

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Jana MIHOR

**VPLIV NAMAKANJA SEMEN REDKVICE (*Raphanus sativus*) V
RAZTOPINAH SELENATA IN SELENITA NA LASTNOSTI KALIC**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**THE IMPACT OF SOAKING OF RADISH (*Raphanus sativus*) SEEDS
IN SOLUTIONS OF SELENATE AND SELENITE ON THE
PROPERTIES OF THE SPROUTS**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Oddelku za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani (postavitev poskusa) ter na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani na Odseku za znanost o okolju (laboratorijsko delo in statistična obdelava podatkov).

Študijska komisija Oddelka za biologijo je potrdila temo in naslov diplomskega dela ter za mentorja imenovala prof. dr. Ivana Krefta.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Alenka GABERŠČIK

Član: prof. dr. Ivan KREFT

Članica: doc. dr. Mateja GERM

Datum zagovora:

Naloga 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 verziji.

Jana MIHOR

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 581.142:546.23(043.2)=163.6
KG Redkvice (*Raphanus sativus*), selenat, selenit, kalice, kotiledoni, stebelca, luske
AV MIHOR, Jana
SA KREFT, Ivan (mentor)
KZ 1000 Ljubljana, SLO, Večna pot 111
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2011
IN VPLIV NAMAKANJA SEMEN REDKVICE (*Raphanus sativus*) V RAZTOPINAH SELENATA IN SELENITA NA LASTNOSTI KALIC
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP VIII 29 str., 8 pregl., 8 sl., 138 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Selen je nujen za življenje ljudi in živali ter ima pozitivne učinke na rast in pomembno antioksidativno, antikancerogeno in antimitogeno aktivnost. Slovenija je ena od evropskih držav, ki spadajo v območje s pomanjkanjem selena v prsti. Poleg same vsebnosti selena v tleh pa je, posebno za rastline, pomembna njegova dostopnost, ki je odvisna od kemijske oblike, ta pa od mnogih dejavnikov. Pomanjkanje selena v prehrani ljudi lahko pripelje do številnih obolenj. Eden izmed uspešnih načinov, kako se izogniti tej težavi, bi lahko bil pridelovanje rastlin z namakanjem semen v raztopini selena. Esencialnost selena za rastline še ni dokazana, pa vendar ima selen v določenih primerih pozitivne učinke na rast in obrambo pred stresom. Namen diplomskega dela je bil ugotoviti, pri katerih koncentracijah selena uspevajo kalice redkvice *Raphanus sativus* najbolje in kako selen vpliva na njihovo rast. Semena *R. sativus* smo namakali v raztopinah različnih koncentracij 0, 5, 10, 30 (mg Se/L) selenita oziroma selenata. Zanima nas tudi vpliv UV-B sevanja na rast in razvoj kalic. Primerjali smo s kalicami, ki so rasle na sončni svetlobi, z zmanjšanim UV-B sevanjem v rastlinjaku oziroma v temi. V poskusu smo nastavili 24 skupin kalic redkvic *R. sativus* namakalnih koncentracij 0, 5, 10, 30 (mg Se/L) natrijevega selenita (SeIV) oziroma selenata (SeVI). Vsako od skupin smo gojili v temi, na sončni svetlobi z zmanjšanim UV-B sevanjem v rastlinjaku in na sončni svetlobi z UV-B sevanjem zunaj rastlinjaka. Kot se je izkazalo obe obliki selena vplivata na manjšo maso kalic skupin namakalnih koncentracij 5, 10, 30 (mg Se/L). Učinke selena na večjo maso kalic dobimo le v primeru namakalnih koncentracij 5 in 30 (mg Se/L) selenata pri sončni svetlobi z UV-B sevanjem, ko je povprečna masa 100 kalic presegla povprečno maso 100 kalic ustrezne skupine (na sončni svetlobi z zmanjšanim UV-B sevanjem) brez dodanega selena.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 581.142:546.23(043.2)=163.6
CX Radish (*Raphanus sativus*), selenate, selenite, sprouts, cotyledons, stems, scales
AU MIHOR, Jana
AA KREFT, Ivan (supervisor)
PP 1000 Ljubljana, SLO, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Biology
PY 2011
TI THE IMPACT OF SOAKING OF RADISH (*Raphanus sativus*) SEEDS IN SOLUTIONS OF SELENATE AND SELENITE ON THE PROPERTIES OF THE SPROUTS
DT Graduation Thesis (University studies)
NO VIII, 29 p., 8 tab., 8 fig., 138 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Selenium is an essential trace nutrient vital for humans and animals due to its positive effects on growth and its antioxidative, anticarcinogenic and antimutagenic activity. Slovenia is part of a region with a low level of selenium in soil. As well as selenium content in the soil, the chemical form of selenium, which depends on many environmental factors, is also of importance, especially for plants. Deficiency of selenium in human diet results in selenium-responsive diseases. Cultivation of plants enriched with selenium could be an effective way of producing selenium-rich foodstuffs which could be beneficial for health. Selenium has not been classified as an essential element for plants, although it has positive effects on growth and defense against oxidative stress. The aim of our research was to examine how selenium affects the growth and development of radish *Raphanus sativus* sprouts. Furthermore we aimed to determine at which concentration of selenium the *R. sativus* sprouts grew best. Seeds of *R. sativus* were soaked in sodium selenite (SeIV) and sodium selenate (SeVI) solutions of concentrations 0, 5, 10, 30 (mg Se/L). We also examined the effect of UV-B radiation on the growth and development of sprouts by growing them in sunlight, in UV-B reduced sunlight inside a greenhouse and in the dark. The study focused on 24 groups of *R. sativus* sprouts grown from seeds soaked in sodium selenite (SeIV) or sodium selenate (SeVI) solutions of concentrations 0, 5, 10, 30 (mg Se/L) and grown in 3 different light conditions: complete darkness, UV-B reduced sunlight inside a greenhouse and sunlight outside the greenhouse with UV-B radiation. The research found both forms of selenium had a negative effect on sprout mass of groups with 5, 10, 30 (mg Se/L). A positive effect on sprout mass was observed only in groups with 5 and 30 (mg Se/L) of selenate grown in sunlight with UV-B radiation. In these groups the average mass of a hundred sprouts exceeded the average mass of a hundred sprouts from the group without added selenium grown in UV-B reduced sunlight.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VI
Kazalo slik	VII
Okrajšave in simboli	VIII
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA IN NAMEN DIPLOMSKE NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 Redkvice (<i>Raphanus sativus</i>)	3
2.2 SELEN	4
2.2.1 Selen in spojine v bioloških sistemih	4
2.2.2 Selen v tleh in njegova razpoložljivost	4
2.2.3 Pomen selena za ljudi	5
2.2.3.1 Učinki selena na ljudi	5
2.2.3.2 Znaki pomanjkanja	6
2.2.3.3 Toksičnost selena	7
2.2.4 Pomen selena za rastline	8
2.2.4.1 Selen v rastlinah in učinki na rastline	8
2.2.4.2 Privzem in akumulacija selena	9
2.2.4.3 Toksičnost selena za rastline in obrambni mehanizmi	11
2.2.4.4 Selen in UV-B sevanje	12
2.2.5 Metode merjenja vsebnosti selena v rastlinskih vzorcih	13
3 MATERIALI IN METODE	14
3.1 Nastavitev poskusa	14
3.2 Priprava vzorcev za analizo	14
3.2.1 Hidridna tehnika	15
3.2.2 Atomska fluorescenčna spektrometrija (AFS)	16
3.3 Metoda za določitev selena	17
3.3.1 Razkroj vzorcev	17
3.3.2 Standardne raztopine	17
3.3.3 Merjenje koncentracije selena	18
3.3.4 Pravilnost in ponovljivost metode	18
4 REZULTATI	19
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	26
5.1 RAZPRAVA	26
5.2 SKLEPI	28
6 POVZETEK	29
7 VIRI	30
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Najpogosteje uporabljene metode za določitev selen v živilih	13
Preglednica 2: Priprava vzorcev skupin namakalnih koncentracij 0, 5, 10, 30 (mg Se/L) selenita oziroma selenata v temi, na sončni svetlobi z zmanjšanim UV-B sevanjem in na sončni svetlobi z UV-A in UV-B sevanjem	15
Preglednica 3: Koncentracije selen ($\mu\text{g Se/g}$ suhe snovi) v kalicah <i>R. sativus</i> raslih v temi, na sončni svetlobi z zmanjšanim UV-B sevanjem in na sončni svetlobi z UV-A in UV-B sevanjem skupin namakalnih koncentracij 0, 5, 10, 30 (mg Se/L) selenita (SeIV)	19
Preglednica 4: Koncentracije selen ($\mu\text{g Se/g}$ suhe snovi) v kalicah <i>R. sativus</i> raslih v temi, na sončni svetlobi z zmanjšanim UV-B sevanjem in na sončni svetlobi z UV-A in UV-B sevanjem skupin namakalnih koncentracij 0, 5, 10, 30 (mg Se/L) selenata (SeVI)	20
Preglednica 5: Povprečna masa 100 kalic (g) <i>R. sativus</i> raslih v temi, na sončni svetlobi z zmanjšanim UV-B sevanjem in na sončni svetlobi z UV-A in UV-B sevanjem v skupinah namakalnih koncentracij 0, 5, 10, 30 (mg Se/L) selenita (SeIV)	21
Preglednica 6: Povprečna masa 100 kalic (g) <i>R. sativus</i> raslih v temi, na sončni svetlobi z zmanjšanim UV-B sevanjem in na sončni svetlobi z UV-A in UV-B sevanjem v skupinah namakalnih koncentracij 0, 5, 10, 30 (mg Se/L) selenata (SeVI)	23
Preglednica 7: Koncentracije selen ($\mu\text{g Se/g}$ suhe snovi) v luskah <i>R. sativus</i> skupin namakalnih koncentracij 0, 5, 30 (mg Se/L) selenita (SeIV) oziroma selenata (SeVI) na sončni svetlobi z UV-A in UV-B sevanjem	24
Preglednica 8: Koncentracije selen ($\mu\text{g Se/g}$ suhe snovi) v kotiledonih in stebelcih <i>R. sativus</i> skupine namakalne koncentracije 30 (mg Se/L) selenita (SeIV) v temi, na sončni svetlobi z zmanjšanim UV-B sevanjem in na sončni svetlobi z UV-A in UV-B sevanjem in skupine namakalne koncentracije 30 (mg Se/L) selenata (SeVI) na sončni svetlobi z zmanjšanim UV-B sevanjem in na sončni svetlobi z UV-A in UV-B sevanjem	25

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematska predstavitev glavnih korakov pri metabolizmu Se v rastlinah	10
Slika 2: Shema atomskega fluorescenčnega spektrometra (AFS)	16
Slika 3: Shema pretočnega sistema HG-AFS	18
Slika 4: Koncentracije selenita ($\mu\text{g Se/g}$ suhe snovi) v kalicah <i>R. sativus</i> raslih v temi, na sončni svetlobi z zmanjšanim UV-B sevanjem in na sončni svetlobi z UV-A in UV-B sevanjem skupin namakalnih koncentracij 0, 5, 10, 30 (mg Se/L) selenita (SeIV)	19
Slika 5: Koncentracije selenata ($\mu\text{g Se/g}$ suhe snovi) v kalicah <i>R. sativus</i> raslih v temi, na sončni svetlobi z zmanjšanim UV-B sevanjem in na sončni svetlobi z UV-A in UV-B sevanjem skupin namakalnih koncentracij 0, 5, 10, 30 (mg Se/L) selenata (SeVI)	20
Slika 6: Povprečna masa 100 kalic (g) <i>R. sativus</i> raslih v temi, na sončni svetlobi z zmanjšanim UV-B sevanjem in na sončni svetlobi z UV-A in UV-B sevanjem v skupinah namakalnih koncentracij 0, 5, 10, 30 (mg Se/L) selenita (SeIV)	22
Slika 7: Povprečna masa 100 kalic (g) <i>R. sativus</i> raslih v temi, na sončni svetlobi z zmanjšanim UV-B sevanjem in na sončni svetlobi z UV-A in UV-B sevanjem v skupinah namakalnih koncentracij 0, 5, 10, 30 (mg Se/L) selenata (SeVI)	23
Slika 8: Koncentracije selenita ($\mu\text{g Se/g}$ suhe snovi) v luskah <i>R. sativus</i> skupin namakalnih koncentracij 0, 5, 30 (mg Se/L) selenita (SeIV) oziroma selenata (SeVI) na sončni svetlobi z UV-A in UV-B sevanjem	24

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Se	selen
SeIV	selenit
SeVI	selenat
Cys	cistein
Met	metionin
SeCys	selenocistein
SeMet	selenometionin
SeMeSeCys	selenometilselenocistein
GPx	družina glutation peroksidaz
DMSe	dimetilselenid
DMDSe	dimetildiselenid
AFS	atomski fluorescenčni spektrometer
HG-AFS	hidridna tehnika atomske fluorescenčne spektrometrije
ETS	elektronski transportni sistem
SS	suha snov
konc.	koncentracija

1 UVOD

Selen je eden izmed najbolj razširjenih elementov zemeljske skorje. Velik del selena se pojavlja kot sestavni del sulfidnih mineralov. Prisotnost ali odsotnost selena v katerih koli tleh je odvisna od sestave tal, materiala, izpiranja ali postopkov dodajanja selena v tla po nastanku prsti (Shamberger, 1981). V Centralni Evropi je koncentracija selena 1,0 mg/kg (Kadrabova et al., 1997; Klavec et al., 1998; Pfannhauser et al., 2000; Kreft et al., 2002; Smrkolj et al., 2005; Sager, 2006; Germ et al., 2007), na Finskem 0,04-0,7 mg/kg (Hartikainen in Xue, 1999; Xue et al., 2001) in na Norveškem 0,25 mg/kg (Øgaard et al., 2006). Slovenija je ena od Evropskih držav, poleg Avstrije, Hrvaške, Slovaške in Finske, z nizko vsebnostjo selena v tleh (Germ et al., 2007; Kreft et al., 2002; Smrkolj et al., 2005; Pfannhauser et al., 2000; Klavec et al., 1998; Kadrabova et al., 1997; Hartikainen in Xue, 1999).

Selen je esencialen element za živali, ljudi ter mikroorganizme (Rotruck et al., 1973). Ima tri nivoje biološke aktivnosti (Hamilton, 2004): i) koncentracija v sledovih omogoča normalno rast in razvoj; ii) nekoliko višje koncentracije služijo za vzdrževanje homeostatskih funkcij; iii) povišane koncentracije so lahko toksične. Od leta 1957 se mu pripisuje esencialna biološka vloga, ko sta Schwarz in Foltz (1957) dokazala pomembnost elementa za življenje živali, leta 1973 pa so odkrili vezavo Se v selenobeljakovino, v encim glutation peroksidazo (Rotruck et al., 1973).

Selen je nujen za življenje ljudi in živali, ima pozitivne učinke na rast ter pomembno antioksidativno, antikancerogeno in antimutageno aktivnost, vendar to velja le za koncentracije do 200 µg Se/dan. Pri koncentracijah nad 1000 µg Se/dan ima genotoksične in kancerogene učinke, nad 300 µg Se/dan povzroča selenozo (Reid et al., 2004), pri nizkih odmerkih pod 11 µg Se/dan se pojavijo znaki pomanjkanja (Letavayova et al., 2006). Torej bi lahko bilo gojenje rastlin, obogatenih s selenom, učinkovit način dodajanja selena ljudem, kar bi lahko pripomoglo k izboljšanju zdravja ljudi (Ip in Lisk, 1994; Finley et al., 2001; Lyons et al., 2005).

Esencialnost selena za rastline še ni dokazana, pa vendar ima v določenih primerih pozitivne učinke na rast in obrambo pred stresom. Vsebnost selena v rastlinah je različna, odvisna od sposobnosti rastline privzema, predvsem pa od vsebnosti elementa v tleh. Koncentracije v tleh so od zelo nizkih do toksičnih. Prav od vsebnosti selena v tleh pa je odvisna količina tega elementa v prehrani ljudi in živali. Živila z veliko vsebnostjo beljakovin, predvsem drobovina, meso mišičnine in jajca, vsebujejo veliko selena, prav tako ga je veliko v morskih sadežih, precej manj pa v mleku, mlečnih izdelkih, sadju, zelenjavi in žitih (Smrkolj et al., 2005).

V Sloveniji je od leta 1989 dovoljeno dodajanje selena živalski krmi, s Pravilnikom o krmnih dodatkih (2005) pa je določena tudi največja dovoljena količina selena v krmnih mešanicah (0,5 mg Se/kg).

Zaradi tanjšanja ozonskega plašča, se intenzivnost UV-B sevanja na zemljino površino zvišuje. Čeprav le majhna količina UV-B sevanja doseže površino Zemlje, ima pomemben vpliv na organizme (poškodbe DNK, spremembe pri transpiraciji, fotosintezi, respiratornem potencialu, rasti, razvoju in morfologiji) (Madronich et al., 1998; Jansen, 2002; Gaberšček et al., 2002).

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA IN NAMEN DIPLOMSKE NALOGE

Slovenija je ena od Evropskih držav, ki spada v območje s pomanjkanjem selena v prsti. Poleg same vsebnosti selena v tleh pa je, posebno za rastline, pomembna njegova dostopnost, ki je odvisna od kemijske oblike, ta pa od mnogo dejavnikov. Pomanjkanje selena v prehrani ljudi lahko pripelje do številnih obolenj. Eden izmed uspešnih načinov, kako se izogniti tej težavi, bi lahko bil, pridelovanje rastlin z namakanjem semen v raztopini selena.

Namen diplomskega dela je bil ugotoviti, pri katerih koncentracijah selena uspevajo kalice redkvice *Raphanus sativus* najbolje in kako selen vpliva na njihovo rast. Semena *R. sativus* smo namakali v raztopinah koncentracij 0, 5, 10, 30 (mg Se/L) selenita oziroma selenata. Zanima nas tudi vpliv UV-B sevanja na rast in razvoj kalic. Primerjali smo s kalicami, ki so rasle na sončni svetlobi z zmanjšanim UV-B sevanjem v rastlinjaku oziroma v temi.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predvidevamo, da imata različni obliki selena, selenit in selenat, pri različnih koncentracijah različne učinke na rast in razvoj kalic *R. sativus*.

Hkrati pri kalicah *R. sativus*, ki so rasle v temi, pričakujemo manjše razlike v učinkih kot pri kalicah, ki so rasle na sončni svetlobi z zmanjšanim UV-B sevanjem v rastlinjaku in na sončni svetlobi z UV-A in UV-B sevanjem zunaj rastlinjaka.

2 PREGLED OBJAV

2.1 Redkvice (*Raphanus sativus*)

Redkev uvrščamo v družino križnic (Brassicaceae) in se jo uporablja in goji po vsem svetu (Murillo in Mehta, 2001). V Združenih državah Amerike je poraba redkev veliko manjša od porabe drugih križnic, posebej brokolija, medtem ko je poraba redkev veliko bolj pogosta na Japonskem (Talalay in Fahey, 2001; Suzuki et al., 2006). Na Japonskem, v državi z največjo porabo redkev, kjer so leta 2006 predelali 1,65 milijona ton redkev, je potrošnja v letu v povprečju 20 kg na osebo (Talalay in Fahey, 2001). V ZDA in večini zahodnih držav, se veliko pogosteje uporablja korenine redkve, kot vegetativne dele redkve, medtem ko se prav slednje pogosto uporablja v Iranu in nekaterih drugih Azijskih državah (Hanlon et al., 2009). Potrošnja križnic je bila povezana z zmanjšanjem tveganja številnih kroničnih bolezni, zlasti raka (Murillo in Mehta, 2001). Številne študije so preučile biološko aktivnost redkev in spojin iz redkev tako in vitro, kot in vivo (Barillari et al., 2006; Hanlon et al., 2007; Nakamura et al., 2008; Papi et al., 2008). Poskusi in vitro so pokazali, da imajo korenine redkve močno antioksidativno aktivnost (Barillari et al., 2006), vzpodbudijo encime za razstrupljanje (Lee S.O. in Lee I.S., 2006; Hanlon et al., 2007) in zavirajo proliferacijo rakavih celic (Kim et al., 2006; Barillari et al., 2008; Papi et al., 2008). In vivo poskusi, s poudarkom na koreninah redkve, pa so pokazali, da redkev ščiti ljudi pred kemično povzročeno škodo in zmanjšuje oksidativni stres (Baek et al., 2008; Sipos et al., 2002; Lugasi et al., 2005).

Oksidacijska škoda zaradi prostih radikalov, je vpletena v razvoj številnih bolezni ljudi, kot so ateroskleroza, sladkorna bolezen, rak, bolezen srca in nevrodegenerativne bolezni. Prosti radikali lahko poškodujejo celične membrane, oksidirajo proteine in lipide in povzročajo mutacije (Halliwell in Gutteridge, 1999). Zato so se v zadnjih nekaj desetletjih osredotočili na raziskovanje zdravih učinkov fitokemikalij, ki jih vsebujejo križnice.

V Indiji gojijo redkev *Raphanus sativus* L. za kulinarične in zdravilne namene. Čeprav so korenine najbolj dragocen in užiten del *R. sativus*, se prav cela rastlina lahko uporablja kot zelena listnata zelenjava. Različne dele rastline uporabljajo v domači medicini za zdravljenje različnih bolezni pri ljudeh, kot so želodčne težave, motnje delovanja jeter, nalezljive bolezni in bronhitis, pa tudi pri opeklinah, odrgninah in smrdečih nogah (Nadkarni, 1976; Kapoor, 1990).

Visentin et al. (1992) so v svoji raziskavi odkrili tri glavne glukozinolate v redkvi (*Raphanus sativus* L.): 4-(metilsulfinil)butil glukozinolat (glukorafanin) in 4-(metilsulfinil)but-3-enil glukozinolat (glukorafenin), ki sta navzoča v semenih, in trans-4-(metiltio)-3-butenil glukozinolat, v koreninah. Redkev *R. sativus* pa ne vsebuje le glukozinolatov in izotiocianatov, temveč tudi druge fitokemikalije, kot so polifenoli, alkaloidi, saponini, L- askorbinska kislina, vitamin B, glutationi in inozitol fosfati, ki v kombinaciji prispevajo k pozitivnemu učinku na zdravje ljudi (Nakamura et al., 2001; Zielinski in Kozłowska, 2003; Takaya et al., 2003; Zielinski et al., 2005).

Kalice se že dolgo uporabljajo po vsem svetu zaradi visoke hranljive vrednosti. Kalice križnic, še posebej brokolijska (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) in kalice redkev (*Raphanus sativus* L.), vsebujejo veliko količino antioksidantov, vitamina C in zdravju koristnih snovi, kot so glukozinolati in fenolne spojine (Barillari et al., 2005; Ciska et al., 2008; Fahey et al., 1997; Martinez-Villaluenga et al., 2008). Ugotovljeno je bilo, da imajo kalice redkev antikancerogeno in antioksidativno aktivnost tako in vivo kot in vitro (Barillari et al., 2008; Ippoushi et al., 2007; Papi et al., 2008).

2.2 SELEN

2.2.1 Selen in spojine v bioloških sistemih

Selen je metaloid, saj ima tako lastnosti kovin kot nekovin, ki se nahaja v VI. skupini periodnega sistema, med žveplom in telurjem. Z žveplom imata podobne lastnosti, vendar v bioloških sistemih nista zamenljiva (Brenčič in Lazarini, 1995). Kemijsko sta si podobna po atomski masi, energiji vezi, ionizacijski energiji in elektronski afiniteti. Razlika med njima je, da je selen v štirivalenčni reducirani obliki, v štirivalenčno oksidirani obliki pa žveplo. Tvorita tudi različno močni kisline. Močnejša kislina je selenijev hidrid (H_2Se) od vodikovega sulfida (H_2S) (Tinggi, 2003).

Brenčič in Lazarini (1995) navajajo šest naravnih izotopov selena: ^{74}Se , ^{76}Se , ^{77}Se , ^{78}Se , ^{80}Se , ^{82}Se , prisotnih v naravi. Selen ima v anorganskih oblikah različna oksidacijska števila in sicer, selenid (- 2), elementarni Se (0), selenit (+ 4) in selenat (+ 6), prisoten pa je tudi v večih hlapnih in nehlapnih organskih spojinah (Uden et al., 2004; Hymer in Caruso, 2006). Najbolj biološko razpoložljiva oblika selena je organski Se, vezan v organske spojine, kot so aminokisliline (Amweg et al., 2003). Posebej pomembno mesto med temi spojinami ima 21. aminokislina selenocistein (SeCys), ki je sestavni del selenobeljakovin (Roy et al., 2005).

2.2.2 Selen v tleh in njegova razpoložljivost

Selen je element v sledovih, ki lahko deluje kot esencialen element za ljudi in živali ali kot strupena snov za okolje, meja med obema je ozka in odvisna od njegove kemijske oblike, koncentracije in drugih okoljskih spremenljivk (Fan et al., 2002; Shardendu et al., 2003).

Količina selena v prehrani je v veliki meri odvisna od koncentracije selena v tleh. Velika odstopanja v koncentracijah selena v tleh med različnimi državami povzročajo velike razlike v regionalnih vsebnosti selena v hrani in posledično v dnevni vnosu selena, na primer, 30 $\mu g/dan$ v Turčiji, 55 $\mu g/dan$ v Nemčiji in 30 $\mu g/dan$ na Japonskem (Kumpulainen, 1993; Schelenz, 1984). Ustrezna fiziološka oskrba s selenom je bila ocenjena na 1 $\mu g Se/kg$ telesne teže, kar je približno 57 in 80 $\mu g/dan$ za srednjo starost ženskega in moškega spola (Levander in Morris, 1984). V Avstriji znaša vnos selena 36-68 (v povprečju 49) $\mu g/dan$, kar kaže na nekoliko nezadostno oskrbo (Wilplinger et al., 1998). Zelo nizke vrednosti selena so našli v serumu pri zdravih otrocih in odraslih, ki živijo na Štajerskem, kar dokazuje, da je to področje eno od Evropskih območij z najnižjo vsebnostjo selena (Tiran et al., 1992).

Prav tako skoraj vse druge Evropske države spadajo v regije z nizko vsebnostjo selena, zlasti Skandinavija. Zaradi tega na posameznih področjih za izboljšanje prehrane za živino in ljudi, dodajajo selen kot dopolnitev k hrani in krmi. Na Finskem od leta 1984 uporabljajo komercialna gnojila obogatena z natrijevim selenatom kot nadomestilo zaradi nizke vsebnosti selena v tleh (Aro et al., 1998). Zaradi gnojenja z gnojilom, ki mu je bil dodan selen, se je koncentracija selena v koruzi in kruhu povečala za faktor 20-30 (Euroala et al., 1990), povečanje je bilo tudi na ravni koncentracije selena v serumu pri odraslih 1,05-1,6 $\mu\text{mol Se/L}$ (Aro et al., 1998; Makela et al., 1993.).

Vsebnost Se pri posamezniku je odvisna od zaužite kemijske oblike selena v živilih (Fairweather-Tait, 1997). Če primerjamo posamezne oblike selena, so študije pri ljudeh pokazale, da se organski selenometionin prevzeme in uporabi učinkoviteje kot selenat in selenit (Butler et al., 1991; Moser-Veillon et al., 1992; Clausen in Nielsen, 1988). Izkazalo se je, da kljub slabšemu prevzemu selenita in selenata kot selenometionina in organsko vezanega selena iz hrane, sta enako ali celo bolj učinkovita pri naraščajoči glutathion peroksidazni aktivnosti, ki se pogosto uporablja za oceno biološke uporabnosti selena (Clausen in Nielsen, 1988; Levander et al., 1983; Alfthan et al., 1991; Thomson et al., 1993; Persson-Moschos et al., 1998).

Glavni obliki selena v živilih sta verjetno aminokislinski selenometionin in selenocistein, vezani v beljakovine. Selenometionin je predvidoma razširjena oblika v prehrani iz rastlinskih virov, medtem ko beljakovine iz živalskega tkiva vsebujejo obe aminokislinski v različnih razmerjih. Anorganske vrste selena se uporabljajo v dopolnilih, vendar ni verjetno, da so prisotne v živilih. Po Coombsu (1988), je mogoče hrano, ki je vir selena, opredeliti na naslednji način: dober vir selena so s selenom obogateni kvas in pšenica, manjši vir selena vsebuje večina rastlinskih materialov, slabi viri so mesni in ribji izdelki in soja. Na žalost je v večini držav z nizko vsebnostjo selena, glavna količina dnevnega vnosa selen, ki izvira iz mesnih izdelkov (Aro et al., 1998; Coombs, 1988; Oster in Prellwitz, 1988).

2.2.3 Pomen selena za ljudi

2.2.3.1 Učinki selena na ljudi

Odkritje esencialnosti selena za živali leta 1957 je vodilo k vprašanju, katera oblika selena je biološko najbolj učinkovita. Pomembna prelomnica je bilo leto 1973, ko je bila glutathion peroksidaza (GPx) prepoznana kot selenoenzim (Rotruck et al., 1973; Behne in Kyriakopoulos, 2001). Za selenometionin (SeMet) pa je znano, da je najbolj učinkovita oblika selena (Patrick, 2004). Duffield-Lillico et al. (2003) so ugotovili, da se je ob dopolnitvi prehrane za ljudi s kvasom, obogatenim s selenom, ki vsebuje SeMet kot glavno kemično obliko selena, občutno zmanjša pojavnost raka na prostati.

Shamberger (1981) poroča, da je v okoljih z večjo vsebnostjo selena, stopnja umrljivosti zaradi raka pri ljudeh nižja, prav tako je tudi umrljivost zaradi bolezni srca nižja. Obsežni klinični poskusi na Kitajskem so pokazali, da selen preprečuje motnje srca pri otrocih s področji s pomanjkanjem selena.

Selen je esencialen element v sledovih, za katerega so poročali, da izboljša delovanje imunskega sistema pri živalih (Beck et al., 1995 a,b), nevropsihološke funkcije pri ljudeh (Finley in Penland, 1998) in določena bolezenska stanja pri ljudeh in živalih (Levander, 1986). V zadnjem času je bilo predstavljenih nekaj prepričljivih dokazov, da lahko uporabljena količina 3-5 krat priporočene mere prehranjevalnega vnosa (70 µg Se/dan za moške in 55 µg Se/dan za ženske) (National Research Council 1989), prepreči nekatere oblike raka, vključno z rakom debelega črevesja. Ob dodajanju selena se je zmanjšalo tveganje za nastanek pljučnega raka, raka prostate in debelega črevesja (Clark et al., 1996). Se-metilselenocistein (SeMeSeCys) se zlahka pretvori v metilselenol in je primarna oblika selena v brokoliju in česnu (Cai et al., 1995). Ip in Lisk (1994 in 1995) sta pokazala, da česen z visoko vsebnostjo selena zavira tumor mlečne žleze pri živalih. Finley et al. (2000) so v študiji dokazali, da je oblika selena iz brokolija z visoko vsebnostjo selena bolj učinkovita kot selenat ali selenit pri preprečevanju rakavih lezij na debelem črevesju pri podganah. Selen, ki vstopi v telo, sledi eni od številnih presnovnih poti, le-ta pa se določi glede na zaužito kemijsko obliko selena (Butler et al., 1989). Brokoli z visoko vsebnostjo selena vsebuje SeMeSeCys (Cai et al., 1995), ki se lahko hitro spremeni v metilselenol z cepitvijo Se-metilne skupine (Foster et al., 1986). Monometilselenol se obravnava kot ključni metabolit za zaščito pred nekaterimi oblikami raka (Ip in Ganther, 1996).

Čeprav trenutno uporabljene tehnike omogočajo odkrivanje velikega števila oblik selena, njihova fizikalno-kemijska prepoznavnost še ni popolna. Zaradi tako skromnih informacij je Evropski parlament izdal »pozitivni seznam« prehranskih dopolnil (Direktiva 2002/46EC), v katerem so navedene kot edine dovoljene oblike selena selenit, selenat in natrijev hidrogen selenit, ostale kemijske oblike selena so prepovedane s 1. avgustom 2005.

2.2.3.2 Znaki pomanjkanja

V povezavi s pomanjkanjem selena pri ljudeh sta znani predvsem dve bolezni. Keshanova bolezen ali kardiomiopatija, značilnosti katere so težave s srcem in Kashin-Beckova bolezen, pri kateri gre za prizadetje sklepov in mišic. Prisotnost selena v tleh in v prehrani ljudi na območjih, kjer sta prisotni ti bolezni, je majhna. Pomanjkanje selena je v močni povezavi z razvojem raka prostate, debelega črevesja, dojke, jajčnikov in pljuč. Mnoge raziskave kažejo na pomanjkanje selena v povezavi z oslabljenim imunskim odzivom, napredovanjem nekaterih virusnih okužb (HIV oziroma AIDS), povečano možnostjo spontanih splavov, zmanjšano plodnostjo pri moških, s senilnostjo, Alzheimerjevo boleznijo, depresijo pri starejših, motenim delovanjem hormonov ščitnice, tveganjem kardiovaskularnih obolenj, revmatoidnim artritidom, astmo, splošnim oksidativnim stresom in nenazadnje v povezavi z nizko porodno težo otrok pri nosečnicah z nizko vsebnostjo Se (Letavayova et al., 2006).

2.2.3.3 Toksičnost selena

Toksičnost Se za živali se spreminja s količino in kemično obliko zaužitega Se, s trajanjem in kontinuiteto vnosa ter z vrsto in izvorom prehrane, predvsem z vsebnostjo beljakovin in sulfata (Shamberger, 1981). Se kot kovina, je strupen za vodne organizme v relativno nizkih koncentracijah (US EPA 1987). Kontaminacije s Se v vodnih ekosistemih so pripeljale do škodljivih ekoloških učinkov na večih področjih (Skorupa, 1998), ki vključujejo reproduktivno in razvojno okvaro vodnih ptic in rib (Sappington, 2002).

Okoljski in biološki dejavniki, ki vplivajo na biogeokemično kroženje Se v okolju imajo velik vpliv na kasnejšo razpoložljivost in toksičnost Se za organizme (Amweg et al., 2003). Ti dejavniki so: (i) Selen se pojavlja v več različnih oksidacijskih stanjih v vodnem okolju, ki vključujejo oksidirane oblike Se, selenat (Se +6) in selenit (Se +4), elementarni selen (Se0) in reducirano obliko Se, selenid (Se -2). Elementarni selen (Se0), prvotno obliko so našli v usedlinah, ima majhen toksikološki pomen za večino organizmov. Selenat (SeO_4^{2-}) in selenit (SeO_3^{2-}) sta vodotopni anorganski vrsti, ki se nahajata v aerobnih vodnih virih. Selenit je bolj biorazpoložljiv in približno 5-10 krat bolj toksičen za organizme, kot selenat (Lemly et al., 1993). Organski Se, vezan v organske spojine, kot so Se-aminokisljine, je najbolj biološko razpoložljiva oblika in jo alge privzemajo 1000-krat hitreje kot anorganske oblike (Amweg et al., 2003).

(ii) Selen se lahko pretvori iz anorganske v organsko obliko, kot posledica biotskih in abiotskih procesov, kar ni še dobro raziskano.

(iii) Dokazano je bilo, da se Se akumulira v vodnih prehranjevalnih verigah in vodnih predatorjih ter organizmih, ki so odvisni od živali v vodi (Sappington, 2002).

Ekotoksikologi so zaskrbljeni glede kroničnih zastrupitev, ki so posledica kopičenja Se v prehranjevalnih verigah in predstavljajo večji problem, kot akutne zastrupitve ob neposredni izpostavljenosti z onesnaženim vodnim virom. Poleg tega je težko napovedati stopnjo tveganja zastrupitve, zaradi obsežnih biotransformacij in prepletenih prehranjevalnih verig (Fan et al., 2002).

Poročali so o onesnaženosti Belews jezera na severu Karoline med letom 1974 in 1985, zaradi Se v odpadnih vodah iz premogovne elektrarne. Selen, ki se je akumuliral v vodne prehranjevalne verige, je povzročil okvare v plodnosti in teratogene deformacije pri ribah. Leta 1986 je družba spremenila postopke pridobivanja električne energije in Se ni več vstopal v jezero. Vendar so okrevanja na ravni ekosistema počasna in učinki toksičnosti še vedno prisotni tudi 10 let po prenehanju onesnaževanja jezera. Ostanek selena v sedimentu bo verjetno še v nadaljnje predstavljal nevarnost ribam in vodnim pticam (Lemly, 2002).

Čeprav je Se esencialen element v sledovih za ljudi in večino drugih živali kot antioksidant, je v velikih koncentracijah strupen zaradi zamenjave žvepla v aminokislinah, kar privede do sprememb v 3D zgradbi beljakovin in opravljanju encimskih funkcij (Amweg et al., 2003). Okoljske zastrupitve s Se pri živalih in ljudeh so redke. Poročali so o številnih zastrupitvah s Se pri ljudeh vendar le kot rezultat namernega zaužitja selenove kisline (30 g/L). Znano je, da nekatere rastline akumulirajo visoke koncentracije selenata, ki so strupene za živali. Pri zaužitju teh rastlin, ki vsebujejo več kot 5 vendar manj kot 50 mg Se/kg se pri konjih in govedu pojavijo kronične zastrupitve (Tinggi, 2003).

2.2.4 Pomen selenata za rastline

2.2.4.1 Selen v rastlinah in učinki na rastline

Pogosto slišimo, da je potrebno za naše zdravje zaužiti več sto gramov zelenjave na dan. Razlog so lahko bogate vsebnosti hranilnih snovi in prehranskih vlaknin v zelenjavi. Poleg obilja hranilnih snovi in bogastva okusov nas zanima biološko delovanje na naše zdravje (Finkel in Holbrook, 2000). Veliko je poročil o antioksidativnem delovanju zelenjave ali o antioksidativnih snoveh v zelenjavi.

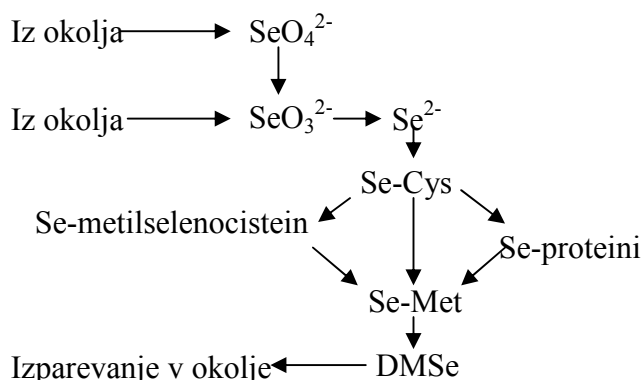
Vsebnost selenata v rastlinah se lahko poveča na različne načine, z dodajanjem Se v tla, z namakanjem semen v raztopini Se, s hidroponskim in aeroponskim gojenjem v prehranski raztopini s selenom in s foliarnim gnojenjem rastlin z raztopino Se. V rastlinah čaja se je s foliarnim gnojenjem s Se znatno povečala vsebnost Se v listih (Hu et al., 2003). Rezultati Smrkolj et al. (2006a) so pokazali, da je vsebnost Se v grahu, pridobljena iz neobravnanih in enkrat, dvakrat foliarno obravnanih rastlin, neposredno sorazmerna s številom škropljenja. Po hidrolizi, je bil SeMet edina oblika Se v supernatantu, najdena z anionsko in kationsko izmenjevalno kromatografijo. Za SeMet je bilo ugotovljeno, da je tudi pri semenih drugih rastlin obogatenih s Se na različne načine, najpomembnejša oblika Se. V ajdi in buči, rastlinah zraslih iz foliarno obravnanih semen s selenatom, je bil SeMet glavna oblika Se in to kar v 81% in 93% vsega Se (Smrkolj et al., 2005, 2006a, 2006b). Stadlober et al. (2001) so gojili različna žita v tleh, katerim je bil dodan selenat, pšenica, ječmen in rž so vsebovali med 70% in 83% Se v obliki SeMet. Sugihara et al. (2004) so pri vzkaljeni soji in fižolu, oboje spada med stročnice, spremljali privzem selenata v kalčke. Vsebnost Se je bila od 8 do 10 $\mu\text{g/g}$ sveže teže, glavčina v obliki SeMeSeCys, manjši delež kot SeMet in neprepoznalni obliki Se. Koncentracija Se v poganjkih ljujke poraste ob uporabi selenata in selenita (Cartes et al., 2005). Vendar so bile najvišje vsebnosti Se pridobljene iz rastlin obravnanih s Se v obliki selenata. Turakainen et al. (2006) so poročali, da se lahko ob gnojenju s Se, izboljša hranilna vrednost krompirja, na račun povečane količine organskih spojin v gomoljih. Od celotnega Se je bilo 49-65% Se v obliki SeMet. Zaradi sposobnosti kopičenja Se predvsem v obliki SeMet v semenih graha obogatenih s Se, je ta dober za uporabo v prehrani ljudi (Smrkolj et al., 2006a).

Še vedno potekajo razprave o esencialnosti selena za višje rastline (Terry et al., 2000). Selen lahko poveča odpornost rastlin na UV oksidativni stres, upočasnjuje in vzpodbuja rast sadik (Hartikainen in Xue, 1999; Xue et al., 2001; Pennanen et al., 2002). Izkazalo se je tudi, da selen regulira vodni status rastlin v obdobju suše (Kuznetsov et al., 2003). Procesi staranja se odvijajo z zamudo zaradi povečanega antioksidativnega delovanja, ki je posledica povečane glutation peroksidazne (GPx) aktivnosti (Hartikainen et al., 2000).

Študije na ljujki in solati so pokazale, da kljub škodljivim učinkom Se pri visokih koncentracijah (zmanjšana biomasa), imajo lahko nizke koncentracije pozitivne učinke na rastline (Hartikainen et al., 2000; Xue et al., 2001). Spodbujena rast rastlin s foliarno dodanim Se, je rezultat povečanega kopičenja škroba v kloroplastih (Pennanen et al., 2002). Turakainen et al. (2004) so v svoji raziskavi dokazali pozitiven učinek selena na rast pri krompirju z večjim kopičenjem ogljikovih hidratov, Xue et al. (2001) pa na zmanjšanje peroksidacije lipidov pri solati. Dodatek Se vzpodbudi dihalni potencial, merjen z elektronskim transportnim sistemom (ETS), pri mladih rastlinah graha (*Pisum sativum*) (Srnkolkj et al., 2006a) in mladem radiču (*Cichorium intybus*) (Germ et al., 2007). Dihalni potencial rukule (*Eruca stiva*) se je povečal pri rastlinah zraslih iz semen obravnavanih s Se (Germ in Osvald, 2005). Možni razlagi sta sledeči: (i) Višja aktivnost ETS, poveča GPx aktivnost v mitohondrijih. Dokazano je (Xue in Hartikainen, 2000; Hartikainen et al., 2000; Xue et al., 2001; Cartes et al., 2005), da se ob izpostavitvi selenu, poveča GPx aktivnost pri ljujki in bučah; (ii) Rastline potrebujejo energijo za popravilo škode nastale zaradi Se. Namreč Se lahko zaradi podobnih lastnosti z žveplom tega nadomesti v aminokislinah (metionin in cistein). Proteinom, ki vsebujejo Se namesto žvepla, se spremeni konformacijska oblika in njihova katalitična aktivnost (Brown in Shrift, 1982).

2.2.4.2 Privzem in akumulacija selena

Privzem in akumulacija Se pri rastlinah sta odvisna od kemijske oblike in koncentracije Se, dejavnikov tal kot so pH, slanost in vsebnost CaCO_3 , prisotnosti in koncentracije drugih ionov, ki tekmujejo za privzem in od metabolizma Se v rastlinah (Kabata Pendias, 2001; Wu, 2004). Rastline privzemajo Se iz tal predvsem kot selenat (SeO_4^{2-}) ali selenit (SeO_3^{2-}) (Ellis in Salt, 2003). Privzem Se je najvišji pri nizkih pH vrednostih, privzem SeIV upada pri pH vrednosti okoli 6, medtem ko privzem SeVI upada preko celotnega pH območja (2,5-10). Privzem Se se povečuje s povečano koncentracijo Ca^{2+} ionov, medtem ko ga prisotnost SO_4^{2-} zavira (Hyun et al., 2006). Obstajajo zapleteni medsebojni vplivi dejavnikov, ki vplivajo na privzem Se v rastline. Na privzem in akumulacijo Se v rastline lahko vplivajo koncentracije anionov (SO_4^{2-} , Cl^-) pogosto prisotnih v s soljo obremenjenih odcednih vodah. Prenos SO_4^{2-} in SeO_4^{2-} preko korenin številnih kmetijskih rastlin se posreduje preko skupnega prenašalca celične membrane pri čemer gre za tekmovanje z anioni za vezavna mesta na prenašalcu. Kot rezultat tega antagonizma, je vnos Se preprečen v večji meri s pomočjo SO_4^{2-} kot Cl^- (Grieve et al., 2001). Dumont et al. (2006) so opisali metabolizem Se v rastlinah, ki je predstavljen na sliki 1.



Slika 1: Shematska predstavitev glavnih korakov pri metabolizmu Se v rastlinah (povzeto po Dumont et al., 2006).

Poleg vsebnosti in razpoložljivosti selena v tleh, je količina akumuliranega selena odvisna tudi od same vrste rastline. Rastline ločimo glede na sposobnost akumuliranja selena v tri skupine (Ellis in Salt, 2003):

- (i) neakumulirajoče, kamor spada večina rastlin in vsebujejo manj kot 25 mg Se/kg suhe snovi,
- (ii) indikatorske rastline iz rodu *Aster*, vrsta *Brassica juncea*, ki kopičijo do 1000 mg Se/kg suhe snovi,
- (iii) akumulirajoče rastline iz rodu *Astragalus*, *Stanleya*, *Neptunia*, ki kopičijo in tolerirajo do 4000 mg Se/kg suhe snovi.

Poročali so, da je večina žit in krmnih rastlin relativno slabo sposobna akumulirati Se, četudi rastejo na tleh z višjo vsebnostjo Se (Nowak et al., 2004). Aktivno rastoča tkiva ponavadi vsebujejo največje količine selena (Kahakachchi et al., 2004). Rastline akumulirajo več selena v steblih in listih kot v tkivih korenin (Zayed et al., 1998). Višje vsebnosti selena v listih kot v steblih, so bile najdene pri vseh preučevanih rastlinah v obeh skupinah torej v enkrat in dvakrat foliarno obravnavanih semenih s Se (Srnkolj et al., 2006a). Semena so običajno zmeren vir selena, vendar so številne študije, ki preučujejo semena žit in stročnic, pokazale sposobnost akumulacije velikih količin selena v teh semenih (Stadlober et al., 2001; Srnkolj et al., 2005; Srnkolj et al., 2006a).

2.2.4.3 Toksičnost selena za rastline in obrambni mehanizmi

Dobro je znano, da je selen toksičen za večino rastlin, razen nekaj akumulatorjev selena iz rodu *Astragalus*, ki lahko kopičijo do nekaj tisoč mg Se/kg suhe mase (Brown in Shrift, 1982; Läuchli, 1993; Wu et al., 1997). Take rastline imajo več obrambnih mehanizmov, ki jim omogočajo preživeti višje koncentracije selena. Nekaj takih mehanizmov je: sinteza nebeljakovinskih aminokislin selenometilselenocisteina (SeMeSeCys) in selenocisteina ter dipeptida γ -glutamil-SeMeSeCys, izključitev SeCys iz procesa vključevanja v beljakovine, kopičenje selena v vakuolah v obliki selenata in nebeljakovinskih aminokislin, odstranjevanje selena s pretvorbo v hlapne spojine, kot sta DMSe in DMDS_e, kar imenujemo fitovolatizacija in je prisotna tudi pri neakumulirajočih rastlinah (Terry et al., 2000), kot so kmetijske rastline, ki prenašajo le nekaj mg/kg Se v tleh (Levine, 1925; Spenger in Siegel, 1978; Carlson et al., 1989).

Ob dodatku Se preko 10 mg/kg se je pojavil oksidativni stres pri ljujki (*Lolium perenne*), rezultat česar so bile drastične izgube pridelka. Toksičnost je moč pripisati pro-oksidativnim učinkom, kot tudi metabolnim motnjam (Hartikainen et al., 2000). Višje vsebnosti selena (1,0 mg/kg tal) so se izkazale strupene za solato in zmanjšal se je donos mladih rastlin (Xue et al., 2001).

Posledice pri rastlinah, kadar so te izpostavljene previsokim koncentracijam selena med gnojenjem, so vidne kot slabša rast, rdeče pike na koreninah, črne pike na listih, rumenenje, sušenje listov, zmanjšana sinteza proteinov in prezgodnja smrt. Eden glavnih mehanizmov, ki je rezultat odziva rastlin na toksičnost Se, je genetsko nepogojena vključitev v proteine SeMet in SeCys namesto Met in Cys. Različne lastnosti žvepla, ki je v Met in Cys, in selena, ki je v SeMet in SeCys, privedejo do sprememb v strukturi proteinov in posledično do sprememb v njihovi katalitični aktivnosti. Meja toksičnosti je odvisna od vrste rastlin, starosti (mlajše so občutljivejše) in prisotnosti sulfatnih ionov.

Najpogostejši toksični obliki selena sta selenat in selenit, ki ju rastline privzemajo in pretvorijo v organske oblike. Nekatere študije so pokazale na večjo toksičnost selenita kot selenata, kar gre pripisati hitrejši pretvorbi selenita v selenoaminokislino in proteine (Terry et al., 2000).

2.2.4.4 Selen in UV-B sevanje

Breznik et al. (2005) so preučevali kombinacijo učinkov med povišanjem UV-B sevanjem in dodanim selenom pri navadni in tatarski ajdi. Upočasnila se je rast, zmanjšala biomasa in število semen zaradi povečanega UV-B sevanja. UV-B sevanje je povzročilo padec suhe teže samo pri rastlinah, ki niso bile obravnavane s selenom, kar kaže na potencialen pozitiven učinek selena.

Germ et al. (2005) so preučevali odziv buče (*Cucurbita pepo*) na UV-B sevanje pri škropljenju listov s selenom pri koncentraciji 1,5 mg/L. Opazili so, da je povečan učinek na pridelek buč, v skladu z ugotovitvami na ljuljki (Hartikainen et al., 2000), solati (Xue et al., 2001), krompirju (Turakainen et al., 2004) in listih zelenega čaja (Hu et al., 2003). Povečan donos pri bučah je bil precej višji v primeru izpostavljenosti rastlin UV-B sevanju po škropljenju s selenom, kot pri tistih, ki so bile škropljene, vendar niso bile izpostavljene UV-B sevanju.

Pennanen et al. (2002) so preučevali ali Se (0,01 in 0,05 mg Se/kg tal) vzpodbuja rast rastlin, ki so bile izpostavljene povečanemu UV sevanju (UV-B in majhni količini UV-C) pri solati (*Lactuca sativa*). Mlade rastline, ki rastejo brez vpliva UV sevanja, uporabijo selen za izgradnjo energijskih rezerv. Te rezerve pripomorejo k povečanemu donosu. Pri UV sevanju, se poveča peroksidacija lipidov in takrat pride do izraza zaščitna vloga selena preko povečane antioksidativne zmogljivosti. Selen vzpodbuja rast rastlin prizadetih zaradi povečanega UV sevanja, z zaščito kloroplastnih encimov.

Ekelund in Danilov (2001) sta preučevala morebitno vlogo selena pri popravilu zaščitnih mehanizmov pri *Euglena gracilis* po obsevanju z UV. Poškodbe fotosistema so posledica oksidativne škode zaradi UV sevanja. Zaščitni mehanizmi zmanjšajo oksidacijsko škodo pri rastlinah in algah, kar sej je pokazalo tudi v citirani raziskavi.

Dodatek selena pa ni omilil škodljivih učinkov UV-B sevanja pri jagodah (*Fragaria x ananassa*), vendar so nižje koncentracije dodanega Se (0,1 mg/kg) povečale rast listov (Heijari et al., 2006). Čeprav so listi ječmena akumulirali večje koncentracije selena kot jagode, ni bilo razvidnih sprememb v rasti, biomasi in fluorescenci klorofila, zaradi učinka selena kot samega ali v kombinaciji z UV-B sevanjem (Valkama et al., 2003).

2.2.5 Metode merjenja vsebnosti selena v rastlinskih vzorcih

Obstaja več različnih metod s katerimi se ugotavlja koncentracijo selena v rastlinskih vzorcih. Rastline običajno vsebujejo malo selena in ravno lastnost metod, ki omogočajo detekcijo nizkih koncentracij selena, zagotavlja meritve le tega. V preglednici 1 so predstavljene najpogosteje uporabljene metode po Foster in Sumar (1995).

Preglednica 1: Najpogosteje uporabljene metode za detekcijo selena v živilih (Foster in Sumar, 1995: 220)

Detekcijske metode	Meja zaznavnosti (ng)
Radiokemična nevtronska aktivacijska analiza (RNAA)	10-20
Atomska fluorescenčna spektroskopija (AFS) ❖ hidridna tehnika (HG-AFS)	2-5
Atomska absorpcijska spektroskopija (AAS) ❖ plamenska (FAAS) ❖ hidridna tehnika (HG-AAS)	500 0,02-2
Induktivno sklopljena plazma (ICP) ❖ optična emisijska spektrometrija ❖ atomska emisijska spektrometrija (ICP-AES) ❖ masna spektrometrija (ICP-MS)	50-100 1 0,063-1,3
Plinska kromatografija ❖ zajetje elektronov ❖ masna spektrometrija	0,5 pg 0,05-1
Voltometrija	0,1-5

3 MATERIALI IN METODE

V okviru diplomske naloge smo ugotavljali celotno količino selena v delih kalice (kotiledonih, stebelcih) ali celih kalicah redkvice (*Raphanus sativus*). Analizirali smo s tehniko hidridne atomske fluorescenčne spektrometrije (HG-AFS) v skupinah namakalnih koncentracij 0, 5, 10, 30 (mg Se/L) natrijevega selenita oziroma selenata. Skupine smo gojili pri različnih svetlobnih razmerah in sicer, v temi, na sončni svetlobi z zmanjšanim UV-B sevanjem v rastlinjaku (v nadaljnjem besedilu: sončna -UV-B) in na sončni svetlobi z UV-A in UV-B sevanjem zunaj rastlinjaka (v nadaljnjem besedilu: sončna z UV-B).

3.1 Nastavitev poskusa

Poskus smo nastavili dne 12.03.2009 in najprej zatehtali v več lončkov po 10 g semen redkvice (*R. sativus*) in jih namočili v raztopine koncentracij 0, 5, 10, 30 (mg Se/L) natrijevega selenata (Na_2SeO_4) oziroma natrijevega selenita (Na_2SeO_3) ter jih pustili stati 4 ure, da se je vsa raztopina vsrkala v semena. 24 lončkov smo namenili skupinam namakalnih koncentracij 10, 30 (mg Se/L) natrijevega selenita oziroma selenata, po dva lončka za posamezne svetlobne razmere (tema, sončna -UV-B in sončna z UV-B). Skupinam z namakalnimi koncentracijami 0, 5 (mg Se/L) natrijevega selenita oziroma selenata, smo namenili 12 lončkov, en lonček za posamezne svetlobne razmere (tema, sončna -UV-B in sončna z UV-B).

V aluminijaste posode smo položili navlažene papirnate brisače in nanje razporedili obravnavana semena. Nato smo semena pokrili s plastjo navlaženega papirja. Tako pripravljene vzorce smo postavili v rastlinjak in jih zalivali z vodo na dva dni oziroma po potrebi. Takoj ko so kalice vzklike, smo del vzorcev postavili v temo, del na sončno -UV-B v rastlinjaku in del vzorcev prenesli ven iz rastlinjaka ter jih izpostavili sončni z UV-B. To smo storili dne 23.3.2009 in sicer smo vzorce, ki smo jih prenesli iz rastlinjaka na sončno z UV-B, izpostavili za obdobje 4-ih ur od 11 do 15 ure. Naslednjega dne smo postopek ponovili in vse vzorce po potrebi zalili z vodo, predvsem tiste, izpostavljene sončni z UV-B.

3.2 Priprava vzorcev za analizo

Dne 25.3.2009 smo vzorce prenesli v delovni prostor s tehtnico in nekatere banjice s škarjami prerezali na pol. Banjice smo razpolovili, da smo dobili večje število ponovitev in s tem zmanjšali napako pri analizah selena v posameznih vzorcih. Preglednica 2 nam prikazuje število banjic (1 ali 2) v skupinah namakalnih koncentracij 0, 5, 10, 30 (mg Se/L) selenita oziroma selenata pri posameznih svetlobnih razmerah, ali smo banjico prerezali na pol (*) ali smo pustili celo banjico (•), in ali smo opravili analize selena v celih kalicah redkvice *R. sativus* (neobarvan kvadrateg) ali v delih (stebelcih, kotiledonih) kalice redkvice (kvadrateg obarvan z rumeno). Pri nekaterih vzorcih smo analizirali vsebnost selena v luskah (+).

Preglednica 2: Priprava vzorcev skupin namakalnih koncentracij 0, 5, 10, 30 (mg Se/L) selenita oziroma selenata v temi, na sončni svetlobi z zmanjšanim UV-B sevanjem (svetloba) in na sončni svetlobi z UV-A in UV-B sevanjem (UV)

Koncentracija selena	Selenit (SeIV)			Selenat (SeVI)		
	tema	svetloba	UV	tema	svetloba	UV
0	2•+	2•	2*	2•+	2•	2*
5	1*	1*	1*+	1*	1*	1*+
10	2*	2*	2*	2*	2*	2*
30	2*+	2*+	2*+	2*	2*+	2*+

(1 ali 2)– število banjic; (*)– banjico prerezali na pol; (•)– cela banjica; (neobarvan kvadrater)– analize Se v celih kalicah; (kvadrater obarvan rumeno)– analize Se v stebelcih in kotiledonih; (+)– analize Se v luskah

Tako pripravljene vzorce smo razporedili v vrečke, jih stekali in postavili v zamrzovalnik do sušenja. Po sušenju smo vzorce ponovno stekali in jih z izjemo lusk dne (28.5.2009) zmleli z ahatnim planetarnim mikro mlinom (FRITSCH, Pulverisette 7) in sicer s hitrostjo 6 (6 min) in nato 7 (2 min). Vzorce smo nato presejali skozi mrežo z odprtini 0,25 mm. Iz dobljenih podatkov smo naposled dne 27.7.2009 pričeli z analizo selena v posameznih vzorcih s tehniko HG-AFS in delo zaključili dne 20.8.2009.

3.2.1 Hidridna tehnika

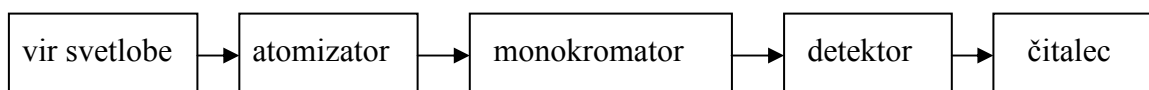
Hidridna tehnika je metoda separacije, pri kateri se selen izloči iz raztopine razkrojenega vzorca. Sestavljena je iz dveh procesov in sicer:

- 1) hidrid se sprosti iz raztopine vzorca (pretvorba analita v nakisanem vzorcu do hidrida in plinske faze),
- 2) sproščeni hidrid se transportira s tokom nosilnega plina do atomizatorja.

Selenove zvrsti je potrebno najprej pretvoriti s HCl v anorgansko obliko, saj le reducirana oblika selena, selenid, tvori hlapne hidride. Reducent natrijev tetrahidridoborat (III) (NaBH_4), se najpogosteje uporablja za tvorbo selenovega hidrida (H_2Se). NaBH_4 pri $\text{pH} \leq 1$ v nekaj mikrosekundah razpade in reducira Se(IV) do H_2Se . Slednjega inerten nosilni plin (ponavadi argon) prenese v atomizator. Plin je pred vstopom potrebno osušiti z dušikom, zrakom ali argonom. Tako se izognemo spektralnim motnjam. Poleg selena tudi As, Bi, Ge, Pb, Sb, Sn in Te tvorijo hlapne hidride (Dedina, 1995).

3.2.2 Atomska fluorescenčna spektrometrija (AFS)

Atomska fluorescenčna spektrometrija se uporablja za analizo 25 elementov, najpogosteje pa za Se, As, Cd, Pb, Hg. Najprej pri tej metodi poteče mehanizem atomizacije hidrida z interakcijo hidridov z vodikovimi radikali. Prosti atomi absorbirajo svetlobo iz črtastega ali kontinuiranega izvora, kar je princip dane metode. Atomi fluorescirajo pri prehodu iz vzbujenega v osnovo stanje. Intenziteta svetlobe je proporcionalna absorbirani svetlobi in številu atomov analita. Z detektorjem, ki je nameščen pravokotno na smer svetlobe in vira za vzbujanje, nato izmerimo fluorescirano svetlobo. Detektorski sistem je običajno fotopomnoževalka. Slika 2 prikazuje shemo AFS (Vandecasteele in Block, 1993).



Slika 2: Shema atomskega fluorescenčnega spektrometra (AFS) (Vandecasteele in Block, 1993).

Večina AFS meritev poteka v plamenskem atomizatorju s pretočnim vnosom vzorca. Od vrste plamena (Ar, H₂,...) je odvisna učinkovitost atomizacije in emisija ozadja. Za vzbujanje v AFS mora biti izvor primeren in sicer stabilen in predstavljati dovolj intenziven izvor svetlobe značilne valovne dolžine za merjeni element. Najpogosteje se uporabljajo žarnice z votlo katodo z dodatnim napajanjem (BHCL). Zanje je značilna izredna stabilnost in intenziteta oddane svetlobe, široko območje linearosti, višje razmere signal/šum in večji naklon umeritvene krivulje.

Hidridna tehnika v povezavi z AFS ima visoko občutljivost z ločitvijo analita od osnovne raztopine, kar poveča natančnost in točnost rezultatov ter omogoča boljšo mejo zaznavnosti (Vandecasteele in Block, 1993).

3.3 Metoda za določitev selena

3.3.1 Razkroj vzorcev

Po postopku, ki sta ga opisali Smrkolj in Stibilj (2004) smo vzorce najprej razkrojili.

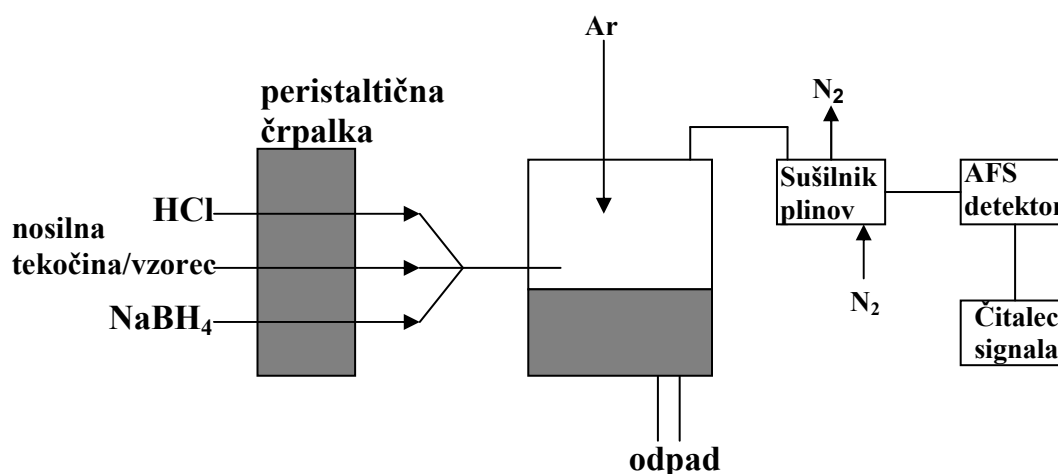
- ❖ V 50 ml teflonske posodice, ki smo jih predhodno 24 ur namakali v raztopini detergenta (10 % Micro 90) in nato še 24 ur v raztopini $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O} = 1 : 1$ ter jih po koncu sprali z deionizirano vodo MilliQ (Millipore) in jih osušili, smo zatehtali 0,150 - 0,200 g vzorca. Stehtali smo tudi posodice.
- ❖ Dodali smo 1,5 mL HNO_3 in 0,5 mL H_2SO_4 ter čez noč segrevali pri temperaturi 80 °C na aluminijastem termo bloku (Termoproc) v dobro s trakom zatesnjenih in z pokrovčkom zaprtih teflonskih posodicah.
- ❖ Naslednji dan temperaturo povečamo na 130 °C in pustimo segrevati še eno uro
- ❖ Vzorce po eni uri ohladimo na sobno temperaturo in jim dodamo 2 mL H_2O_2 ter jih segrevamo pri odprti posodi 10 min pri temperaturi 115 °C
- ❖ Ko vzorce ohladimo jim dodamo 0,1 mL 40 % HF (zrnju HF ne dodamo) in jih segrevamo 10 min pri 115 °C
- ❖ Ohlajenim vzorcem ponovno dodamo 2 mL H_2O_2 in jih segrevamo 10 min pri 115 °C
- ❖ Po končanem razkroju vzorce ohladimo na sobno temperaturo in jim dodamo 0,1 mL V_2O_5 v H_2SO_4 in segrevamo 20 min pri 115 °C
- ❖ Vzorce ohladimo na sobno temperaturo in jih reduciramo z dodajanjem 2,5 mL HCl in segrevamo 10 min pri 90 °C
- ❖ Vzorce ohladimo in jih vzamemo iz bloka ter raztopine razredčimo na 15 – 40 mL MilliQ, odvisno od predvidene koncentracije Se v vzorcu
- ❖ Tako pripravljenim vzorcem s HG-AFS določimo vsebnost Se

3.3.2 Standardne raztopine

Za pripravo standardov selenovih spojin uporabimo Na_2SeO_4 (Sigma, SigmaUltra), ki smo ga raztopili v deionizirani vodi (MilliQ) in pripravili raztopino z koncentracijo 11,194 μg Se/g. Tedensko smo pripravili delovne selenove raztopine z koncentracijo 100 ng Se/g, dnevno pa raztopine z nižjimi koncentracijami Se v enako kislem mediju kot so bili razkrojeni sami vzorci.

3.3.3 Merjenje koncentracije selen

Slika 3 prikazuje shemo pretočnega sistema HG-AFS. V križnem spoju pretočnega sistema reagira nosilna tekočina/vzorec s HCl za tvorbo hidrida in z reducentom NaBH₄. S cevki (Tygon LFL) različnih notranjih premerov (0,76 mm; 1,02 mm; 2,06 mm) smo uravnavali pretok na peristaltični črpalki (Ismatec, MCP 380). Cevi z notranjim premerom 0,51 mm in spojev PEEK (polieterketon) so sestavljale povezavo med injektorjem in separatorjem (A-tip, PS Analytical). Nastala plina H₂Se in H₂ je argon odnesel skozi sušilnik plinov (Perma Pure Products), kjer je dušik uporabljen kot sušilni plin, v atomski fluorescenčni spektrometer (Excalibur, PS Analytical). V difuzijskem plamenu H₂Se atomizira, pri čemer nastanejo Se atomi, ki absorbirajo svetlobo s selenove žarnice z votlo katodo in fluorescirajo. Dobljene signale, ki jim izmerimo višino in le to primerjamo z višinami signalov standardnih raztopin Se (IV), zabeleži rekorder (čitalec signala).



Slika 3: Shema pretočnega sistema HG-AFS

3.3.4 Pravilnost in ponovljivost metode

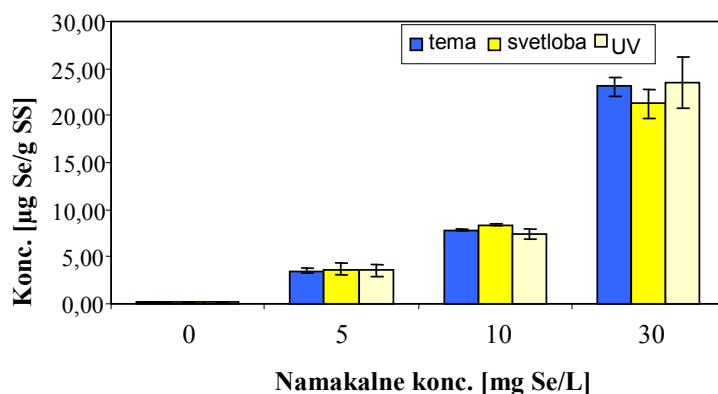
Z merjenjem koncentracije Se v certificiranem referenčnem materialu smo preverili ponovljivost in zanesljivost metode za merjenje koncentracije Se v rastlinah. Dani material, ki je bil po svojih značilnostih podoben posameznim vzorcem redkvice *R. sativus*, smo vključili v analizo vsake serije vzorcev na začetku in koncu meritev. Razkroj in vsi nadaljnji postopki certificiranega referenčnega materiala, v našem primeru SRM Spinach Leaves (NIST 1570a), so potekali enako kot razkroj vzorcev redkvice *R. sativus*.

4 REZULTATI

V preglednici 3 in na sliki 4 so prikazani rezultati meritev koncentracije Se v kalicah redkvice *R. sativus* v skupinah namakalnih koncentracij 0, 5, 10, 30 (mg Se/L) selenita (SeIV). Vsako od skupin smo gojili v temi, na sončni svetlobi z zmanjšanim UV-B sevanjem v rastlinjaku (v nadaljnjem besedilu: sončna -UV-B) in na sončni svetlobi z UV-A in UV-B sevanjem zunaj rastlinjaka (v nadaljnjem besedilu: sončna z UV-B) ter rezultate med seboj primerjali. Vidimo, da je vsebnost selena v kalicah naraščala z večjo namakalno koncentracijo selenita. V kalicah *R. sativus* posameznih skupin, ki so rasle v temi in na sončni z UV-B, je vsebnost selena približno enaka. V kalicah skupin namakalnih koncentracij 0, 30 (mg Se/L), ki so rasle na sončni -UV-B, je vsebnost selena nižja v primerjavi s kalicami, ki so rasle v temi in na sončni z UV-B, ter višja v skupinah namakalnih koncentracij 5, 10 (mg Se/L).

Se IV	vrsta materiala	tema	svetloba	UV
		konc. [$\mu\text{g Se/g SS}$]	konc. [$\mu\text{g Se/g SS}$]	konc. [$\mu\text{g Se/g SS}$]
0	Cele kalice	0,20	0,18	0,19
5	Cele kalice	3,45	3,65	3,56
10	Cele kalice	7,85	8,40	7,42
30	Cele kalice	23,06	21,28	23,46

Preglednica 3: Koncentracije selena ($\mu\text{g Se/g}$ suhe snovi) v kalicah *R. sativus* raslih v temi, na sončni svetlobi z zmanjšanim UV-B sevanjem (svetloba) in na sončni svetlobi z UV-A in UV-B sevanjem (UV) skupin namakalnih koncentracij 0, 5, 10, 30 (mg Se/L) selenita (SeIV).

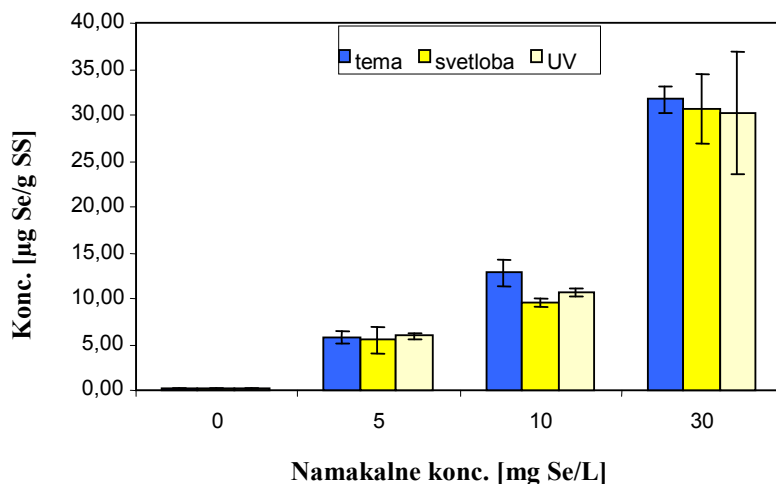


Slika 4: Koncentracije selena ($\mu\text{g Se/g}$ suhe snovi) v kalicah *R. sativus* raslih v temi, na sončni svetlobi z zmanjšanim UV-B sevanjem (svetloba) in na sončni svetlobi z UV-A in UV-B sevanjem (UV) skupin namakalnih koncentracij 0, 5, 10, 30 (mg Se/L) selenita (SeIV).

V preglednici 4 in na sliki 5 so prikazani rezultati meritev koncentracije Se v kalicah redkvice *R. sativus* v skupinah namakalnih koncentracij 0, 5, 10, 30 (mg Se/L) selenata (SeVI). Vsako od skupin smo gojili v temi, na sončni -UV-B v rastlinjaku in na sončni z UV-B zunaj rastlinjaka ter rezultate med seboj primerjali. Tudi v tem primeru vidimo, da je vsebnost selena naraščala z večjo namakalno koncentracijo selenata. V skupinah namakalnih koncentracij 0, 10 (mg Se/L) je vsebnost selena v kalicah raslih na sončni -UV-B najnižja ter najvišja v kalicah raslih v temi. Tudi v skupini z namakalno koncentracijo 5 mg Se/L je vsebnost selena najnižja v kalicah raslih na sončni -UV-B vendar najvišja v kalicah raslih na sončni z UV-B. V skupini z največjo namakalno koncentracijo selenata pa je vsebnost selena najnižja v kalicah raslih na sončni z UV-B in najvišja v kalicah raslih v temi.

Se VI	vrsta materiala	tema	svetloba	UV
		konc. [$\mu\text{g Se/g SS}$]	konc. [$\mu\text{g Se/g SS}$]	konc. [$\mu\text{g Se/g SS}$]
0	Cele kalice	0,20	0,18	0,19
5	Cele kalice	5,84	5,46	5,93
10	Cele kalice	12,81	9,63	10,71
30	Cele kalice	31,73	30,63	30,32

Preglednica 4: Koncentracije selena ($\mu\text{g Se/g}$ suhe snovi) v kalicah *R. sativus* raslih v temi, na sončni svetlobi z zmanjšanim UV-B sevanjem (svetloba) in na sončni svetlobi z UV-A in UV-B sevanjem (UV) skupin namakalnih koncentracij 0, 5, 10, 30 (mg Se/L) selenata (SeVI).

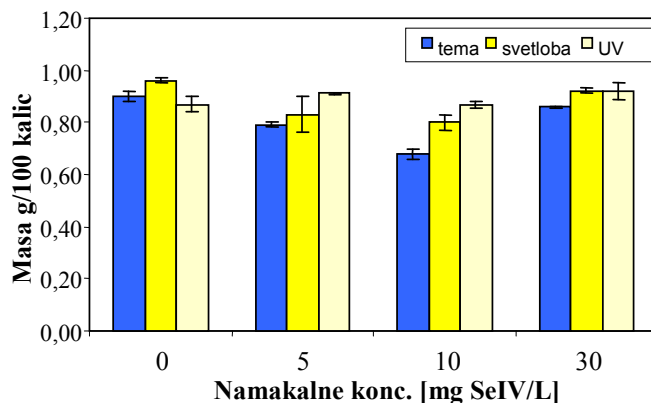


Slika 5: Koncentracije selena ($\mu\text{g Se/g}$ suhe snovi) v kalicah *R. sativus* raslih v temi, na sončni svetlobi z zmanjšanim UV-B sevanjem (svetloba) in na sončni svetlobi z UV-A in UV-B sevanjem (UV) skupin namakalnih koncentracij 0, 5, 10, 30 (mg Se/L) selenata (SeVI).

Preglednica 5 in slika 6 nam prikazujeta povprečno maso 100 kalic redkvice *R. sativus* v skupinah namakalnih koncentracij 0, 5, 10, 30 (mg Se/L) selenita (SeIV), ki smo jih gojili v različnih svetlobnih razmerah. V skupinah namakalnih koncentracij 5, 10, 30 (mg Se/L) selenita, imajo najmanjšo povprečno maso (g/100 kalic) kalice rasle v temi, večjo maso imajo kalice rasle na sončni -UV-B in največjo kalice rasle na sončni z UV-B. Največje razlike v povprečni masi 100 kalic v primerjavi z povprečno maso 100 semen z luskami (1,12 g) in brez lusk (1,03 g), so v skupini namakalne koncentracije 10 mg Se/L in sicer, kalice rasle v temi v povprečju tehtajo 0,68 g/100 kalic, rasle na sončni -UV-B 0,80 g/100 kalic in rasle na sončni z UV-B 0,87 g/100 kalic. Med kalicami, ki so rasle v temi, imajo kalice skupine z namakalno koncentracijo 10 mg Se/L najmanjšo povprečno maso (0,68 g/100 kalic), večjo maso imajo kalice skupine z namakalno koncentracijo 5 mg Se/L (0,79 g/100 kalic), še večjo kalice skupine z namakalno koncentracijo 30 mg Se/L (0,86 g/100 kalic) ter največjo (0,90 g/100 kalic) kalice ustrezne skupine (v temi) brez dodanega selena. Med kalicami, ki so rasle na sončni -UV-B, imajo najmanjšo povprečno maso (0,80 g/100 kalic) kalice skupine z namakalno koncentracijo 10 mg Se/L, nekoliko večjo povprečno maso (0,83 g/100 kalic) kalice skupine z namakalno koncentracijo 5 mg Se/L, še večjo (0,92 g/100 kalic) kalice skupine z namakalno koncentracijo 30 mg Se/L ter največjo (0,96 g/100 kalic) kalice ustrezne skupine (na sončni -UV-B) brez dodanega selena. Med kalicami *R. sativus*, ki so rasle na sončni z UV-B, imajo največjo povprečno maso (0,92 g/100 kalic) kalice skupine z največjo namakalno koncentracijo selenita, z nekoliko manjšo povprečno maso (0,91 g/100 kalic) kalice skupine z namakalno koncentracijo 5 mg Se/L in najmanjšo (0,87 g/100 kalic) kalice skupine z namakalno koncentracijo 10 mg Se/L ter kalice ustrezne skupine (na sončni z UV-B) brez dodanega selena.

Se IV	vrsta materiala	tema	svetloba	UV
		100 kalic (g)	100 kalic (g)	100 kalic (g)
0	Cele kalice	0,90	0,96	0,87
5	Cele kalice	0,79	0,83	0,91
10	Cele kalice	0,68	0,80	0,87
30	Cele kalice	0,86	0,92	0,92

Preglednica 5: Povprečna masa 100 kalic (g) *R sativus* raslih v temi, na sončni svetlobi z zmanjšanim UV-B sevanjem (svetloba) in na sončni svetlobi z UV-A in UV-B sevanjem (UV) v skupinah namakalnih koncentracij 0, 5, 10, 30 (mg Se/L) selenita (SeIV). Povprečna masa 100 semen z luskami je 1,12 g in brez lusk 1,03 g.

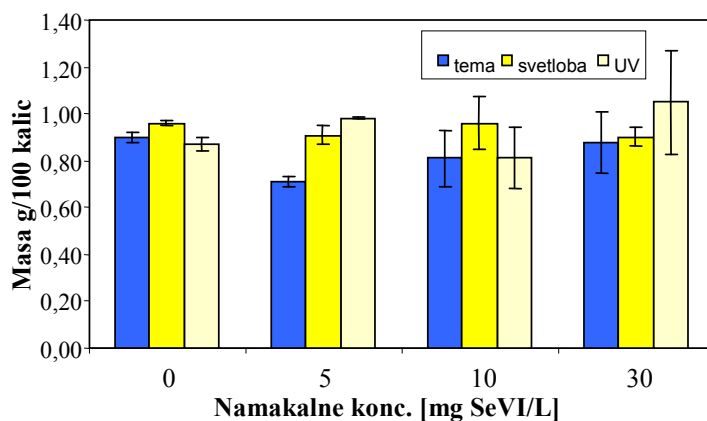


Slika 6: Povprečna masa 100 kalic (g) *R. sativus* raslih v temi, na sončni svetlobi z zmanjšanim UV-B sevanjem (svetloba) in na sončni svetlobi z UV-A in UV-B sevanjem (UV) v skupinah namakalnih koncentracij 0, 5, 10, 30 (mg Se/L) selenita (SeIV).

Preglednica 6 in slika 7 nam prikazujeta povprečno maso 100 kalic redkvice *R. sativus* v skupinah namakalnih koncentracij 0, 5, 10, 30 (mg Se/L) selenata (SeVI), ki smo jih gojili v različnih svetlobnih razmerah. V skupinah z namakalno koncentracijo 5 in 30 mg Se/L, si povprečne mase 100 kalic sledijo v naraščajočem zaporedju (**0,71 g/0,88 g**) tema, (**0,91 g/0,90 g**) sončna -UV-B in (**0,98 g/1,05 g**) sončna z UV-B. V skupini z namakalno koncentracijo 10 mg Se/L imajo največjo povprečno maso (0,96 g/100 kalic) kalice rasle na sončni -UV-B. Razlik v povprečni masi med kalicami raslimi v temi in na sončni z UV-B, v tej skupini ni (0,81 g/100 kalic). Med kalicami, ki so rasle v temi, imajo kalice ustrezne skupine (v temi) brez dodanega selenata največjo povprečno maso (0,90 g/100 kalic), povprečna masa je manjša (0,88 g/100 kalic) pri kalicah skupine z največjo namakalno koncentracijo selenata, sledijo kalice skupine z namakalno koncentracijo 10 mg Se/L (0,81 g/100 kalic) in najmanjša (0,71 g/100 kalic) pri kalicah skupine z namakalno koncentracijo 5 mg Se/L. Med kalicami, ki so rasle na sončni -UV-B, imajo kalice ustrezne skupine (na sončni -UV-B) brez dodanega selenata ter kalice skupine z namakalno koncentracijo 10 mg Se/L največjo povprečno maso (0,96 g/100 kalic), sledijo kalice skupine z namakalno koncentracijo 5 mg Se/L (0,91 g/100 kalic) in kalice skupine z namakalno koncentracijo 30 mg Se/L (0,90 g/100 kalic). Med kalicami, ki so rasle na sončni z UV-B pa imajo največjo povprečno maso kalice skupine z namakalno koncentracijo 30 mg Se/L (1,05 g/100 kalic), sledijo kalice skupine namakalne koncentracije 5 mg Se/L (0,98 g/100 kalic), kalice ustrezne skupine (na sončni z UV-B) brez dodanega selenata (0,87 g/100 kalic) in z najmanjšo povprečno maso kalice skupine z namakalno koncentracijo 10 mg Se/L (0,81 g/100 kalic).

Se VI	vrsta materiala	tema	svetloba	UV
		100 kalic (g)	100 kalic (g)	kalic (100 g)
0	Cele kalice	0,90	0,96	0,87
5	Cele kalice	0,71	0,91	0,98
10	Cele kalice	0,81	0,96	0,81
30	Cele kalice	0,88	0,90	1,05

Preglednica 6: Povprečna masa 100 kalic (g) *R. sativus* raslih v temi, na sončni svetlobi z zmanjšanim UV-B sevanjem (svetloba) in na sončni svetlobi z UV-A in UV-B sevanjem (UV) v skupinah namakalnih koncentracij 0, 5, 10, 30 (mg Se/L) selenata (SeVI). Povprečna masa 100 semen z luskami je 1,12 g in brez lusk 1,03 g.

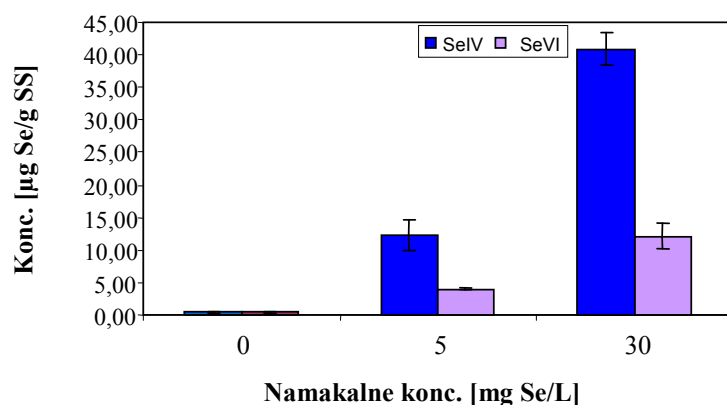


Slika 7: Povprečna masa 100 kalic (g) *R. sativus* raslih v temi, na sončni svetlobi z zmanjšanim UV-B sevanjem (svetloba) in na sončni svetlobi z UV-A in UV-B sevanjem (UV) v skupinah namakalnih koncentracij 0, 5, 10, 30 (mg Se/L) selenata (SeVI).

Preglednica 7 in slika 8 nam prikazujeta vsebnost Se v luskah *R. sativus* skupin namakalnih koncentracij 0, 5, 30 (mg Se/L) selenita (SeIV) oziroma selenata (SeVI). V primeru selenita oziroma selenata koncentracija Se v luskah narašča z večjo namakalno koncentracijo Se od 0 do 30 mg Se/L. Pri kalicah skupine z namakalno koncentracijo 5 mg Se/L, je vsebnost Se v luskah večja v primeru selenita SeIV (12,27 $\mu\text{g Se/g SS}$) kot selenata SeVI (3,97 $\mu\text{g Se/g SS}$). Enako velja tudi pri kalicah skupine z namakalno koncentracijo 30 mg Se/L, kjer je vsebnost Se v luskah v primeru selenita (SeIV) 40,9 $\mu\text{g Se/g suhe snovi}$ in selenata (SeVI) 12,13 $\mu\text{g Se/g suhe snovi}$.

	vrsta materiala	SeIV	SeVI
		konc. [$\mu\text{g Se/g SS}$]	konc. [$\mu\text{g Se/g SS}$]
0	Luske (prazne)	0,40	0,40
5	Luske (prazne)	12,27	3,97
30	Luske (prazne)	40,9	12,13

Preglednica 7: Koncentracije selenata ($\mu\text{g Se/g}$ suhe snovi) v luskah *R. sativus* skupin namakalnih koncentracij 0, 5, 30 (mg Se/L) selenita (SeIV) oziroma selenata (SeVI) na sončni svetlobi z UV-A in UV-B sevanjem.



Slika 8: Koncentracije selenata ($\mu\text{g Se/g}$ suhe snovi) v luskah *R. sativus* skupin namakalnih koncentracij 0, 5, 30 (mg Se/L) selenita (SeIV) oziroma selenata (SeVI) na sončni svetlobi z UV-A in UV-B sevanjem.

V preglednici 8 imamo koncentracije Se v delih (stebelcih, kotiledonih) kalic *R. sativus* v skupini z največjo namakalno koncentracijo selenita (SeIV) oziroma selenata (SeVI) pri različnih svetlobnih razmerah (tema, sončna -UV-B, sončna z UV-B). Pri kalicah *R. sativus* raslih na sončni -UV-B in na sončni z UV-B, je vsebnost Se v stebelcih večja kot v kotiledonih tako v primeru selenita (SeIV) kot selenata (SeVI). Pri kalicah *R. sativus* raslih v temi pa je ravno obratno. Podatek imamo samo za kalice skupine namakalne koncentracije 30 mg Se/L selenita (SeIV). Ne glede na različne svetlobne razmere (tema, sončna -UV-B in sončna z UV-B) in razlike med manjšo ali večjo vsebnostjo Se v kotiledonih in stebelcih, je vsebnost selenata v kalicah *R. sativus* večja v primeru selenata (SeVI) kot selenita (SeIV), saj slednjega več ostane v luskah, kar nam prikazujeta preglednica 7 in slika 8.

Namakalna konc. Se	vrsta materiala	tema	svetloba	UV
			konc. [$\mu\text{g Se/g SS}$]	
30 SeIV	Kotiledoni	23,48	20,21	21,79
	Stebelca	22,48	23,01	26,37
30 SeVI	Kotiledoni	/	27,97	25,65
	Stebelca	/	34,88	37,62

Preglednica 8: Koncentracije selena ($\mu\text{g Se/g}$ suhe snovi) v kotiledonih in stebelcih *R. sativus* skupine namakalne koncentracije 30 mg Se/L selenita (SeIV) v temi, na sončni svetlobi z zmanjšanim UV-B sevanjem (svetloba) in na sončni svetlobi z UV-A in UV-B sevanjem (UV) in skupine namakalne koncentracije 30 mg Se/L selenata (SeVI) na sončni svetlobi z zmanjšanim UV-B sevanjem (svetloba) in na sončni svetlobi z UV-A in UV-B sevanjem (UV).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Pri namakanju semen v raztopinah koncentracij 5, 10, 30 (mg Se/L) natrijevega selenita, je privzem selen v kalice *R. sativus* manjši, kot pri selenatu. Med kalicami, ki so rasle v temi, na sončni svetlobi z zmanjšanim UV-B sevanjem (v nadaljnjem besedilu: sončna - UV-B) in na sončni svetlobi z UV-A in UV-B sevanjem (v nadaljnjem besedilu: sončna z UV-B) skupine namakalne koncentracije 5 mg Se^{IV}/L, je vsebnost selen manjša povprečno za 2 µg Se/ g SS kot v primeru selenata. Tudi med kalicami skupin namakalnih koncentracij 10, 30 (mg Se/L), je privzem manjši v primeru selenita kot selenata in sicer v skupini z namakalno koncentracijo 10 mg Se/L povprečno za 3 µg Se/g SS, v skupini z namakalno koncentracijo 30 mg Se/L pa povprečno za 8 µg Se/g SS. O manjšem privzemu selenita v kalice so poročali tudi Cartes et al. (2005), ko so spremljali porast koncentracije Se v poganjkih ljujke in ugotovili, da so bile vsebnosti Se nižje v primeru, ko so rastline obravnavali s Se v obliki selenita in višje v primeru selenata. V našem primeru slednje ugotovitve potrjujejo tudi rezultati iz preglednice 7 in slike 8 iz katerih vidimo, da je vsebnost Se v luskah višja v primeru, ko smo semena namakali v raztopinah selenita kot selenata, posledica česar je manjši privzem selenita v kalice.

Razlike v privzemu med selenitom oziroma selenatom v kalice *R. sativus*, so manjše pri manjših namakalnih koncentracijah Se in večje pri večjih namakalnih koncentracijah Se. To je lahko posledica same koncentracije Se. Ozka meja koncentracije selen, ki ločuje esencialnost in toksičnost, je odvisna od kemijske oblike selen (Kabata Pendias, 2001; Wu, 2004). Da je odvisna tudi od okoljskih dejavnikov, poročajo tudi Fan et al. (2002) in Shardendu et al. (2003). Breznik et al. (2005) so preučevali kombinacijo učinkov med povišanjem UV-B sevanja in dodanim selenom pri navadni in tatarski ajdi. Eden izmed učinkov Se v kombinaciji z UV-B sevanjem je bil povečanje nadzemne biomase rastlin. Tudi v našem primeru se je izkazalo, da je masa kalic *R. sativus* skupin z namakalnimi koncentracijami 5, 10, 30 (mg Se/L) selenita, večja v primeru ko smo kalice gojili na sončni svetlobi z UV-B sevanjem, kot v temi in na sončni svetlobi z zmanjšanim UV-B sevanjem. UV-B sevanje je negativno vplivalo na rast kalic *R. sativus* vendar se je negativni učinek v kombinaciji s Se zmanjšal. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi drugi raziskovalci, ki so opravljali študije na bučah, ljujki, solati, krompirju in zelenem čaju.

Razlike v privzemu med selenitom oziroma selenatom v kalice, so lahko posledica toksičnosti selenita, saj kot so poročali Lemly et al. (1993) je ta približno 5-10 krat bolj toksičen za organizme kot selenat. Terry et al. (2000) so dokazali, da gre to pripisati hitrejši pretvorbi selenita v selenoaminokislino in proteine. V naši raziskavi smo ugotovili, da ima selenit večji učinek na manjšo maso kalic, kot selenat. V preglednici 5 in na sliki 6 vidimo, da je masa kalic skupin namakalnih koncentracij 5, 10, 30 (mg Se/L) selenita, ki smo jih gojili v temi in na sončni -UV-B, manjša v primerjavi z ustrežno skupino (v temi, na sončni -UV-B) brez dodanega Se in razlike so večje kot pri selenatu (preglednica 6 in slika 7).

V preglednici 8, ki nam prikazuje koncentracije Se v kotiledonih in stebelcih kalic *R. sativus*, vidimo, da v skupinah namakalnih koncentracij 5 mg Se/L (podatki niso prikazani v tabeli: kotiledoni 3,61 $\mu\text{g Se/g SS}$; stebelca 3,24 $\mu\text{g Se/g SS}$) in 30 mg Se/L selenita v temi, več Se vsebujejo kotiledoni kot stebelca, vendar je razlika majhna. V skupini namakalne koncentracije 30 mg Se/L selenita oziroma selenata na sončni -UV-B in na sončni z UV-B, pa je vsebnost Se večja v stebelcih kot v kotiledonih. Aktivno rastoča tkiva ponavadi vsebujejo največje količine selena, o čemer so poročali tudi Kahakachchi et al. (2004). Breznik et al. (2005) navajajo manjšo rast stebel pri navadni in tatarski ajdi kot rezultat povečanega UV-B sevanja. V našem primeru vsebujejo stebelca kalic *R. sativus* ustrezne skupine (na sončni z UV-B) brez dodanega selena, nižje koncentracije Se kot kotiledoni (podatki niso prikazani v tabeli: kotiledoni 0,24 $\mu\text{g Se/g SS}$; stebelca 0,11 $\mu\text{g Se/g SS}$), kar je v skladu z zgornjimi ugotovitvami Kahakachchi et al. (2004) in Breznik et al. (2005). Pri kalicah skupine z največjo namakalno koncentracijo selenita oziroma selenata, ki smo jih gojili na sončni z UV-B, pa višje koncentracije Se vsebujejo stebelca kot kotiledoni. Selenit še bolj pa selenat, zmanjšata negativne vplive UV-B sevanja na manjšo maso kalic. Enako velja tudi za kalice skupine z namakalno koncentracijo 5 mg Se/L selenita, ki smo jih gojili na sončni z UV-B (podatki niso prikazani v tabeli: kotiledoni 3,37 $\mu\text{g Se/g SS}$; stebelca 3,87 $\mu\text{g Se/g SS}$). Za ostale skupine tega ne moremo trditi, ker nismo pridobili podatkov. Višje vsebnosti Se, pri kalicah skupine namakalne koncentracije 30 mg Se/L selenita oziroma selenata, ki smo jih gojili na sončni -UV-B, vsebujejo stebelca. Pri optimalnih razmerah fotosintezni aparat učinkovito izrablja razpoložljivo svetlobo, kar omogoča povečanje asimilacijske površine in s tem boljše rast. Germ et al. (2007) navajajo, da mlade rastline, ki rastejo brez UV-B sevanja, uporabijo selen za gradnjo energetskih rezerv, kar se kaže v večji rasti poganjkov.

5.2 SKLEPI

Rezultati naše raziskave kažejo, da različne koncentracije selenita oziroma selenata v kombinaciji s svetlobnimi razmerami tema, sončna svetloba z zmanjšanim UV-B sevanjem (v nadaljnjem besedilu: sončna -UV-B) in sončna svetloba z UV-A in UV-B sevanjem (v nadaljnjem besedilu: sončna z UV-B) različno vplivajo na rast in razvoj kalic redkvice *R. sativus*. Med kalicami skupin namakalnih koncentracij 5, 10, 30 (mg Se/L) selenita v vseh svetlobnih razmerah, imajo najmanjšo povprečno maso (g/100 kalic) kalice, ki smo jih obravnavali z namakalno koncentracijo 10 mg Se/L, največjo pa kalice, obravnavane z največjo namakalno koncentracijo selenita. Enako se je izkazalo tudi med kalicami skupin različnih namakalnih koncentracij selenata vendar le v kombinaciji s sončno z UV-B. Pri kalicah, ki smo jih gojili na sončni -UV-B, pa je ravno obratno, z največjo maso kalice skupine z namakalno koncentracijo 10 mg Se/L in najmanjšo kalice skupine z namakalno koncentracijo 30 mg Se/L. Pri kalicah, ki smo jih gojili v temi, pa masa kalic narašča z večjo namakalno koncentracijo Se. Ugotovili smo tudi, da ima selenat v kombinaciji s temo in sončno -UV-B, manjše učinke na manjšo maso kalic kot selenit, pri vseh namakalnih koncentracijah Se, razen pri koncentraciji 5 mg Se/L v temi in 30 mg Se/L na sončni -UV-B. Učinek obeh oblik selena na manjšo maso kalic, v primerjavi z ustrežno skupino (na sončni z UV-B) brez dodanega selena, se zmanjša pri kalicah skupine z najmanjšo (5 mg Se/L) in največjo (30 mg Se/L) namakalno koncentracijo Se vendar le v kombinaciji s sončno z UV-B. Pri kalicah skupine z namakalno koncentracijo 10 mg Se/L selenita, ki smo jih gojili na sončni z UV-B, ni bilo sprememb v masi v primerjavi z ustrežno skupino (na sončni z UV-B) brez dodanega selena. V primeru selenata pa se je učinek na manjšo maso kalic še povečal. Učinke selena na večjo maso kalic dobimo le v primeru namakalnih koncentracij 5 in 30 (mg Se/L) selenata pri sončni z UV-B sevanjem, ko je povprečna masa 100 kalic presegla povprečno maso 100 kalic ustrezne skupine (na sončni -UV-B) brez dodanega selena. S temi rezultati smo potrdili hipotezo, da imata selenit in selenat pri različnih koncentracijah različne učinke na rast in razvoj kalic redkvice *R. sativus*.

Če primerjamo povprečne mase 100 kalic redkvice ugotovimo, da so mase (g/100 kalic) najmanjše v primeru kalic, ki so rasle v temi pri vseh namakalnih koncentracijah selenita oziroma selenata. S tem potrjujemo hipotezo o pričakovanih najmanjših učinkih selena na kalice, ki so rasle v temi v primerjavi s kalicami, ki so rasle na sončni svetlobi z zmanjšanim UV-B sevanjem in na sončni svetlobi z UV-A in UV-B sevanjem.

6 POVZETEK

Selen je za normalno delovanje človeškega organizma nujno potreben v majhnih količinah. Zaradi pomanjkanja selena na določenih območjih, ga je v prehrani ljudi premalo, kar lahko pripelje do številnih obolenj. Zato bi lahko bil eden izmed uspešnih načinov, kako se izogniti tej težavi, pridelovanje rastlin z namakanjem semen v raztopini selena. Pri tem pa je potrebno spremljati koncentracijo le-tega v rastlini.

Zaradi velike vsebnosti glukozinolatov, izotiocianatov in številnih drugih fitokemikalij, ki prispevajo k pozitivnemu učinku na zdravje ljudi, se je poraba križnic povečala. Posebno kalice redkvice *R. sativus* so že dolgo v uporabi zaradi vsebnosti velikih količin antioksidantov, vitamina C in drugih zdravju koristnih snovi. Pri teh je bila ugotovljena tudi antikancerogena in antioksidativna aktivnost. Tako bi lahko z dodajanjem selena redkviči še dodatno povečali nabor dobrih lastnosti in s tem zdravje ljudi.

V poskusu smo nastavili 24 skupin kalic redkvic *R. sativus* namakalnih koncentracij 0, 5, 10, 30 (mg Se/L) natrijevega selenita (SeIV) oziroma selenata (SeVI). Vsako od skupin smo gojili v temi, na sončni svetlobi z zmanjšanim UV-B sevanjem v rastlinjaku (v nadaljnjem besedilu: sončna -UV-B) in na sončni svetlobi z UV-A in UV-B sevanjem zunaj rastlinjaka (v nadaljnjem besedilu: sončna z UV-B). Želeli smo ugotoviti, pri katerih koncentracijah selenita oziroma selenata kalice *R. sativus* rastejo najboljše in kako selen vpliva na njihovo rast. Zanimal nas je tudi vpliv UV-B sevanja na rast in razvoj kalic. Primerjali smo s kalicami, ki so rasle na sončni -UV-B v rastlinjaku oziroma v temi.

Rezultati so pokazali, da tako selenit kot selenat vplivata na rast kalic *R. sativus*, kar se kaže v manjši povprečni masi 100 kalic in črnih pikah na kotiledonih. Učinek selenita na manjšo maso kalic skupin različnih namakalnih koncentracij Se, ki smo jih gojili v temi, v primerjavi z ustrežno skupino (v temi) brez dodanega selena, je najmanjši pri namakalni koncentraciji 30 mg Se/L in največji pri namakalni koncentraciji 10 mg Se/L. Enako velja tudi za kalice, ki smo jih gojili na sončni -UV-B. Pri selenatu pa je pri kalicah, ki smo jih gojili na sončni -UV-B ravno obratno. Pri kalicah raslih v temi je učinek na manjšo maso kalic v primerjavi z ustrežno skupino (v temi) brez dodanega Se, najmanjši pri skupini z največjo namakalno koncentracijo (30 mg Se/L) in največji pri skupini z najmanjšo namakalno koncentracijo (5 mg Se/L) selenata. Prišli smo tudi do ugotovitve o boljšem privzemu selenata kot selenita in temu posledično večjemu vplivu le-tega na rast in razvoj kalic *R. sativus*. V skladu z ugotovitvami o boljšem privzemu selenata kot selenita se je izkazalo, da selenat v kombinaciji z UV-B sevanjem intenzivneje blaži negativne učinke UV-B sevanja in poveča rast kalic. Učinek obeh oblik selena na manjšo maso kalic, v primerjavi z ustrežno skupino (na sončni z UV-B) brez dodanega selena, se zmanjša pri kalicah skupine z najmanjšo (5 mg Se/L) in največjo (30 mg Se/L) namakalno koncentracijo Se v kombinaciji s sončno svetlobo z UV-B sevanjem. Pri kalicah skupine z namakalno koncentracijo 10 mg Se/L selenita, ki smo jih gojili na sončni z UV-B, ni bilo sprememb v masi v primerjavi z ustrežno skupino (na sončni z UV-B) brez dodanega selena. V primeru selenata pa se je učinek na manjšo maso kalic še povečal. Učinke selena na večjo maso kalic dobimo le v primeru namakalnih koncentracij 5 in 30 (mg Se/L) selenata pri sončni z UV-B, ko je povprečna masa 100 kalic presegla povprečno maso 100 kalic ustrezne skupine (na sončni -UV-B) brez dodanega selena.

7 VIRI

- Alfthan G., Aro A., Arvilommi H., Huttunen J.K. (1991). Selenium metabolism and platelet glutathione peroxidase activity in healthy Finnish men: effects of selenium yeast, selenite and selenate. *American Journal of Clinical Nutrition*, 53: 120-125.
- Amweg E.L., Stuart D.L., Weston D.P. (2003). Comparative bioavailability of selenium to aquatic organisms after biological treatment of agricultural drainage water. *Aquatic Toxicology*, 63: 13-25.
- Aro A., Ekholm P., Alfthan G., Varo P. (1998). Effects of selenium supplementation of fertilizers on human nutrition and selenium status. In *Environmental Chemistry of Selenium*, Frankenberger W.T., Engbert R.A., Eds., Dekker: New York, pp 81-97.
- Baek S.H., Park M., Suh J.H. & Choi H.S. (2008). Protective effects of an extract of young radish (*Raphanus sativus* L.) cultivated with sulfur (sulfur-radish extract) and of sulforaphane on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 72: 1176–1182.
- Barillari J., Cervellati R., Costa S., Guerra M.C., Speroni E., Utan A. & Iori R. (2006). Antioxidant and choleric properties of *Raphanus sativus* L. sprout (Kaiware Daikon) extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 9773–9778.
- Barillari J., Cervellati R., Paolini M., Tatibouet A., Rollin P. & Iori R. (2005). Isolation of 4-methylthio-3-butenyl glucosinolate from *Raphanus sativus* sprouts (kaiware daikon) and its redox properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 9890–9896.
- Barillari J., Iori R., Papi A., Orlandi M., Bartolini G., Gabbanini S., Pedulli G. F. & Valgimigli L. (2008). Kaiware Daikon (*Raphanus sativus* L.) extract: A naturally multipotent chemopreventive agent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 7823–7830.
- Beck M., Kolbeck P., Rohr L., Shi Q., Morris V., Levander O. (1995a). Benign human enterovirus becomes virulent in selenium-deficient mice. *Journal of Medical Virology*, 43: 166-170.
- Beck M., Shi Q., Morris V., Levander O. (1995b). Rapid genomic evolution of a non-virulent coxsackievirus B3 in selenium deficient mice results in selection of identical virulent isolates. *Nature Medicine*, 1: 433-441.
- Behne D., Kyriakopoulos A. (2001). Mammalian selenium-containing proteins. *Annual Review of Nutrition*, 21: 453-473.
- 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 tatarly (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.) buckwheat. *Photosynthetica*, 43: 583-589.
- Brown T.A., Shrift A. (1982). Selenium-toxicity and tolerance in higher plants. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 57: 59-84.
- Butler J.A., Beilstein M.A. & Whanger P.D. (1989). Influence of dietary methionine on the metabolism of selenomethionine in rats. *Journal of Nutrition*, 119: 1001-1009.
- Butler J.A., Thomson C.D., Whange P.D., Robinson M.F. (1991). Selenium distribution in blood fractions of New Zealand women taking organic or inorganic selenium. *American Journal of Clinical Nutrition*, 53: 748-754.
- Cai X.J., Block E., Uden P.C., Zhang X., Quimby B.D. & Sullivan J.J. (1995). *Allium* chemistry: identification of selenoamino acids in ordinary and selenium-enriched garlic, onion and broccoli using gas chromatography with atomic emission detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 1754-1757.
- Carlson C.L., Kaplan D.I., Adriano D.C. (1989). Effects of selenium on germination and radicle elongation of selected agronomic species. *Environmental and Experimental Botany*, 29: 493-498.
- Cartes P., Gianfreda L., Mora M.L. (2005). Uptake of selenium and its antioxidant activity in ryegrass when applied as selenate and selenite forms. *Plant and Soil*, 276: 359-367.
- Ciska E., Honke J. & Kozłowska H. (2008). Effect of light conditions on the contents of glucosinolates in germinating seeds of white mustard, red radish, white radish, and rapeseed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 9087-9093.
- Clark J., Combs G., Turnbull B., Slate E., Chalker D., Chow J., Davis L., Glover R., Graham G., Gross E., Krongard A., Leshner J., Park H., Sanders B., Smith C. & Taylor J. (1996). Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. *Journal of the American Medical Association*, 276: 1957-1963.
- Clausen J., Nielsen S.A. (1988). Comparison of whole blood selenium values and erythrocyte glutathione peroxidase activities of normal individuals on supplementation with selenate, selenite, L-selenomethionine and high selenium yeast. *Biological Trace Element Research*, 15: 125-138.
- Coombs G. F. (1988). Selenium in foods. In *Advances in Food Research*, Chichester C.O., Schweiger B.S., Eds., Academic Press: San Diego, CA, pp 85-113.
- Dedina J. (1995). *Hydride generation atomic absorption spectrometry*. Chichester, New York, Brisbane, John Wiley & Sons: 526 str.

Duffield-Lillico A.J., Dalkin B.L., Reid M.E., Turnbull B.W., Slate E.H., Jacobs E.T., Marshall J.R., Clark L.C. (2003). Selenium supplementation, baseline plasma selenium status and incidence of prostate cancer: an analysis of the complete treatment period of the nutritional prevention of cancer trial. *BJU International*, 91: 608-612.

Dumont E., Vanhaecke F., Cornelis R. (2006). Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385: 1304-1323.

EC (2002). Directive 2002/46/EC of the European Parliament and the Council. *Official Journal of the European Communities*, L183: 51-57.

Ekelund N.G.A., Danilov R.A. (2001). The influence of selenium on photosynthesis and "light-enhanced dark respiration" (LEDR) in the flagellate *Euglena gracilis* after exposure to ultraviolet radiation. *Aquatic Sciences*, 63: 457-465.

Ellis D.R., Salt D.E. (2003). Plants, selenium and human health. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 273-279.

Eurola M., Ekholm P., Ylien M., Koivistoinen P., Varo P. (1990). Effects of selenium fertilization on the selenium content of cereal grains, flour, and bread produced in Finland. *Cereal Chemistry*, 67: 334-337.

Fahey J. W., Zhang Y. & Talalay P. (1997). Broccoli sprouts: An exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94: 10367-10372.

Fairweather-Tait S. J. (1997). Bioavailability of selenium. *European Journal of Clinical Nutrition*, 51: S20-S23.

Fan T.W.M., Teh S.J., Hinton D.E., Higashi R.M. (2002). Selenium biotransformations into proteinaceous forms by foodweb organisms of selenium-laden drainage waters in California. *Aquatic Toxicology*, 57: 65-84.

Finkel T., Holbrook N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of aging. *Nature*, 408: 239-247.

Finley J.W., Davis C.D., Feng Y. (2000). Selenium from high selenium broccoli protects rats from colon cancer. *Journal of Nutrition*, 130: 2384-2389.

Finley J.W., Ip C., Lisk D.J., Davis C.D., Hintze K.J., Whanger P.D. (2001). Cancer-protective properties of high-selenium broccoli. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 2679-2683.

Finley J. & Penland J. (1998). Adequacy or deprivation of dietary selenium in healthy men: clinical and psychological findings. *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, 11: 11-27.

Foster L.H., Sumar S. (1995). Selenium in the environment, food and health. *Nutrition & Food Science*, 5: 17-23.

Foster S. J., Kraus R. J., Ganther H. E. (1986). The metabolism of selenomethionine, S-methylselenocysteine, their selenonium derivatives, and trimethylselenonium in the rat. *Archives of Biochemistry Biophysics*, 251: 77-86.

Gaberščik A., Vončina M., Trošt T., Germ M., Bjorn L.O. (2002). Growth and production of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) treated with reduced, ambient, and enhanced UV-B radiation. *Journal of Phytochemistry and Photobiology B-Biology*, 66: 30-36.

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 Physiology and Biochemistry*, 43: 445-448.

Germ M., Osvald J. (2005). Selenium treatment affected respiratory potential in *Eruca sativa*. *Acta Agriculturae Slovenica*, 85: 329-335.

Germ M., Stibilj V., Osvald J., Kreft I. (2007). Effect of selenium foliar application on chicory (*Cichorium intybus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 795-798.

Grieve C.M., Poss J.A., Suarez D.L., Dierig D.A. (2001). *Lesquerella* growth and selenium uptake affected by saline irrigation water composition. *Industrial Crops and Products*, 13: 57-65.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1999). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford.

Hanlon P.R., Robbins M.G., Hammon L.D., Barnes D.M. (2009). Aqueous extract from the vegetative portion of Spanish black radish (*Raphanus sativus* L. var. *niger*) induces detoxification enzyme expression in HepG2 cells. *Journal of Functional Foods* I, 356-365.

Hanlon P.R., Webber D.M. & Barnes D.M. (2007). Aqueous extract from Spanish black radish (*Raphanus sativus* L. var. *niger*) induces detoxification enzymes in the HepG2 human hepatoma cell line. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 6439-6446.

Hamilton S.J. (2004). Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. *Science of the Total Environment*, 326: 1-31.

Hartikainen H., Xue T. (1999). The promotive effect of selenium on plant growth as triggered by ultraviolet irradiation. *Journal of Environmental Quality*, 28: 1272-1275.

Hartikainen H., Xue T., Piironen V. (2000). Selenium as an antioxidant and prooxidant in ryegrass. *Plant and Soil*, 225: 193-200.

- Heijari J., Kivimäenpää M., Hartikainen H., Julkunen-Tiitto R., Wulff A. (2006). Responses of strawberry (*Fragaria x ananassa*) to supplemental UV-B radiation and selenium under field conditions. *Plant and Soil*, 282: 27-39.
- Hu Q.H., Xu J., Pang G.X. (2003). Effect of selenium on the yield and quality of green tea leaves harvested in early spring. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 3379-3381.
- Hymer C.B, Caruso J.A. (2006). Selenium speciation analysis using inductively coupled plasma-mass spectrometry-review. *Journal of Chromatography A*, 1114: 1-20.
- Hyun S., Burns P.E., Murarka I., Lee L.S. (2006). Selenium (IV) and (VI) sorption by soils surrounding fly ash management facilities. *Vadose Zone Journal*, 5: 1110-1118.
- Ip C., Ganther H. (1996). Activity of methylated forms of selenium in cancer prevention. *Cancer Research*, 50: 1206-1211.
- Ip C., Lisk D.J (1994). Enrichment of selenium in *allium* vegetables for cancer prevention. *Carcinogenesis*, 15: 1881-1885.
- Ip C., Lisk D.J. (1994). Characterization of tissue selenium profiles and anticarcinogenic responses in rats fed natural sources of selenium-rich products. *Carcinogenesis*, 15: 573-576.
- Ip C., Lisk D.J. (1995). Efficacy of cancer prevention by high-selenium garlic is primarily dependent on the action of selenium. *Carcinogenesis*, 16: 2649-2652.
- Ippoushi K., Takeuchi A., Ito H., Horie H. & Azuma K. (2007). Antioxidative effects of daikon sprout (*Raphanus sativus* L.) and ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) in rats. *Food Chemistry*, 102: 237-242.
- Jansen M. (2002). Ultraviolet-B radiation effects on plants: induction of morphogenic responses. *Physiologia Plantarum*, 116: 423-429.
- Kabata Pendias A. (2001). *Trace Elements in Soils and Plants* (3rd Edn) CRC Press, Boca Raton, FL, 287 pp.
- Kadrabova J., Mandaric A., Ginter E. (1997). The selenium content of selected food from the Slovak Republic. *Food Chemistry*, 58: 29-32.
- Kahakachchi C., Boakye H.T., Uden P.C., Tyson J.F. (2004). Chromatographic speciation of anionic and neutral selenium compounds in Se-accumulating *Brassica juncea* (Indian mustard) and in selenized yeast. *Journal of Chromatography A*, 1054: 303-312.
- Kapoor L.D. (1990). *Hand book of ayurvedic medicinal plants*. CRC press, Boca Raton.

Kim S.J., Kim B.S., Kyung T.W., Lee S.C., Rho C.W., Choi K.R., Hwang H.J. & Choi H.S. (2006). Suppressive effects of young radish cultivated with sulfur on growth and metastasis of B16–F10 melanoma cells. *Archives of Pharmacol Research*, 29: 235–240.

Klapec T., Mandić M.L., Grgić J., Primorac Lj., Ikić M., Lovrić T., Grgić Z., Herceg Z. (1998). Daily dietary intake of selenium in eastern Croatia. *Science of the Total Environment*, 217: 127-136.

Kreft I., Stibilj V., Trkov Z. (2002). Iodine and selenium content in pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) oil and oil-cake. *European Food Research and Technology*, 215: 279-281.

Kumpulainen J.T.(1993). Selenium in foods and diets of selected countries. *Journal of Trace Element Electrolytes Health*, 7: 107-108.

Kuznetsov V.V., Kholodova V.P., Kuznetsov V.I., Yagodin B.A. (2003). Selenium regulates the water status of plants exposed to drought. *Doklady Biological Sciences*, 390: 266-268.

Läuchli A. (1993). Selenium in plants: Uptake, functions and environmental toxicity. *Botanica Acta*, 106: 455-468.

Lee S.O. & Lee I.S. (2006). Induction of quinone reductase, the phase 2 anticarcinogenic marker enzyme, in Hepa1c1c7 cells by radish sprouts, *Raphanus sativus* L.. *Journal of Food Science*, 71: S144–S148.

Lemly A.D., Finger S.E., Nelson M.K. (1993). Sources and impacts of irrigation drainwater contaminants in arid wetlands. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12: 2265-2279.

Lemly A.D. (2002). *Selenium Assessment in Aquatic Ecosystems-a Guide for Hazard Evaluation and Water Quality Criteria*. Springer-Verlag, New York, 161 pp.

Letavayova L., Vlčkova V., Brozmanova J. (2006). Selenium: From cancer prevention to DNA damage. *Review. Toxicology*, 227: 1-14.

Levander O.A. (1986). Selenium. In: *Trace Elements in Human and Animal Nutrition* (Mertz W. ed.). Academic Press, Orlando, FL, pp 209-208.

Levander O.A., Morris V.C. (1984). Dietary selenium levels needed to maintain balance in North American adults self-selected diets. *American Journal of Clinical Nutrition*, 39: 809-815.

Levander O.A., Alfthan G., Arvilommi H., Gref C.G., Huttunen, J.K., Kataja M., Koivistoinen P., Pikkarainen J. (1983). Bioavailability of selenium to Finnish men as assessed by platelet glutathione peroxidase activity and other blood parameters. *American Journal of Clinical Nutrition*, 37: 887-897.

Levine V.E. (1925). The effect of selenium compounds upon growth and germination in plants. *American Journal of Botany*, 12: 82-90.

Lugasi A., Blazovics A., Hagymasi K., Kocsis I. & Kery A. (2005). Antioxidant effect of squeezed juice from black radish (*Raphanus sativus* L. var. *niger*) in alimentary hyperlipidaemia in rats. *Phytotherapy Research*, 19: 587–591.

Lyons G., Ortiz-Monasterio I., Stangoulis J., Graham R. (2005). Selenium concentration in wheat grain: Is there sufficient genotypic variation to use in breeding? *Plant and Soil*, 269: 369-380.

Madronich S., McKenzie R.L., Bjorn L.O., Caldwell M.M. (1998). Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 46: 5-18.

Makela A.L., Nanto V., Makela P., Wang W. (1993). The effect of nationwide selenium enrichment of fertilizers on selenium status of healthy Finnish medical students living in southwestern Finland. *Biological Trace Element Research*, 36: 151-157.

Martinez-Villaluenga C., Frias J., Gulewicz P., Gulewicz K. & Vidal-Valverde C. (2008). Food safety evaluation of broccoli and radish sprouts. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 1635–1644.

Moser-Veillon P.B., Mangels A.R., Patterson K.Y., Veillon C. (1992). Utilization of two different chemical forms of selenium during lactating using stable isotope tracers: an example of speciation in nutrition. *Analyst*, 117: 559-562.

Murillo G. & Mehta R. G. (2001). Cruciferous vegetables and cancer prevention. *Nutrition and Cancer*, 41: 17–28.

Nadkarni K.M. (1976). *Indian materia medica*. Popular Prakashan, Bombay.

Nakamura Y., Iwahashi T., Tanaka A., Koutani J., Matsuo T., Okamoto S., Sato K., Ohtsuki K.J. (2001). 4-(Methylthio)-3-butenyl isothiocyanate, a principle antimutagen in daikon (*Raphanus sativus*; Japanese white radish). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 5755–5760.

Nakamura Y., Nakamura K., Asai Y., Wada T., Tanaka K., Matsuo T., Okamoto S., Meijer J., Kitamura Y., Nishikawa A., Park E. Y., Sato K. & Ohtsuki K. (2008). Comparison of the glucosinolate-myrosinase systems among daikon (*Raphanus sativus*, Japanese white radish) varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 2702–2707.

National Research Council (1989) *Recommended Dietary Allowances*. National Academy Press, Washington, DC.

Nowak J., Kaklewski K., Ligocki M. (2004). Influence of selenium on oxidoreductive enzymes activity in soil and in plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 36: 1553-1558.

- Oster O., Prellwitz W. (1988). The daily dietary selenium intake of West German adults. *Biological Trace Element Research*, 20: 1-14.
- Øgaard A.F., Sogh T.A., Eich-Greatorex S. (2006). Effect of cattle manure on selenate and selenite retention in soil. *Nutrients Cycling in Agroecosystems* 76: 39-48.
- Papi A., Orlandi M., Bartolini G., Barillari J., Iori R., Paolini M., Ferroni F., Grazia Fumo M., Pedulli G. F. & Valgimigli L. (2008). Cytotoxic and antioxidant activity of 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate from *Raphanus sativus* L. (Kaiware Daikon) sprouts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 875–883.
- Patrick L. (2004). Selenium biochemistry and cancer: a review of the literature. *Alternative Medicine Review*, 9: 239-258.
- Pennanen A., Xue T., Hartikainen H. (2002). Protective role of selenium in plant subjected to severe UV irradiation stress. *Journal of Applied Botany*, 76: 66-76.
- Persson-Moschos M., Alfthan G., Akesson B. (1998). Plasma selenoprotein P levels of healthy males in different selenium status after oral supplementation with different forms of selenium. *European Journal of Clinical Nutrition*, 52: 363-367.
- Pfannhauser W., Sima A., Heumann S., Schaller U., Wilplinger M., Schönsleben I. (2000). Estimation of trace element supply in Austria. In: Centeno J.A., Collery P., Vernet G., Finkelman R.B., Gibb H., Etienne J.C. (Eds) *Metal Ions in Biology and Medicine*, John Libbey Eurotext, Paris, pp 521-523.
- Pravilnik o krmnih dodatkih. Ur.l.RS št. 47/05.
- Reid M.E., Stratton M.S., Lillico A.J., Fakh 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.
- Rotruck J.T, Pope A.L, Ganther H.E., Hafeman D.G., Swanson A.B., Hpekstra W.G. (1973). Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, 179: 588-590.
- Roy G., Sarma B.K., Phadnis P., Muges G. (2005). Selenium-containing enzymes in mammals: Chemical perspectives. *Journal of Chemical Science*, 177: 287-303.
- Sager M. (2006). Selenium in agriculture, food, and nutrition. *Pure and Applied Chemistry*, 78: 111-133.
- Sappington K.G. (2002). Development of aquatic life criteria for selenium: a regulatory perspective on critical issues and research needs. *Aquatic Toxicology*, 57: 101-113.

- Schelenz R.F.W. (1984). Intake of Zn, Mn, and Se by adult females. A total diet study. In Trace Element Analytical Chemistry in Medicine and Biology; Brätter P., Schramel P., Eds.; de Gruyter: Berlin, pp 73-86.
- Shamberger R.J. (1981). Selenium in the environment. *Science of the Total Environment*, 17: 59-74.
- Shardendu S.N., Boulyga S.F., Stengel E. (2003). Phytoremediation of selenium by two helophyte species in subsurface flow constructed wetland. *Chemosphere*, 50: 967-973.
- 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.
- Sipos P., Hagymasi K., Lugasi A., Feher E. & Blazovics A. (2002). Effects of black radish root (*Raphanus sativus* L. var. niger) on the colon mucosa in rats fed a fat rich diet. *Phytotherapy Research*, 16: 677-679.
- Skorupa J.P. (1998). Selenium poisoning of fish and wildlife in nature: lessons from twelve real-world examples. In: Frankenberger WT, Engberg RA (Eds) *Environmental Chemistry of Selenium*, Marcel Dekker, New York, pp 315-354.
- Smrkolj P., Kreft I., Kapolna E., Stibilj V. (2005). Selenium species determination in selenium enriched pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds by HPLC-UVHG-AFS. *Analytical Sciences*, 21: 1501-1504.
- Smrkolj P., Germ M., Kreft I., Stibilj V. (2006a). Respiratory potential and Se compounds in pea (*Pisum sativum* L.) plants grown from Se-enriched seeds. *Journal of Experimental Botany*, 57: 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.
- 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., Stibilj V. (2004). Determination of selenium in vegetables by hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 512: 11-17.
- Spenger N.E., Siegel S.M. (1978). Effects of sulfur and selenium oxyanions on Hg-toxicity in turnip seed germination. *Water, Air, & Soil Pollution*, 9: 423-427.
- Stadlober M., Sager M., Irgolic K.J. (2001). Effects of selenate supplemented fertilisation on the selenium level of cereals-identification and quantification of selenium compounds by HPLC-ICP-MS. *Food Chemistry*, 73: 357-366.

- Sugihara S., Kondo M., Chihara Y., Yuji M., Hattori H., Yoshida M. (2004). Preparation of selenium enriched sprouts and identification of their selenium species by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 68: 193-199.
- Suzuki C., Ohnishi-Kameyama M., Sasaki K., Murata T. & Yoshida M. (2006). Behavior of glucosinolates in pickling cruciferous vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 9430–9436.
- Takaya Y., Kondo Y., Furukawa T., Niwa M. (2003). Antioxidant constituents of radish sprout (Kaiware-daikon), *Raphanus sativus* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 8061–8066.
- Talalay P. & Fahey J.W. (2001). Phytochemicals from cruciferous plants protect against cancer by modulating carcinogen metabolism. *Journal of Nutrition*, 131: 3027S–3033S.
- 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.
- Thomson C.D., Robinson M.F., Butler J.A., Whanger P.D. (1993). Long-term supplementation with selenate and selenomethionine: selenium and glutathione peroxidase in blood components of New Zealand women. *British Journal of Nutrition*, 69: 577-588.
- Tinggi U. (2003). Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review. *Toxicology letters*, 137: 103-110.
- Tiran B., Tiran A., Petek W., Rossipal E., Wawschinek O. (1992). Selenium status of healthy children and adults in Styria (Austria). *Trace Element in Medicine*, 9: 75-79.
- Turakainen M., Hartikainen H., Seppänen M.M. (2004). Effects of selenium treatments on potato (*Solanum tuberosum* L.) growth and concentrations of soluble sugars and starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 5378-5382.
- Turakainen M., Hartikainen H., Ekholm P., Seppänen M.M. (2006). Distribution of selenium in different biochemical fractions and raw darkening degree of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers supplemented with selenate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 8617-8622.
- Uden P.C., Boakye H.T., Kahakachchi C., Tyson J.F. (2004). Selective detection and identification of Se containing compounds- review and recent developments. *Journal of Chromatography A*, 1050: 85-93.
- US EPA (1987). Ambient aquatic life criteria for selenium. EPA-440/5-87-006. US Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC, pp142-237.

- Valkama E., Kivinäenpää M., Hartikainen H., Wulff A. (2003). The combined effect of enhanced UV-B radiation and selenium on growth, chlorophyll fluorescence and ultrastructure in strawberry (*Fragaria x ananassa*) and barley (*Hordeum vulgare*) treated in the field. *Agricultural and Forest Meteorology*, 120: 267-278.
- Vandecasteele C., Block C.B. (1993). *Modern Methods for Trace Element Determination*. Chichester, New York, John Wiley & Sons: 526 str.
- Visentin M., Tava A., Iori R. & Palmieri S. (1992). Isolation and identification of trans-4-(methylthio)-3-butenyl glucosinolate from radish roots (*Raphanus sativus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 1687–1691.
- Wilplinger M., Sima A., Pfannhauser W. (1998). Selengehalt in der Nahrung und dessen Zusammenhang zum Gehalt im Boden. *Lebensmittelchemie*, 52: 93-95.
- Wu L. (2004). Review of 15 years of research on ecotoxicology and remediation of land contaminated by agricultural drainage sediment rich in selenium. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57: 257-269.
- Wu L., Guo X., Banuelos G.S. (1997). Accumulation of seleno-amino acids in legume and grass plant species grown in seleniumladen soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16: 491-497.
- Zayed A., Lytle C.M., Terry N. (1998). Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants. *Planta*, 206: 284-292.
- Zielinski H., Kozłowska H. (2003). The content of tocopherols in cruciferae sprouts. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 12: 19–23.
- Zielinski H., Frias J., Piskula M.K., Kozłowska H., Vidal-Valverde C. (2005). Vitamin B1 and B2, dietary fiber and minerals content of Cruciferae sprouts. *European Food Research and Technology*, 221:78–83.
- Xue T., Hartikainen H. (2000). Association of antioxidative enzymes with the synergistic effect of selenium and UV irradiation in enhancing plant growth. *Agricultural and Food Science in Finland*, 9: 177-186.
- Xue T., Hartikainen H., Piironen V. (2001). Antioxidative and growth-promoting effect of selenium in senescing lettuce. *Plant and Soil*, 237: 55-61.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju, prof. dr. Ivanu Kreftu za številne strokovne nasvete, pomoč pri diplomskem delu in prijetno delovno vzdušje. Bilo mi je v veselje sodelovati z vami.

Za pomoč pri laboratorijskem delu se zahvaljujem izr. prof. dr. Vekoslavi Stibilj.

Še posebej pa gre zahvala mojim staršem, ker so mi omogočili dokončati študij in partnerju Janezu, ki mi je bil v oporo vsa leta. Hvala za potrpežljivost in zaupanje.

Za bivanje v Ljubljani se zahvaljujem teti Minki. Hvala, ker tvoja dobrota ne pozna meja.

Hvala sošolcem, zaradi katerih mi ni bilo težko vstajati vsako jutro in hoditi na predavanja, ker ste me pričakali z nasmehom na obrazu in vročo kavico.