

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Meta ZAKOTNIK

**VPLIV SELENITA NA RAST IN KONCENTRACIJO  
SELENA V KALICAH BROKOLIJA  
(*Brassica oleracea* L. var. *italica*)**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Meta ZAKOTNIK

**VPLIV SELENITA NA RAST IN KONCENTRACIJO SELENA V  
KALICAH BROKOLIJA (*Brassica oleracea* L. var. *italica*)**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**IMPACT OF SELENITE ON THE GROWTH AND  
CONCENTRATION OF SELENIUM IN BROCCOLI (*Brassica oleracea*  
L. var. *italica*) SPROUTS**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija Kmetijstvo - agronomija. Opravljeno je bilo na Oddelku za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani (postavitev poskusa) in na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani na Odseku za znanosti o okolju.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Ivana KREFTA.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Franc Batič  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

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

Članica: doc. dr. Nina Kacjan Maršić  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega diplomskega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Meta ZAKOTNIK

### KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 635. 356: 546. 23: 543. 61 (043. 2)
KG	Brocoli / <i>Brassica oleracea</i> var. <i>italicica</i> /selen/selenit/kalice
KK	AGRIS A50
AV	ZAKOTNIK, Meta
SA	KREFT, Ivan (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI	2013
IN	VPLIV SELENITA NA RAST IN KONCENTRACIJO SELENA V KALICAH BROKOLIJA ( <i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>italicica</i> )
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	IX, 37 str., 10 pregl., 7 sl., 98 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Selen je bistven element za življenje ljudi in živali, njegov primarni vir je hrana. Njegova esencialnost za rastline še ni dokazana. Namen naše raziskave je bil ugotoviti, v kolikšni meri se z namakanjem semen v raztopini natrijevega selenita poveča vsebnost selenita v kalicah brokolija ter kako selenit vpliva na njihovo rast. Zanimal nas je tudi vpliv UV-B sevanja na rast in razvoj kalic. Kalice smo gojili pri različnih svetlobnih razmerah: v temi, v rastlinjaku z zmanjšanim UV-B sevanjem in na prostem s povečanim UV-B sevanjem. Semena brokolija smo predhodno namakali v raztopini natrijevega selenita s koncentracijami 0, 5 in 10 mg Se/L. Ugotovili smo, da selenit v majhni meri vpliva na manjšo maso kalic brokolija. Največjo povprečno maso so imele kalice gojene v rastlinjaku, najmanjšo pa kalice, ki smo jih kratkotrajno izpostavljeni naravnemu UV-B sevanju. Vsebnost selenita v kalicah brokolija smo ugotavljali z metodo hidridne tehnike fluorescenčne spektrometrije (HG-AFS). Kontrolne skupine kalic so vsebovale malo selenita, vsebnost selenita v kalicah, ki so zrasle iz semen predhodno namakanih v raztopinah natrijevega selenita, se je povečala. Kalice brokolija, obogatene s selenom, so primerne kot funkcionalna hrana.

#### KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 635. 356: 546. 23: 543. 61 (043. 2)  
CX Broccoli/*Brassica oleracea* var. *italicica*/selenium/selenite/sprouts  
CC AGRIS A50  
AU ZAKOTNIK, Meta  
AA KREFT, Ivan (supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy  
PY 2013  
TI IMPACT OF SELENITE ON THE GROWTH AND CONCENTRATION OF  
SELENIUM IN BROCCOLI (*Brassica oleracea* L. var. *italicica*) SPROUTS  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO IX, 37 p., 10 tab., 7 fig., 98 ref.  
LA Sl  
AL sl / en  
AB Selenium, of which primary source for people is food, is an essential element for animals and humans. However, its essentiality for plants has not yet been proved. The aim of our research was to find out to what extent soaking of seeds in sodium selenite increases the content of selenium in broccoli sprouts and how selenite affects their growth. Moreover, it is focused on the effect of UV-B radiation on the growth and development of sprouts grown under different light conditions: in the dark, in a greenhouse with a decreased UV-B radiation and outdoors with the natural UV-B radiation. The broccoli seeds had been previously soaked in a sodium selenite solution with the following concentrations: 0, 5 and 10 mg Se/L. We noticed that selenite had a minor effect on a smaller mass of broccoli sprouts. The highest average mass was observed in the sprouts grown in the greenhouse, the smallest average mass was observed in the sprouts exposed to the natural UV-B radiation. The content of selenium in the broccoli sprouts was analysed with HG-AFS method. The control groups of sprouts contained low levels of selenium. The content of selenium in the sprouts grown out of seeds soaked in the sodium selenite solutions was higher in comparison to the control. We therefore conclude that selenium-enriched broccoli sprouts could be used as functional food.

## KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	IX
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA IN NAMEN DIPLOMSKE NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>3</b>
2.1 SELEN	3
<b>2.1.1 Priporočen dnevni vnos selena</b>	3
<b>2.1.2 Selen v hrani</b>	3
2.1.2.1 Funkcionalna hrana	4
<b>2.1.3 Selen v tleh in njegova razpoložljivost</b>	4
<b>2.1.4 Selen in rastline</b>	5
2.1.4.1 Toksičnost selena pri rastlinah	6
2.1.4.2 Obrambni mehanizmi pri rastlinah	6
2.1.4.3 Rastline obogatene s selenom	7
2.1.4.4 Vpliv UV-B sevanja na rastline	7
2.2 BROKOLI	8
2.3 DOLOČITEV VSEBNOSTI SELENA V RASTLINSKIH VZORCIH	10
<b>2.3.1 Vzorčenje in razkroj vzorcev</b>	10
<b>2.3.2 Metode detekcije selena</b>	10
2.3.2.1 Hidridna tehnika atomske fluorescenčne spektrometrije (HG-AFS)	11
<b>3 MATERIALI IN METODE</b>	<b>13</b>
3.1 POSTAVITEV POSKUSA	13
3.2 VZORCI	14
<b>3.2.1 Priprava vzorcev</b>	14
3.3 REAGENTI IN APARATURE	14
<b>3.3.1 Reagenti</b>	14
<b>3.3.2 Aparature</b>	15

3.4	METODA ZA DOLOČITEV SELENA	15
<b>3.4.1</b>	<b>Razkroj vzorcev</b>	15
<b>3.4.2</b>	<b>Standardne raztopine</b>	15
<b>3.4.3</b>	<b>Merjenje koncentracije selena s HG-AFS</b>	16
<b>3.4.4</b>	<b>Pravilnost in ponovljivost metode</b>	16
3.5	STATISTIKA	17
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	18
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	24
5.1	RAZPRAVA	24
5.2	SKLEPI	28
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	29
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	30
	<b>ZAHVALA</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Vsebnost selena po državah in po živilih (Smrkolj, 2003)	4
Preglednica 2: Najpogosteje uporabljene metode detekcije selena v živilih (Smrkolj, 2003)	11
Preglednica 3: Shema poskusa namakanja semen brokolija v raztopini natrijevega selenita	14
Preglednica 4: Vsebnosti selena v certificiranem referenčnem materialu špinačni listi (Spinach Leaves, NIST 157a: $117 \pm 9$ ng Se/g SS)	17
Preglednica 5: Povprečna masa 100 celih kalic (g SS) brokolija pri različnih svetlobnih razmerah, iz semen, namočenih v raztopino natrijevega selenita, s koncentracijo 0, 5 in 10 mg Se/L	18
Preglednica 6: Vsebnost selena v 100 celih kalicah brokolija pri različnih svetlobnih razmerah, iz semen, namočenih v raztopino natrijevega selenita, s koncentracijami 0, 5 in 10 mg Se/L	20
Preglednica 7: Vsebnost selena v kalicah in semenskih ovojnicah kontrolne skupine brokolija pri različnih svetlobnih razmerah	21
Preglednica 8: Vsebnost selena v kalicah in semenskih ovojnicah brokolija pri različnih svetlobnih razmerah, iz semen namočenih v raztopino natrijevega selenita, s koncentracijo 5 mg Se/L	22
Preglednica 9: Vsebnost selena v kalicah in semenskih ovojnicah brokolija pri različnih svetlobnih razmerah, iz semen namočenih v raztopino natrijevega selenita, s koncentracijo 10 mg Se/L	23
Preglednica 10: Povprečna suha masa kalic in vsebnost selena v kalicah brokolija, redkvice, tatarske in navadne ajde, pri različnih koncentracijah selenita v raztopini za namakanje, gojene pri različnih svetlobnih razmerah	26

## KAZALO SLIK

Slika 1: Shema avtomskega fluorescenčnega spektrometra AFS (Smrkolj, 2003)	12
Slika 2: Shema pretočnega sistema HG-ASF (Smrkolj, 2003)	16
Slika 3: Povprečna masa 100 celih kalic (g SS) brokolija pri različnih svetlobnih razmerah, iz semen, namočenih v raztopino natrijevega selenita, s koncentracijo 0, 5 in 10 mg Se/L	19
Slika 4: Vsebnost selena (ng/g) v 100 celih kalicah brokolija pri različnih svetlobnih razmerah, iz semen, namočenih v raztopino natrijevega selenita, s koncentracijami 0, 5 in 10 mg Se/L	20
Slika 5: Vsebnost selena (ng/g) v kalicah in semenskih ovojnicah kontrolne skupine brokolija pri različnih svetlobnih razmerah	21
Slika 6: Vsebnost selena (ng/g) v kalicah in semenskih ovojnicah brokolija pri različnih svetlobnih razmerah, iz semen namočenih v raztopino natrijevega selenita, s koncentracijo 5 mg Se/L	22
Slika 7: Vsebnost selena (ng/g) v kalicah in semenskih ovojnicah brokolija pri različnih svetlobnih razmerah, iz semen namočenih v raztopino natrijevega selenita, s koncentracijo 10 mg Se/L	23

### OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Se	selen
Met	metionin
Cys	cistein
SeMet	selenometionin
SeCys	selenocistein
SeMeSeCys	selenometilselenocistein
CRM	certificiran referenčnímaterial
HG-AFS	hidridna tehnika atomske fluorescenčne spektrometrije
AFS	atomske fluorescenčni spektrometer
Stdev	standardni odmik
SS	suha snov
Konc.	koncentracija
Razt.	raztopina

## 1 UVOD

Selen (Se) je kemijski element, ki ga je leta 1818 odkril švedski kemik Jons Jakob Berzelius. V periodnem sistemu je v VI. skupini med žveplom in telurjem.

Selen je esencialen (neobhodno potreben) mikroelement za normalno rast in razvoj ljudi in živali, njegov primarni vir je hrana. Od leta 1957 je selen znan kot esencialen, neobhodno potreben za ljudi in živali (Schwarz in Foltz, 1957). Leta 1973 so Rotruck in sod. (1973) odkrili vezavo selena v encimu glutation peroksidazi.

Selen ima močno antikancerogeno, antimutageno in antioksidativno vlogo. Vendar to velja le za manjše koncentracije (do 200 µg Se/dan), oziroma v okviru priporočenega dnevnega vnosa, ki se giblje med 55 µg Se/dan za odrasle ženske in 70 µg Se/dan za odrasle moške (Elles in sod., 2000). V Sloveniji je priporočen dnevni vnos od 30-70 µg Se/dan (Referenčne vrednosti za vnos hranil, 2004). Pri prevelikih koncentracijah (nad 1000 µg Se/dan) ima element kancerogene in genotoksične učinke. Selenozo povzročajo koncentracije, ki so večje od 3200 µg Se/dan (Reid in sod., 2004), znaki pomanjkanja pa se kažejo pri dnevnom vnosu, ki je manjši od 11 µg Se/dan (Letavayova in sod., 2006). Živila z veliko vsebnostjo beljakovin vsebujejo večje koncentracije selena (drobovina, meso, jajca, morski sadeži), medtem ko so mleko, mlečni izdelki, žita, sadje in zelenjava živila z manjšimi vsebnostmi selena (Smrkolj in sod., 2005). Čeprav pri rastlinah ni dokazana esencialnost selena, je znano, da ima selen v določenih primerih pozitivno vlogo na rast in obrambo rastlin pred stresom. Selen v majhnih količinah zmanjšuje oksidativni stres, ki ga povzroča UV-B sevanje (Germ in Stibilj, 2007).

V zemeljski skorji je selen eden izmed najbolj razširjenih elementov, vendar pa je njegova razporejenost zelo neenakomerna (Reilly, 1996; Lenz in sod., 2009). Prisotnost selena v tleh je odvisna od sestave tal in izpiranja tal (Shamberger, 1981). Kot večina evropskih držav tudi Slovenija spada med države z majhno vsebnostjo selena v tleh (Pirc in Šajn, 1997).

Vsebnost selena v naši prehrani je odvisna od koncentracije elementa v tleh in od sposobnosti rastlin za njegov privzem. Na tržišču se pojavljajo prehranska dopolnila s selenom in živila, ki imajo povečano količino naravno prisotnega selena. Od leta 1989 je v Sloveniji dovoljeno dodajati selen živalski krmi. V Pravilniku o krmnih dodatkih iz leta 2005 je določena tudi največja dovoljena količina selena v krmnih mešanicah (0,5 mg Se/kg).

Brokoli (*Brassica oleracea* L. var. *italicica*) spada v družino križnic (Brassicaceae), med kapusnice, kamor spadajo tudi zelje, ohrov, cvetača, koleraba idr. Že od nekdaj so bile kapusnice izredno pomembne v prehrani, saj so se v zimskih mesecih pojavljale kot skoraj edine vrtnine. Brokoli izvira iz Sredozemlja, kjer so ga v Italiji pridelovali že stoletja, vendar pa je postal pomemben šele, ko so ga italijanski priseljenci prinesli v Združene države Amerike. Pri nas smo brokoli uvedli v pridelovanje šele pred nekaj desetletji (Černe, 1998). V zadnjem času se brokoli vse pogosteje uporablja v kulinariki, saj ima zelo veliko prehransko vrednost. Shivapriya in sod. (2011) navajajo, da brokoli vsebuje veliko mineralov, vlaknin (30,4 g/100g SS), ogljikovih hidratov (6,64 g/100g sveže snovi) in vitaminov (C vitamina več kot 50 mg/100g sveže snovi). Ima majhno vsebnost maščob (0,37 g/100g sveže snovi), zato spada med srcu prijazna živila (Shivapriya in sod., 2011). Križnice med vso zelenjavo vsebujejo največ antioksidantov, zato zmanjšujejo možnost nastanka starostnih bolezni (srčnožilne bolezni in druge degenerativne bolezni), ter zavirajo nastanek številnih oblik raka (Soengas in sod., 2012; Wagner, 2004; Wang in sod., 2004; Kris-Etherton in sod., 2002).

### 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA IN NAMEN DIPLOMSKE NALOGE

Vsebnost selena v naravnih virih je odvisna od vsebnosti in dostopnosti selena v prsti. Torej bi bilo smiselno razviti tehnike obogatitve rastlin s tem esencialnim elementom, v našem primeru brokolija. Z dodajanjem selena bi brokoliju še dodatno povečali njegovo funkcionalno vrednost in tako ustvarili funkcionalno živilo s povečano vsebnostjo selena, ter na ta način vplivali na dnevni vnos selena s hrano.

Namen diplomskega dela je ugotoviti, v kolikšni meri se s tretiranjem semena s selenitom poveča vsebnost selena v kalicah brokolija. Zanima nas tudi, pri katerih koncentracijah selenita kalice brokolija najbolje uspevajo in kako Se vpliva na njihovo rast.

### 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Selen za rastline ni esencialen element, zato v veliki meri tudi selenit ne bo vplival na rast in razvoj kalic brokolija, razen če se bo pojavil v takih koncentracijah, ki so za rastlino toksične. Predvidevamo, da se bo vsebnost selena, po tretiranju semen s selenitom, v kalicah brokolija povečala.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 SELEN

Selen (Se) je kemijski element, ki ga je odkril švedski kemik Jons Jacob Berzelius. Selen (atomsko število 34, atomska masa 78,96) se nahaja v VI. skupini periodnega sistema in spada med metaloide in ima tako lastnosti kovin kot tudi nekovin. Po atomski masi, energijski vezi, ionizacijski energiji in elektronski afiniteti je selen zelo podoben žveplu, zato imata tudi podobne lastnosti (Reilly, 1998). V naravi lahko najdemo šest naravnih izotopov selena ( $^{74}\text{Se}$ ,  $^{76}\text{Se}$ ,  $^{77}\text{Se}$ ,  $^{78}\text{Se}$ ,  $^{80}\text{Se}$  in  $^{82}\text{Se}$ ) (Brenčič in Lazarini, 1995). V anorganskih spojinah se selen nahaja v različnih oksidacijskih stanjih: -2 (selenid), 0 (elementarni selen), +4 ( $\text{SeO}_3^{2-}$  selenit) in +6 ( $\text{SeO}_4^{2-}$  selenat), prisoten pa je tudi v mnogih hlapnih in nehlapnih organskih spojinah (Uden in sod., 2004). Selen, ki je vezan v selenoaminokisline je biološko najbolj razpoložljiva oblika selena (Amweg in sod., 2003).

#### 2.1.1 Priporočen dnevni vnos selena

Za optimalno sintezo selenoproteinov je potrebna zadostna količina zaužitega selena. Priporočen dnevni vnos selena je po DRI (Dietary references intakes, 2000) 55 µg Se/dan za odrasle. Otroci ga potrebujejo nekoliko manj, nosečnice pa nekoliko več (60 µg Se/dan). Če dnevno zaužijemo manj kot 11 µg Se/dan, se na daljši rok pokažejo znaki pomanjkanja, 100 – 200 µg Se/dan pa zavira razvoj raka (Ip in Ganther, 1992; Clark in sod., 1996). Zgornja še varna meja predstavlja 600- 800 µg Se/dan (Whanger, 2002), pri koncentracijah med 3200 in 5000 µg Se/dan pa se pojavi selenoza (Reid in sod., 2004).

#### 2.1.2 Selen v hrani

Selen je v hrani prisoten večinoma v organski obliki, anorganske oblike je zelo malo (izjema so le listi cvetače, čebule in rdeče pese, ki vsebujejo do 50% anorganskega selena). V hrani živalskega izvora se pojavlja v obliki selenocisteina, v rastlinski hrani pa predvsem v obliki selonometionina (Reilly, 2004).

Foster in Sumar (1997) navajata, da veliko selena vsebujejo živila z veliko vsebnostjo beljakovin. Bogat vir selena so predvsem drobovina, meso, jajca in morski sadeži. Manj selena pa vsebujejo mleko in mlečni izdelki ter sadje in zelenjava. Bogat vir selena so tudi jetra (0,05 – 1,33 mg Se/kg), mišičnina (0,06 – 0,42 mg Se/kg) in ribe (0,05 – 0,54 mg Se/kg) (Reilly, 2002). Žita vsebujejo le 0,01 – 0,31 mg Se/kg, vendar imajo kljub temu velik prispevek k vnosu, saj jih vključujemo v večino dnevnih obrokov. Brazilski oreščki v povprečju vsebujejo kar 50 µg Se/g in so tako zelo bogat naravni vir selena (Reilly, 2002).

V preglednici 1 so prikazane vsebnosti selena po državah in po živilih.

Preglednica 1: Vsebnost selena po državah in po živilih (cit. po Smrkolj, 2003)

<b>Država</b>	<b>Živilo</b>	<b>Se (mg/kg)</b>
Anglija	žita, žitni izdelki	0,11
	meso, drogovina, ribe, jajca	0,12-0,6
	mleko in mlečni izdelki	0,01-0,085
	zelenjava in sadje	0,005-0,01
ZDA	žita, žitni izdelki	0,3-0,56
	meso, drogovina, ribe, jajca	0,06-1,33
	mleko in mlečni izdelki	0,006-0,3
	zelenjava in sadje	0,004-0,07
Kanada	žita, žitni izdelki	0,01
	meso, drogovina, ribe, jajca	0,06-1,22
	mleko in mlečni izdelki	0,005-0,01
	zelenjava in sadje	0,005-0,01
Finska	žita, žitni izdelki	0,2
	meso, drogovina, ribe, jajca	0,05-0,48
	mleko in mlečni izdelki	0,002-0,025
	zelenjava in sadje	0,002
Nova Zelandija	žita, žitni izdelki	0,035
	meso, drogovina, ribe, jajca	0,03-0,38
	mleko in mlečni izdelki	0,004-0,025
	zelenjava in sadje	0,003
Kitajska	žita, žitni izdelki	0,01-3,88
	meso, drogovina, ribe, jajca	0,025-0,48
	mleko in mlečni izdelki	0,002-0,02
	zelenjava in sadje	0,001-0,01

#### 2.1.2.1 Funkcionalna hrana

Funkcionalna hrana je lahko modificirana ali tradicionalna hrana. Funkcionalna živila so tista, za katera je znanstveno dokazano, da imajo pozitiven vpliv na zdravje. Funkcionalna živila niso tablete, kapsule, ampak so sestavina prehrane, katerih vzorce prepoznamo kot hrano in imajo dokazano pozitiven vpliv na dobro počutje in zdravje (Raspor in Rogelj, 2001).

#### 2.1.3 Selen v tleh in njegova razpoložljivost

Količina selena v rastlinah in posledično v prehranjevalni verigi je odvisna od količine, porazdelitve in dostopnosti tega elementa v tleh (Terry in sod., 2000). Porazdelitev selena v tleh je zelo neenakomerna in je odvisna od klimatskih razmer, narave in izvora tal (Reilly, 2004; Kabata-Pendias, 2004; Lenz in Lens, 2009). Germ in Stibilj (2007) navajata,

da je prisotnost selena v prsti odvisna od sestave tal in izpiranja, ali drugih procesov, ki vplivajo na tvorbo s selenom obogatene prsti. Vsebnost selena v tleh variira od manj kot 0,1 µg Se/g pa do več kot 1 mg Se/g, največkrat pa se giblje med 1,0 in 1,5 µg Se/g. Matična podlaga tudi vpliva na koncentracijo elementa v tleh. Tako skrilavci vsebujejo večje koncentracije selena (0,6 mg Se/kg) od apnenca in peščenjaka (<0,1 mg Se/kg). Sedimentne kamnine vsebujejo več selena od magmatskih. Veliko selena je prisotnega v piritu in drugih sulfidnih mineralih (Wu, 2004).

Če je selen prisoten v topni obliku, lahko obilne padavine povzročijo njegovo izpiranje. Zaradi tega dejstva so tla na Finskem, v Novi Zelandiji, Tasmaniji, v določenih območjih Kitajske, Vzhodni Sibiriji in Koreji revna s selenom (Combs, 2001). Pirc in Šajn (1997) poročata, da tla v Sloveniji vsebujejo malo selena (od <0,1 do 0,7 mg Se/kg). Na območjih s toplim in suhim podnebjem (Kanada, ZDA, del Azije in Avstralije), so tla bogata s selenom (Combs, 2001).

Oblika, v kateri se element nahaja, je odvisna od pH tal, zbitosti tal, vsebnosti organske snovi, mikrobiološke aktivnosti, fiksacijske kapacitete tal, klimatskih razmer ter prisotnosti drugih elementov in spojin. Veliko sposobnost vezave selena ima organska snov, kjer ga najdemo v kompleksnih oblikah vezanega v proteine s pomočjo mikroorganizmov (Wu, 2004). Več selena je v glinenih tleh kot v peščenih, saj imajo glineni minerali pomembno vlogo pri vezavi tega elementa. Elementarna oblika selena in selenid sta dokaj stabilna in netopna, zato je v teh oblikah element slabo dostopen. Dostopnost Se se še dodatno zmanjša ob veliki vsebnosti železa (Fe) v tleh, saj se selen veže nanj. Med žveplom in selenom obstaja kompetitivno razmerje zaradi fizikalno-kemijske podobnosti, še posebej, če sta prisotna v obliki sulfata in selenata. Selenat s sulfatom tekmuje za vezavo na aktivna mesta permeaze, ki je odgovorna za črpanje sulfata. Selenat za vezavna mesta tekmuje tudi z nitratom, fosfatom in kloridom (Marscher, 2002). Zelo pomembno vlogo pri dostopnosti selena v tleh ima selenit, ki se zaradi mikrobiološke aktivnosti, alkalnih tal in zračnih razmer v tleh, spremeni v bolj open selenat, ki je dobro dostopen rastlinam. V kislih razmerah pa se selenit veže na glinene delce in železove komplekse, kar zmanjša njegovo razpoložljivost.

#### **2.1.4 Selen in rastline**

Sposobnost rastlin za akumulacijo selena ima pomemben vpliv na prehrano in zdravje ljudi. Esencialna vloga selena za rastline ni dokazana, vendar je vse več podatkov o pozitivnih učinkih tega elementa na rastline (Germ in Stibilj, 2007). Znano je, da selen omili posledice oksidativnega stresa zaradi UV sevanja (Germ in sod., 2005), upočasni staranje rastlin in hitrejšo zmanjša transpiracijo v sušnih razmerah (Germ in Stibilj, 2007). V zadnjem času se veliko pozornosti namenja v kakšni obliku je selen v rastlini. Ljudje namreč lahko absorbiramo selen iz rastlin le, če je ta-ta vezan na beljakovino (Dumont in sod., 2006)

Privzem selena in njegova akumulacija v rastlini je odvisna od kemijske oblike in koncentracije, pH prsti, kislosti, slanosti, vsebnosti  $\text{CaCO}_3$ , koncentracije drugih ionov, s katerimi tekmuje Se za privzem in sposobnosti rastlin za presnovo selena (Germ in Stibilj, 2007).

Količina akumuliranega selena je odvisna tudi od same vrste rastline. Glede na to sposobnost, ločimo rastline na (Ellis in Salt, 2003):

- neakumulirajoče, ki vsebujejo manj kot 25 mg Se/kg SS (večina rastlin);
- indikatorske, ki vsebujejo do 1000 mg Se/kg SS (rastline iz rodov *Aster*, *Atriplex*, *Melilotus*);
- primarni akumulatorji, ki vsebujejo do 4000 mg Se/kg (rastline iz rodov *Astragalus*, *Stanleya*, *Neptunia*).

Rastline, ki vsebujejo več žvepla, kot so rastline iz družine lukovk (Alliaceae) (česen in čebula) ter iz družine križnic (Brassicaceae) (zelje in brokoli), vsebujejo tudi več selena (Dumont in sod., 2006).

Terry in sod. (2000) navajajo, da je razporeditev selena po različnih delih rastline odvisna od vrste, razvojne faze in fiziološkega stanja le-te. Aktivno rastoča tkiva vsebujejo več selena, zato ga rastline več kopičijo v listih in poganjkih kot v koreninah, vendar obstajajo tudi izjeme (Germ in sod., 2007 (a)).

#### 2.1.4.1 Toksičnost selena pri rastlinah

Slabša rast, pojav rdečih pik na koreninah, črnih na listih, sušenje in rumenenje listov, zmanjšana sinteza proteinov, predčasna smrt, so znaki, da je bila rastlina izpostavljena prevelikim koncentracijam selena.

Mehanizem, ki povzroči toksičen odziv rastlin, je vključitev selenocisteina (SeCys) in selenometionina (SeMet) v proteine na mesto cisteina (Cys) oziroma metionina (Met). Ker ima žveplo v Met in Cys različne lastnosti kot selen v SeMet in SeCys, pride do sprememb v terciarni strukturi proteinov, to pa ima lahko usodne posledice za katalitično aktivnost le-teh. Selenat in selenit sta za rastline toksična in ju rastline absorbirajo in spreminjajo v organske oblike. Terry in sod. (2000) navajajo, da je selenit bolj toksičen kot selenat, saj se selenit hitreje pretvori v selenoaminokisline in naprej v proteine.

Terry in sod. (2000) navajajo, da so mejne vrednosti toksičnosti selena pri rastlinah odvisne od starosti in vrste rastline ter prisotnosti sulfatnih ionov.

#### 2.1.4.2 Obrambni mehanizmi pri rastlinah

Akumulirajoče rastline, ki kopičijo in tolerirajo večje koncentracije selena, imajo več obrambnih mehanizmov in se bolje branijo pred toksičnostjo tega elementa. Tak primer je tudi brokoli.

Nekateri obrambni mehanizmi so (Terry in sod., 2000):

- sinteza nebeljakovinskih aminokislin (selenometilselenocisteina (SeMeSeCys), selenocistationa, in dipeptida  $\gamma$ -glutamil-SeMeSeCys);
- izključitev selenocisteina iz procesa vključevanja v beljakovine;
- kopičenje selena v vakuolah (v obliki selenata in nebeljakovinskih aminokislin);
- fitovolatizacija (ali odstranjevanje selena z njegovo pretvorbo v hlapne oblike, kot sta dimetilselenid in dimetildiselenid).

#### 2.1.4.3 Rastline obogatene s selenom

Gojenje rastlin obogatenih s selenom, še posebej križnic, je najbolj učinkovita in varna rešitev težav s pomanjkanjem selena v prehrani ljudi, kar lahko ima pozitiven učinek na zdravje ljudi (Germ in Stibilj, 2007; Ramos in sod., 2011).

Koncentracijo naravno prisotnega selena v rastlinah lahko povečamo na različne načine: z dodajanjem selena v hranilno raztopino (hidroponsko in aeroponski gojenje, foliarno škropljenje), z namakanjem semen, z dodajanjem selena v obliki mineralnih gnojil in z genetskimi modifikacijami, ki omogočajo učinkovitejšo asimilacijo selena.

V zadnjem času se veliko pozornosti namenja rastlinam, ki so sposobne tolerirati in transformirati selen v bioaktivne snovi (Pyrzynska, 2009). Veliko raziskav poteka na rastlinah s povečano vsebnostjo naravno prisotnega selena. Med take rastline spada tudi brocoli (Dumont in sod., 2006; Terry in sod., 2000; Hsu in sod., 2011; Abdulah in sod., 2009; Ramos in sod., 2011; Mahn in sod., 2012), ajda (Smrkolj in sod., 2006; Ožbolt in sod., 2008; Stibilj in sod., 2004; Vogrinčič in sod., 2009), grah (Smrkolj in sod., 2006), fižol (Smrkolj in sod., 2007), buče (Germ in sod., 2005, 2007 (a); Stibilj in sod., 2004), krompir (Germ in sod., 2007; Cuderman in sod., 2008), cikorija (Germ in sod., 2007 (b)), rukola (Germ in sod., 2007 (a)), šentjanževka (Germ in sod., 2009), česen, čebula (Pyrzynska, 2009).

#### 2.1.4.4 Vpliv UV-B sevanja na rastline

Na Zemlji se ves čas dogajajo klimatske spremembe, vendar pa so le-te v zadnjem času hitrejše in bolj drastične, kot v preteklosti (Breznik in sod., 2009). Zaradi tanjšanja ozonske plasti, se povečuje količina UV-B sevanja, ki prodre do Zemlje. Rastline so se na povečano UV-B sevanje različno odzvale glede na: vrsto, sorto, genotip, stopnjo razvoja, fiziološko stanje rastline, količino dodatnega UV-B sevanja ter glede na druge biotske in abiotiske dejavnike. Količina UV-B sevanja, ki prodre skozi listno površino, je odvisna od anatomije lista, vsebnosti in porazdelitve UV-B absorbirajočih snovi (če jih listi vsebujejo več, prepuščajo manj sevanja) ter fizioloških procesov. Povečana količina UV-B sevanja lahko pri rastlinah povzroči poškodbe DNA, spremembe pri transpiraciji, fotosintezi, respiratornemu potencialu, v rasti, razvoju in morfologiji (Breznik in sod., 2009).

Ob izpostavitev rastlin povečanemu UV-B sevanju je pri ajdi prišlo do zmanjšanja biomase. Prav nasprotno se je pokazalo pri jagodi, kjer ni prišlo do zmanjšanja biomase, pri bobu pa se je biomasa celo povečala (Breznik in sod., 2009). Germ in sod. (2005) so preučevali vpliv naravnega in zmanjšanega UV-B sevanja na pridelek buč in ugotovili, da se je pridelek povečal ob zmanjšanem UV-B sevanju. Bučam so foliarno dodali tudi selen v obliku natrijevega selenata s koncentracijo 1,5 mg Se/L, ter ugotovili, da ima le-ta pomembno vlogo pri zagotovitvi pridelka pri naravnem UV-B sevanju.

Rastline so se prilagodile na povečano količino UV-B sevanja s tvorbo UV absorbirajočih pigmentov, kot na primer flavonoidov. To so antioksidanti, ki ščitijo rastlino pred oksidativnim stresom. Pri višjih rastlinah so flavonoidi prisotni v epidermisu in zgornjih plasteh mezofila, v vakuolah, lahko pa tudi v kloroplastih ali vezani v celične stene. (Bornman in Teramura, 1993). Breznik in sod. (2005) navajajo, da se rastline na povečano UV-B sevanje odzovejo s povečano biosintezo komponent, ki ščitijo rastlino pred radiacijo (kaempferol, luteolin, rutin, tricin in apigenin), ki absorbirajo sevanje v obsegu 280 - 400 nm.

## 2.2 BROKOLI

Brokoli (*Brassica oleracea* L. var. *italicica*) spada v družino križnic (Brassicaceae), rod *Brassica*. Brokoli, imenovan tudi brokuli, kavolin ali kavulin, izvira iz iste vrste kot cvetača. Osnovne karakteristike brokolija in cvetače so zelo podobne. Razlike med njima se kažejo v tem, da brokoli razvije tudi lateralne cvetove, in je zelene, vijolične ali rožnate barve, medtem ko je cvetača bele ali slonokoščene barve. Cvetovi pri brokoliju niso tako zbiti, saj rastejo vzdolž stebla iz pazduh listov. Je zelo odporen na sušo in je manj občutljiv na vročino. Poznamo dva tipa: zimski brokoli z razvito terminalno rožo bele ali rumene barve, ki izvira iz Anglije, in brokoli z manjšimi, zelenimi rožami z izvorom iz Italije (Osvald in Kogoj Osvald, 2005).

V svetu je dobro znana vrtnina, k nam pa je prišla iz Italije šele pred dvajsetimi do tridesetimi leti. Italija je tudi sicer največja pridelovalka brokolija v Evropi, sledijo pa ji Španija, Nizozemska, Nemčija, Anglija in Francija (Černe, 1998).

V prehrani je zelo vsestransko uporaben, saj ga lahko uporabimo za pripravo raznih zelenjavnih in kremnih juh, ki so lahko tudi osnova za zgoščanje drugih jedi. Kuhanega lahko pripravimo v solati, kot okusno samostojno jed, lahko ga dušimo, cvremo ali uporabimo kot prilogo k drugim jedem. Černe in Vrhovnik (1992) omenjata tudi blanširanje brokolija, ki ga potem hitro zamrznemo ter takega uporabljam enako kot svežega ali ga dodamo juham kot jušno zelenjavo.

Brokoli ima majhno energetsko vrednost (od 105 do 167 kJ/100g) in je zato primeren za dietno prehrano. V 100 gramih užitnega dela brokolija je 88 do 90,4 g vode; 3,3 do 3,37 g surovih beljakovin; 0,2 do 0,34 g surovih maščob; 2,5 do 5,8 g ogljikovih hidratov in 1,3

do 3,0 g prehranskih vlaknin. Poleg tega vsebuje tudi veliko aminokislin (treonin, triptofan, lizin, izolevcin, arginin in levcin); mineralov (kalij, kalcij, fosfor, žveplo in železo) in vitaminov (C vitamin, karoten, vitamin B<sub>5</sub>) (Černe, 1998; Shivapriya in sod., 2011). Bogat pa je tudi s številnimi antioksidanti (karotenoidi, flavonoidi, fenoli, indoli, izotiocianati), ki razstrupljajo telo (Černe, 1998; Shivapriya in sod., 2011). V zadnjem desetletju se je povečala poraba brokolija prav zaradi njegovih pozitivnih lastnosti na zdravje ljudi (Ramos in sod., 2011; Herr in Buchler, 2010).

Radikali nastajajo pri aerobnem celičnem dihanju. Pri normalnih razmerah antioksidanti odstranjujejo radikale. Če pa je slednjih v telesu preveč, se na celični ravni pojavi oksidacijski stres. Slednji povzroča poškodbe na lipidih, nukleinskih kislinah in proteinih, kar vodi do številnih kroničnih bolezni. Zato bi povečanje vnosa antioksidantov s hrano močno pripomoglo k splošnemu izboljšanju zdravja ljudi. Med vsemi vrstami zelenjave imajo prav križnice (kamor spada tudi brokoli) največjo antioksidativno aktivnost (Soengas in sod., 2012).

Brokoli ima velik potencial pri preprečevanju degenerativnih bolezni, kot so različne vrste raka (Mahn in sod., 2012; Abdulah in sod., 2005; Finley in sod., 2000; Keck in Finley, 2004) in srčnožilne bolezni (Mukherjee in sod., 2008). Glavne bioaktivne snovi v brokoliju so glukozinolati, polifenoli in minerali, med njimi tudi selen (Mahn in sod., 2012). Glukozinolati so žveplo vsebujoči glikozidi (sekundarni metaboliti), ki so pomembni pri zaščiti rastlin pred herbivori, na ljudi pa delujejo antikancerogeno in so naravno prisotni v križnicah (Matich in sod., 2012; Ramos in sod., 2011). Raziskave v zadnjem času so pokazale, da je sintetično pridobljen selenoglukozinolat bolj učinkovit v boju z rakom, kot glukozinolat (Matich in sod., 2012). Znano je, da žveplo in selen v bioloških metabolnih poteh med seboj delujejo antagonistično. V rastlinah, ki so bile izpostavljene velikim koncentracijam selenita ali selenata, so zaznali majhne koncentracije glukozinolatov (Ramos in sod., 2011; Hsu in sod., 2011). Vendar pa so Hsu in sod. (2011) dokazali, da je pod določenimi pogoji možno vzgojiti s selenom obogaten brokoli, ki vsebuje velike vsebnosti tako selena kot glukozinolatov. Rastline iz rodu *Brassica* in *Allium* akumulirajo selen v obliki Se-metilselenocisteina, ki zavira razvoj rakavih celic (Arscott in sod., 2012; Ellis in Salt, 2003; Ellis in sod., 2004; Medina in sod., 2001; Ip in sod., 2002). Brokoli vsebuje tudi sulforafan, ki je prav tako aktivna antikancerogena snov (Zhang in sod., 1992; Shankar in sod., 2008). V zadnjem času se kalicam brokolija namenja prav posebno pozornost, saj vsebujejo 10-krat večjo koncentracijo sulforafana, kot rože brokolija (Matusheski in sod., 2004; Nakagawa in sod., 2006). Ugotovljeno je bilo, da imajo kalice brokolija antioksidativno in antikancerogeno aktivnost tako *in vitro* kot *in vivo* (Tang in sod., 2006; Dinkova-Kostova in sod., 2006; Munday in sod., 2008). Z gojenjem s selenom obogatenih kalic brokolija bi torej lahko veliko pripomogli k zmanjšanju števila ljudi obolelih za rakom (Abdulah in sod., 2009).

## 2.3 DOLOČITEV VSEBNOSTI SELENA V RASTLINSKIH VZORCIH

Koncentracijo selena v rastlinskih vzorcih lahko določamo na več različnih načinov, vendar mora biti metoda določanja prilagojena določanju majhnih koncentracij selena, saj ga rastline po navadi vsebujejo v sledovih (ng/g). Pred detekcijo selena je potreben popoln razkroj vzorcev, saj se le-ta kompleksno veže v zgradbo rastlin, obenem pa moramo preprečiti izgube zaradi nastanka lahko hlapnih oblik selena (Smrkolj, 2003).

### 2.3.1 Vzorčenje in razkroj vzorcev

Velik vpliv na pravilnost rezultatov ima vzorčenje preiskovanega materiala. Zagotoviti moramo reprezentativnost in homogenost vzorca. Priprava vzorcev vključuje vzorčenje, homogenizacijo in mletje. Pri teh postopkih lahko pride do neželenih kontaminacij in izgub.

Reprezentativne in homogene vzorec razkrojimo, da pretvorimo selen in njegove spojine v vodotopno obliko. Razkroj predstavlja najbolj kritično fazo v postopku določanja selena. Rastlinske vzorce lahko razkrojimo na več načinov, večini pa je skupen razkroj organske snovi, selen pa se pretvorí v topno obliko v raztopini. Pri suhem postopku oksidacije vzorec upepelimo s segrevanjem pri visokih temperaturah (550-560 °C) ob prisotnosti zraka. Ta postopek ni najbolj primeren, saj nastajajo izgube zaradi nastanka hlapnih Se spojin (Reilly, 1996). Za mokro oksidacijo uporabimo mineralne kislino ali njihove mešanice pri povišani temperaturi. Ker moker razkroj v zaprtem sistemu zagotavlja manjše izgube, se zmanjša možnost kontaminacije, sam postopek pa je tudi hitrejši, je za določanje selena bolj primeren (Combs in Combs, 1986). Za analizo so primerni predvsem reagenti z velikim oksidacijskim potencialom (dušikova kislina, mešanica dušikove in žveplene kislino ali mešanica žveplove kislino in vodikovega peroksida). Ker je v rastlinskih vzorcih prisoten silicij, za razkroj uporabljam tudi fluorovodikovo kislino (HF) (Vassileva in sod., 2001).

### 2.3.2 Metode detekcije selena

V preglednici 2 so navedene najpogosteje uporabljeni metodi za detekcijo selena v živilih in meje zaznavnosti. Izbera primerne metode je odvisna od koncentracije selena v vzorcu, prisotnosti motečih elementov, zahtevane natančnosti in zanesljivosti.

Preglednica 2: Najpogosteje uporabljeni metodi detekcije selena v živilih (cit. po Smrkolj, 2003)

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

### 2.3.2.1 Hidridna tehnika atomske fluorescenčne spektrometrije (HG-AFS)

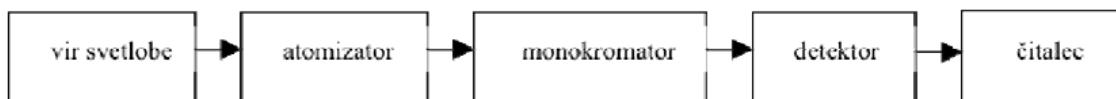
Metodo atomske fluorescenčne spektrometrije je prvič predstavil Winefoder leta 1964, vendar jo pogosteje uporabljamo šele v zadnjem času, zaradi uporabe primerne separacijske tehnike, ki prej ni bila znana (hidridna tehnika). Uporaba HG-AFS zagotavlja veliko občutljivost, saj hidridna tehnika vključuje ločitev analita od osnovne raztopine, kar omogoča tudi boljšo mejo zaznavnosti ter poveča natančnost in točnost rezultatov (Vandecasteele in Block, 1993).

Pri hidridni tehniki se selen izloči iz raztopine razkrojenega vzorca in je sestavljena iz dveh delov (Dedina, 1995):

- sprostitev hidrida iz raztopine vzorca v obliki vodikovega selenida (pretvorba analita v nakisanem vzorcu do hidrida in pretvorba v plinsko fazo);
- transport sproščenega hidrida z nosilnim plinom do atomizatorja.

Le selenid, ki je reducirana oblika selenita, tvori hlapne hidride, zato je potrebno selenove zvrsti pretvoriti v selen (IV) s HCl. Za tvorbo selenovega hidrida ( $H_2Se$ ) najpogosteje uporabljajo reducent natrijev tetrahidridoborat (III) ( $NaBH_4$ ). Le-ta pri  $pH \leq 1$  zelo hitro razpade in tako reducira Se(IV) do  $H_2Se$  (vodikov selenid), ki ga nosilni plin prenese v atomizator. Običajno za nosilni plin uporabimo argon, za sušilni plin pa dušik, zrak ali argon. Spektralnim motnjam se izognemo z ločitvijo analita od osnove.

Metodo AFS najpogosteje uporabimo za določitev As, Cd, Hg, Pd in Se. Zasnovana je na principu absorpcije svetlobe, ki jo prosti atomi absorbirajo iz črtastega ali kontinuiranega izvora, pri čemer atomi ob prehodu iz vzbujenega v osnovno stanje fluorescirajo. Intenziteta svetlobe je proporcionalna absorbirani svetlobi in številu atomov analita. Z detektorjem, ki je nameščen pravokotno na smer svetlobe iz vira za vzbujanje, merimo fluorescirano svetlobo. Detektorski sistem je običajno fotopomnoževalka. Shema AFS je prikazana na sliki 1 (cit. po Smrkolj, 2003).



Slika 1: Shema avtomatskega fluorescenčnega spektrometra AFS (cit. po Smrkolj, 2003)

### 3 MATERIALI IN METODE

V okviru diplomske naloge smo ugotavljali koncentracijo selena v kalicah in semenskih ovojnicih brokolija (*Brassica oleracea* L. var. *italicica*) s tehniko hidridne atomske fluorescenčne spektrometrije (HG-ASF), pri kontrolni skupini kalic in kalicah, katerih semena so bila predhodno namočena v raztopini natrijevega selenita ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) s koncentracijo 5 mg Se/L in 10 mg Se/L.

#### 3.1 POSTAVITEV POSKUSA

V petrijevke smo zatehtali po 5,4 g semen brokolija, ter dodali 50 mL raztopine natrijevega selenita z različnimi koncentracijami selena (5 in 10 mg Se/L). Za kontrolno skupino smo uporabili semena brokolija, ki smo jih predhodno namakali v destilirani vodi. Tako pripravljena semena smo pustili stati približno 4 ure, dokler niso vsrkala vse razpoložljive raztopine. Semena smo nato posejali v aluminijaste posode na omočen papir. Kalice so bile razporejene v tri skupine glede na svetlobne razmere: tema, dnevna svetloba brez UV-B sevanja in dnevna svetloba s kratkotrajnim izpostavljanjem sončnemu UV-B sevanju in tako dobili 8 poskusnih skupin, ki so opisane v preglednici 3. Del kalic smo 6 dni postavljali izven rastlinjaka, kjer so bile kratkotrajno izpostavljene dnevni svetlobi s povečanim UV-B sevanjem (v povprečju za 2 uri na dan, v času največjega sončevega obsevanja). Kalice smo gojili 12 dni (od 2.4. do 24.4.2009), v tem času so razvile dva klična lista. V rastlinjaku je bila povprečna temperatura 20°C.

Dne, 14.4.2009 smo vzorce pripravili za analizo. Nekatere banjice smo razpolovili, da smo dobili dve ponovitvi posameznega obravnavanja. Pri vsakem vzorcu smo pazljivo pobrali 100 kalic s koreninami, pri ostalih kalicah pa je večina korenin ostala na pivniku. Po sušenju kalic v liofilizatorju smo vzorce stotih celih kalic stehtali in iz dobljenih podatkov analizirali vpliv različnih koncentracij natrijevega selenita ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) na rast kalic brokolija. S HG-AFS smo ugotavljali vsebnost selena v vzorcih stotih kalic, ostalih kalicah in semenskih ovojnicih.

### 3.2 VZORCI

Za določitev selena smo vsako ponovitev analizirali v treh oziroma v dveh paralelkah. Kalic z namakalno koncentracijo 10 mg Se/L v temi nismo gojili.

Preglednica 3: Shema poskusa namakanja semen brokolija v raztopini natrijevega selenita

Namakalna koncentracija selena selenit (SeIV)	Svetlobne razmere		
	tema	Rastlinjak (zmanjšano UV-B sevanje)	Dnevna svetloba z UV-B
mg Se/L	Število ponovitev znotraj skupin		
0	2	2	3
5	2	2	3
10	—	2	2

#### 3.2.1 Priprava vzorcev

Suhe vzorce smo zmleli s pomočjo ahatnega planetarnega mikro mlina (FRITSCH, Pulverisette 7), in sicer pri hitrosti 2600 obratov / minuto (5 minut) in nato 2800 obratov / minuto (1 minuto). Delovno površino in mlin z ahatnimi lončki in kroglicami smo pred vsakim mletjem očistili in s tem preprečili kontaminacijo vzorcev. Shranili smo jih v ustrezno označene plastične posodice, ki smo jih do analize hranili v temnem prostoru. Za zatehto vzorcev smo uporabili analitsko tehnico.

### 3.3 REAGENTI IN APARATURE

#### 3.3.1 Reagenti

Za celoten postopek razkroja vzorcev in pripravo raztopin smo potrebovali:

- Deionizirano vodo MilliQ (Millipore),
- 65% HNO<sub>3</sub> (Merck, suprapur),
- 96% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck, suprapur),
- 30% HCl (Merck, suprapur),
- 37% HCl (Merck, p.a.),
- 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, p.a.),
- V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (Merck, p.a.),
- 40% HF (Merck, suprapur),
- NaOH (Merck, puriss p.a.),
- NaBH<sub>4</sub> (Fluka, purum p.a.)

### 3.3.2 Aparature

Pri pripravi vzorcev in meritvah koncentracije selena smo uporabili naslednje aparature:

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

## 3.4 METODA ZA DOLOČITEV SELENA

### 3.4.1 Razkroj vzorcev

Vzorce smo razkrojili po postopku, ki sta ga opisali Smrkolj in Stibilj (2004). Visoke teflonske posodice (50 mL, Savillex) smo predhodno 24 ur namakali v raztopini detergenta (10 % Micro 90) in nato še 24 ur v raztopini  $\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O} = 1:1$ , jih sprali z deionizirano vodo MilliQ (Milipore) in jih osušili.

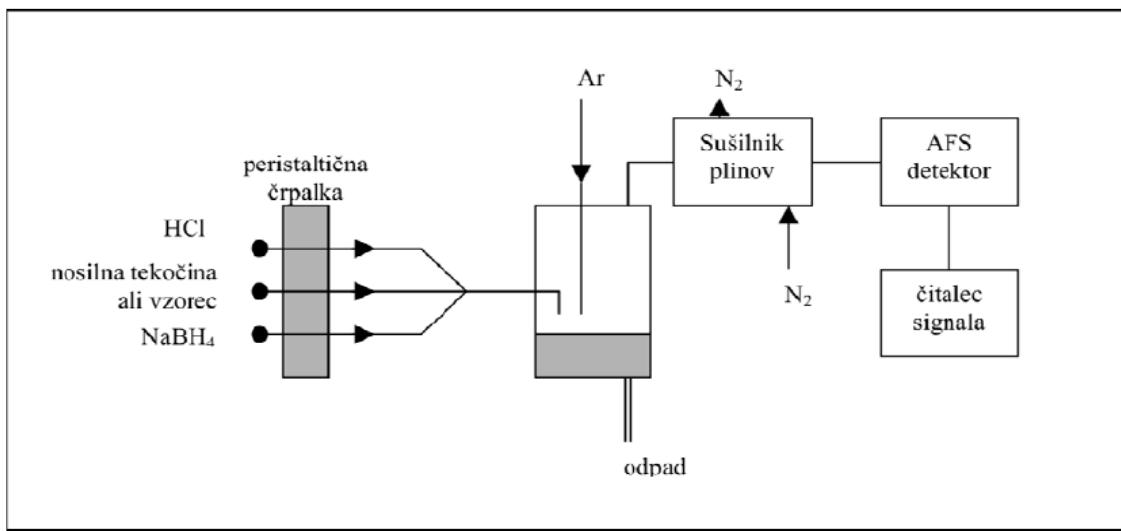
V tako pomite in stehtane teflonske posodice smo zatehtali od 0,150 do 0,200 g vzorca z natančnostjo 0,5 mg. Za razkroj smo dodali 1,5 mL konc.  $\text{HNO}_3$  in 0,5 mL konc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  in čez noč segrevali pri 80 °C v zaprtih posodicah na aluminijastem termo bloku (Termoproc). Naslednji dan smo temperaturo za eno uro povišali na 130 °C. Nato smo vzorce ohladili na sobno temperaturo, jim dodali 2 mL konc.  $\text{H}_2\text{O}_2$  in jih segrevali 15 minut v odprtih posodicah pri temperaturi 115 °C. Za tem smo ponovno dodali 2 mL konc.  $\text{H}_2\text{O}_2$  in 0,100 mL 40 % HF in segrevali 10 minut pri temperaturi 115 °C. Vzorce smo ponovno ohladili na sobno temperaturo, dodali 0,100 mL razt.  $\text{V}_2\text{O}_5$  v  $\text{H}_2\text{SO}_4$  in jih segrevali pri 115 °C približno 20 minut (da se je raztopinaobarvala modro). V ponovno ohljene raztopine smo nato dodali od 2,5 do 3 mL konc. HCl in segrevali 10 minut pri 90 °C. Po redukciji Se(VI) v Se(IV) smo ohljene raztopine redčili na 20 – 50 g z MilliQ (ustrezno glede na predvidene koncentracije Se v vzorcu) ter s HG-AFS določili vsebnost selena.

### 3.4.2 Standardne raztopine

Za pripravo selenovih standardov smo uporabili  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  (Sigma, SigmaUltra), ki smo ga raztoplili v MilliQ in pripravili raztopino s koncentracijo 10 µg Se/g. Delovne selenove raztopine s koncentracijo 100 ng Se/g smo pripravljali tedensko, raztopine z manjšimi koncentracijami Se pa dnevno v enakem kislinskem mediju kot so bili razkrojeni vzorci.

### 3.4.3 Merjenje koncentracije selena s HG-AFS

Shemo pretočnega sistema HG-AFS prikazuje slika 2. Nosilna tekočina HCl (2 mol/L, s pretokom 1 mL/min) v križnem spoju reagira s HCl (2 mol/L, s pretokom 8 mL/min) za tvorbo hidrida in z reducentom 1,2% NaBH<sub>4</sub> v 0,1M NaOH (pretok 3 mL/min). Pretoke na peristaltični črpalki (Ismatec, MPC 380) smo uravnavali s cevkami iz Tygona LFL z različnimi notranjimi premeri (0,76 mm, 1,02 mm in 2,06 mm). Povezava med injektorjem in separatorjem je sestavljena iz spojev iz PEEK-a (polietereterketon) in iz cevi z notranjim premerom 0,51 mm. V plinsko-tekočinskem separatorju (A-tip, PS Analytical) je prišlo do ločitve dveh faz. Argon, s pretokom 260 mL/min, odnese nastala plina (H<sub>2</sub>Se in H<sub>2</sub>) skozi sušilec plinov (Perma Pure Products), kjer kot sušilni plin uporabimo dušik, s pretokom 3 L/min, v atomski fluorescenčni spektrometer (Excalibur, PS Analytical). H<sub>2</sub>Se v plamenu atomizira do selenovih atomov, ki absorbirajo svetlubo s selenove žarnice z votlo katodo z dodatnim napajanjem (Super Lamp Photron, valovna dolžina 196 nm; primarni tok 20 mA; sekundarni tok 25 mA), ki nato fluorescirajo. Signalom vzorcev, ki nam jih zabeleži rekorder, smo nato izmerili višino in jih primerjali z višino vrhov standardnih delovnih raztopin Se (IV) z znanimi koncentracijami. S pomočjo regresijske premice in višino izmerjenih vrhov smo izračunali vsebnost selena v vzorcu.



Slika 2: Shema pretočnega sistema HG-AFS (Smrkolj, 2003)

### 3.4.4 Pravilnost in ponovljivost metode

Pravilnost ter zanesljivost metode za merjenje vsebnosti selena v brokoliju smo preverjali z ugotavljanjem koncentracije selena v certificiranem referenčnem materialu CRM Spinach Leaves, NIST 157a. Certificiran referenčni material smo vključili v analizo vsake serije vzorcev v treh paralelkah. Razkroj referenčnega materiala je potekal enako kot razkroj vzorcev brokolija, tudi vsi nadaljnji postopki so bili enaki. Dobljene rezultate smo podali

kot povprečje  $\pm$  standardna napaka. Rezultati se ujemajo s certificirano vrednostjo in so prikazani v preglednici 4.

Preglednica 4: Vsebnosti selena v certificiranem referenčnem materialu špinačni listi (Spinach Leaves, NIST 157a:  $117 \pm 9$  ng Se/g SS).

Spinach Leaves (NIST 1570a)	
Datum	povprečje (ng Se/g SS)
21.7.2010	$92,3 \pm 2,8$
23.7.2010	$87,4 \pm 5,6$
27.7.2010	$117 \pm 2$
28.7.2010	$118 \pm 5$
29.7.2010	$114 \pm 1$
30.7.2010	$106 \pm 3$
2.8.2010	$99 \pm 4$
3.8.2010	$104 \pm 8$
4.8.2010	$106 \pm 6$
5.8.2010	$102 \pm 11$

### 3.5 STATISTIKA

Dobljene podatke smo tabelarično uredili in obdelali v programu Microsoft Excel in jih nato statistično obdelali z enosmerno analizo variance (ANOVA) s pomočjo programa Statgraphics plus 4,0. Razlike med obravnavanji smo ugotavljali s pomočjo testa mnogoterih primerjav (LSD test), upoštevali smo 5% tveganje. Obravnavanja, pri katerih nismo ugotovili statistično značilne razlike, so označena z isto črko.

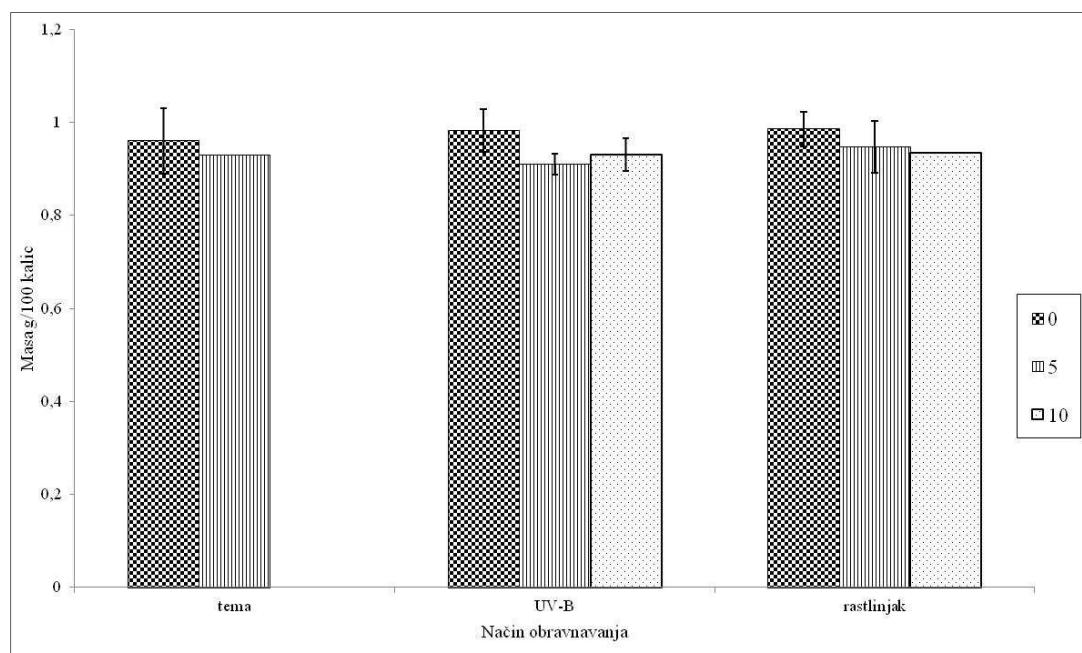
#### 4 REZULTATI

Preglednica 5 in slika 3 nam prikazujeta povprečno suho maso 100 celih kalic brokolija (skupaj s koreninami), zraslih iz semen, ki smo jih predhodno namakali v raztopini natrijevega selenita s koncentracijo 0, 5 in 10 mg Se/L. Vsako od skupin smo gojili pri različnih svetlobnih razmerah: tema, dnevna svetloba z zmanjšanim UV-B sevanjem (v nadalnjem besedilu: RASTLINJAK) in dnevna svetloba s kratkotrajnim izpostavljanjem sončevemu UV-B sevanju (v nadalnjem besedilu: UV-B) in rezultate med seboj primerjali. Kalic v temi z namakalno koncentracijo 10 mg Se/L nismo gojili. Pri vseh svetlobnih razmerah so imele največjo povprečno maso (g/100 kalic) kalice iz kontrolne skupine. Največjo povprečno maso 100 kalic imajo kalice gojene v rastlinjaku, pri vseh namakalnih koncentracijah, najmanjšo pa imajo kalice gojene na dnevni svetlobi z UV-B sevanjem. Pri namakalnih koncentracijah 0 in 10 mg Se/L velikih razlik med povprečnimi masami 100 kalic med skupinami kalic gojenih v rastlinjaku in na dnevni svetlobi z UV-B ne opazimo, saj je povprečna masa kalic pri obeh namakalnih koncentracijah iz skupine kalic gojenih pri UV-B le za 0,01 g/100 kalic manjša od skupine kalic gojenih v rastlinjaku. Pri namakalni koncentraciji 5 mg Se/L imajo najmanjšo povprečno maso kalice, ki so bile kratkotrajno izpostavljene sončnemu UV-B sevanju, sledijo jim kalice rasle v temi, kalice iz rastlinjaka imajo največjo povprečno maso.

Preglednica 5: Povprečna masa 100 celih kalic (g SS) brokolija pri različnih svetlobnih razmerah, iz semen, namočenih v raztopino natrijevega selenita, s koncentracijo 0, 5 in 10 mg Se/L<sup>a</sup>

Svetlobne razmere	Selenit (mg Se/L)		
	0	5	10
Masa 100 kalic (g SS)			
Tema	0,96±0,07 ab	0,93±0 ab	—
Dnevna svetloba z UV-B	0,98±0,05 a	0,91±0,02 b	0,93±0,02 ab
RASTLINJAK (zmanjšano UV-B sevanje)	0,99±0,04 a	0,95±0,06 ab	0,94±0,04 ab

<sup>a</sup> Rezultati so podani kot povprečje ± standardni odklon. Povprečne vrednosti, označene z isto črko v istem stolpcu namakalne koncentracije, se med seboj statistično ne razlikujejo. Masa kalic pri namakalni koncentraciji 5 mg Se/L pri dnevni svetlobi z UV-B je statistično značilno manjša od kontrolne skupine kalic gojenih na dnevni svetlobi z UV-B in v rastlinjaku.



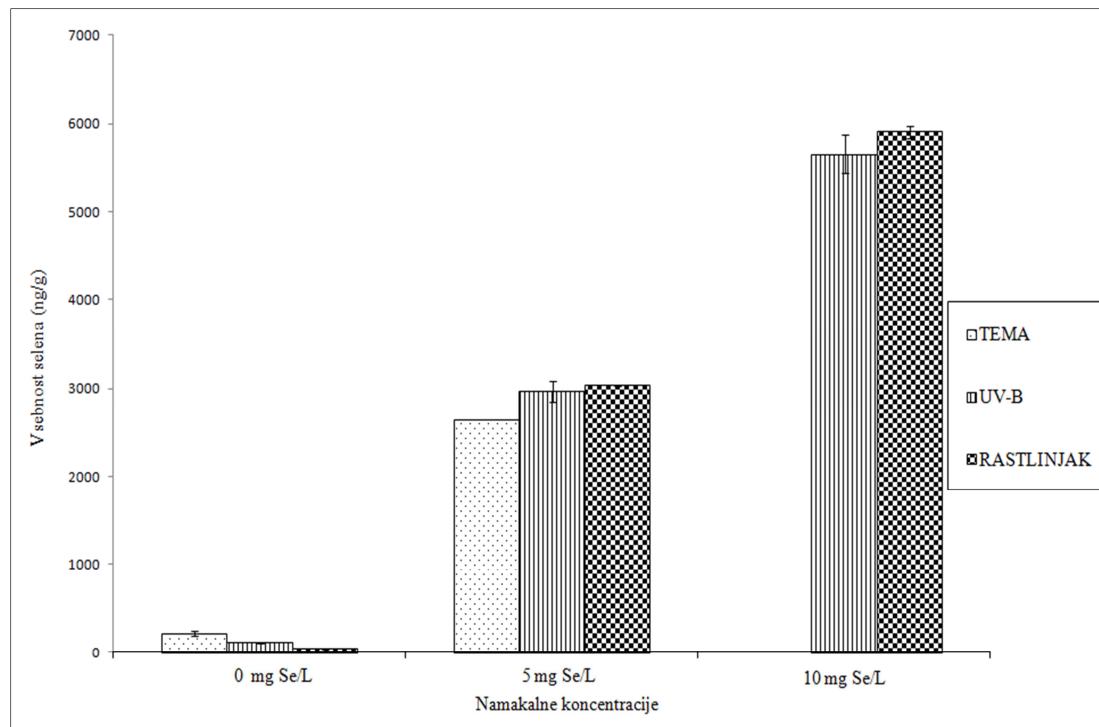
Slika 3: Povprečna masa 100 celih kalic (g SS) brokolija pri različnih svetlobnih razmerah, iz semen, namočenih v raztopino natrijevega selenita, s koncentracijo 0, 5 in 10 mg Se/L

V preglednici 6 in sliki 4 je prikazana vsebnost selena 100 celih kalic brokolija, zraslih iz semen, ki smo jih predhodno namakali v raztopini natrijevega selenita s koncentracijami 0, 5 in 10 mg Se/L pri različnih svetlobnih razmerah. Kalice smo previdno pobrali s pivnika skupaj s koreninami. Najmanjšo vsebnost selena imajo pričakovano kalice iz kontrolne skupine, največjo pa kalice, zrasle iz semen, ki smo jih predhodno namakali v raztopini natrijevega selenita s koncentracijo 10 mg Se/L. Pri kontrolni skupini kalic, ki so rasle v temi, je vsebnost selena nekoliko večja od ostalih. Prišlo je do kontaminacije vzorca. Iz rezultatov je tudi razvidno, da je koncentracija selena v kalicah brokolija ob dodajanju natrijevega selenita s koncentracijami 5 in 10 mg Se/L, naraščala linearno. Največjo vsebnost selena pri namakalnih koncentracijah 5 in 10 mg Se/L imajo kalice gojene v rastlinjaku. Poudariti je treba, da je pri vseh celih kalicah vsebnost Se večja kot v ostalih kalicah, pri katerih je večina korenin ostala na pivniku (podatki niso vidni iz preglednice ali slike).

Preglednica 6: Vsebnost selena v 100 celih kalicah brokolija pri različnih svetlobnih razmerah, iz semen, namočenih v raztopino natrijevega selenita, s koncentracijami 0, 5 in 10 mg Se/L<sup>a</sup>

	Selenit (mg Se/L)		
	0	5	10
Svetlobne razmere	Povprečje (ng Se/g SS)		
TEMA	221±26 c	2637 ±1 b	—
Dnevna svetloba z UV-B	114±5 c	2971±114 b	5656±219 a
RASTLINJAK (zmanjšano UV-B sevanje)	45,4±1,5 c	3031±6 b	5913 ±69 a

<sup>a</sup> Rezultati so podani kot povprečje ± standardna napaka. Povprečne vrednosti, označene z isto črko v istem stolpcu namikalne koncentracije, se med seboj statistično ne razlikujejo. Namikalni koncentraciji 5 in 10 mg Se/L sta statistično značilno vplivali na povečanje vsebnosti Se v kalicah brokolija v primerjavi s kontrolo.



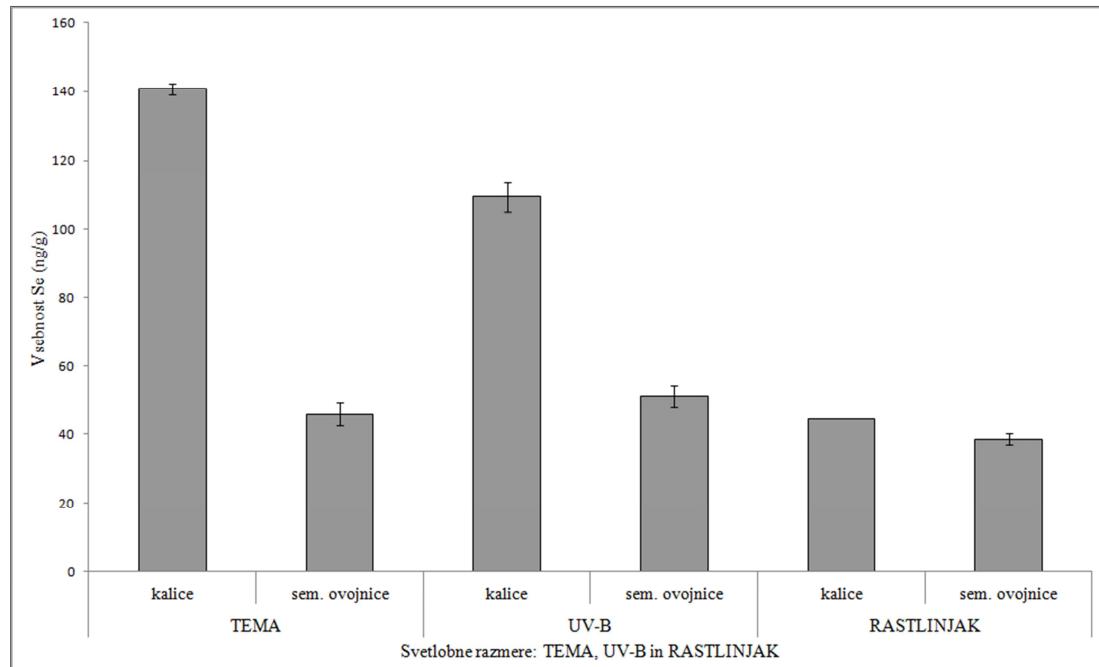
Slika 4: Vsebnost selena (ng/g) v 100 celih kalicah brokolija pri različnih svetlobnih razmerah, iz semen, namočenih v raztopino natrijevega selenita, s koncentracijami 0, 5 in 10 mg Se/L

V preglednici 7 in sliki 5 so prikazani rezultati meritev vsebnosti selena v kalicah in semenskih ovojnicih kontrolne skupine brokolija pri različnih svetlobnih razmerah. Rezultati meritev kažejo, da največ selena vsebujejo kalice gojene v temi. Kalice gojene v rastlinjaku vsebujejo najmanj selena. Vse prazne semenske ovojnici iz kontrolne skupine vsebujejo manj selena kot ustreerne kalice.

Preglednica 7: Vsebnost selena v kalicah in semenskih ovojnicih kontrolne skupine brokolija pri različnih svetlobnih razmerah<sup>a</sup>

Svetlobne razmere	Del kalic	Št. vzorcev	Št. določitev	Povprečje (ng Se/g SS)
TEMA	kalice	2	6	141±2 a
	sem. ovojnice	2	4	46,1±3,4
Dnevna svetloba z UV-B	kalice	3	9	109±4 ab
	sem. ovojnice	3	8	51,2±3,1
RASTLINJAK (zmanjšano UV-B sevanje)	kalice	2	6	44,8±0,1 b
	sem. ovojnice	2	6	38,5±1,5

<sup>a</sup> Rezultati so podani kot povprečje ± standardna napaka. Povprečne vrednosti, označene z isto črko, se med seboj statistično ne razlikujejo. Gojenje kalic v rastlinjaku je statistično značilno vplivalo na zmanjšanje vsebnosti selena v kalicah, v primerjavi s kalicami gojene v temi.



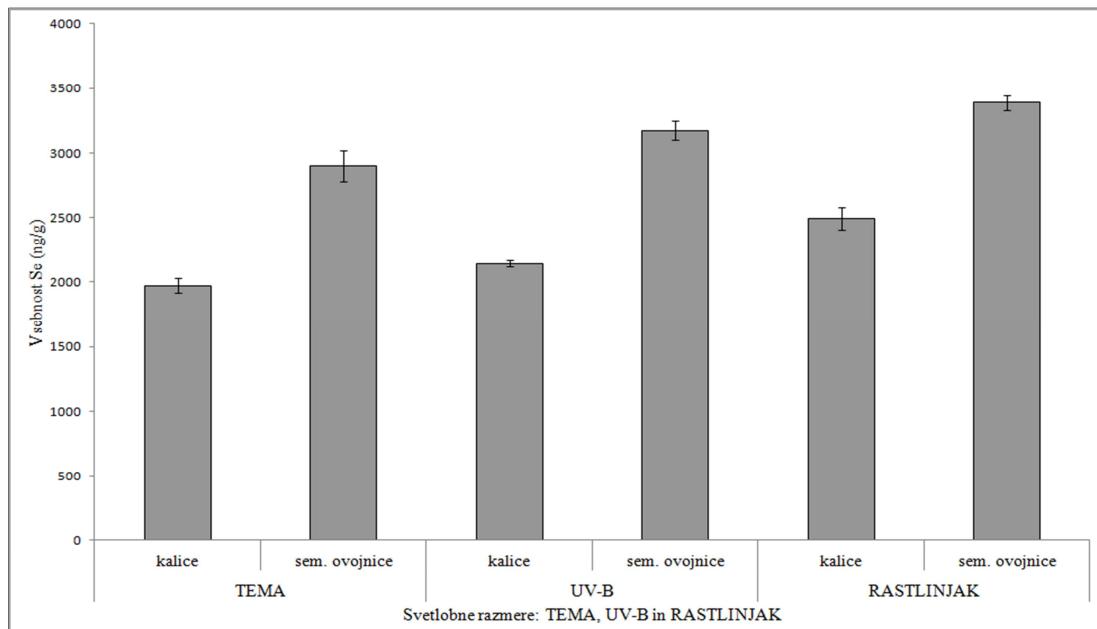
Slika 5: Vsebnost selena (ng/g) v kalicah in semenskih ovojnicih kontrolne skupine brokolija pri različnih svetlobnih razmerah

V preglednici 8 in sliki 6 so prikazani rezultati meritev vsebnosti selena v kalicah in semenskih ovojnicih brokolija, zraslih iz semen, ki smo jih predhodno namakali v raztopini natrijevega selenita s koncentracijo 5 mg Se/L. Opazimo povečanje vsebnosti selena glede na kontrolno skupino. Vsebnost selena se je povečala pri vseh analiziranih skupinah kalic. Vsebnost selena je bila pri vseh svetlobnih razmerah največja v semenskih ovojnicih. Največjo vsebnost selena smo izmerili v semenskih ovojnicih, ki smo jih gojili v rastlinjaku. Največjo vsebnost selena so imele kalice gojene v rastlinjaku, nekoliko manjše vsebnosti pa smo izmerili pri kalicah, ki smo jih izpostavili sončnemu UV-B sevanju. Najmanjšo vsebnost selena so vsebovale kalice gojene v temi.

Preglednica 8: Vsebnost selena v kalicah in semenskih ovojnicih brokolija pri različnih svetlobnih razmerah, iz semen namočenih v raztopino natrijevega selenita, s koncentracijo 5 mg Se/L<sup>a</sup>

Svetlobne razmere	Del kalic	Št. vzorcev	Št. določitev	Povprečje (ng Se/g SS)
TEMA	kalice	2	6	1975±59 b
	sem. ovojnice	2	4	2896±123
Dnevna svetloba z UV-B	kalice	3	9	2146±27 b
	sem. ovojnice	3	9	3175±76
RASTLINJAK (zmanjšano UV-B sevanje)	kalice	2	6	2494±88 a
	sem. ovojnice	2	6	3388±58

<sup>a</sup> Rezultati so podani kot povprečje ± standardna napaka. Povprečne vrednosti, označene z isto črko, se med seboj statistično ne razlikujejo. Gojenje kalic v rastlinjaku je statistično značilno vplivalo na povečanje vsebnosti selena v kalicah brokolija, v primerjavi s kalicami gojene v temi in na dnevni svetlobi z UV-B.



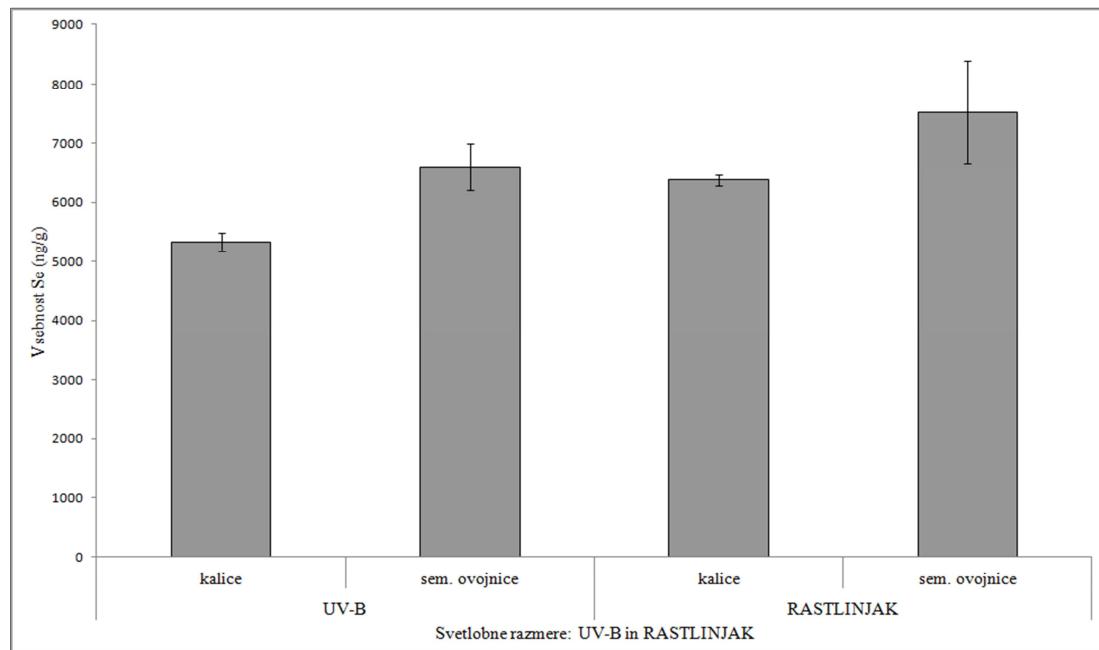
Slika 6: Vsebnost selena (ng/g) v kalicah in semenskih ovojnicih brokolija pri različnih svetlobnih razmerah, iz semen namočenih v raztopino natrijevega selenita, s koncentracijo 5 mg Se/L

V preglednici 9 in sliki 7 so prikazani rezultati meritev vsebnosti selena v kalicah in semenskih ovojnicih brokolija, zraslih iz semen, ki smo jih predhodno namakali v raztopini natrijevega selenita s koncentracijo 10 mg Se/L. Kalic v temi nismo gojili. Iz preglednice 9 vidimo, da kalice, katerih semena smo predhodno namakali v raztopini selenita s koncentracijo 10 mg Se/L, vsebujejo največjo vsebnost selena v primerjavi s kontrolno skupino in skupino kalic, zraslih iz semen predhodno namakanih v natrijevem selenitu, s koncentracijo 5 mg Se/L. Tako kot pri kalicah, katerih semena smo predhodno namočili v raztopino s koncentracijo 5 mg Se/L, tudi v tem primeru največjo vsebnost selena vsebujejo semenske ovojnice. Tudi v tem primeru vsebujejo kalice gojene v rastlinjaku večjo vsebnost selena od tistih, ki smo jih kratkotrajno izpostavljeni naravnemu sončevemu UV-B sevanju.

Preglednica 9: Vsebnost selena v kalicah in semenskih ovojnicih brokolija pri različnih svetlobnih razmerah, iz semen namočenih v raztopino natrijevega selenita, s koncentracijo 10 mg Se/L<sup>a</sup>

Svetlobne razmere	Del kalic	Št. vzorcev	Št. določitev	Povprečje (ng Se/g SS)
Dnevna svetloba z UV-B	kalice	3	9	5336±150 a
	sem. ovojnice	3	7	6606±401
RASTLINJAK (zmanjšano UV-B sevanje)	kalice	2	6	6374±88 a
	sem. ovojnice	2	4	7528±868

<sup>a</sup> Rezultati so podani kot povprečje ± standardna napaka. Povprečne vrednosti, označene z isto črko v istem stolpcu namakalne koncentracije, se med seboj statistično ne razlikujejo.



Slika 7: Vsebnost selena (ng/g) v kalicah in semenskih ovojnicih brokolija pri različnih svetlobnih razmerah, iz semen namočenih v raztopino natrijevega selenita, s koncentracijo 10 mg Se/L

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Selen za rastline ni esencialen element in zato ne vpliva na kalivost, rast in razvoj kalic, razen če je prisoten v takšni koncentraciji, da je za rastlino toksičen. Tudi v našem primeru so semena normalno kalila, vse kalice pa so bile zdrave in se na pogled niso razlikovale od tistih iz kontrolne skupine. Do podobnih rezultatov so prišli tudi Hu in sod. (2002), ki niso zaznali razlik v pridelku riža, ki mu je bil dodan selen. Broadly in sod. (2010) niso opazili razlik v količini pridelka pšenice, ki so ji dodajali 0, 1, 5, 10, 15, 20, 50 in 100 g Se/ha. Tudi pri hidroponskem gojenju koriandra, kjer so selen dodajali v obliki natrijevega selenata v koncentracijah 2, 4, 6 in 8 mg Se/L niso zaznali razlik v količini pridelka (HoMin in sod. 2000). Rani in sod. (2005) poročajo, da se je pridelek koruze močno zmanjšal, ko je rastlina vsebovala 76,9 µg Se/g in pri rjavi ogrščici (*Brassica juncea*) 104,8 µg Se/g, kar je precej več, kot v našem primeru. Arscott in sod. (2012) so semena brokolija, zelenega mungo fižola (*Vigna radiata*) in čebule namakali v raztopini selenata s koncentracijami 10, 50 in 100 mg Se/L in ugotovili, da so kalice pri 10 mg Se/L izgubile zelo malo na biomasi v primerjavi s kontrolo, medtem ko so pri namakalni koncentraciji 100 mg Se/L izgubile tudi do 46% (brokoli), 30% (fižol) in 10% (čebula) biomase v primerjavi s kontrolo. 10% izpad pridelka so opazili pri kalicah brokolija, zraslih iz semen, ki so jih predhodno namakali v raztopini natrijevega selenata s koncentracijo 15 mg Se/L, medtem ko sama kalivost ni bila ovirana niti pri koncentraciji 152 mg Se/L (Banuelos in sod. 1997). Sugihara in sod. (2004) poročajo, da je koncentracija 10 mg Se/L tako selenita kot selenata inhibirala rast kalic daikona (japonske redkvice). V našem primeru smo opazili približno 4% zmanjšan pridelek suhe snovi, ne glede na svetlobne razmere.

Naši rezultati kažejo, da imajo najmanjše povprečne mase (g/100 kalic) pri namakalnih koncentracijah 5 in 10 mg Se/L, kalice, ki smo jih kratkotrajno izpostavljali dnevni svetlobi z UV-B sevanjem. Gabersčik in sodelavci (2002) navajajo, da UV sevanje vpliva na rast. Poškodbe, ki jih povzroča UV sevanje, rastline prisili, da usmerijo svojo energijo v popravljalne mehanizme in ne v povečanje biomase. Največjo povprečno maso imajo kalice, ki smo jih gojili v rastlinjaku z zmanjšanim UV-B sevanjem. Germ in sodelavci (2007 (a)) navajajo, da mlade rastline, ki niso izpostavljene sončnemu UV-B sevanju, bolje izrabljajo selen za svoj metabolizem in za gradnjo energetskih rezerv, kar se kaže v povečani rasti poganjkov.

Ob namaknaju semen v natrijevem selenitu se je koncentracija selena v kalicah brokolija povečala pri vseh svetlobnih razmerah. Največjo vsebnost selena so vsebovale kalice gojene v rastlinjaku. Pri 100 celih kalicah, ki smo jih pobrali skupaj s koreninami, smo izmerili večjo vsebnost selena (pri ustreznih namakalnih koncentracijah), kot pri kalicah, katerih večina korenin je ostala na pivniku. Tako lahko sklepamo, da korenine shranjujejo večjo količino in imajo tako večjo vsebnost selena. Tudi Terry in sod. (2000) poročajo, da se selenit in SeMet težje prenašata od korenin do ostalih delov rastline kot selenat. Razlog

za to gre pripisati, da se selenit pretvori v organske oblike (SeMet), ki se shranijo v koreninah (Terry in sod., 2000).

Ugotovili smo, da je vsebnost selena v kalicah brokolija naraščala linearno. Tudi Kopsell in sod. (2009) poročajo, da je koncentracija selena, ob dodajanju selenata s koncentracijo 0, 2, 4, 8, 16 in 32 mg Se/L, v baziliki in koriandru naraščala linearno. Linearne povečanje vsebnosti selena so opazili tudi pri čebuli (Kopsell in William, 1997), ohrovtru in repi (Suarez in sod., 2003) ter veliki koprivi (Krystofova in sod., 2010).

Iz preglednic 8 in 9 ter slik 6 in 7 je razvidno, da je vsebnost selena pri namakalnih koncentracijah 5 in 10 mg Se/L pri vseh svetlobnih razmerah večja v semenskih ovojnicih kot v kalicah. Pri kontrolni skupini je izmerjena vsebnost selena večja v kalicah, kot v semenskih ovojnicih (preglednica 7, slika 5). Ugotovitev, da je selenit bolje dostopen in 5-10 krat bolj toksičen od selenata, je večja koncentracija selena v semenskih ovojnicih in manjši privzem selena v kalice (Lemly in sod., 1993). Našo ugotovitev lahko pripišemo dejству, da semenske ovojnlice vsebujejo več vlaknine kot kalice, zaradi česar so lahko absorbirale več raztopine kot endosperm.

Naši rezultati kažejo, da so kalice brokolija obogatene s selenom (z namakalnimi koncentracijami 5 in 10 mg Se/L) primerne za pridelavo, saj se njihova masa ni občutno zmanjšala v primerjavi s kontrolo, obenem pa so kalice akumulirale tudi selen, kar bi pripomoglo k izboljšanju zdravja ljudi. Tudi Arscott in sod. (2012) poročajo, da so kalice obogatene s selenom idealna oblika sveže zelenjave, saj zaradi zgodnjega razvojnega stadija lahko tolerirajo večje koncentracije selena, kot odrasle rastline. V bodoče bi bilo smiselno preučiti v katerih oblikah je selen v kalicah brokolija, zraslih iz semen, ki so bila predhodno namočena v raztopini natrijevega selenita. Kot poročajo Arscott in sod. (2012) so kalice rjave ogrščice (*Brassica juncea* L.) in daikona (*Kaiware daikon* L.), ki so rasle v raztopini natrijevega selenita vsebovale selen v obliki SeMeSeCys in SeMet (selenit so zaznali le v sledovih), medtem ko so pri kalicah, ki so rasle v raztopini natrijevega selenata, zaznali selen večinoma v obliki selenata, ter v majhnih količinah v obliki SeMet in SeMeSeCys. Torej je selenit bolj primeren za tvorbo SeMeSeCys v kalicah, kot selenat (Arscott in sod., 2012).

Če bi s kalicami brokolija iz našega poskusa želeli zadostiti dnevni potrebi po selenu (30-70 µg Se/dan), bi morali zaužiti približno od 125 do 290 g (namakalna raztopina 5 mg Se/L), oziroma od 60 do 145 g svežih kalic (namakalna raztopina 10 mg Se/L), ob predpostavki, da kalice vsebujejo 8% SS.

V preglednici 10 so zbrani podatki povprečne suhe mase kalic, ter koncentracija selena za tatarsko ajdo (Štrekelj in sod., 2012), navadno ajdo (Cuderman in sod., 2010), redkvico (Mihor, 2011) in brokoli. Semena so bila predhodno namočena v raztopini natrijevega selenita s koncentracijami 0, 5 in 10 mg Se/L. Kalice so bile gojene pri različnih svetlobnih razmerah: v rastlinjaku z zmanjšanim UV-B sevanjem, v temi in na dnevni svetlobi s

povečanim UV-B sevanjem. Kalice brokolija smo gojili 12 dni v mesecu aprilu, povprečna temperatura v rastlinjaku je bila 20°C. Kalice redkvice so gojili 13 dni v mesecu marcu (Mihor, 2011), kalice navadne ajde so gojili 8 dni v mesecu maju (povprečna dnevna temperatura 25°C in povprečna temperatura ponoči 18°C) (Cuderman in sod., 2010), kalice tatarske ajde so gojili 15 dni v mesecu aprilu (povprečna dnevna temperatura rastlinjaka 30°C in povprečna temperatura ponoči 10°C) (Štrekelj in sod., 2012).

Iz preglednice 10 lahko vidimo, da je selenit pozitivno vplival na suho maso kalic pri tatarski ajdi. Pri brokoliju in redkvici lahko opazimo, da se s povečevanjem koncentracije selena v raztopini natrijevega selenita zmanjšuje masa kalic. Vsebnost selena v kalicah je naraščala s povečevanjem koncentracije selena v raztopini. Svetlobne razmere nimajo bistvenega vpliva na vsebost selena v kalicah. Kalice navadne in tatarske ajde pri enakih namakalnih koncentracijah, vsebujejo podobne koncentracije selena. To lahko opazimo tudi pri kalicah brokolija in redkvice. Kalice brokolija in redkvice vsebujejo večjo vsebnost selena (ne glede na namakalne koncentracije) kot kalice navadne in tatarske ajde. Slednjo ugotovitev lahko pripisemo dejству, da brokoli in redkvica spadata v družino križnic, ki so verjetno sposobne tolerirati večje vsebnosti selena, kot dresnovke (kamor spadata navadna ter tatarska ajda).

Preglednica 10: Povprečna suha masa kalic in vsebnost selena v kalicah brokolija, redkvice, tatarske in navadne ajde, pri različnih koncentracijah selenita v raztopini za namakanje, gojene pri različnih svetlobnih razmerah (<sup>1</sup>naša raziskava; <sup>2</sup>Mihor, 2011; <sup>3</sup>Štrekelj in sod., 2012; <sup>4</sup>Cuderman in sod., 2010)

	Selenit (mg Se/L)	Rastlinjak (zmanjšano UV-B sevanje)		Tema		Dnevna svetloba z UV-B	
		Suha masa kalice (mg)	Vsebnost Se (µg/g SS)	Suha masa kalice (mg)	Vsebnost Se (µg/g SS)	Suha masa kalice (mg)	Vsebnost Se (µg/g SS)
Brocoli <sup>1</sup>	0	9,9	0,1	9,6	0,2	9,8	0,1
	5	9,5	3	9,3	2,6	9,1	3
	10	9,4	5,9			9,3	5,7
Redkvica <sup>2</sup>	0	9,6	0,2	9,0	0,2	8,7	0,2
	5	8,3	3,7	7,9	3,5	9,1	3,6
	10	8	8,4	6,8	7,9	8,7	7,4
Tatarska Ajda <sup>3</sup>	0	7,9	0,1	6,6	0,1	6,7	0,1
	5	8,8	1,2	7,8	1	7,0	1,3
	10	8,4	3,4	9,2	2,9	8,1	4,1
Navadna ajda <sup>4</sup>	0	11	0,1				
	5	12	2,4				
	10	9,5	2,6				

Kalice brokolija so privzele od 27 do 29% selena, ki je bil na voljo, tatarska ajda približno 20% (Štrekelj in sod., 2012) in navadna ajda od 12 do 27% (Cuderman in sod., 2010). Kalice tatarske in navadne ajde, zraslih iz semen, ki so bila predhodno namakana v

raztopini natrijevega selenata s koncentracijo 5 in 10 mg Se/L, so privzele približno 60% selena (Štrekelj in sod., 2012; Cuderman in sod., 2010). Delež privzema Se je bil izračunan na podlagi razmerja med maso Se v kalici (vsebnost Se/g SS v kalici pomnoženo s suho maso kalice) in teoretičnim privzemom Se iz raztopine v semen. V našem primeru imamo 5,4 g semen, ki so vpila 50 mL raztopine, masa 1 semena = 4,3 mg.

## 5.2 SKLEPI

Z rezultati poskusa smo potrdili delovno hipotezo, da se ob predhodnem namakanju semen v raztopini natrijevega selenita vsebnost selena v kalicah brokolija poveča, ne glede na svetlobne razmere. Opazili smo trend linearnega naraščanja vsebnosti selena v kalicah. Svetlobne razmere so različno vplivale na vsebnost selena v kalicah. Največjo koncentracijo selena, pri s selenom obogatenih kalicah, smo tako izmerili pri kalicah, ki smo jih gojili pri sončni svetlobi brez UV-B sevanja. Pri kontrolni skupini vzorcev pa je bila vsebnost selena največja v kalicah, ki smo jih gojili v temi. Koncentracija selena za kalice brokolija ni bila toksična, saj so vsa semena normalno kalila, kalice obogatene s selenom pa se na pogled niso razlikovale od kontrolne skupine kalic. V manjši meri je selen pripomogel k zmanjšani masi (g SS/100 kalic) imajo kalice, ki smo jih kratkotrajno izpostavljali sončnemu UV-B sevanju, največjo pa tiste, ki smo jih gojili v rastlinjaku.

Rezultati so uporabni predvsem pri morebitni pridelavi s selenom obogatenih kalic brokolija. Redno bi morali kontrolirati le vsebnost selena v kalicah, ter prisotnost zdravju škodljivih mikroorganizmov. Ker ima brokoli velik potencial pri preprečevanju različnih vrst raka in srčnožilnih boleznih, bi z dodajanjem selena še dodatno povečali njegovo biološko vrednost, na ta način pa bi lahko tudi zadostili dnevne potrebe po selenu. V nadalnjih raziskavah bi bilo potrebno ugotoviti, v kakšni obliki se element nahaja v kalicah brokolija, saj je dostopnost selena človeškemu organizmu odvisna od oblike, v kateri se element nahaja.

## 6 POVZETEK

Selen je za življenje živali in človeka neobhodno potreben mikroelement. Ker naravno prisotnega selena primanjkuje v tleh na določenih območjih, ga zaradi tega primanjkuje v prehrani ljudi, kar pa lahko vodi do številnih obolenj. Z gojenjem kalic, zraslih iz semen, ki so bila predhodno namočena v raztopini s selenom, bi se lahko izognili težavam nastalih ob pomanjkanju selena v prehrani ljudi.

Brocoli pozitivno vpliva na zdravje ljudi, prav zato se je v zadnjem desetletju močno povečala njegova poraba. Vsebuje veliko količino antioksidantov, C vitamina in drugih zdravju koristnih snovi, ki imajo antimutageno in antikancerogeno aktivnost. Njegove glavne bioaktivne snovi so glukozinolati, polifenoli in minerali, kot je selen. Z dodajanjem selena bi brokoliju še dodatno povečali njegovo funkcionalno vrednost, ter na ta način vplivali na boljše zdravje ljudi.

V poskusu smo obravnavali 8 poskusnih skupin kalic brokolija (v dveh ali treh ponovitvah), zraslih iz semen, ki smo jih predhodno namakali v raztopini natrijevega selenita s koncentracijami 0, 5 in 10 mg Se/L. Vsako od skupin smo izpostavili različnim svetlobnim razmeram: tema, zmanjšano UV-B sevanje ter dnevna svetloba z UV-B sevanjem. Namen našega dela je bil ugotoviti, v kolikšni meri se z namakanjem semen v raztopini natrijevega selenita poveča vsebnost Se v kalicah brokolija in kako selen vpliva na njihovo rast. Zanima nas tudi vpliv UV-B sevanja na rast in razvoj kalic. Vsebnost selena smo ugotavliali s HG-AFS.

V naši raziskavi smo ugotovili, da selenit v majhni meri vpliva na maso kalic brokolija, saj so bile mase (g SS/100 kalic) kontrolnih skupin kalic večje od mas kalic, zraslih iz semen, ki smo jih predhodno namočili v raztopini s selenom. Najmanjšo povprečno maso (g SS/100 kalic), med s selenom obogatenimi rastlinami, so imele skupine kalic, ki smo jih kratkotrajno izpostavljali naravnemu UV-B sevanju, največjo pa kalice, ki so bile gojene v rastlinjaku. Kontrolne skupine kalic so vsebovale majhne vsebnosti selena. Pri kalicah, ki so zrasle iz semen predhodno namakanih v raztopini s selenom, se je vsebnost selena povečala. Opazili smo trend linearne naraščanja vsebnosti selena. Kalice brokolija obogatene s selenom bi bile primerne kot funkcionalna hrana, potrebno bi bilo le spremmljanje vsebnosti selena v rastlini.

## 7 VIRI

- Abdullah R., Faried A., Kobayashi K., Yamazaki C., Suradij E. W., Ito K., Suzuki K., Murakami M., Kuwano H., Koyama H. 2009. Selenium enrichment of broccoli sprout extract increases chemosensitivity and apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. *BMC Cancer*, 9: 414
- Abdullah R., Miyazaki K., Nakazawa M., Koyama H., 2005. Chemical forms of selenium for cancer prevention. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 19: 141-150
- Amweg E. L., Stuart D. L., Weston D. P. 2003. Comparative bioavailability of selenium to aquatic organisms after biological treatment of agricultural draining water. *Aquatic Toxicology*, 63: 13-25
- Arscott S., Goldman I., 2012. Biomass effects and selenium accumulation in sprouts of three vegetable species grown in selenium-enriched conditions. *Hortscience*, 47: 497–502
- Banuelos, G.S., Ajwa H.A., Wu L., Guo X., Akohoue S., Zambrzuski S. 1997. Selenium induced growth reduction in *Brassica* land races considered for phytoremediation. *Ecotoxicol. Environment*, 36: 282–287
- Bornman J. F., Teramura A. H. 1993. Effect of ultraviolet-B radiation on terrestrial plants. V: Environmental UV photobiology. Young A. R., Bjorn L. O., Moan J., Nultsch W. (eds.). New York, Plenum Press: 427-471
- Brenčič J., Lazarini F. 1995. Splošna in anorganska kemija. Ljubljana, DZS: 220 str.
- Breznik B., Germ M., Gaberščik A., Kreft I. 2005. Combined effects of elevated UV-B radiation and the addition of selenium on common (*Fagopyrum esculentum* Moench) and Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn). *Photosynthetica*, 43: 583-589
- Breznik B., Germ M., Kreft I., Gaberščik A. 2009. Crop responses to enhanced UV-B radiation. V: Environmental Science and Engineering. Chapter 12. Berlin, Springer-Verlag: 269-281
- Broadley, M. R., Alcock, J., Alford, J., Cartwright, P., Foot, I., Fairweather-Tait, S. J., Hart, D. J., Hurst, R., Knott, P. & McGrath, S. P. 2010. Selenium biofortification of highyielding winter wheat (*Triticum aestivum* L.) by liquid or granular Se fertilisation. *Plant and Soil*, 332, 1: 5-18
- Clark L. C., Combs G.F., Jr, Turnbull B.W. 1996. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial.

- Nutritional prevention of cancer study group. The Journal of the American Medical Association, 276: 1957-1963
- Combs G. F., Combs S. B. 1986. The role of selenium in nutrition. Orlando, San Diego, New York, Academic Press: 453 str.
- Combs Jr. G. F. 2001. Selenium in global food system. British Journal of Nutrition, 85: 517-547
- Cuderman P., Kreft I., Germ M., Kovačevič M., Stibilj V. 2008. Selenium species in selenium-enriched and drought-exposed potatoes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 65, 19: 9114-9120
- Cuderman, P.; Ožbolt L.; Kreft I.; Stibilj V. 2010. Extraction of Se species in buckwheat sprouts grown from seeds soaked in various Se solutions. Food Chemistry, 123: 941–948
- Černe M. 1998. Kapusnice. Ljubljana, Kmečki glas: 173 str.
- Černe M., Vrhovnik I. 1992. Vrtnine vir zdravja in naša hrana. Ljubljana, Kmečki glas: 219 str.
- Dedina J. 1995. Hydride generation atomic spectrometry. Chichester, New York, Brisbane, John Wiley & Sons: 526 str.
- Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids: a report of the panel of dietary antioxidants and related compounds, subcommittees on upper reference levels of nutrients and of interpretation and use of dietary reference intakes, and the standing committee on the scientific evaluation of dietary reference intakes, food and nutrition board. 2000. Washington, D. C., National Academy Press: 319 str.
- Dinkova-Kostova A.T., Jenkins S.N., Fahey J.W., Ye L., Wehage S.L., Liby K.T., Stephenson K.K., Wade K.L., Talalay P. 2006. Protection against UV-light-induced skin carcinogenesis in SKL-I high-risk mice by sulforaphane-containing broccoli sprout extracts. Cancer Letters, 240: 243-252
- Dumont, E.; Vanhaecke, F. and Cornelis R. 2006. Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 385: 1304-1323
- Elles M. P., Blaylock M. J., Huang J. W., Gussman C. D. 2000. Plants as a natural source of concentrated mineral nutritional supplements. Food Chemistry, 71: 181-188
- Ellis D. R., Salt D. E. 2003. Plants, selenium and human health. Current Opinion in Plant Biology, 6: 273-279

- Ellis D.R., Sors T.G., Bunk D.G., Albrecht C., Orser C., Lahner B., Wood K.V., Harris H.H., Pickering I.J., Salt D.E. 2004. Production of Se-methylselenocysteine in transgenic plants expressing selenocysteine methyltransferase. *BMC Plant Biology*, 4: 1
- Finley J. W., Davis C., Feng Y. 2000. Selenium from high selenium broccoli protects rats from colon cancer. *Journal of Nutrition*, 130: 2384-2389
- Foster L. H., Sumar S. 1997. Selenium in health and disease: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37, 3: 211-228
- Gaberščik A., Vončina M., Trošt Sedej 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 Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 66, 1: 30-36
- Germ M., Kreft I., Osvald J. 2005. Influence of UV-B exclusion of selenium treatment on photochemical efficacy of photosystem II, yield and respiratory potential in pumpkins (*Cucurbita pepo* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 43: 445-448
- Germ M., Kreft I., Stibilj V., Urbanc-Berčič O. 2007. Combined effect of selenium and drought on photosynthesis and mitochondrial respiration in potato. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45: 162-167
- Germ M., Stibilj V. 2007. Selenium and plants. *Acta Agricultura Slovenica*, 89, 1: 65-71
- Germ M., Stibilj V., Kreft I. 2007 (a). Metabolic importance of selenium for plants. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*, 1: 91-97
- Germ M., Stibilj V., Osvald J., Kreft I. 2007 (b). Effect of selenium foliar application on chicory (*Chicorium intybus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 795-798
- Germ M., Stibilj V., Kreft S., Gaberščik A., Pajk F., Kreft I. 2009. Selenium concentration in St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) herb after foliar spraying of young plants under different UV-B radiation levels. *Food Chemistry*, 117, 2: 204-206
- Herr I., Buchler M. W. 2010. Dietary constituents of broccoli and other cruciferous vegetables: Implications for prevention and therapy of cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 36: 377-383
- HoMin, K., MoonJung, L. & KuenWoo, P. 2000. Effects of selenium on growth, storage life, and internal quality of coriander (*Coriandrum sativum* L.) during storage. *Journal of the Korean Society for Horticultural Science*, 41, 5: 490-494

- Hsu F.-C., Wirtz M., Heppel S. C., Bogs J., Kramer U., Khan M. S., Bub A., Hell R., Rausch T. 2011. Generation od Se-fortified broccoli as functional food: impact of Se fertilization on S metabolism. *Plant, Cell & Environment*, 34: 192-207
- Hu, Q., Chen, L., Xu, J., Zhang, Y. & Pan, G. 2002. Determination of selenium concentration in rice and the effect of foliar application of Se enriched fertiliser or sodium selenite on the selenium content of rice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 8: 869-872
- Ip C., Dong Y., Ganther H.E. 2002. New concepts in selenium chemoprevention. *Cancer and Metastasis Reviews*, 21: 281-289
- Ip C., Ganther H. 1992. Comparison of selenium and sulfur analogs in cancer prevention. *Carcinogenesis*, 13: 1167-1170
- Kabata-Pendias A. 2004. Soil - plant transfer of trace elements - an environmental issue. *Geoderma*, 122: 143-149
- Keck A. S., Finely J. W., 2004. Cruciferous vegetables: cancer protective mechanism of glucosinolate hydrolysis products and selenium. *Integral Cancer Therapies*, 3: 5-12
- Kopsell D. A., Sams C. E., Barickman T. C., Deyton D. E. 2009. Selenization of basil and cilantro through foliar applications of selenate-selenium and selenite-selenium. *Hort Science*, 44: 438-442
- Kopsell D. A., William M. R. 1997. Selenate concentration affects selenium and sulfur uptake and accumulation by Granex 33 onions. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 122: 721-726
- 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
- Kris-Etherton P. M., Hacker K. D., Bonanome A., Coval S. M., Binkoski A. E., Hilpert K. F., Griell A. E., Etherton T. D. 2002. Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *American Journal of Medicine*, 113: 71-88
- Krystofova O., Adam V., Babula P., Zehnalek J., Beklova M., Havel L., Kizek R., 2010. Effects of various doses of selenite on stinging nettle (*Urtica dioica* L.). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7: 3804-3815
- 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

- Lenz, M., Lens, P. N. L. 2009. The essential toxin: The changing perception of selenium in environmental sciences. *Science of the Total Environment*, 407: 3620-3633
- Letavayova L., Vlačkova V., Brazmanova J. 2006. Selenium: From cancer prevention to DNA damage. *Review. Toxicology*, 227: 1-14
- Mahn A., Zmorano M., Barrientos H., Reyes A. 2012. Optimization of a process to obtain selenium-enriched freeze-dried broccoli with high antioxidant properties. *Food Science and Technology*, 47: 267-273
- Marscher H. 2002. Mineral nutrition of higher plants. 6th edition. Amsterdam, Boston, London, Academic Press: 887 str.
- Matich A.J., McKenzie M. J., Lill R. E., Brummell D. A., McGhie T. K., Chen R. K.-Y., Rowan D. D. 2012. Selenogluconolates and their metabolites produced in *Brassica* spp. fertilised with sodium selenate. *Phytochemistry*, 75: 140-152
- Matusheski N.V., Juvik J.A., Jeffery E.H. 2004. Heating decreases epithiospecifier protein activity and increased sulforaphane formation in broccoli. *Phytochemistry*, 65: 1273-1281
- Medina D., Thompson H., Ganther H., Ip C. 2001. Se-methylselenocysteine: a new compound for chemoprevention of breast cancer. *Nutrition and Cancer*, 40: 12-17
- Mihor J. 2011. Vpliv namakanja semen redkvice (*Raphanus sativus*) v raztopinah selenata in selenita na lastnosti kalic. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 40 str.
- Mukherjee S., Gangopadhyay H., Das D. K. 2008. Broccoli: a unique vegetable that protects mammalian hearts through the redox cycling of the thioredoxin superfamily. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 609-617
- Munday R., Mhawech-Fauceglia P., Munday C.M., Paonessa J.D., Tang L., Munday J.S., Lister C., Wilson P., Fahey J.W., Davis W. 2008. Inhibition of urinary bladder carcinogenesis by broccoli sprouts. *Cancer Research*, 68: 1593-1600
- Nakagawa K., Umeda T., Higuchi O., Suzuki T., Miyazawa T. 2006. Evaporative light-scattering analysis of sulforaphane in broccoli samples: Quality of broccoli products regarding sulphoraphane contents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 2479-2483
- Osvald J., Kogoj Osvald M. 2005. Vrtnarstvo: splošno vrtnarstvo in zelenjadarstvo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 287 str.
- Ožbolt L., Kreft S., Kreft I., Germ M., Stibilj V. 2008. Distribution of selenium and phenolics in buckwheat plants grown from seed soaked in Se solution and under different levels of UV-B radiation. *Food Chemistry*, 110: 691-696

- Pirc S., Šajn R. 1997. Vloga geokemije v ugotavljanju kemične obremenitve okolja. V: Projekt evropskega leta varstva narave 1995. Kemizacija okolja in življenja. Do katere meje? Ljubljana, Slovensko ekološko društvo: 165-185
- Pravilnik o krmnih dodatkih. 2005. Ur. I. RS št. 47/05
- Pyrzynska K. 2009. Selenium speciation in enriched vegetables. Food Chemistry, 114: 1183-1191
- Ramos S. J., Yuan Y., Faquin V., Guilherme L. R. G., Li L. 2011. Evaluation of genotypic variation of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) in response to selenium treatment. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59: 3657-3665
- Raspor P., Rogelj I. 2001. Funkcionalna hrana – definicije. V: Funkcionalna hrana. 21. Bitenčevi živalski dnevi 2001, Portorož, 8-9 nov. 2001. Žlender B., Gašperlin L. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 25-36
- Rani, N., Dhillon, K. & Dhillon, S. 2005. Critical levels of selenium in different crops grown in an alkaline silty loam soil treated with selenite-Se. Plant and Soil, 277: 367-374.
- Referenčne vrednosti za vnos hranil, DACH, 1. izdaja 2004. Ljubljana, Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije
- Reid M. E., Stratton M. S., Lillico A. J., Fakih M., Natarajan R., Clark L. C., Marshall J. R. 2004. A report of high-dose selenium supplementation: response and toxicities. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 18: 69-74
- Reilly C. 1996. Selenium in food and health. London, Weinheim, New York, Blackie Academic & Professional: 323 str.
- Reilly C. 1998. Selenium: A new entrant into the functional food arena. Trends in Food, Science & Technology, 9: 114-118
- Reilly C. 2002. Metal contamination of food. Its significance for food quality and human health. 3rd ed. Oxford, Blackwell Science: 214 str.
- Reilly, C. 2004. The nutritional trace metals. Blackwell Science: 123 str.
- Rotruck J. T., Pope A. L., Ganther H. E., Hafeman D. G., Swanson A. B., Hoekstra W. G. 1973. Selenium: biochemical role as a component of glutation peroxidase. Science, 179: 588-590
- Schwarz 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

Shamberger R. J. 1981. Selenium in the environment. Science of the Total Environment, 17: 59-74

Shankar S., Ganapathy S., Srivastava R. K. 2008. Sulforaphane enhances the therapeutic potential of TRAIL in prostate cancer orthotopic model through regulation of apoptosis, metastasis, and angiogenesis. Clinical Cancer Research, 14: 6855-6866

Shivapriya M., Katamballi N., Chidambara M., Bhimanagouda S. P. 2011. Crucial facts about health benefits of popular cruciferous vegetables. Journal of Functional Foods, 4: 94-106

Smrkolj P. 2003. Ugotavljanje selena in njegove porazdelitve v izbarnih živilih z metodo hidridne tehnike atomske fluorescenčne spektrometrije. Magistrsko delo. Ljubljana, oddelek za živilstvo: 97 str.

Smrkolj P., Stibilj V. 2004. Determination of selenium in vegetables by hydride generation atomic fluorescence spectrometry. Analytica Chemica Acta, 512: 11-17

Smrkolj P., Germ M., Kreft I., Stibilj V. 2006. Respiratory and Se compounds in pea (*Pisum sativum* L.) plants grown from Se-enriched seeds. Journal of Experimental Botany, 57, 1-4: 3595-3600

Smrkolj P., Osvald M., Osvald J., Stibilj V. 2007. Selenium uptake and species distribution in selenium-enriched bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds obtained by two different cultivations. European Food Research Technology A, 2, 225: 233-237

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., Kreft I., Germ M. 2006. Selenium species in buckwheat cultivated with foliar addition of Se(VI) and various levels of UV-B radiation. Food Chemistry, 96: 675-681

Soengas P., Cartea M. E., Francisco M., Sotelo T., Velasco P. 2012. Se insights into antioxidant activity of Brassica crops. Food Chemistry, 134: 725-733

Stibilj V., Kreft I., Smrkolj P., Osvald J. 2004. Enhanced selenium content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* L.) and pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds by foliar fertilisation. European Food Research Technology, 219: 142-144

Suarez D. L., Grieve C. M., Poss J. A. 2003. Irrigation method affects selenium accumulation in forage Brassica species. Journal of Plant Nutrition, 26: 191–201

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 Biochemistry*, 68: 193–199
- Štrekelj P., Stibilj V.: Gaberščik A., Germ M., Kreft I. 2012. Enhancement of selenium concentration in Tartary buckwheat sprouts by soaking seeds in Se solutions. (poslano v objavo, osebni vir, dec. 2012)
- Tang L., Zhang Y., Jobson H.E., Li J., Stephenson K.K., Wade K.L., Fahey J.W. 2006. Potent activation of mitochondria-mediated apoptosis and arrest in S and M phases of cancer cells by a broccoli sprouts extract. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5: 935-944
- 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
- Uden P. C., Boakye H. T., Kahakaohchi C., Tyson J. F. 2004. Selective detection and identification of Se containing compounds- review and recent developments. *Journal of Chromatography A*, 1050: 85-93
- Vandecasteele C., Block C. B. 1993. Modern methods for trace elements determination. Chichester, New York, John Wiley & Sons: 526 str.
- Vassileva E., Dočekalova H., Beaten H., Vanhentenrijk S., Hoenig M. 2001. Revisitation of mineralization modes for arsenic and selenium determination in environmental samples. *Talanta*, 54: 187-196
- Vogrinčič M., Cuderman P., Kreft I., Stibilj V. 2009. Selenium and its species distribution in above-ground plant parts of selenium enriched buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Analytical Science*, 25, 11: 1357-1363
- Wang L. I., Giovannucci E. L., Honter D., Nuberg D., Su L., Christiani D.C. 2004. Dietary intake of cruciferous vegetables, glutathione S-transferase (GST) polymorphism and lung cancer risk in a Caucasian population. *Cancer Causes & Control*, 15,10: 977-985
- Wagner P. D. 2004. Selenium and its relationship to cancer: an update. *British Journal of Nutrition*, 91: 11-28
- Whanger P. D. 2002. Selenocompounds in plants and animals and their biological significance. *Journal of the American College of Nutrition*, 21, 3: 223-232
- Wu L. 2004. Review of 15 years of research on ecotoxicology and remediation of land contaminated agricultural drainage sediment rich in selenium. Academic Press, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57: 257-269
- Zhang Y., Talalay P., Cho C.G., Posner G.H. 1992. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 6: 2399-2403

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Ivanu Kreftu in prof. dr. Vekoslavi Stibilj.