine selena (Ellis in Salt, 2003). Rastline, ki lahko akumulirajo večje količine selena delimo na indikatorske rastline in primarne akumulatorje, ki lahko akumulirajo tudi več tisoč mgSe/kg. Primarni akumulatorji selena so nekatere rastline iz rodu grahovcev (*Astragalus*), na primer vrsta *Astragalus bisulactus*. Indikatorske rastline, ki so pokazatelji večjih količin selena v tleh, pa so nekatere rastline iz rodov nebine (*Aster*), lobode (*Atriplex*) in medena detelja (*Melilotus*), prav tako pa tudi rjava gorjušica (*Brassica juncea*) (Ellis in Salt, 2003). Pri rastlinah, ki ne akumulirajo selena, se toksično delovanje lahko pojavi pri vsebnosti pod 100 µg Se/g suhe snovi ali celo manj kot 10 µg Se/g suhe snovi (na primer pri pšenici). Večje količine selena lahko, med gojenimi rastlinami, privzame brokoli (Terry in sod., 2000; Reilly, 1998).

2.2.3.1 Toksičnost selena pri rastlinah

Če so rastline med gojenjem izpostavljene prevelikim količinam selena, pride do vidnih posledic v slabši rasti, pojavijo se rdečkaste pike na koreninah in črne na listih, listi

začnejo rumeneti in se sušiti, zmanjša se sinteza proteinov, pride pa lahko tudi do odmiranja.

Najpogostejši toksični obliki selena za rastline sta selenat in selenit, saj ju rastline absorbirajo in spreminjajo v organske oblike. Nekatere študije kažejo na večjo toksičnost selenita, ker se hitreje pretvori v selenoaminokislino in naprej v proteine (Terry in sod., 2000). Mehanizem, ki povzroča toksičen odziv, je da se selenometionin (SeMet) in selenocistein (SeCys) lahko vključita v proteine namesto metionina (Met) in cisteina (Cys), kar lahko spremeni terciarno strukturo proteinov in privede do usodnih katalitičnih aktivnosti le-teh.

Mejne vrednosti toksičnosti so odvisne od starosti rastline, prisotnosti sulfatnih ionov ter od vrste rastline (Terry in sod., 2000). Bolj občutljive so mlajše rastline.

2.2.3.2 Obrambni mehanizmi pri rastlinah

Pred toksičnostjo selena se bolje branijo rastline, ki lahko akumulirajo večje količine selena (Terry in sod., 2000), na primer brokoli in rjava gorjušica. Nekateri obrambni mehanizmi so:

- fitovolatizacija oziroma pretvorba selena v hlapno obliko. Na izhlapevanje selena vpliva tudi prisotnost rizosfernih mikrobov, odvisno pa je tudi od koncentracije selena in njegove kemijske oblike.
- izključevanje selenocisteina iz procesa vključevanja v beljakovine;
- kopičenje selena v vakuolah;
- sinteza nebeljakovinskih aminokislin.

2.2.4 Rastline, obogatene s selenom

S selenom obogatene rastline so ena izmed rešitev težav s pomanjkanjem selena v prehrani ljudi. Poleg številnih selenovih preparatov, ki jih ljudje uporabljajo ob težavah s pomanjkanjem ali preprečevanju bolezni povezanih s pomanjkanjem selena, so obogatene rastline oziroma prehranska dopolnila ena izmed možnosti, ki so lahko vir selena.

Pomembno je, da najdemo rastline, ki so sposobne tolerirati in transformirati selen v bioaktivne snovi (Pyrzynska, 2009). V zadnjem času poteka tudi veliko raziskav na področju gojenja s selenom obogatenih rastlin. Tako raziskane rastline so med drugim tudi ajda (Smrkolj in sod., 2006b); Stibilj in sod., 2004; Ožbolt in sod. 2008), buče (Germ in sod., 2005), radič (Germ in sod., 2007) in grah (Smrkolj in sod., 2006a).

Pri rjavi gorjušici (*Brassica juncea*) so laboratorijske raziskave potrdile, da je sposobna zadrževanja večjih količin selena in bora v listih in steblih, v kolikor raste na tleh, bogatih s temi minerali. Dobre rezultate pa so dobili tudi pri hidroponskem gojenju s hranilno raztopino, ki je vsebovala selen. Obogatena rastlina je lahko uporabna v prehrani kot prehransko dopolnilo. Tako bi lahko zadostili priporočenemu dnevni vnosu selena v organizem (50 do 70 µg/dan) (Elles in sod., 2000).

Koncentracijo naravno prisotnega selena lahko povečamo na različne načine:

- dodajanje selena v hranilno raztopino (hidroponsko, aeroponsko gojenje, foliarno škropljenje);
- namakanje semen;
- dodajanje selena z mineralnimi gnojili;
- genetske spremembe, ki omogočajo akumulacijo selena.

2.2.5 Ugotavljanje selena v rastlinskih vzorcih

Koncentracijo selena v rastlinskih vzorcih lahko ugotavljamo na več načinov. Metoda merjenja mora biti prilagojena meritvam majhnih vsebnosti selena, saj ga rastline navadno vsebujejo v sledovih (ng/g). Zaradi kompleksne vezave selena v zgradbo rastlin je pred detekcijo potreben popoln razkroj vzorcev, sočasno pa moramo preprečiti izgube zaradi nastanka lahko hlapnih oblik selena.

2.2.5.1 Vzorčenje in razkroj vzorcev

Vzorčenje preiskovanega materiala je precej pomembna faza priprave vzorca, saj homogenost vzorca vpliva na pravilnost rezultatov.

Pripravljen vzorec je potrebno razkrojiti, kar je ena najbolj kritičnih faz v postopku ugotavljanja selena. Razkroj lahko poteka na več načinov, večini je skupna razgradnja organske snovi in pretvorba selena v topno obliko v raztopini. Oksidacija lahko poteka na suh ali moker način. S suhim postopkom vzorec upepelimo s segrevanjem pri visoki temperaturi ob prisotnosti zraka in kisika. Ta postopek ni najbolj primeren zaradi izgub hlapnih spojin med segrevanjem (Reilly, 1996). Pri mokrem postopku pa uporabljamo mineralne kisline ali njihove mešanice pri povišani temperaturi.

Za ugotavljanje selena je bolj primeren moker razkroj v zaprtem sistemu, ker zagotavlja manjše izgube zaradi hlapnosti, postopek je hitrejši, zmanjša pa se tudi možnost zunanje kontaminacije (Combs in Combs, 1986). Uporabljajo se predvsem reagenti z velikim oksidacijskim potencialom, kot so dušikova kislina, mešanica dušikove in žveplove kisline ali mešanica žveplove kisline in vodikovega peroksida. Zaradi prisotnosti silicija v rastlinskih vzorcih pa se uporablja tudi fluorovodikova kislina (HF) (Vassileva in sod., 2001). Slaba stran mokrega postopka ugotavljanja selena je, da lahko uporabljamo le majhne zatehte vzorca, kar oteži reprezentativnost in homogenost analiziranega vzorca.

2.2.5.2 Metode detekcije selena

Preglednica 3 prikazuje najpogosteje uporabljene metode detekcije selena v živilih. Izbira metode je odvisna od koncentracije selena v vzorcu, hlapnosti elementa, prisotnosti motečih zvrsti, zahtevane natančnosti in zanesljivosti, razpoložljivosti opreme, časa ter cene analize.

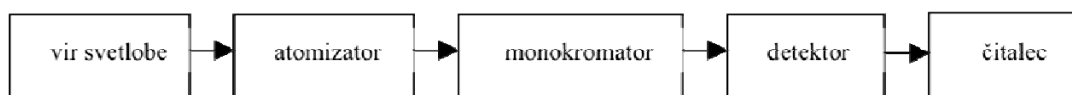
Preglednica 3: Najpogosteje uporabljene metode detekcije selena v živilih (cit. po Smrkolj, 2003)

Metode detekcije	Mera zaznavnosti (ng)
Radiokemična nevtronska aktivacijska analiza	10-20
Atomska fluorescenčna spektroskopija (AFS) <ul style="list-style-type: none">• Hidridna tehnika (HG-AFS)	2-5
Atomska absorpcijska spektroskopija (AAS) <ul style="list-style-type: none">• Plamenska (FAAS)• Hidridna tehnika (HG-AAS)	500 0,02-2
Induktivno sklopljena plazma (ICP) <ul style="list-style-type: none">• Optična emisijska spektrometrija• Atomska emisijska spektrometrija (ICP-AES)• Masna spektrometrija (ICP-MS)	50-100 1 0,063-1,3
Plinska kromatografija <ul style="list-style-type: none">• Zajetje elektronov• Masna spektrometrija	0,5pg 0,05-1
Voltametrij	0,1-5

2.2.5.3 Hidridna tehnika atomske fluorescenčne spektrometrije (HG-AFS)

Metoda atomske fluorescenčne (AFS) spektrometrije je v večji meri uporabna v zadnjem času zaradi uporabe primerne separacijske tehnike, hidridne tehnike. Metoda ima veliko občutljivost, saj vključuje ločitev analita od osnovne raztopine kar pa omogoča tudi boljšo mejo zaznavnosti, poveča natančnost in točnost rezultatov (Vandecasteele in Block, 1993). Pri hidridni tehniki se selen izloči iz raztopine razkrojenega vzorca v obliki vodikovega selenida (pretvorba analita v nakisanem vzorcu do hidrida in pretvorba v plinsko fazo) ter se transportira z nosilnim plinom do atomizatorja (Dedina, 1995). Za tvorbo selenovega hidrida (H_2Se) se najpogosteje uporablja reducent natrijev tetrahidroborat (III) ($NaBH_4$), ki pri $pH \leq 1$ razpade in reducira $Se(IV)$ do vodikovega selenida. Inerten nosilni plin nato hlapno obliko selena prenese v atomizator. Z ločitvijo analita od osnove se izognemo spektralnim motnjam.

Metoda AFS se lahko uporablja za analizo 25 elementov, najpogosteje za določanje As, Cd, Hg, Pb in Se. Shema 2 prikazuje metodo AFS, ki je zasnovana na principu absorpcije svetlobe, ki jo prosti atomi absorbirajo iz črtastega ali kontinuiranega izvora, pri prehodu iz vzbujenega v osnovno stanje pa fluorescirajo. Intenziteta svetlobe je proporcionalna absorbirani svetlobi in številu atomov analita. Fluorescirano svetlobo merimo z detektorjem, ki je nameščen pravokotno na smer svetlobe iz vira za vzbujanje in je običajno fotopomnoževalka.



Slika 2: Shema atomskega fluorescenčnega spektrometra AFS (cit. po Smrkolj, 2003)

2.2.6 Vpliv UV-B sevanja na rastline

UV-B sevanje je sevanje z valovno dolžino med 280 in 320 nm. Rastline se na povečano UV-B sevanje odzivajo zelo različno. Odzivi so različni glede na vrsto, sorte, populacije, genotip, stopnjo razvoja, fiziološko stanje rastline, količino dodanega UV-B sevanja ter od drugih biotskih in abiotskih dejavnikov. Raziskave so pokazale, da je pri ajdi prišlo do zmanjšanja biomase pri povečanem UV-B sevanju. Nasprotno pri nekaterih rastlinah, na primer jagodi, ne pride do zmanjšanja oziroma lahko pride tudi do povečanja biomase, kot pri bobu (Breznik in sod., 2009). Germ in sodelavci (2005) so preučevali vpliv naravnega ter zmanjšanega UV-B sevanja na pridelek buč (*Cucurbita pepo* L.) ter ugotovili, da se je ob zmanjšanju UV-B sevanja pridelek povečal. Rastlinam so dodajali tudi selen ter ugotovili, da ima ta pomembno vlogo pri zagotovitvi pridelka pri naravnem UV-B sevanju.

Na prodiranje UV-B sevanja skozi list vplivajo anatomija lista, vsebnost in porazdelitev UV-B absorbirajočih snovi in fiziološki procesi. Prvi filter UV-B sevanja je listna povrhnjica. Če listi vsebujejo več UV-B absorbirajočih snovi, prepuščajo manj sevanja.

UV-B sevanje pri rastlinah vpliva predvsem na DNK, aminokisljine, proteine in citoskelet, lipide, rastlinske hormone in pigmente. Ob absorpciji UV-B fotonov nastane množica fotoproduktov, ki lahko med podvojevanjem DNK povzročijo mutacije. Na ciljnih celicah lahko povzročajo škodo neposredno zaradi absorpcije ali pa posredno zaradi nastanka prostih radikalov. Znano je, da UV-B sevanje povzroča oksidativni stres, lahko direktno ali posredno zmanjšuje neto fotosintezo (Allen in sod., 1998), pogosto prihaja tudi do nastanka morfoloških sprememb, kot so spremenjena debelina listov, gostota listnih rež, zmanjšanje dolžine glavnega in stranskih stebel, sprememba števila cvetov in časa cvetenja in druge spremembe. Pogosto se zmanjša listna površina, tako zaradi manjših listov kot tudi manjšega števila listov, kar je lahko posledica manjših celic ali manjšega števila celic, lahko pa obojega.

2.2.6.1 Obrambni mehanizmi rastlin pred UV-B sevanjem

Rastline se pred poškodbami UV-B sevanja lahko zavarujejo na več načinov. Stresni odziv rastline je usmerjen v preprečevanje in popraviljanje poškodb zaradi stresnega dejavnika (Trevini in Teramura, 1989). Eden od teh je tvorba UV absorbirajočih pigmentov, na primer flavonoidov. Ti so pri višjih rastlinah predvsem v epidermisu in zgornjih plasteh mezofila, v vakuolah ali vezani v celične stene ter v manjši meri lahko tudi v kloroplastih (Bornman in Teramura, 1993). Flavonoidi so antioksidanti in ščitijo rastlino pred oksidativnim stresom.

Epikutikularni vosek, ki sicer šibko absorbira UV-B sevanje, dobro služi za odboj svetlobe in UV sevanja (Bornman in Teramura, 1993), prav tako tudi epidermalne strukture, kot so listni lasi pri oljki.

3 MATERIALI IN METODE

V okviru diplomske naloge smo ugotavljali koncentracijo selena v različnih delih šentjanževke (*Hypericum perforatum* L.) s tehniko hidridne atomske fluorescenčne spektrometrije (HG-AFS) pri rastlinah kontrolne skupine ter rastlinah, ki so bile foliarno gnojene z raztopino natrijevega selenata (Na_2SeO_4) s koncentracijo 10 mgSe/L. Rastline so bile gojene pri različnih intenzitetah UV-B sevanja v Botaničnem vrtu Univerze v Ljubljani v Ljubljani, ki leži na nadmorski višini 320 m.

Morfogenezne lastnosti poskusne rastline ter rezultati ekofizioloških meritev (fotosinteza, transpiracija, fotokemična učinkovitost) so opisane v diplomskem delu Franje Pajk (2006).

3.1 MATERIAL

Izbrano poskusno rastlino šentjanževko so z metodo mikropropagacije razmnožili na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo v Žalcu leta 2004. Sadike so nato prezimile v rastlinjaku. Rastline so bile presajene v cvetlične lonce velikosti 15 x 15 x 15 cm (po ena sadika na cvetlični lonec) v ilovnato prst z dodatkom šote v Botaničnem vrtu Univerze v Ljubljani, Ljubljana (koordinate 46°35'S, 14°55' V, 320 m nadmorske višine) 20.5.2005. Rastline so stale na prostem, bile so redno zalivane. Vzorčili smo jih štirinajst tednov po saditvi.

3.1.1 Postavitev poskusa

Rastline so bile naključno razporejene v 3 skupine, glede na intenziteto UV-B sevanja. Izpostavljene so bile naravnemu UV-B sevanju (UV0), zmanjšani (UV-) in povečani (UV+) intenziteti UV-B sevanja.

Zmanjšanje UV-B sevanja smo dosegli tako, da smo rastline gojili pod Mylar folijo, napeto na aluminijast okvir 80 cm nad tlemi. Mylar folija ne prepušča svetlobe z valovnimi dolžinami krajšimi od 318 nm (UV-B in UV-C).

UV-B sevanje smo dodali z uporabo Q-Panel UV-B 313 luči (Cleveland, OH, ZDA). Šest žarnic je bilo nameščenih v aluminijastem okvirju 105 cm nad površino tal. Luči smo ovili s celuloznimi filtri, ki odrežejo UV-C sevanje. Odmerki dodanega UV-B sevanja simulirajo 17 % redukcijo ozona v zgornji plasti atmosfere. Izračunane in prilagajane so bile tedensko po računalniškem programu, ki sta ga objavila Björn in Murphy (1985), z uporabo generaliziranega akcijskega spektra po Caldwellu (1968). Luči so bile prižigane vsak dan okrog poldneva, ko je tudi naravno UV-B sevanje najmočnejše.

Tudi rastline kontrolne skupine (UV0) so bile gojene pri enakih razmerah kot rastline UV+, vendar pa smo na žarnice, s katerimi smo dodajali UV-B sevanje, namestili filtre iz Mylar folije, ki ne prepuščajo niti UV-C niti UV-B sevanja. Rastline kontrolne skupine UV0 so bile tako izpostavljene le naravnemu UV-B sevanju.

3.1.2 Aplikacija selena

Tri tedne po sajenju je bila naključno izbrana skupina rastlin, ki so bile po listih škropljene z raztopino selena, s koncentracijo 10 mgSe/L, v obliki natrijevega selenata (Na_2SeO_4). Tako smo dobili šest poskusnih skupin, ki so opisane v preglednici 4. Skupine rastlin, ki jim selena nismo dodali, nam služijo kot kontrolne skupine. V času gnojenja s selenovo raztopino so imele rastline šentjanževke ne več kot štiri liste, ki pa v analize niso bili vključeni.

3.1.3 Reagenti in aparature

3.1.3.1 Reagenti

Za razkroj vzorcev in pripravo raztopin smo potrebovali:

- deionizirana voda MilliQ (Millipore)
- 65% HNO_3 (Merck, suprapur)
- 96% H_2SO_4 (Merck, suprapur)
- 30% HCl (Merck, suprapur)
- 37% HCl (Merck, p.a)
- 30% H_2O_2 (Merck, p.a)
- V_2O_5 (Merck, p.a)
- 40% HF (Merck, suprapur)
- NaOH (Merck, puriss p.a)
- NaBH_4 (Fluka, purum p.a).

3.1.3.2 Aparature

Pri pripravi vzorcev in meritvah so bile uprabljene naslednje aparature:

- ahatni planetarni mlin (FRITSCH, Pulverisette 7)
- kavni mlinček (TEFAL, Prep'line)
- peristaltična črpalka (Ismatec, MCP 380), njen pretok smo uravnavali s cevmi različnih notranjih premerov (0,78 mm, 1,02 mm, 2,06 mm) iz Tygona LFL (Ismatec)
- sušilnik plinov (Nafion dryer, Perma Pure Products)
- AFS detektor (Excalibur, PS Analytical) s selenovo žarnico z votlo katodo z dodatnim napajanjem (Super Lamp Photon), valovna dolžina 196 mm, primarni tok 20 mA, sekundarni tok 25 mA
- drugo: analitska tehtnica, termo blok (Termoproc), rekorder.

3.2 METODE DELA

Delo je potekalo na Institutu Jožef Stefan. Zračno suhe vzorce je bilo najprej potrebno ločiti (listi, stebela, cvetovi in živice). Posamezne dele rastlin je bilo potrebno zmleti ter izmeriti vsebnost selena z metodo HG-AFS.

3.2.1 Vzorci

V vsaki skupini (preglednica 4) je bilo 7 ali 8 rastlin. Naključno smo izbrali polovično število od vsake skupine rastlin in jih razporedili v dve ponovitvi. Vsaki rastlini smo ločili liste od stebel, živice, cvetove in jih spravili v označene vrečke. Vsaka ponovitev skupine torej vsebuje združene posamezne dele (list, steblo, živice, cvet) treh ali štirih naključno izbranih rastlin. Na ta način smo dobili vzorce za analizo v dveh ponovitvah. Za določitev selena smo vsako ponovitev analizirali v najmanj dveh paralelkah.

Preglednica 4: Poskusne skupine rastlin šentjanževke

Oznaka skupine	UV-B sevanje	Dodatek selena	Številka rastline	Št. vzorcev
UV-	Zmanjšano	Ne	1,3,6,8	2
			4,2,7,10	
Se(UV-)	Zmanjšano	Da	1,3,4,6	2
			2,7,8,9	
UV0	Naravno	Ne	1,3,6	2
			4,7,9,8	
Se(UV0)	Naravno	Da	1,3,6,9	2
			2,5,7,10	
UV+	Povečano	Ne	1,3,6	2
			4,5,7,9	
Se(UV+)	Povečano	Da	1,3,6,9	2
			2,4,5,8	

3.2.2 Mletje in tehtanje vzorcev

Stebela vzorčnih rastlin smo zmleli v kavnem mlinčku (TEFAL, Prep'line). Za mletje listov smo uporabili ahatni planetarni mikro mlin (FRITSCH, Pulverisette 7), in sicer pri hitrosti 2600 obratov / minuto (10 minut) in nato 2800 obratov / minuto (2 minuti), cvetove pa pri hitrosti 2600 obratov / minuto (13 minut) in nato 2800 obratov / minuto (2 minuti). Pred vsakim mletjem smo zaradi nevarnosti kontaminacije vzorcev očistili delovno površino in mlin (ahatni lončki s kroglicami). Kjer je bilo vzorcev živic in cvetov manj od 2 g, smo se odločili za ročno mletje vzorcev s pomočjo tekočega dušika in vzorec homogenizirali v ahatni terilnici.

Po mletju smo vse vzorce prenesli v plastične posodice, le-te pa shranili v plastične vrečke in do analize hranili v temnem prostoru.

Za odtehtovanje vzorcev za meritev selena smo uporabili analitsko tehtnico. Pred vsakim ponovnim tehtanjem smo površino očistili z etanolom zaradi nevarnosti kontaminacije vzorcev.

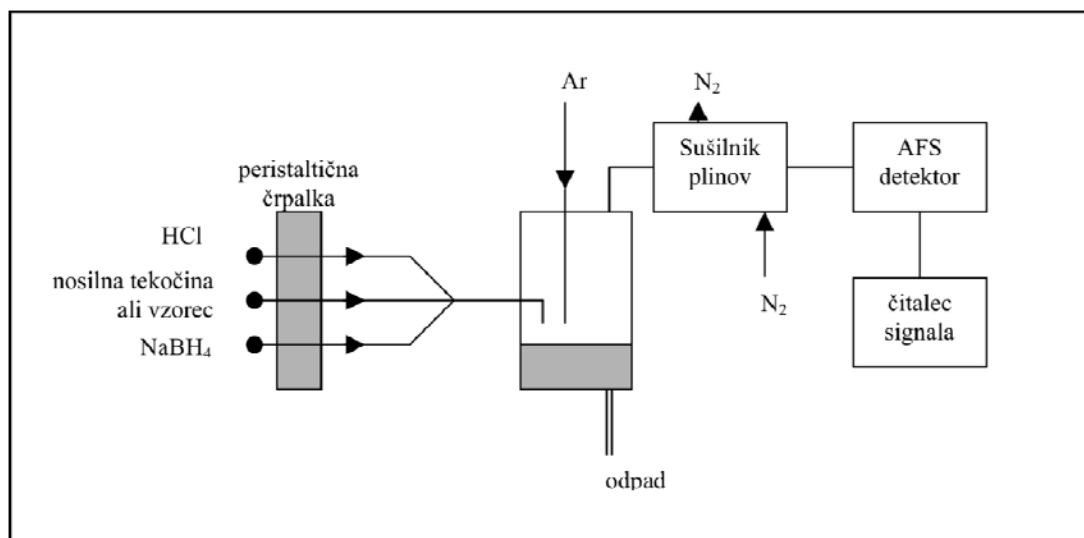
3.2.3 Razkroj vzorcev

Vzorci smo razkrojili po postopku, ki ga opisujeta Smrkolj in Stibilj (2004). Uporabili smo 50 ml teflonske posodice, ki smo jih pred uporabo 24 ur namakali v raztopini detergenta (10 % Micro 90) in nato še 24 ur v raztopini $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O} = 1:1$. Sprali smo jih z MilliQ ter osušili.

V pomite in stehtane posodice smo zatehtali do 0,200 g vzorca in mu dodali 0,5 ml konc. H_2SO_4 in 1,5 ml konc. HNO_3 in čez noč segrevali pri 80 °C v zaprtih posodicah (navoj posodic smo ovili s teflonskim trakom, da ob zaprtju posodice dodatno tesnijo) v aluminijastem bloku (Termoproc). Naslednji dan smo temperaturo za 1 uro povišali na 130 °C. Nato smo raztopine ohladili na sobno temperaturo in jim dodali še 2 ml konc. H_2O_2 in jih v odprtih posodicah segrevali še 15 minut pri 115 °C. Za tem smo dodali še 2 ml konc. H_2O_2 in 0,1 ml 40 % HF in pri isti temperaturi segrevali še 10 minut. Posodice smo ponovno ohladili na sobno temperaturo in dodali 0,15 ml razt. V_2O_5 v H_2SO_4 ter segrevali pri 115 °C do pojava modre raztopine (približno 20 minut). Vzorce smo ponovno ohladili in jih reducirali z dodajanjem 2 ml konc. HCl in jih ponovno segreli na 90 °C za 10 minut. Ohlajene raztopine smo po redukciji razredčili na 20 g z MilliQ oziroma glede na predvidene koncentracije Se v vzorcu ter s HG-AFS izmerili vsebnost Se.

3.2.4 Detekcija selena s HG-AFS

Shema pretočnega sistema HG-AFS prikazuje slika 3. Nosilna tekočina (HCl) v križnem spoju reagira s HCl za tvorbo hidrida z reducentom (NaBH_4 in NaOH). Pretoke na peristaltični črpalki uravnavamo s cevkami različnih notranjih premerov. V plinsko-tekočinskem separatorju pride do ločitve dveh faz. Argon (Ar) odnese nastala plina H_2Se in H_2 skozi sušilec plinov, kjer je kot sušilni plin uporabljen dušik, v atomski fluorescenčni spektrometer. Selenovi atomi absorbirajo svetlobo selenove votle katode z dodatnim napajanjem, vzbujeni atomi pa oddajajo (fluorescirajo) absorbirano svetlobo. Signale vzorcev smo zabeležili z rekorderjem in jim izmerili višine.

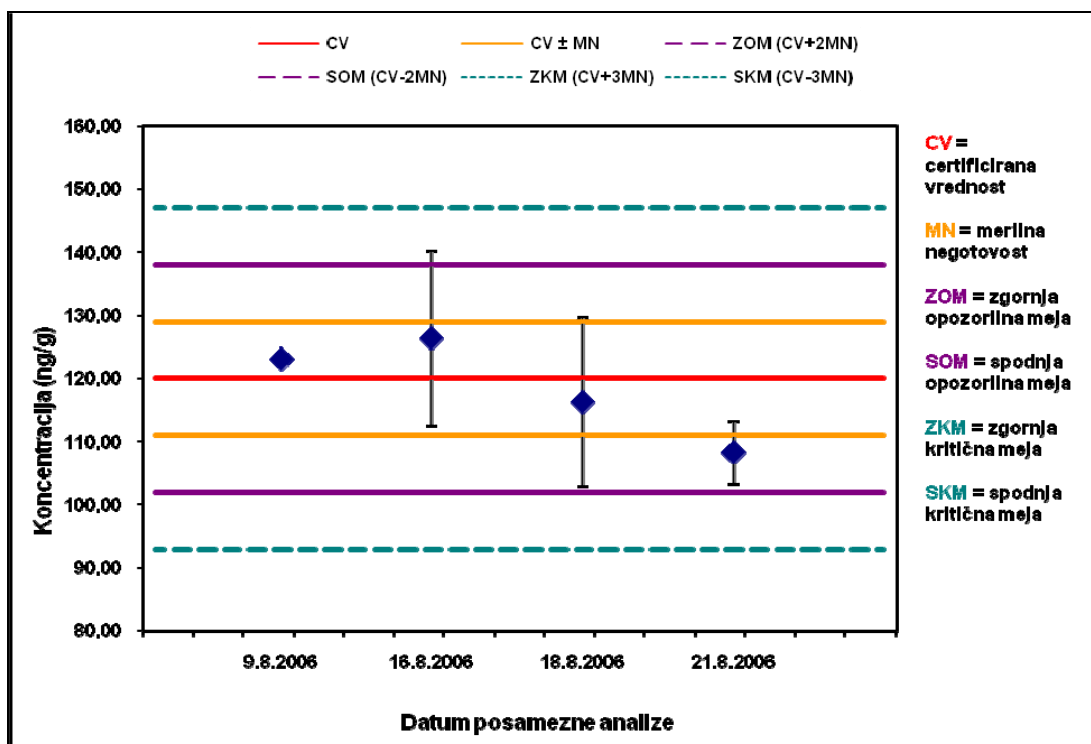


Slika 3: Shema pretočnega sistema HG-AFS (Smrkolj, 2003)

Izmerili smo višine vrhov standardnih delovnih raztopin z znano koncentracijo in pripravili regresijsko premico. S pomočjo regresijske premice in izmerjenih vrhov smo izračunali vsebnost selena v vzorcu.

3.2.5 Pravilnost in ponovljivost metode

Pravilnost in ponovljivost metode za meritev vsebnosti selena v šentjanževki smo preverjali z meritvijo vsebnosti selena v certificiranem referenčnem materialu, ki smo ga vključili v analizo vsake serije vzorcev v dveh ponovitvah. Uporabili smo certificirani referenčni material CRM Peach Leaves, NIST 1547. Razkroj tega materiala je potekal enako kot razkroj vzorcev šentjanževke. Tudi vsi nadaljni postopki so bili enaki. Dobljene rezultate, ki so prikazani na sliki 4, smo podali kot povprečje in se ujemajo s certificirano vrednostjo.



Slika 4: Ugotavljanje vsebnosti selena v certificiranem referenčnem materialu (CRM Peach Leaves, NIST 1547: 120 ± 9 ngSe/gSS). Rezultati so podani kot izmerjene povprečne vrednosti.

3.3 STATISTIČNA ANALIZA

Dobljene podatke smo analizirali s programom Microsoft Excel in Statgraphics plus 4,0. Statistično značilne razlike smo preverjali s testom ANOVA, upoštevali smo 5 % tveganje.

4 REZULTATI

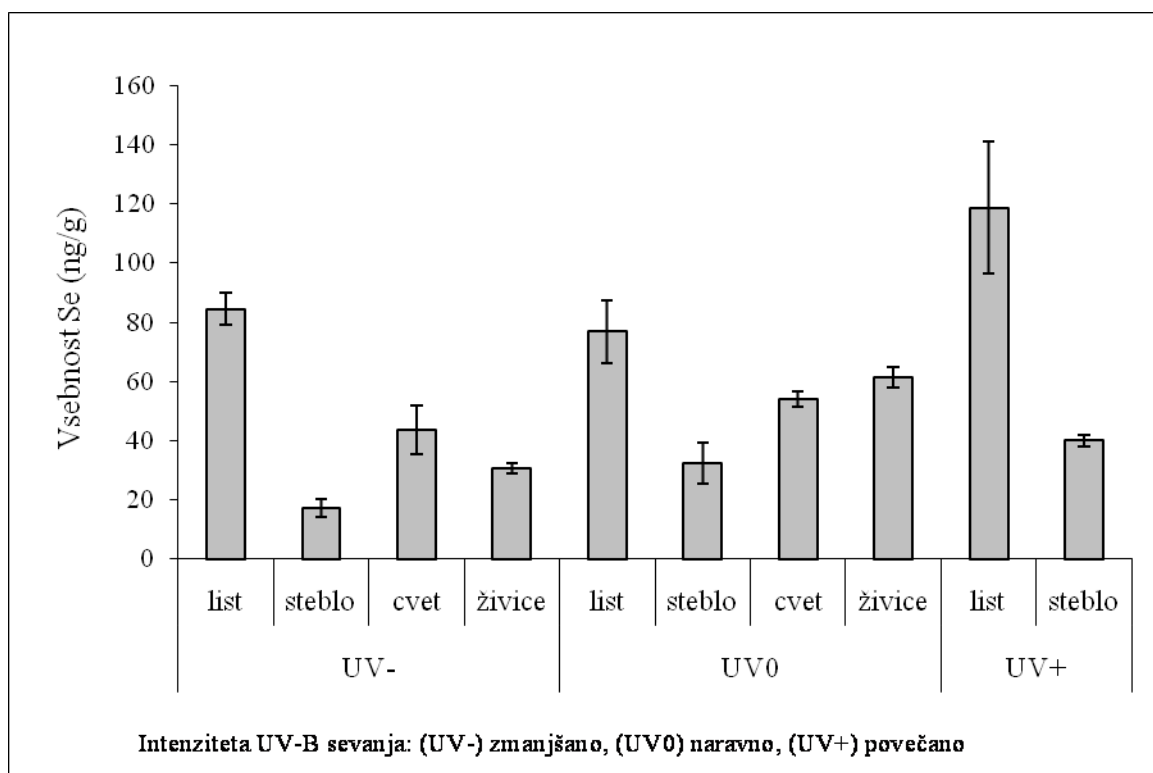
V preglednici 5 in sliki 5 so prikazani rezultati vsebnosti selena v posameznih delih rastlin šentjanževke v kontrolni skupini. Rastline šentjanževke so bile gojene pri različnih razmerah UV-B sevanja. Rastline izpostavljene povečanemu UV-B sevanju (UV+), niso imele cvetov in živic, zato smo lahko analizirali samo liste in stebila. Rezultati meritev kažejo, da največ selena vsebujejo zeleni deli rastlin, torej listi, najmanj pa stebila. Največ selena so vsebovali listi rastlin, ki so bile izpostavljene povečani intenziteti UV-B sevanja. Listi rastlin, ki smo jih gojili pri zmanjšani intenziteti UV-B sevanja, so vsebovali nekoliko več selena kot listi rastlin, ki so bile gojene pri naravnem UV-B sevanju.

Cvetovi, živice in stebila rastlin, ki so bile izpostavljene naravnemu UV-B sevanju (UV0), so vsebovali več selena kot omenjeni deli rastlin, izpostavljenih zmanjšani intenziteti UV-B sevanja (UV-). Pri rastlinah, ki so bile izpostavljene zmanjšanemu UV-B sevanju, smo v živicah izmerili manj selena kot v cvetu. Ravno obratno pa je bilo pri živicah rastlin, izpostavljenih okoljskemu UV-B sevanju, ki so vsebovale nekoliko večje količine selena kot cvetovi teh rastlin.

Preglednica 5: Koncentracija selena v posameznih delih šentjanževke iz kontrolne skupine izpostavljene naravnemu UV-B sevanju (UV0), zmanjšanemu UV-B sevanju (UV-) ter povečanemu UV-B sevanju (UV+)

Stopnja UV-B sevanja	Del rastline	Število vzorcev	Število določitev	Povprečje (ngSe/gSS)	±Stdev/a*
UV 0	Listi	2	6	76,9	10,60
	Stebila	2	6	32,5	7,04
	Cvetovi	2	2	54,0	2,47
	Živice	2	2	61,5	3,46
UV -	Listi	2	4	84,5	5,32
	Stebila	2	4	17,2	3,14
	Cvetovi	2	6	43,5	8,20
	Živice	2	2	30,7	1,59
UV +	Listi	2	4	118,8	22,41
	Stebila	2	4	40,0	2,00

Stdev/a* – standardni odklik (št. določitev > 2) / absolutna napaka (št. določitev ≤ 2)



Slika 5: Vsebnost selena (ng/g) v posameznih delih kontrolne skupine rastlin šentjanževke pri različnih UV-B obravnavanjih.

Kot je razvidno iz preglednice 6 in slike 6, lahko pri rastlinah, ki smo jim foliarno dodali raztopino selena v obliki natrijevega selenata s koncentracijo 10 mgSe/L, opazimo veliko povečanje vsebnosti selena v primerjavi s kontrolno skupino. Množina selena se je povečala v vseh vzorčenih delih šentjanževke in je primerljiva s porazdelitvijo v kontrolni skupini rastlin.

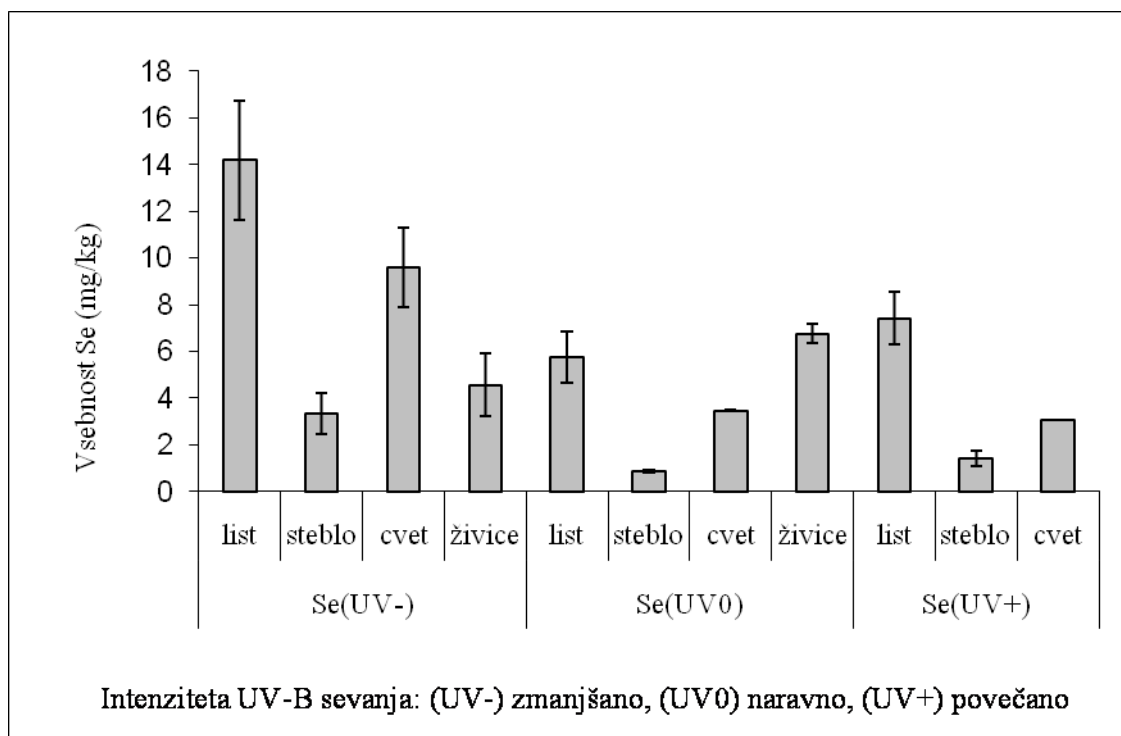
Vsebnost selena je bila največja v listih, najmanjša pa v steblih rastlin, in sicer pri vseh intenzitetah UV-B sevanja. Največjo vsebnost selena smo ugotovili v listih rastlin, ki so bile izpostavljene zmanjšani intenziteti UV-B sevanja. Listi rastlin, ki so bile izpostavljene povečani intenziteti UV-B sevanja, so vsebovali nekoliko več selena kot listi rastlin, izpostavljenih naravnemu sevanju. Tudi cvetovi in stebela rastlin, gojenih pri zmanjšani intenziteti UV-B sevanja, so vsebovali več selena kot cvetovi rastlin pri naravnem in povečanem UV-B sevanju.

Vsebnost selena v kontrolni skupini rastlin je bila največja v listih, najmanjša pa v steblih. Prav tako lahko tako porazdelitev selena opazimo pri rastlinah, ki smo jih foliarno gnojili, kjer vsebnost selena narašča od stebel, preko živic, cvetov do listov, kjer je najvišja. Pri neškropljenih rastlinah smo največjo vsebnost selena izmerili v skupini rastlin, ki smo ji dodali UV-B sevanje, medtem ko pri škropljenih rastlinah največje vsebnosti opazimo pri rastlinah, ki so bile zaščitene pred UV-B sevanjem.

Preglednica 6: Vsebnost selena v posameznih delih šentjanževke iz obogatene skupine izpostavljene naravnemu (Se(UV0)), zmanjšanemu (Se(UV-)) ter povečanemu (Se(UV+)) UV-B sevanju

Stopnja UV-B sevanja	Del rastline	Število vzorcev	Število določitev	Povprečje (mgSe/kgSS)	±Stdev/ a*
SeUV0	Listi	2	8	5,74	1,08
	Stebila	2	4	0,87	0,07
	Cvetovi	2	2	3,46	0,02
	Živice	2	4	6,75	0,41
SeUV-	Listi	2	8	14,19	2,56
	Stebila	2	8	3,35	0,87
	Cvetovi	2	4	9,58	1,70
	Živice	2	4	4,56	1,34
SeUV+	Listi	2	8	7,42	1,13
	Stebila	2	8	1,44	0,33
	Cvetovi	1	1	3,08	-

Stdev/a* – standardni odklik (št. določitev > 2) / absolutna napaka (št. določitev ≤ 2)



Slika 6: Vsebnost selena (mg/kg) v posameznih delih šentjanževke, foliarno gnojene s selenom pri različnih UV-B razmerah

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Količine selena v posameznih delih rastlin kontrolne skupine so bile majhne, gibale so se med 17 in 119 ngSe/gSS. Največje vsebnosti selena smo izmerili v listih, manj v cvetovih in živicah, najmanj pa v steblih neškropljenih rastlin, ki so bile gojene pri različnih intenzitetah UV-B sevanja. Največ selena pri kontrolni skupini smo izmerili v listih rastlin (118,8 ngSe/gSS), ki so bile gojene pri povečani intenziteti UV-B sevanja (UV+), tudi stebila teh rastlin so vsebovala več selena v primerjavi s stebli rastlin, ki so bile gojene pri zmanjšani in naravni intenziteti sevanja. Rastline UV+ skupine niso imele živic in cvetov, zato analize selena v teh delih nismo izvedli. Listi rastlin, gojenih pri naravni in znižani intenziteti UV-B sevanja, so vsebovali nekoliko manj selena (76,9 in 84,5 ngSe/gSS). Cvetovi in živice rastlin, gojenih pri naravnih razmerah, so vsebovali nekoliko več selena kot cvetovi in živice rastlin pri zmanjšani intenziteti sevanja. Najmanj selena smo izmerili v steblih rastlin, ki smo jih gojili pri zmanjšani intenziteti UV-B sevanja.

Smrkolj in sod. (2006b) so selen foliarno dodajali navadni in tatarski ajdi. Največje vsebnosti selena so izmerili v cvetovih obeh vrst rastlin pri različnih intenzitetah UV-B sevanja, tatarska ajda pa je vsebovala več selena kot navadna ajda. Tatarska ajda navadno raste na višjih nadmorskih višinah, kjer je UV-B sevanje močnejše, selen pa bi lahko rastline zaščitil pred škodljivimi učinki sevanja. Navadna ajda je v listih, cvetovih in semenih pri povišani intenziteti UV-B sevanja vsebovala več selena kot pri naravnem UV-B sevanju, prav tako pa tudi listi tatarske ajde. Semena in cvetovi tatarske ajde so pri naravnih razmerah vsebovali več selena kot pri dodanem UV-B sevanju.

Več selena v skupini rastlin, gojenih pri povišani intenziteti UV-B sevanja, ki povzroča tudi oksidativni stres, bi lahko pripisali antioksidativni vlogi selena v rastlini ter večji potrebi po selenu pri rastlinah, ki so bile sevanju bolj izpostavljene.

Podobno, kot primerjamo vsebnost flavonoidov v odvisnosti od UV-B sevanja, bi lahko primerjali tudi vsebnost selena v posameznih delih rastline v odvisnosti od sevanja. Germ in sod. (2010) so ugotovili, da šentjanževka, gojena pri povečani intenziteti UV-B sevanja, v listih vsebuje več flavonoidov kot rastline, ki so bile gojene pri zmanjšani intenziteti ali pri naravnem sevanju.

Vsebnost selena pri rastlinah, ki smo jih foliarno gnojili s selenovo raztopino v obliki natrijevega selenata, se je povišala v vseh delih rastlin pri različnih UV-B obravnavanjih. Rastline, ki smo jim foliarno dodali selen, niso kazale znakov toksičnosti selena, le-ta pa se je v velikih količinah transportiral v nove mlade liste. Največje vrednosti selena smo izmerili v listih rastlin (14,19 mgSe/kgSS), manj v cvetovih in živicah, najmanj pa v steblih (0,87 mgSe/kgSS). Vsebnost selena v šentjanževki se je v največji meri povečala pri skupini rastlin, ki so bile izpostavljene zmanjšani intenziteti UV-B sevanja, nekoliko manj selena pa so vsebovale rastline, gojene pri naravnih razmerah in zvečani intenziteti sevanja, le-te pa so imele le malo cvetov in niso imele živic.

Germ in sod. (2007) so selen foliarno dodajali radiču (*Cichorium intybus* L.) ter opazili povečanje vsebnosti le-tega v glavicah radiča. Selen se je transportiral od zunanjih

poškropljenih listov do notranjih listov glavic radiča. Smrkolj in sod. (2006b) pa so selen foliarno dodajali ajdi ter prav tako opazili, da se je le-ta razporedil po rastlini, največ selena pa so vsebovali listi rastlin (preglednica 7).

Pri neškropljenih rastlinah smo torej opazili največje vsebnosti selena pri skupini, ki je bila izpostavljena povečani intenziteti UV-B sevanja, medtem ko smo pri škropljenih rastlinah največ selena izmerili pri skupini, ki je bila gojena pri zmanjšanem UV-B sevanju. Transformacija selenata v rastlini v lastne selenove spojine in transport le-teh v nove, mlade liste, je odvisen od razpoložljive energije (Germ in sod., 2009; Ožbolt in sod., 2008). Rastline, ki niso bile izpostavljene dodatnemu UV-B sevanju, so imele dovolj energije za sprejem in transport selena po rastlini. Vprašanje pa je, ali so rastline, ki so bile gojene pri dodanem UV-B sevanju že občutile stres zaradi povečane intenzitete sevanja in zato niso imele dovolj energije še za sprejem selena in njegovo transformacijo v rastlini lastne bioaktivne snovi.

Rezultati kažejo, da se količina selena povečuje od stebel, preko živic, cvetov in listov, kjer je največja. Ta trend smo opazili pri gnojenih kot tudi pri ne-gnojenih rastlinah. Največ selena smo izmerili v listih rastlin, ki so bile zaščitene pred UV-B sevanjem. Zato bi bilo z vidika pridelave s selenom obogatene šentjanževke najbolj primerno gojenje le-te pri zmanjšani intenziteti UV-B sevanja. Za uporabo za prehranska dopolnila bi morali nadzorovati foliarno gnojenje rastlin ter spremljati vsebnost selena v rastlini, da ne bi prišlo do prekomernega dnevnega vnosa selena. Uporabljali bi lahko celo rastlino ali pa ekstrakt šentjanževke.

Rastlina	Način dodajanja Se	Koncentracija	Deli rastline	Stopnje UV-B sevanja / Se (ng/g)			Referenca
	Oblika selena			UV0	UV-	UV+	
Šentjanževka (<i>Hypericum perforatum</i> L.)	Foliarno	10 mgSe/L	List	5738 ± 1084	14192 ± 2561	7418 ± 1130	Neža Kenda, Diplomsko delo
	Natrijev selenat		Steblo	869 ± 70	3345 ± 873	1435 ± 326	
			Cvet	3455 ± 16	9575 ± 1697	3083	
			živice	6755 ± 408	4558 ± 1336		
Tatarska ajda (<i>Fagopyrum tataricum</i>)	Foliarno	15 mgSe/L	List	3328 ± 166		3824 ± 191	P. Smrkolj, V. Stibilj, I. Kreft, M. Germ. 2006b.
	Natrijev selenat		Cvet	3195 ± 159		3869 ± 193	
			Seme	3219 ± 161		3447 ± 172	
Navadna ajda (<i>Fagopyrum esculentum</i>)		15 mgSe/L	List	4649 ± 232		4525 ± 226	
			Cvet	3163 ± 158		3834 ± 191	
			seme	2936 ± 147		2710 ± 135	
Navadna ajda (<i>Fagopyrum esculentum</i>)	Namakanje semen	10 mg Se ^{VI} /L	List	90 ± 5	75 ± 4	108 ± 7	Ljerka Ožbolt, Samo Kreft, Ivan Kreft, Mateja Germ, Vekoslava Stibilj. 2008
	Natrijev selanat		Steblo	66 ± 4	39 ± 5	76 ± 3	
			Semena	100 ± 7	70 ± 5	190 ± 3	

Preglednica 7: Vsebnost selena pri različnih rastlinah, ki so bile obogatene s selenom in gojene pri različnih intenzitetah UV-B sevanja

5.2 SKLEPI

Z rezultati poskusa smo potrdili delovno hipotezo. Po foliarni aplikaciji selena se je njegova vsebnost povečala v vseh delih šentjanževke, ne glede na UV-B obravnavanje. Selen se je različno porazdelil na posamezne dele rastline, največ smo ga izmerili v listih, manj v cvetovih in živicah, najmanj pa v steblih rastlin. Opazili smo, da se trend porazdelitve selena po posameznih delih šentjanževke med kontrolno in foliarno gnojeno skupino ni bistveno razlikoval; vsebnost je bila največja v listih, najnižja pa v steblih. Potrdili smo tudi hipotezo, da bo selena v rastlinah, izpostavljenih različni intenziteti UV-B sevanja, različne. Pri kontrolnih vzorcih je bila vsebnost selena večja v skupini rastlin pri povečanem UV-B sevanju, pri foliarno gnojeni skupini rastlin pa pri zmanjšanem UV-B sevanju.

Ugotovitve raziskave so uporabne predvsem z vidika gojenja s selenom obogatene šentjanževke. Foliarno dodajanje je precej enostavno, potrebna pa je pozorost pri enakomernem nanašanju in uporabi optimalne koncentracije selenove raztopine. Ker je šentjanževka dobro znana zdravilna rastlina, bi se gojenje le-te, obogatene s selenom, kot prehranskega dopolnila, lahko upravičilo, potrebno pa bi bilo še raziskati, v kakšni obliki bi bila rastlina bolj primerna (cela rastlina ali pa kot ekstrakt).

Šentjanževka obogatena s tem esencialnim elementom v sledovih, bi bila lahko dobro prehransko dopolnilo, saj bi na ta način lahko nadomestili nekatere pripravke s selenatom in selenitom. Dostopnost selena v človeškem organizmu je odvisna od oblike, v kateri se le- ta nahaja, zato bi bilo potrebno ugotoviti, v kakšni obliki se nahaja v selenom obogateni šentjanževki.

6 POVZETEK

Selen je esencialen mikroelement za ljudi in živali, v naravi pa je navadno prisoten v majhnih količinah, njegova dostopnost rastlinam je omejena z mnogimi biotskimi in abiotskimi dejavniki. Esencialnost selena za rastline sicer ni dokazana, znano pa je, da ima pri določenih rastlinah pozitivne učinke na rast in obrambo pred stresom. Vse več je indikacij, da selen v majhnih koncentracijah igra pomembno vlogo pri zmanjšanju oksidativnega stresa, povzročenege z UV-B sevanjem. Pomanjkanje selena bi lahko rešili s prehranskimi dopolnili, ki vsebujejo selen. Foliarno dodajanje je enostaven način obogatitve rastlin

Šentjanževka je dobro raziskana zdravilna rastlina z mnogo medicinskimi učinkovinami, ki je za farmacevtsko industrijo zelo zanimiva. Znano je njeno antidepresivno delovanje, v zadnjih letih pa preizkušajo njene pozitivne učinke tudi pri zdravljenju raka in nekaterih virusnih obolenj. V ljudskem zdravilstvu je že desetletja znana kot rastlina, ki pomaga pri celjenju ran, opeklin, vročičnih in drugih obolenj. Z dodajanjem selena šentjanževki, bi še razširili nabor dobrih lastnosti te rastline ter vplivali na zdravje uporabnikov.

V poskusu smo obravnavali šest skupin rastlin in sicer kontrolno skupino z rastlinami, ki so bile izpostavljene različnim intenzitetam UV-B sevanja (naravno, zmanjšano in povečano) ter rastlinami, ki smo jim foliarno dodali selen v obliki natrijevega selenata s koncentracijo 10 mgSe/L tri tedne po sajenju, bile pa so izpostavljene enakim intenzitetam UV-B sevanja kot kontrolne skupine. Želeli smo ugotoviti kako se selen razporedi po posameznih delih šentjanževke, kako se po foliarni aplikaciji vsebnost selena poveča v posameznih delih rastline ter kakšne bodo razlike med posameznimi UV-B obravnavanji. Rastline smo ločili na različne dele (listje, stebila, cvetovi in živice), vzorce smo zmleli, jih stehali in kemijsko analizirali. Za detekcijo selena smo uporabili metodo HG-AFS s hidridno tehniko.

Rezultati so pokazali, da se selen različno razporedi po različnih delih šentjanževke in sicer je naravno najbolj koncentriran v listih in cvetovih, najmanj pa smo ga zaznali v steblih rastlin. Po aplikaciji selena se je njegova vsebnost povečala v vseh delih rastline, trend razporeditve pa je enak v kontrolni in izpostavljeni skupini. Ugotovili smo, da je v kontrolni skupini največ selena pri rastlinah, ki so bile izpostavljene povečanemu UV-B sevanju, pri rastlinah, ki smo jim dodali selen, pa je element najbolj koncentriran v listih, izpostavljenih zmanjšanemu UV-B sevanju.

7 VIRI

- Allen D.J., Nogues S., Baker N.R. 1998. Ozone depletion and increased UV-B radiation: is there a real threat to photosynthesis? *Journal of Experimental Botany*, 49, 328: 1775-1778
- Björn L.O., Murphy T.M. 1985. Computer calculation of solar ultraviolet-B radiation at ground level. *Physiologie Végétale*, 23: 555-561
- Bornman J.F., Teramura A.H. 1993. Effects of ultraviolet-B radiation on terrestrial Plants. V: *Environmental UV photobiology*. Young A.R, Bjorn L.O., Moan J., Nultsch W. (eds.). New York, Plenum Press,: 427-471
- Brenčič J., Lazarini F. 1995. *Splošna in anorganska kemija*. Ljubljana, DZS: 220 str.
- Breznik B., Germ M., Gaberščik A., Kreft I. 2005. Combined effects of elevated UV-B radiation and the addition of selenium on common (*Fagopyrum esculentum* Moench.) and tartary (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.) buckwheat. *Photosynthetica*, 43, 4: 583-589
- Breznik B., Germ M., Kreft I., Gaberščik A. 2009. Crop responses to enhanced UV-B Radiation. V: *Environmental science and engineering*. Chapter 12. Berlin, Springer-Verlag: 269-281
- Caldwell M.M. 1968. Solar UV radiation as an ecological faktor for alpine plants. *Ecological Monographs*, 38: 243-268
- Combs Jr. G.F. 2001. Selenium in global food system. *British Journal of Nutrition*, 85: 517-547
- Combs G.F., Combs S.B. 1986. *The Role of Selenium in Nutrition*. Orlando, San Diego, New York, Academic Press: 453 str.
- Dedina J. 1995. *Hydride generation atomic absorption spectrometry*. Chichester, New York, Brisbane, John Wiley & Sons: 526 str.
- Elles M.P., Blaylock M.J., Huang J.W., Gussman C.D. 2000. Plants as a natural source of concentrated mineral nutritional supplements. *Food Chemistry*, 71: 181-188
- Ellis R.D., Salt E.D., 2003. Plants, selenium and human health. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 273-279
- Foster L.H., Sumar S. 1997. Selenium in health and disease. *Reviews in Food Science and Nutrition*, 37, 3: 211-228
- Germ M., Stibilj V. 2007. Selenium and plants. *Acta agriculturae Slovenica*, 89, 1: 65-71

- Germ M., Kreft I., Osvald J. 2005. Influence of UV-B exclusion and selenium treatment on photochemical efficacy of photosystem II, yield and respiratory potential in pumpkins (*Cucurbita pepo*). *Plant Physiology and Biochemistry*, 43: 445-448
- Germ M., Stibilj V., Osvald J., Kreft I. 2007. Effect of selenium foliar application on chicory (*Chicorium intybus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 795-798
- Germ M., Stibilj V., Kreft S., Gaberščik A., Pajk F., Kreft I. 2009. Selenium concentration in St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) herb after foliar spraying of young plants under different UV-B radiation levels. *Food Chemistry*, 117: 204-206
- Germ M., Stibilj V., Kreft S., Gaberščik A., Kreft I. 2010. Flavonoid, tannin and hypericin concentrations in the leaves of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) are affected by UV-B radiation levels. *Food Chemistry*, 122: 471-474
- Johnsson L. 1991. Selenium uptake by plants as a function of soil type, organic matter content and pH. *Plant and Soil*, 133: 57-64
- Kabata-Pendias A. 2001. Trace Elements in soil and plants. 3rd edition. Boca Raton, Florida, CRC Press: 313 str.
- Kabata-Pendias A. 2004. Soil - plant transfer of trace elements - an environmental issue. *Geoderma*, 122: 143-149
- Letavayova L., Vlčkova V., Brozmanova J. 2006. Selenium: From cancer prevention to DNA damage. *Toxicology*, 227: 1-14
- Navarro-Alarcon M., Cabrera-Vique C., 2008. Selenium in food and the human body: A review. *Science of the Total Environment*, 400: 115-141
- Ožbolt L., Kreft S., Kreft I., Germ M., Stibilj V. 2008. Distribution of selenium and phenolics in buckwheat plants grown from seeds soaked in Se solution and under different levels of UV-B radiation. *Food Chemistry*, 110: 691-696
- Pajk F. 2006. Vpliv UV-B sevanja na šentjanževko (*Hypericum perforatum* L.). Diplomsko delo. Ljubljana, oddelek za biologijo: 57 str.
- Pograjc L., Stibilj V., Ščančar J., Jamnik M. 2010. Determination of macronutrients and some essential elements in the slovene military diet. *Food Chemistry*, 122: 1235-1240
- Pravilnik o prehranskih dopolnilih. Ur. l. RS, št. 82/03
- Pyrzynska K. 1996. Speciation analysis of some organic selenium compounds. *Analyst*, 121: 77-83
- Pyrzynska K. 2009. Selenium speciation in enriched vegetables. *Food Chemistry*, 114: 1183-1191

- Reid M.E., Stratton M.S., Lillico A.J., Fakih M., Natarajan R., Clark L.C., Marshall J.R. 2004. A report of high-dose selenium supplementation: response and toxicities. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 18: 69-74
- Reilly C. 1996. Selenium in food and health. London, Weinheim, New York, Blackie Academic & Professional: 323 str.
- Reilly C. 1998. Selenium: A new entrant into the functional food arena. *Trends in Food Science & Technology*, 9: 114-118
- Rotruck J.T., Pope A.L., Ganther H.E., Hafeman D.G., Swanson A.B., Hoekstra W.G. 1973. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, 179: 588-590
- Roy G., Sarma B.K., Phadnis P., Mughesh G. 2005. Selenium- containing enzymes in mammals. Chemical perspectives. *Journal of Chemical Science*, 117, 4: 287-303
- Schwartz K., Foltz C.M. 1957. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *Journal of the American Chemical Society*, 79: 3292-3293
- Seliškar A., Wraber T. 1996. Travnikiške rastline na Slovenskem: sto pogostih vrst. 3. Izdaja. Ljubljana, Prešernova družba, Vrba: 229 str.
- Smrkolj P. 2003. Ugotavljanje selena in njegove porazdelitve v izbranih živilih z metodo hidridne tehnike atomske fluorescenčne spektrometrije. Magistrsko delo. Ljubljana, oddelek za živilstvo: 97 str.
- Smrkolj P., Stibilj V. 2004. Determination of selenium in vegetables by hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 512: 11-17
- Smrkolj P., Pograjc L., Hlastan-Ribič C., Stibilj V. 2005. Selenium content in selected Slovenian foodstuffs and estimated daily intakes of selenium. *Food Chemistry*, 90: 691-697
- Smrkolj P., Germ M., Kreft I., Stibilj V. 2006a. Respiratory and Se compounds in pea (*Pisum sativum* L.) plants grown from Se-enriched seeds. *Journal of Experimental Botany*, 57, 1-4: 3595-3600
- Smrkolj P., Stibilj V., Kreft I., Germ M. 2006b. Selenium species in buckwheat cultivated with foliar addition of Se(VI) and various levels of UV-B radiation. *Food Chemistry*, 96: 675-681
- Stibilj V., Kreft I., Smrkolj P., Oswald J. 2004. Enhanced selenium content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* L.) and pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds by foliar fertilisation. *European Food Research Technology*, 219: 142-144
- Sturm J., Sturm J.G. 1796. Šentjanževka (*Hypericum perforatum* L.) Deutschlands Flora in Abbildungen. 1796.
<http://luirig.altervista.org/cpm/displayimage.php?album=42&pos=10115>, (15.9.2010)

- Toplak Galle K. 2000. Zdravilne rastline na Slovenskem. Ljubljana, Založba Mladinska knjiga: 312 str.
- Terry N., Zayed A.M., de Souza M.P., Tarun A.S. 2000. Selenium in higher plants. Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 51: 401-432
- Trevini M., Teramura A.H., 1989. UV-B effects on terrestrial plants. Photochemistry and Photobiology, 50, 4: 479-487
- Vandecasteele C., Block C.B. 1993. Modern Methods for Trace Element Determination. Chichester, New York, John Wiley & Sons: 526 str.
- Vassileva E., Dočekalova H., Baeten H., Vanhentenrijk S., Hoenig M. 2001. Revisitation of mineralization modes for arsenic and selenium determination in environmental samples. Talanta, 54:187-196
- Wu L. 2004. Review of 15 years of research on ecotoxicology and remediation of land contaminated agricultural drainage sediment rich in selenium. Ecotoxicology and Environmental Safety, 57: 257-269

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Vekoslavi Stibilj in so-mentorju prof. dr. Ivanu Kreftu za strokovne nasvete in pomoč pri teoretičnem in praktičnem delu diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi vsem, ki so mi ves čas opravljanja diplomske naloge stali ob strani.