

# Biofortifikacija lisnatog povrća selenom uz primjenu nanobiotehnologije

---

**Ravnjak, Boris**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:*

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek /  
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:438254>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-11**



Sveučilište Josipa Jurja  
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet  
agrobiotehničkih  
znanosti Osijek**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Agrobiotechnical  
Sciences Osijek - Repository of the Faculty of  
Agrobiotechnical Sciences Osijek](#)



REPUBLIKA HRVATSKA  
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA  
U OSIJEKU  
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

**Boris Ravnjak, mag.ing.agr.**

**BIOFORTIFIKACIJA LISNATOG POVRĆA SELENOM UZ  
PRIMJENU NANOBIOTEHNOLOGIJE**

- Doktorska disertacija -

Osijek, 2023.

REPUBLIKA HRVATSKA  
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA  
U OSIJEKU  
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

**Boris Ravnjak, mag.ing.agr.**

**BIOFORTIFIKACIJA LISNATOG POVRĆA SELENOM UZ  
PRIMJENU NANOBIOTEHNOLOGIJE**

- Doktorska disertacija -

Osijek, 2023.

REPUBLIKA HRVATSKA  
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA  
U OSIJEKU  
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

**Boris Ravnjak, mag.ing.agr.**

**BIOFORTIFIKACIJA LISNATOG POVRĆA SELENOM UZ  
PRIMJENU NANOBIOTEHNOLOGIJE**

- Doktorska disertacija -

Mentor: izv.prof.dr.sc. Tomislav Vinković

**Povjerenstvo za ocjenu:**

- 1. prof.dr.sc. Zdenko Lončarić, redoviti profesor Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, predsjednik**
- 2. prof.dr.sc. Brigita Popović, izvanredni profesor Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, član**
- 3. izv.prof.dr.sc. Ivna Štolfa Čamagajevac, izvanredni profesor Odjela za biologiju Osijek, član**

Osijek, 2023.

REPUBLIKA HRVATSKA  
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA  
U OSIJEKU  
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

**Boris Ravnjak, mag.ing.agr.**

**BIOFORTIFIKACIJA LISNATOG POVRĆA SELENOM UZ  
PRIMJENU NANOBIOTEHNOLOGIJE**

- Doktorska disertacija -

Mentor: izv.prof.dr.sc. Tomislav Vinković

Javna obrana doktorske disertacije održana je 27. siječnja 2023. godine pred  
Povjerenstvom za obranu:

1. **prof.dr.sc. Zdenko Lončarić, redoviti profesor Fakulteta agrobiotehničkih znanosti  
Osijek, predsjednik**
2. **prof.dr.sc. Brigita Popović, izvanredni profesor Fakulteta agrobiotehničkih  
znanosti Osijek, član**
3. **izv.prof.dr.sc. Ivna Štolfa Čamagajevac, izvanredni profesor Odjela za biologiju  
Osijek, član**

Osijek, 2023.

*Veliku zahvalu dugujem svojem dragom profesoru i mentoru prof.dr.sc. Tomislavu Vinkoviću na svesrdnoj i nesebičnoj pomoći tijekom vođenja i pisanja doktorske disertacije.*

*Hvala vam na svojoj podršci, ljubaznosti, prenesenom znanju i pomoći kada je to bilo najpotrebnije.*

*Također, veliku zahvalu dugujem prof.dr.sc. Zdenku Lončariću na pomoći prilikom osmišljavanja i realizacije istraživanja, na svim savjetima i sugestijama od samog početka istraživanja.*

*Zahvaljujem i prof.dr.sc. Brigiti Popović na suradnji, svim dobronamjernim primjedbama, savjetima i sugestijama.*

*Zahvalu upućujem i izv.prof.dr.sc. Ivni Štolfa Čamagajevac na pomoći u laboratorijskim analizama, konstruktivnim savjetima te nesebičnom odvajanju svog vremena kad god je to bilo potrebno.*

*Mojoj obitelji, riječi nisu dovoljne da izrazim koliko ste mi bili važni u ovom procesu. Vaša ljubav, podrška i razumijevanje bili su neumorni izvor snage tijekom svih izazova koje sam susreo. Hvala vam što ste mi pružili poticajnu okolinu u kojoj sam mogao razvijati svoje ideje i ambicije.*

*Također želim zahvaliti svim kolegama, prijateljima i suradnicima koji su me podržali tijekom mog istraživanja. Vaše ideje, konstruktivne rasprave i podrška značili su mi mnogo.*

*Boris Ravnjak*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Doktorska disertacija

Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Poslijediplomski sveučilišni (doktorski) studij: Poljoprivredne znanosti

Smjer: Agrokemija

UDK: 606:631.528+66.094.529:635.1/.8

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Poljoprivreda

Grana: Bilinogojstvo

**Biofortifikacija lisnatog povrća selenom uz primjenu nanobiotehnologije**

**Boris Ravnjak, mag.ing.agr.**

Disertacija je izrađena na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

**Mentor: izv.prof.dr.sc. Tomislav Vinković**

Doktorska disertacija temelji se na istraživanju optimizacije modela biofortifikacije špinata (*Spinacia oleracea* L.) i rukole (*Eruca sativa* Mill.) selenom - konvencionalni pristup uz primjenu selenata te nanobiotehnološki pristup uz primjenu SeNPs. Ovo istraživanje imalo je za cilj optimizirati proizvodnju lisnatog povrća u sustavu plutajućeg hidropona, odabrati optimalni model biofortifikacije u ovisnosti o obliku i koncentraciji selena za više vrsta lisnatog povrća u cilju zadovoljavanja preporučenog dnevnog unosa selena u ljudski organizam te utvrđivanje učinka primijenjenih modela biofortifikacije na rast i razvoj, mineralni sastav te antioksidativna svojstva ispitivanih vrsta. Istraživanje je provedeno u grijanom plasteniku s automatskom kontrolom temperature i prozračivanja u sustavu plutajućeg hidropona tijekom 2019. i 2020. godine. Statističkom obradom podataka utvrđeno je da biofortifikacija s različitim oblicima Se značajno utječe na broj listova, dužinu korijena te svježiu i suhu masu kod obje ispitivane vrste. Biofortifikacija različitim oblicima Se je utjecala i na promjene sadržaja makro i mikroelemenata kod ispitivanih vrsta. Kod sadržaja Se je utvrđen linearan trend povećavanja u korijenu i listova ispitivanih vrsta kod svih tretmana biofortifikacije. U korijenu špinata i rukole kod SeNPs tretmana utvrđen je značajno veći sadržaj Se. Suprotno tome, značajno najveći sadržaj Se u listovima špinata i rukole je utvrđen kod tretmana selenatom. Tretmani biofortifikacije su utjecali na povećanje koncentracija klorofila a (Chl a), klorofila b (Chl b) i karotenoida (Car) kod obje ispitivane vrste. Također, biofortifikacija s različitim oblicima Se je značajno utjecala i na pokazatelje oksidativnog stresa te enzimatske i neenzimatske pokazatelje antioksidativnog odgovora u ovisnosti o biljnoj vrsti te obliku i koncentraciji selena. Biofortifikacija selenom je utjecala na povećanje koncentracije ukupnih fenola (PHE), ukupnog, reduciranog i oksidiranog glutationa (GSH) i askorbinske kiseline (AA) kod ispitivanih vrsta što se

odrazilo i na povećanje ukupne antioksidacijske aktivnosti. Općenito, tretmani biofortifikacije su značajno utjecali na smanjenje razine lipidne peroksidacije (LPO) kod obje ispitivane vrste. Također, utvrđen je i utjecaj povećanja aktivnosti enzima askorbat-peroksidaze (APX), katalaze (CAT), superoksid-dismutaze (SOD), glutation-reduktaze (GR) i glutation-s-transferaze (GST) kod tretmana biofortifikacije među ispitivanim vrstama, dok je utjecaj na povećanje aktivnosti kod enzima glutation-peroksidaze (GPX) izostao.

**Broj stranica:** 176

**Broj slika i grafikona:** 70

**Broj tablica:** 32

**Broj literaturnih navoda:** 220

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** Biofortifikacija, selen, SeNPs, lisnato povrće

**Datum obrane:** 27.01.2023.

**Povjerenstvo za obranu:**

1. prof.dr.sc. Zdenko Lončarić, redoviti profesor Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, predsjednik
2. prof.dr.sc. Brigita Popović, izvanredni profesor Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, član
3. izv.prof.dr.sc. Ivna Štolfa Čamagajevac, izvanredni profesor Odjela za biologiju Osijek, Član

**Disertacija je pohranjena u:**

Nacionalna i sveučilišna knjižnica u Zagrebu, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Sveučilište u Zagrebu, Sveučilište u Rijeci, Sveučilište u Splitu



## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

**University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek**

**PhD thesis**

**Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek**

**Postgraduate university study: Agricultural sciences**

**Course: Agrochemistry**

**UDK: 606:631.528+66.094.529:635.1/.8**

**Scientific Area: Biotechnical Sciences**

**Scientific Field: Agriculture**

**Branch: Plant production**

**Biofortification of leafy vegetables with selenium using nanobiotechnology**

**Boris Ravnjak, M. Eng. Sc., Agriculture**

**Thesis performed at Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek**

**Supervisor: PhD Tomislav Vinković, associate professor**

The dissertation is based on research on the optimization of the biofortification model of spinach (*Spinacia oleracea* L.) and arugula (*Eruca sativa* Mill.) with selenium - a conventional approach with the use of selenate and a nanobiotechnological approach with the use of selenium nanoparticles. The aim of this research was to optimize the production of leafy vegetables in a floating hydroponic system, to select the optimal biofortification model depending on the form and concentration of selenium for several types of leafy vegetables in order to meet the recommended daily intake of selenium in the human body, and to determine the effect of the applied biofortification models on growth and development, mineral composition and antioxidant properties of the tested species. The research was conducted in a heated greenhouse with automatic temperature and ventilation control in a floating hydroponic system during 2019 and 2020. Statistical processing of the data revealed that biofortification with different forms of Se significantly affects the number of leaves, root length and fresh and dry weight in both tested species. Biofortification with different forms of Se also influenced changes in the content of macro and microelements in the examined species. In the case of Se content, a linear trend of increasing Se content in the roots and leaves of the examined species was determined in all biofortification treatments. A significantly higher Se content was found in the roots of spinach and arugula with SeNPs treatment. On the contrary, the significantly highest content of Se in spinach and rocket leaves was found in the treatment with selenate. Biofortification treatments increased the concentrations of chlorophyll a (Chl a), chlorophyll b (Chl b) and carotenoids (Car) in both tested species. Also, biofortification with different forms of Se significantly influenced both enzymatic and non-enzymatic indicators of oxidative stress depending on the plant species and the form and concentration of selenium. Selenium biofortification increased the concentration of total phenols (PHE), glutation (GSH) and ascorbic acid (AA) in the examined

species, which was reflected in the increase of total antioxidant activity (UAA). In general, biofortification treatments had a significant effect on the reduction of lipid peroxidation (LPO) levels in both tested species. Also, the effect of increasing the activity of the enzymes ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase (GR) and glutathione S-transferase (GST) during the biofortification treatment among the examined species was determined, while the effect on increasing the activity of the enzyme glutathione peroxidase (GPX) was absent.

**Number of pages:** 176

**Number of figures:** 70

**Number of tables:** 32

**Number of references:** 220

**Original in:** croatian

**Key words:** Biofortification, selenium, SeNPs, leafy vegetables

**Date of the thesis defense:** 27.01.2023.

Reviewers:

1. PhD Zdenko Lončarić, full professor at the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek
2. PhD Brigita Popović, full professor at the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek
3. PhD Ivna Štolfa Čamagajevac, associate professor at Department of Biology Osijek

**Thesis deposited in:**

National and University Library, University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek, University of Zagreb; University of Rijeka; University of Split

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Pregled literature.....	2
1.1.1. Selen i njegovi oblici u okolišu .....	2
1.1.2. Unos i akumulacija selena u biljkama .....	3
1.1.3. Reaktivne kisikove tvari i komponente antioksidacijskog odgovora biljke ....	6
1.1.4. Biofortifikacija selenom .....	9
1.1.5. Nanobiotehnologija .....	14
1.1.6. Utjecaj biorasploživosti selena na ljudsko zdravlje.....	17
1.2. Cilj istraživanja.....	19
2. MATERIJAL I METODE RADA.....	21
2.1. Lokalitet .....	21
2.2. Materijal i opis pokusa .....	21
2.2.1. Biofortifikacijski pokus tijekom 2019. godine .....	24
2.2.2. Biofortifikacijski pokus tijekom 2020. godine .....	26
2.3. Analize vegetativnih pokazatelja razvoja biljaka .....	28
2.4. Kemijske analize biljne tvari .....	28
2.4.1. Priprema uzoraka biljnog materijala.....	28
2.4.2. Određivanje koncentracije N.....	28
2.4.3. Određivanje koncentracije Ca, Mg, K, P, S, Cu, Fe, Mn i Zn.....	29
2.4.4. Određivanje koncentracije selena.....	30
2.5. Određivanje fiziološko-biokemijskih pokazatelja u listovima špinata i rukole .....	30
2.5.1. Određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata .....	30
2.5.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola .....	30
2.5.3. Određivanje koncentracije askorbinske kiseline (AA).....	31
2.5.4. Određivanje ukupne antioksidacijske aktivnosti .....	31

2.5.5.	Određivanje ukupnog, reduciranog i oksidiranog glutationa .....	32
2.5.6.	Određivanje produkata lipidne peroksidacije (LPO).....	32
2.5.7.	Mjerenje aktivnosti enzima askorbat-peroksidaze (APX).....	33
2.5.8.	Mjerenje aktivnosti enzima katalaze (CAT).....	33
2.5.9.	Mjerenje aktivnosti enzima glutation-reduktaze (GR) .....	33
2.5.10.	Mjerenje aktivnosti enzima glutation-s-transferaze (GST).....	34
2.5.11.	Mjerenje aktivnosti enzima glutation-peroksidaze (GPX) .....	34
2.5.12.	Mjerenje aktivnosti enzima superoksida-dismutaze (SOD) .....	35
2.6.	Sinteza selenovih nanočestica (SeNPs) .....	35
2.6.1.	Sinteza selenovih nanočestica stabiliziranih s polivinilpirolidonom (PVP)..	36
2.6.2.	Sinteza selenovih nanočestica stabiliziranih s polisorbitom (Tween 20) .....	37
2.6.3.	Sinteza selenovih nanočestica stabiliziranih s huminskom kiselinom .....	37
2.6.4.	Karakterizacija i vizualizacija selenovih nanočestica .....	38
2.7.	Statistička obrada podataka .....	38
3.	REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....	40
3.1.	Fizikalno-kemijska svojstva selenovih nanočestica (SeNPs) .....	40
3.2.	Biofortifikacijski pokus tijekom 2019. – špinat.....	42
3.2.1.	Morfološki pokazatelji rasta i razvoja špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs .....	42
3.2.2.	Sadržaj makroelemenata u korijenu špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs .....	44
3.2.3.	Sadržaj makroelemenata u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs .....	45
3.2.4.	Sadržaj mikroelemenata u korijenu špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs .....	46
3.2.5.	Sadržaj mikroelemenata u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs .....	47

3.2.6.	Sadržaj Se u korijenu špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs	48
3.2.7.	Sadržaj Se u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs	49
3.2.8.	Koncentracije fotosintetskih pigmenata u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs	51
3.2.9.	Ukupan sadržaj fenolnih spojeva (PHE) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs	52
3.2.10.	Koncentracija askorbinske kiseline (AA) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs	52
3.2.11.	Ukupna antioksidativna aktivnost (UAA) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs	53
3.2.12.	Intenzitet lipidne peroksidacije (LPO) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs	54
3.2.13.	Koncentracija reduciranog glutationa (GSH) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs	55
3.2.14.	Aktivnost enzima askorbat peroksidaze (APX) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs	56
3.2.15.	Aktivnost enzima katalaze (CAT) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs	57
3.2.16.	Aktivnost enzima glutation-reduktaze (GR) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs	58
3.2.17.	Aktivnost enzima glutation-S-transferaze (GST) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs	59
3.2.18.	Aktivnost enzima glutation-peroksidaze (GPX) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs	60
3.2.19.	Aktivnost enzima superoksid-dismutaze (SOD) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs	61
3.3.	Biofortifikacijski pokus tijekom 2019. – rukola	62

3.3.1. Morfološki pokazatelji rasta i razvoja rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs .....	62
3.3.2. Sadržaj makroelemenata u korijenu rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs .....	64
3.3.3. Sadržaj makroelemenata u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs .....	65
3.3.4. Sadržaj mikroelemenata u korijenu rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs .....	66
3.3.5. Sadržaj mikroelemenata u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs .....	67
3.3.6. Sadržaj Se u korijenu rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs	69
3.3.7. Sadržaj Se u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs	70
3.3.8. Koncentracije fotosintetskih pigmenta u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs .....	71
3.3.9. Ukupan sadržaj fenolnih spojeva (PHE) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs .....	72
3.3.10. Koncentracija askorbinske kiseline (AA) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs .....	73
3.3.11. Ukupna antioksidativna aktivnost (UAA) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs .....	74
3.3.12. Intenzitet lipidne peroksidacije (LPO) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs .....	75
3.3.13. Koncentracija reduciranog glutation (GSH) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs.....	76
3.3.14. Aktivnost enzima askorbat-peroksidaze (APX) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs.....	77
3.3.15. Aktivnost enzima katalaze (CAT) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs .....	78

3.3.16.	Aktivnost enzima glutation-reduktaze (GR) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs.....	79
3.3.17.	Aktivnost enzima glutation-S-transferaze (GST) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs.....	80
3.3.18.	Aktivnost enzima glutation-peroksidaze (GPX) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs.....	81
3.3.19.	Aktivnost enzima superoksid-dismutaze (SOD) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs.....	82
3.4.	Biofortifikacijski pokus tijekom 2020. - špinat .....	83
3.4.1.	Morfološki pokazatelji rasta i razvoja špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs .....	84
3.4.2.	Sadržaj makroelemenata u korijenu špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs .....	85
3.4.3.	Sadržaj makroelemenata u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs .....	86
3.4.4.	Sadržaj mikroelemenata u korijenu špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs .....	88
3.4.5.	Sadržaj mikroelemenata u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs .....	89
3.4.6.	Sadržaj Se u korijenu špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs	89
3.4.7.	Sadržaj Se u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs	90
3.4.8.	Koncentracije fotosintetskih pigmenata kod špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs .....	92
3.4.9.	Ukupan sadržaj fenolnih spojeva (PHE) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs .....	92
3.4.10.	Koncentracija askorbinske kiseline (AA) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs .....	93

3.4.11.	Koncentracija ukupne antioksidativne aktivnosti (UAA) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs.....	94
3.4.12.	Intenzitet lipidne peroksidacije (LPO) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs .....	95
3.4.13.	Koncentracija reduciranog glutationa (GSH) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs.....	96
3.4.14.	Aktivnost enzima askorbat-peroksidaze (APX) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs.....	97
3.4.15.	Aktivnost enzima katalaze (CAT) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs .....	98
3.4.16.	Aktivnost enzima glutation-reduktaze (GR) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs.....	99
3.4.17.	Aktivnost enzima glutation-S-transferaze (GST) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs.....	100
3.4.18.	Aktivnost enzima glutation-peroksidaze(GPX) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs.....	101
3.4.19.	Aktivnost enzima superoksid-dismutaze (SOD) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs.....	102
3.5.	Biofortifikacijski pokus tijekom 2020. - rukola.....	103
3.5.1.	Morfološki pokazatelji rasta i razvoja rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs .....	103
3.5.2.	Sadržaj makroelemenata u korijenu rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs .....	105
3.5.3.	Sadržaj makroelemenata u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs .....	106
3.5.4.	Sadržaj mikroelemenata u korijenu rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs .....	107
3.5.5.	Sadržaj mikroelemenata u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs .....	108



3.5.6.	Sadržaj Se u korijenu rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs	109
3.5.7.	Sadržaj Se u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs	110
3.5.8.	Koncentracije fotosintetskih pigmenata u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs	112
3.5.9.	Ukupan sadržaj fenolnih spojeva (PHE) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs	113
3.5.10.	Koncentracija askorbinske kiseline (AA) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs	114
3.5.11.	Koncentracija ukupne antioksidativne aktivnosti (UAA) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs	115
3.5.12.	Intenzitet lipidne peroksidacije (LPO) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs	116
3.5.13.	Koncentracije reduciranog glutationa (GSH) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs	117
3.5.14.	Aktivnost enzima askorbat-peroksidaze (APX) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs	118
3.5.15.	Aktivnost enzima katalaze (CAT) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs	119
3.5.16.	Aktivnost enzima glutation-reduktaze (GR) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs	120
3.5.17.	Aktivnost enzima glutation-S-transferaze (GST) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs	121
3.5.18.	Aktivnost enzima glutation-peroksidaze (GPX) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs	122
3.5.19.	Aktivnost enzima superoksid-dismutaze (SOD) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs	123
4.	RASPRAVA	125
5.	ZAKLJUČAK	146

6. LITERATURA .....	148
7. SAŽETAK .....	168
8. SUMMARY .....	171

## 1. UVOD

Selen (Se) je esencijalan element neophodan za ljudsko zdravlje te koristan za više biljke. Međutim, granica između nedostatka selena i toksičnosti iznimno je uska za većinu organizama. Za ljude, 55-70 µg selena je preporučeni dnevni unos. Unos selena ispod 40 µg/dan dovodi do nedostatka Se u ljudskom organizmu što uzrokuje niz zdravstvenih problema kao što su kardiovaskularne bolesti, oštećenje stanica, smanjena funkcija štitnjače i imunološkog sustava te povećan rizik od raznih karcinoma (Dall'Acqua i sur., 2019.). Zastupljenost selena u tlima nije dovoljna u većini područja diljem svijeta kako bi se zadovoljio optimalan sadržaj selena u hrani te se procjenjuje da milijarde ljudi pate od nedostatka selena. Poljoprivredni proizvodi obogaćeni ili biofortificirani selenom smatraju se dobrom strategijom povećanja sadržaja selena u ljudskom organizmu (Liu i sur., 2021.). Danas, konzumacija svježeg lisnatog povrća je u velikom porastu zbog iznimnih nutritivnih svojstava ove vrste hrane. Stoga, biofortificirano mlado lisnato povrće (*engl. baby leaf vegetables*) selenom, a koje ujedno obiluje raznim bioaktivnim komponentama smatra se fiziološki funkcionalnom hranom (Malorgio i sur., 2009.). Biofortifikacija je jedan od najpraktičnijih i najučinkovitijih načina kontrole i poboljšanja prinosa te nutritivne kvalitete usjeva za ljudsku prehranu (Kılıç i Duyar, 2016.), a agronomska biofortifikacija se vrlo lako primjenjuje kod lisnatog povrća s obzirom na njihov intenzitet rasta i razvoja te usvajanje elemenata ishrane. Također, lisnato povrće se vrlo lako uzgaja u sustavu plutajućeg hidropona što još dodatno olakšava kontroliranu biofortifikaciju. Biofortifikacija selenom se uobičajeno obavlja dodatkom selena u obliku selenata ili selenita u tlo, hranjivu otopinu ili neki drugi medij rasta. Međutim, razvojem nanotehnologije selen je postao dostupan u nano obliku te je postao zanimljiv u mnogim znanstvenim područjima. Općenito, nanočestice su definirane kao male čestice veličine između 1 i 100 nm koje pokazuju specifična fizikalna i kemijska svojstva. Stoga, nanočestice imaju jedinstvena svojstva, uključujući oblik, veličinu, veliku reaktivnu površinu, poroznost, zeta potencijal i dr. (Chugh i sur., 2021.). Nanočestice selena (SeNPs) su privukle interes mnogih istraživača zbog svoje biokompatibilnosti, biorasploživosti te niske toksičnosti. SeNPs se mogu sintetizirati fizikalnim, kemijskim i biološkim metodama (Bisht i sur., 2022.) te su stoga vrlo zanimljive u različitim primjenama i tehnologijama proizvodnje hrane, dodatka prehrani i lijekova. Međutim, utjecaj selena te posebno SeNPs na žive organizme još je uvijek tema mnogih istraživanja posebno zbog ograničenih informacija o rizicima rukovanja i primjene

nanomaterijala kao što su SeNPs. S druge strane, nanotehnologija i sinteza SeNPs određenih svojstava može biti rješenje problema usvajanja te uspješnije biofortifikacije selenom određenih biljnih vrsta.

## 1.1. Pregled literature

### 1.1.1. Selen i njegovi oblici u okolišu

Selen je esencijalni mikroelement vrlo važan kod ishrane ljudi i životinja te se često koristi kao dodatak prehrani, osobito zbog svoje zaštitne uloge u imunološkom odgovoru organizma i borbi protiv tumora (Parnham i Graf, 1991.). Prvi ga je otkrio švedski znanstvenik Jöns Jakob Berzelius 1817. godine tijekom proizvodnje sumporne kiseline (Bano i sur., 2016.). Tridesetih godina prošlog stoljeća smatralo se da je selen otrovan teški metal koji u većim dozama dovodi do smrti živih organizama (Vernie, 1984.). Bitna uloga selena prvi put je objavljena 1957. godine, kada su pokusi na štakorima dokazali da dodatak selena u hrani sprječava nekrozu jetre (Schwarz i Foltz, 1957.). Zahvaljujući tim istraživanjima, selen je uvršten u skupinu elemenata u tragovima čiji nedostatak u prehrani može uzrokovati brojne bolesti (Kieliszek i Błażej, 2016.).

Selen se nalazi u skupini 16 periodnog sustava, koja također uključuje kisik, sumpor, polonij, telurij i livermorij. Selen je čest element u prirodi, može se naći u atmosferi, litosferi, biosferi i hidrosferi Zemlje (Reich i Hondal, 2016.). Ovaj element koji kruži u okolišu pokreće proces trošenja u stijenama te se emitira u atmosferu kroz vulkanske plinove. Selen se u okolišu nalazi u elementarnom stanju ( $\text{Se}^0$ ), u obliku selenida ( $\text{Se}^{2-}$ ), selenata ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) ili selenita ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ) (Kieliszek, 2019.). Selenati i seleniti su topivi u vodi pa se Se najčešće javlja u tim oblicima. Osim anorganskih, postoji mnogo oblika organskih spojeva u kojima je selen prisutan kao selenid, a uglavnom su to selenoproteini ili njihovi derivati, od kojih su selenocistein (SeCys) i selenometionin (SeMet) najznačajniji (Tóth i Csapó 2018.).

U cijelom svijetu prosječna koncentracija selena u tlima iznosi 0,4 mg/kg. Koncentracija selena u tlu ovisi o vrsti tla, organskoj tvari te oborinama (Sors i sur., 2005.). Prema Swaine (1955.), sadržaj selena u većini tala varira od 0.1 do 2  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Prema Berrow i Ure (1998.), koncentracije selena u tlu se kreću u rasponu manje od 0,1 do preko 100 mg  $\text{kg}^{-1}$  tla.

Hrvatska pripada regijama s nedostatkom selena u tlu. Gavrilović i Matešić (1986.) navode da je koncentracija selena u poljoprivrednim tlima u Požeškoj kotlini u rasponu od 20 do 48

$\mu\text{g kg}^{-1}$ . Antunović i sur. (2005.) navode da prosječna vrijednost selena u tlima s područja Međimurja, Podravine i Slavonije iznosi  $0,180 \text{ mg kg}^{-1}$  tla.

Oko 80 % ukupnih svjetskih rezervi selena nalazi se u Peruu, Kini, Čileu, Sjedinjenim Američkim Državama, Kanadi, Zambiji, Filipinima, Zairu, Australiji i Novoj Gvineji. Planinske zemlje kao što su Finska, Švedska i Škotska općenito imaju manjak sadržaja selena u tlu. Zemlje kao što su Velika Britanija, Francuska, Indija, Belgija, Brazil, Srbija, Slovenija, Španjolska, Portugal, Turska, Poljska, Njemačka, Danska, Slovačka, Austrija, Irska, Grčka, Nizozemska, Italija, Kina, Nepal, Saudijska Arabija, Češka, Hrvatska, Egipat, Burundi i Nova Gvineja spadaju u područja s nedostatkom selena. Prema WHO-u razina selena u javnim vodoopskrbama ne bi trebala porasti više od  $10 \mu\text{g/L}$ . U podzemnim vodama koncentracija selena raste zbog prekomjerne upotrebe gnojiva koja sadrže taj element te je dosegla procijenjenu koncentraciju od  $0,12 \mu\text{g/L}$  u Belgiji,  $2,4\text{-}40 \mu\text{g/L}$  u Francuskoj i  $341 \mu\text{g/L}$  u Punjabu (Gupta i Gupta, 2017.). U atmosferi je selen uglavnom prisutan kao hlapljivi organski spoj, tj. dimetilselenid (DMSe), dimetildiselenid (DMDSe), metanselenol i hlapljivi anorganski spoj ( $\text{SeO}_2$ ). Sadržaj selena u zraku općenito je nizak u usporedbi s tlom i vodom i kreće se između  $1$  i  $10 \text{ ng/m}^3$  (Mehdi i sur., 2013.).

Selen se u prehrambenim proizvodima najčešće javlja u kombinaciji s proteinima, pa se proizvodi s visokim udjelom bjelančevina obično karakteriziraju višim udjelom selena. Ovi proizvodi uključuju meso, ribu i žitarice. U skupini mesnih proizvoda sadržaj selena kreće se između  $0,08$  i  $0,73 \mu\text{g/g}$ . RIBE morskog ( $0,11\text{-}0,97 \mu\text{g/g}$ ) i slatkovodnog ( $0,18\text{-}0,68 \mu\text{g/g}$ ) podrijetla bogate su selenom. Razina selena u proizvodima od žitarica kreće se od  $0,01$  do  $0,55 \mu\text{g/g}$ . Voće i povrće sadrže malu količinu selena, u rasponu od  $0,001$  do  $0,022 \mu\text{g/g}$ . To je uzrokovano niskim sadržajem proteina i visokim udjelom vode. Međutim, iznimno visoke razine selena nalaze se u brazilskim orašastim plodovima i gljivama (Kieliszek, 2019.).

### *1.1.2. Unos i akumulacija selena u biljkama*

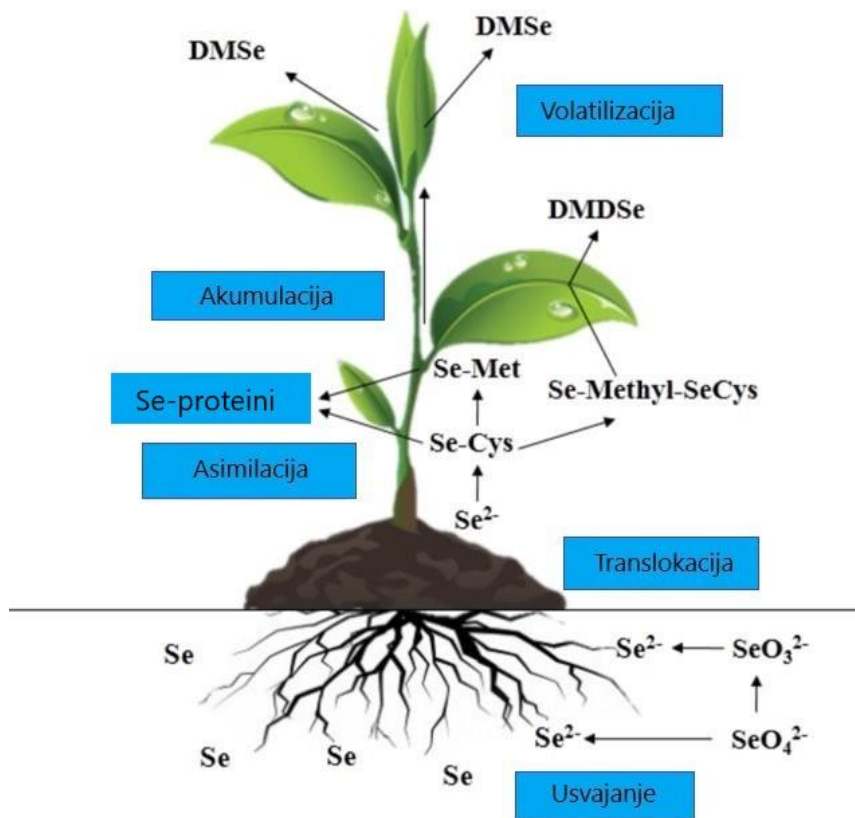
Sadržaj selena u biljkama snažno je povezan sa sadržajem biorasploživog selena u tlu. Biljke apsorbiraju selen u obliku selenata ( $\text{SeO}_2^{-4}$ ) i selenita ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ) te u organskom obliku kao što su selenocistein (SeCys) i selenometionin (SeMet). Svi ti različiti oblici selena razlikuju se s obzirom na mogućnost njihove apsorpcije i mobilnost unutar biljke (Shahid i sur., 2018.). Selenat ( $\text{SeO}_2^{-4}$ ) je najrašireniji oblik biorasploživog selena u poljoprivrednim

tlima i topljivi je u vodi od selenita. U alkalnim tlima, selen se nalazi u obliku selenata, dok u kiselim tlima prevladava selenit. Selen i sumpor su elementi skupine 16 u periodnom sustavu, što znači da imaju slične ionske radijuse, kovalentne polumjere te kemijska svojstva (Gupta i Gupta, 2017.). Sumpor i selen se natječu za enzimski sustav uključeni u unos i translokaciju jer koriste iste puteve asimilacije, što može biti posljedica sličnosti njihovih kemijskih svojstava (Pilon-Smith i sur., 2009; Zayed i sur., 1998.). Na sadržaj sumpora u biljkama utječu različite koncentracije te različiti oblici selena (Boldrin i sur., 2016.). Lara i sur. (2019.) tvrde da povećanje doza selena ne utječe na sadržaj sumpora kod biljaka. Pojedina istraživanja su utvrdila suprotno (Boldrin i sur., 2013; Yang i sur., 2015; Boldrin i sur., 2018; Mackowiak i Amacher, 2008.). Selenat i selenit se razlikuju po svojoj mobilnosti i apsorpciji unutar biljke. Utvrđeno je da se selenit prenosi mehanizmom transporta fosfata (Li i sur., 2008.) ili silicijevim prijenosnikom (Zhao i sur., 2010.), dok se selenat transportira sulfatnim transporterima (Zhang i sur., 2003; Schiavon i sur., 2015.). Korijenje različitih biljnih vrsta imaju različite transportere za apsorpciju selenata ( $\text{SeO}_2^{-4}$ ). Trenutačno ni u jednom organizmu nije pronađen nikakav specifičan transporter, ali rezultati bioinformatičke analize sugeriraju da specifični selenatovi ( $\text{SeO}_2^{-4}$ ) transporteri mogu postojati u biljkama koje nazivamo hiperakumulatorima selena. Međutim, do danas nije identificirana ni jedna biljna vrsta koja posjeduje specifični transportni put selenata ( $\text{SeO}_2^{-4}$ ) (Zhou i sur., 2020.).

Osim razlike u mehanizmu asimilacije, selenat i selenit se razlikuju i po pokretljivosti unutar biljaka. Selenat se lako prenosi od korijena do izdanka, dok selenit ima tendenciju akumulacije u korijenu (Li i sur., 2008; Souza i sur., 1998.). Međutim, akumulacija selena u biljkama ovisi o kiselosti i redoks statusu tla, koncentraciji i specijaciji oblika selena ili koncentraciji kompetitivnih aniona (kao npr.  $\text{SO}_4^{2-}$ ) (Mikkelsen i sur., 1989.). Štoviše, unos selena u biljku može biti uvelike inhibiran istovremenom pojavom visokog sadržaja organske tvari u tlu, željezovog hidroksida i glinenih minerala, od kojih svi mogu adsorbirati ili vezati selen (Rayman, 2008.).

Prvi korak u asimilaciji selena je pretvorba selenata u selenit. Zahtijeva uzastopno djelovanje dvaju enzima poznatih kao ATP-sulfurilaza (APS) i APS-reduktaza (APR). Selenit se zatim pretvara u selenid pomoću enzima sulfid-reduktaze, a selenid se pretvara u SeCys te se tada može pretvoriti u elementarni selen u prisutnosti enzima SeCys-liaze (SL) ili se može metilirati u metil-SeCys (Me-SeCys) ili se pak može pretvoriti u selenometionin (SeMet) aktivnošću niza enzima. SeMet se može upotrijebiti za stvaranje selenoproteina ili

metilirati prilikom čega nastaje metil-SeMet (Me-SeMet). Me-SeCys ili Me-SeMet mogu dalje ispariti u atmosferu kao netoksični dimetilselenid (DMSe) u biljkama neakumulatorima ili dimetildiselenid (DMDSe) u biljkama hiperakumulatorima (Gupta i Gupta, 2017.).



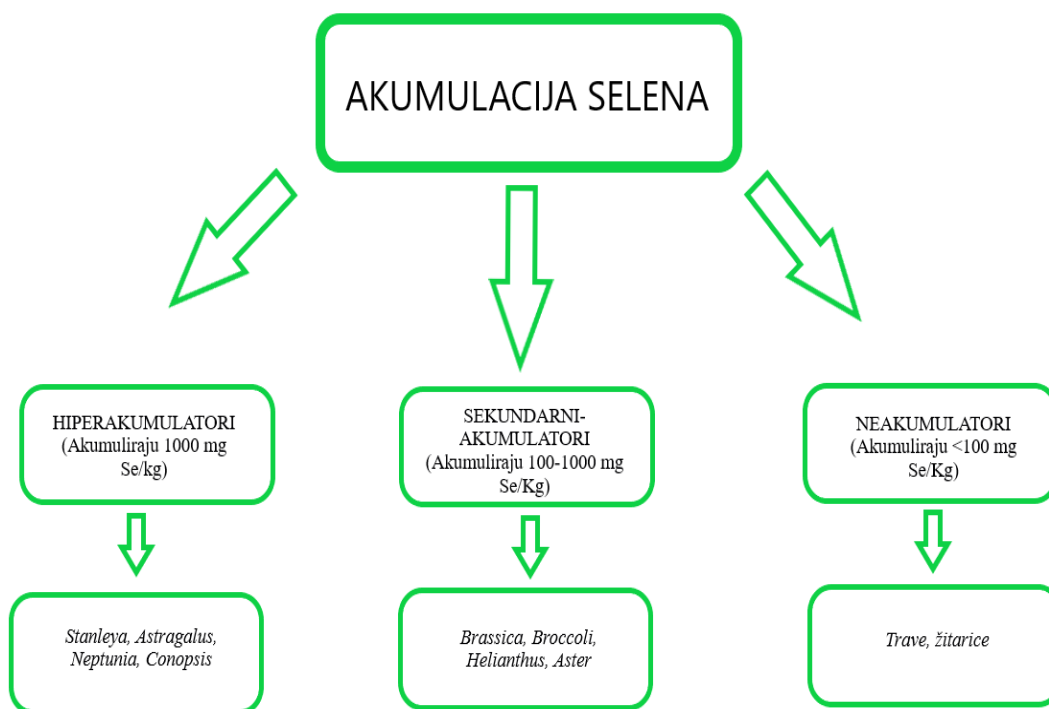
**Slika 1.** Shematski prikaz metabolizma selena u biljkama. Preuzeto i modificirano prema Chomchan i sur. (2017.).

Po pitanju usvajanja selena, kako je već prije spomenuto, biljke su podijeljene na hiperakumulatore, sekundarne-akumulatore i neakumulatore ovisno o akumulaciji selena u njihovim stanicama. Baker i Brooks (1989.) hiperakumulaciju smatraju kao sposobnost određenih biljnih vrsta da akumuliraju visoke koncentracije metala i elemenata u tragovima. Hiperakumulatori akumuliraju veće količine selena u svojim stanicama. Osim selena, biljke hiperakumulatori mogu akumulirati arsen (As), kadmij (Cd), kobalt (Co), bakar (Cu), mangan (Mn), nikal (Ni) i cink (Zn). Najmanje 400 biljnih vrsta u 45 biljnih porodica su hiperakumulatori, a oni su pronađeni na mnogim različitim geografskim lokacijama (Galeas i sur., 2007.)

U hiperakumulatore pripadaju biljke iz rodova *Xylorhiza*, *Stanleya*, *Astragalus*, *Conopsis* i *Neptunia*. Sekundarni akumulatori akumuliraju selen i ne pokazuju znakove

toksičnosti od 100–1000 mg Se/kg suhe tvari, a to su npr. vrste *Brassica juncea*, *Brassica napus*, *Broccoli*, *Helianthus*, *Aster*, *Camelina*, *Medicago sativa*.

Neakumulatori su one biljke koje akumuliraju manje od 100 mg Se/kg suhe tvari, a ako rastu na tlima bogatim selenom ne mogu preživjeti te pokazuju usporen rast. Ovoj grupi biljaka pripadaju trave i žitarice (Gupta i Gupta, 2017.).



**Slika 2.** Podjela biljaka ovisno o akumulaciji selena na hiperakumulatore, sekundarne-akumulatore i neakumulatore. Preuzeto i modificirano prema Gupta i Gupta (2017.).

### 1.1.3. Reaktivne kisikove tvari i komponente antioksidacijskog odgovora biljke

Prisutnost Se u biljkama igra važnu ulogu u biljnom metabolizmu, kako u pogledu oksidacijskog tako i antioksidacijskog statusa. Se posjeduje nekoliko fizioloških i biokemijskih karakteristika, kao što je ublažavanje različitih vrsta abiotskog stresa. Selenoproteini djeluje kao snažni antioksidansi u metabolizmu biljaka i osiguravaju povećanu aktivnost za enzimske i neenzimske spojeve koji djeluju u borbi protiv reaktivnih kisikovih tvari (ROS, engl. *reactive oxygen species*) (Lanza i Reis, 2021.). ROS se smatraju nusproduktima biljnog aerobnog metabolizma i stvaraju se u nekoliko staničnih odjeljaka kao što su kloroplasti, mitohondriji i peroksisomi (Huang i sur., 2019.). Među mnogim ROS za indukciju oksidacijskog stresa ključni su singletni kisik ( $^1\text{O}_2$ ), hidroksilni radikal ( $\bullet\text{OH}$ ),



vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), superoksidni radikal ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) i dušikov oksid (NO) (Apel i Hirt 2004.). ROS u biljkama imaju dvostruku ulogu, u normalnim uvjetima u stanici funkcioniraju kao važne signalne molekule koje reguliraju normalan rast biljaka i reakciju biljke na stres (Huang i sur., 2019.), dok s druge strane, povećano nakupljanje ROS može izazvati oštećenje stanica razgradnjom proteina, inaktivacijom enzima i genetskim promjenama (Choudhury i sur., 2013.). Povećana koncentracija ROS-a aktivira brojne enzimske i neenzimske antioksidacijske sustave koje ih učinkovito uklanjaju (Wang i sur., 2007). Najznačajniji enzimski antioksidansi uključuju superoksid-dismutazu (SOD), katalazu (CAT), askorbat-peroksidazu (APX), glutation-reduktazu (GR), dehidroaskorbat-reduktazu (DHAR), glutation-S-transferazu (GST) i glutation-peroksidazu (GPX), dok neenzimske antoksidanse uključuje reducirani glutation (GSH), askorbinska kiselina (AA)  $\alpha$ -tokoferol, flavonoide, karotenoide i prolin (Wituszyńska i Karpiński, 2013; Ahmad i sur. 2010.).

Među enzimskim sustavima, SOD čine prvu liniju obrane protiv ROS-a (Alscher i sur., 2002.). SOD katalizira uklanjanje  $\text{O}_2^{\cdot-}$  dismutiranjem u  $\text{O}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Time se uklanja mogućnost stvaranja  $\text{OH}^{\cdot}$  Haber-Weissovom reakcijom. SOD se klasificira u tri izozima na temelju metalnog iona na koji se veže, Mn-SOD (lokaliziran u mitohondrijima), Fe-SOD (lokaliziran u kloroplastima) i Cu/Zn-SOD (lokaliziran u citosolu, peroksisomima i kloroplastima) (Das i Roychoudhury, 2014.).

CAT su tetramerni hemoproteini koji se nalaze uglavnom u peroksisomima te sadrže enzime koji pretvaraju  $2\text{H}_2\text{O}_2$  u  $\text{O}_2$  i  $2\text{H}_2\text{O}$  (Ahmad i sur., 2010.). Svi aerobni organizmi sadrže CAT, jedinstveni enzim za detoksikaciju ROS bez ikakvog redukcijskog ekvivalenta. Među antioksidativnim enzimima, CAT posjeduje najveću brzinu obrta te se 26 milijuna molekula  $\text{H}_2\text{O}_2$  može pretvoriti u jednu molekulu CAT u jednoj minuti.

APX je sastavni dio ciklusa askorbat-glutation (AsA-GSH). Dok CAT pretežno čisti  $\text{H}_2\text{O}_2$  u peroksisomima, APX obavlja istu funkciju u citosolu i kloroplastu. APX reducira  $\text{H}_2\text{O}_2$  u  $\text{H}_2\text{O}$  i DHA, koristeći AA kao redukcijsko sredstvo (Das i Roychoudhury, 2014.). U ciklusu AsA-GSH, GR je još jedan vitalni enzim za regulaciju redoks homeostaze, koja reducira GSSG u GSH. Reakcija koju katalizira GR uključuje dva koraka - u prvom koraku, NADPH reducira flavinski dio, koji se oksidira i reducira tvoreći disulfidni most, koji je redoks-aktivan i stvara tiolatni anion i cistein. U sljedećem koraku, jedan GSSG dio se veže s cisteinom tvoreći disulfidnu vezu, konačno oslobađajući GSH (Hasanuzzaman i sur., 2020.).

GPX jedan je od najvažnijih selenoenzima zbog svoje uloge u nizu bioloških funkcija uključujući detoksikaciju  $H_2O_2$  i hidroperoksida (Masuda i Goto, 2022.). Igra vitalnu ulogu u biosintezi lignina, kao i u obrani od biotičkog stresa razgradnjom indol octene kiseline (IAA). GPX preferira aromatske spojeve poput gvajakola i piragalola kao elektron donore. Budući da je GPX aktivan intracelularno, u staničnoj stijenci i izvanstanično, smatra se ključnim enzimom u uklanjanju  $H_2O_2$  (Das i Roychoudhury, 2014.).

Kao neenzimski antioksidans niske molekularne težine i neproteinski tiol, GSH ima ključnu ulogu u regulaciji unutarstanične obrane uklanjanjem ROS-a. Osim toga, GSH održava redoks homeostazu kao sastavni dio AsA-GSH ciklusa (Hasanuzzaman i sur., 2019.). Također, GSH je uključen u očitavanje promjena redoks stanja i prijenos tih promjena na odgovarajuće ciljane proteine (May i sur., 1998.). Osim svoje izravne uloge u uklanjanju ROS-a, GSH također održava reducirano stanje drugih antioksidansa poput tokoferola i zeaksantina te neizravno štiti stanične membrane. GSH također štiti proteine od denaturacije u stresnim uvjetima. Također prenosi signale za održavanje stanične homeostaze u biljkama, čime štiti biljku od oštećenja izazvanih stresom (Noctor, 2006.).

Uz GSH, AA je najzastupljeniji i najopsežnije proučavani antioksidativni spoj. Smatra se snažnim jer može donirati elektrone širokom rasponu enzimskih i neenzimskih reakcija. Većina AA u biljnim stanicama rezultat je Smirnoff-Wheelerovog puta, kataliziranog L-galaktano- $\gamma$ -lakton dehidrogenazom u biljnim mitohondrijima, dok se ostatak stvara iz D-galakturonske kiseline. 90 % AA koncentrirano je ne samo u citosolu, već i značajno u apoplastu, što ga čini prvom linijom obrane od napada ROS-a (Barnes i sur. 2002.).

Tokoferoli su skupina antioksidansa koji se nalaze u svih dijelova biljaka i algi. Od četiri izomera ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$ ),  $\alpha$ -tokoferoli su biološki najaktivniji i najdominantniji antioksidansi u kloroplastu membrane i uglavnom su odgovorni za njegovu zaštitu protiv fotooksidativnog oštećenja (Ahmad i sur., 2010.).

Flavonoidi su niske molekularne težine i sadrže hidroksilacije u svojoj molekularnoj strukturi, što ukazuje na antioksidativni kapacitet. Flavonoidi smanjuju oštećenje stanica u biljkama hvatanjem slobodnih radikala i štiteći stanične membrane od LPO. Geni povezani s biosintezom flavonoida snažno su izraženi u uvjetima stresa. Osim antioksidativnog djelovanja, flavonoidi mogu regulirati transport auksina in vivo te dati fotozaštitu. Štoviše, flavonoidi štite biljke od oštećenja UV zračenjem apsorbirajući UV. Iako je svjetlo bitno za

biosintezu flavonoida, izlaganje UV zračenju inducira više razine flavonoida u biljkama, koji dalje djeluju na mehanizam uklanjanja ROS-a u biljkama (Hasanuzzaman i sur., 2020.).

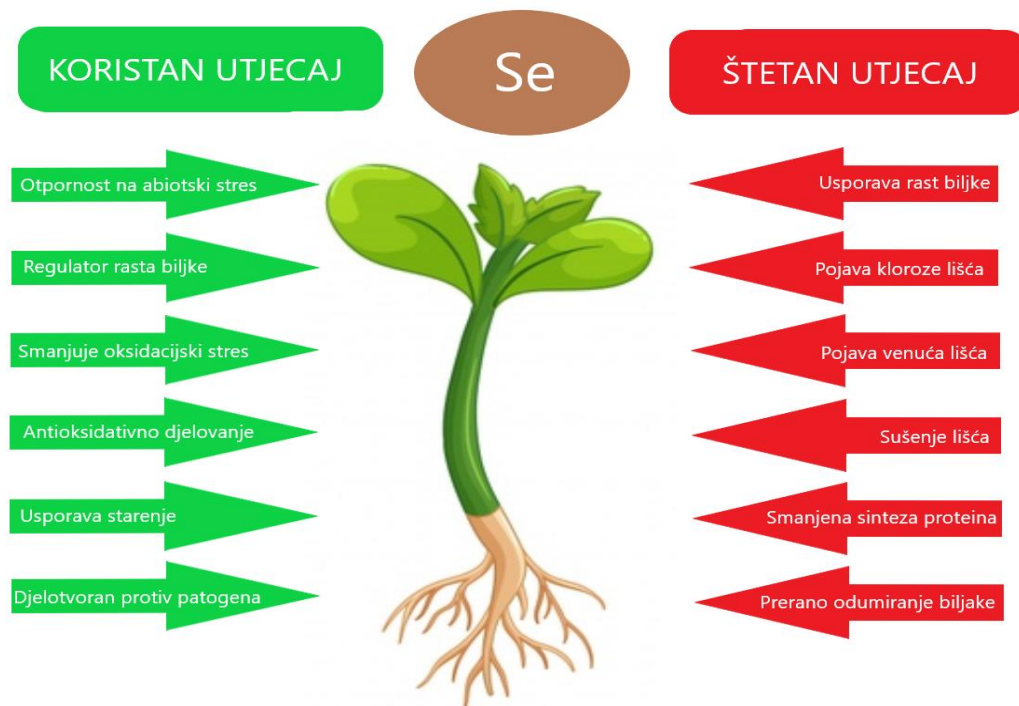
Snažnim antioksidativom smatra se i prolin. Naširoko se koristi kao neenzimski antioksidans za suzbijanje štetnih učinaka različitih vrsta ROS-a. Prolin se sintetizira koristeći glutaminsku kiselinu kao supstrat, preko pirolin 5-karboksilatnog (P5C) intermedijera. Učinkovit je čistač  $\text{OH}^{\bullet}$  i  $^1\text{O}_2$  i može spriječiti oštećenja uzrokovana LPO. Tijekom stresa, prolin se nakuplja u biljkama u velikim količinama (Verbruggen i Hermans, 2008.).

#### *1.1.4. Biofortifikacija selenom*

Biofortifikacija je definirana kao proces povećanja biorasploživih koncentracija esencijalnih elemenata u jestivim dijelovima biljaka kroz poljoprivrednu intervenciju ili genetsku selekciju (White i Broadley, 2005.). Biofortifikacija znatno povećava sadržaj selena u poljoprivrednim prehrambenim proizvodima i može pomoći u ublažavanju nedostataka selena u ishrani, od kojeg pati više od milijardu ljudi širom svijeta (WHO, 2009). Također, biofortifikacija selenom može utjecati na rast i razvoj biljaka. Niska ili optimalna koncentracija selena štiti biljke od različitih stresnih uvjeta. Selen poboljšava fotosintezu, regulira koncentraciju štetnih reaktivnih kisikovih spojeva, smanjuje toksičnost metala, održava staničnu strukturu i funkciju te pomaže raspodjeli ostalih esencijalnih elemenata, a gnojidba selenom utječe na sintezu aminokiselina, proteinskih i fenolnih spojeva u tretiranim biljkama (Gupta i Gupta, 2017.).

Razlikujemo agronomsku i genetsku biofortifikaciju. Agronomska biofortifikacija kroz upotrebu anorganskog selena kao gnojiva pokazala se uspješnom strategijom povećanja sadržaja selena u prehrambenim usjevima (Nayan i sur., 2020.). Genetska biofortifikacija temelji se na oplemenjivanju biljaka i primjeni genetskog inženjeringa. Agronomska biofortifikacija je jednostavniji, kratkoročniji i povoljniji pristup poboljšanju usjeva u usporedbi s genetskom biofortifikacijom (Lyons i Cakmak 2012.).

Agronomska biofortifikacija obično se koristi u područjima s niskim sadržajem selena i uglavnom se sastoji od dodavanja selena u tlo i folijarne gnojidbe selenom koja se obično provodi korištenjem gnojiva na bazi selenata ili selenita (Schiavon i sur., 2020.).



**Slika 3.** Korisni i štetni učinci selena u biljkama. Blagotvorni učinci su izazvan niskom dozom selena, dok su štetni učinci povezani s prekomjernom količinom dodavanja selena ili visoke razine selena u tlu. Preuzeto i modificirano prema Hasanuzzaman i sur. (2020.).

Brojna dosadašnja istraživanja upućuju na prednosti agronomske biofortifikacije prvenstveno zbog povećanja koncentracije selena u biljkama tj. prehrambenim proizvodima te pozitivnim učincima na rast i razvoj biljaka (Slika 3.).

Među prvim pozitivnim učincima selena na rast biljaka ispitali su Singh i sur. (1980.) te utvrdili da primjena  $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$  selena u obliku selenita potiče rast i prinos suhe tvari indijske gorušice (*Brassica juncea* L.).

U istraživanju Ferrarese i sur. (2012.) ispitan je utjecaj biofortifikacije selenom u sustavu plutajućeg hidropona na prinos, sadržaj selena te parametre kvalitete poput sadržaja nitrata, reducirajućih šećera i saharoze u mladim listovima špinata (*Spinacia oleracea* L.). Selen je primijenjen u koncentracijama od 0, 2,6, 3,9 i  $5,2 \mu\text{M}$  Se u obliku selenata ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ). Dobivenim rezultatima su utvrdili da je sadržaj selena u listovima špinata linearno rastao povećavanjem koncentracije selena u hranjivoj otopini. Biofortifikacija selenom nije značajno utjecala na prinos te sadržaj nitrata i reducirajućih šećera u listovima špinata.

Zafeiriou i sur. (2022.) ispitali su utjecaj biofortifikacije rukole selenom na sadržaj selena u izdancima i korijenju. Biljke su rasle u posudama napunjenim tlom u koje je

primijenjen selen u obliku selenata i selenita u dvije doze od 5 i 10 mg /kg tla te je u polovicu pokusa dodan biostimulator. Dobivenim rezultatima su utvrdili da je najveća koncentracija selena zabilježena na tretmanu s najvećom primjenom selenata bez biostimuladora. Toksični učinci zabilježeni su kod biljaka koje su tretirane najvećom koncentracijom Se u obliku selenata, dok nisu primijećeni toksični učinci u slučaju primjene Se u obliku selenita kod svih primijenjenih koncentracija.

Borbély i sur. (2021.) su u svom istraživanju ispitivali utjecaj folijarne primjene selena na rast i razvoj, koncentraciju pigmenata, asimilaciju selena te sadržaj glikozida kod stevije (*Stevia rebaudiana* L.). Selen je primijenjen u obliku selenata ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ) otopljenom u destiliranoj vodi u koncentraciji od 6, 8, 10 mg Se  $\text{L}^{-1}$ . Temeljem dobivenih rezultata utvrdili su da folijarna primjena selena značajno utječe na povećanje dužine stabljike te broj listova. Koncentracija selena u listu stevije se linearno povećavala uslijed povećanja koncentracije selena prilikom folijarne primjene. Međutim, primjena selena nije značajno utjecala na povećanje koncentracije pigmenata te na sadržaj glikozida tj. steviozida i rebaudiozida A.

U istraživanju Xue i sur. (2001.) ispitivan je utjecaj biofortifikacije selenom na morfološke parametre te pokazatelje oksidativnog stresa i antioksidativnog odgovora (enzimatske i neenzimatske) kod presadnica salate (*Lactuca sativa* L.). Biljke su uzgajane u plastičnim posudama napunjenim tlom u koje je naknadno dodan Se u obliku selenata ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ) u koncentraciji od 0,1 i 1 mg  $\text{kg}^{-1}$ . Dobiveni rezultati su pokazali značajno povećanje suhe tvari (14 %) kod primjene selena u koncentraciji od 0,1 mg  $\text{kg}^{-1}$ . Također, smanjena je razina lipidne peroksidacije te je utvrđeno povećanje aktivnosti enzima glutation-peroksidaze u usporedbi s kontrolnim tretmanom.

Rios i sur. (2008.) ispitivali su utjecaj različitih koncentracija selenata i selenita (5, 10, 20, 40, 60, 80 i 120  $\mu\text{M L}^{-1}$ ) na biomasu, razinu lipidne peroksidacije, nakupljanje selena u lišću salate (*Lactuca sativa* L.) te antioksidativni kapacitet. Temeljem dobivenih rezultata utvrdili su da je selen u obliku selenata manje toksičan u usporedbi sa selenitom. Biljke tretirane selenatom su imale veću biomasu, akumulirale veću količinu selena te su sadržavale veću koncentraciju antioksidativnih spojeva od biljaka tretiranih selenitom.

Slično istraživanje proveli su Ramos i sur. (2010.) gdje su ispitivali utjecaj biofortifikacije različitim koncentracijama selenita i selenata na rast i razvoj te antioksidativna svojstva salate (*Lactuca sativa* L.). Biljke su uzgajane u plastičnim posudama zapremine 3 l napunjene hranjivom otopinom u kojima je selen primijenjen u

koncentracijama 0, 2, 4, 8, 16, 32, 64  $\mu\text{mol/L}$ . Selen primijenjen u oba oblika je imao dvojak učinak neovisno o samom obliku. Sukladno tome, niže koncentracije selena su djelovale antioksidativno te poboljšale rast i razvoj salate, dok su veće koncentracije djelovale prooksidativno te se smanjio prinos biomase.

U istraživanju Hawrylak-Nowak (2013.) ispitan je utjecaj dva različita oblika selena na rast i razvoj, koncentraciju pigmenta te akumulaciju selena kod salate (*Lactuca sativa* L. var. *capitata*) uzgajane u hidroponskom načinu proizvodnje. Selen je primijenjen u obliku selenata ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ) i selenita ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) u rasponu koncentracija od 0 do 60  $\mu\text{M}$  Se. Rezultati su pokazali da oba oblika selena primijenjena putem hranjive otopine u koncentraciji ispod 15  $\mu\text{M}$  Se značajno povećavaju koncentraciju selena u jestivim dijelovima biljaka salate bez negativnog utjecaja na rast i razvoj biljke te koncentraciju fotosintetskih pigmenta.

Kowalska i sur. (2020.) također su ispitali utjecaj dva različita oblika selena. Oni su primijenili selenit ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) kao anorganski oblik te selenometionin (SeMet) kao organski oblik te su odredili njihov utjecaj na prinos, ukupan sadržaj šećera i askorbinske kiseline kod salate (*Lactuca sativa* L. var. *capitata*). Najveća masa glavica salate utvrđena je kod tretmana selenometioninom (SeMet) u usporedbi se selenitom, dok oblik selena nije utjecao na povećanje koncentracije ukupnog sadržaja šećera i AA.

U istraživanju Diao i sur. (2014.) ispitan je utjecaj biofortifikacije selenom na rast i razvoj, sadržaj selena u listu te pokazatelje antioksidativnog odgovora kod rajčice (*Lycopersicon esculentum* Mill.) uzgajane u hidroponu pod uvjetima solnog stresa. Presadnice rajčice su uzgajane u posudama od 12 L te kada su narasle do šest pravih listova, započeli su tretmani soli i selenom dodatkom natrijevog klorida ( $\text{NaCl}$ ) i natrijevog selenita ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) u hranjivu otopinu. Temeljem dobivenih rezultata utvrdili su da biofortifikacija selenom utječe na povećanje sadržaja fotosintetskih pigmenta u lišću presadnica rajčice pod solnim stresom te ublažava oštećenja kloroplasta. Također, dodatak selena je povećao aktivnosti enzima monodehidroaskorbat reduktaze (MDAR), dehidroaskorbat reduktaze (DHAR) i GR te potaknuo aktivnost GPX i Tioredoksin-reduktaze (TrxR) u kloroplastima rajčice pod solnim stresom. Nadalje, selen je utjecao i na povećanje sadržaja antioksidansa, tj. GSH i acetilsalicilne kiseline (AsA) te omjera GSH/GSSG, AsA/DHA i NADPH/NADP<sup>+</sup>.

Chu i sur. (2010.) su ispitali utjecaj primjene različitih koncentracija selena na svježu masu, koncentraciju pigmenta, antioksidativne aktivnosti te razinu lipidne peroksidacije kod presadnica pšenice (*Triticum aestivum* L.) izloženima niskim temperaturama. Biljke su

uzgajane u plastičnim posudama napunjenim supstratom u koji je apliciran selen u obliku selenata u koncentraciji od 0,5 do 3 mg Se kg<sup>-1</sup> tla. Temeljem dobivenih rezultata utvrdili su da tretmani s niskim koncentracijama selena štite presadnice pšenice od hladnoće povećavajući svježiu masu presadnica, koncentraciju klorofila i antioksidativne aktivnosti enzima te smanjujući intenzitet lipidne peroksidacije (LPO).

Hasanuzzaman i Fujita (2011.) su istražili utjecaj primjene selena na neenzimatske i enzimatske pokazatelje antioksidativnog odgovora kod uljane repice (*Brassica napus* L.) u uvjetima suše. Selen je primijenjen na način da je korijen biljaka bio uronjen u otopinu koja je sadržavala 25 μM selenata (Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub>). Dobivenim rezultatima su pokazali da primjena selena značajno poboljšava toleranciju biljke na sušu. Također, primjena selena povećala je koncentraciju GSH, AA, aktivnost enzima GR, GST, GPX, APX, MDAR i DHAR u usporedbi s kontrolnim tretmanom.

Puccinelli i sur. (2020.) su ispitali utjecaj biofortifikacije selenom na biljnu masu, antioksidativni kapacitet, koncentraciju ukupnih fenola i pigmentata te ukupnu koncentraciju selena u listu bosiljka (*Ocimum basilicum* L.). Pokus je proveden u hidroponskom uzgoju te je selen dodan u hranjivu otopinu u obliku selenata u koncentracijama od 0,5, 1, 2 i 4 mg Se L<sup>-1</sup>. Temeljem dobivenih rezultata utvrdili su da selen značajno i linearno povećava sadržaj selena u bosiljku, dok tretmani selenom nisu značajno utjecali na povećanje biomase i pokazatelje kvalitete biljke.

U istraživanju Hernández i sur. (2018.) ispitan je utjecaj natrijevog selenita (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) i natrijevog selenata (Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub>) na koncentraciju klorofila, karotenoida te na rast i razvoj paprike (*Capsicum annuum* L.). Pokus je proveden u hidroponskom uzgoju te su oba oblika selena primijenjena putem hranjive otopine u različitim koncentracijama (0, 5, 10 i 20 μM). utvrdili su da primjena Se u obliku selenata u nižim koncentracijama (5 i 10 μM) potiče rast i nakupljanje suhe tvari u biljkama paprike. U slučaju primjene Se u obliku selenita, srednja koncentracija od 10 μM značajno je povećala koncentraciju fotosintetskih pigmentata.

Huang i sur. (2022.) su u svom istraživanju utvrdili da biofortifikacija selenom utječe na različite morfološke i fiziološke pokazatelje kod klijanaca soje (*Glycine max* L.). Sjeme soje postavljeno je u inkubator s kontroliranom temperaturom i vlagom te je sjeme namočeno otopinama selena u različitim koncentracijama (0, 5, 10, 20, 40 i 60 Se mg L<sup>-1</sup>). Ukupni sadržaj selena u klijanima soje povećan je za 87,3 puta, a veliki dio anorganskog selena je transformiran u organski selen tijekom 24 sata od klijanja. Metilselenocistein (MeSeCys) i

selenometionin (SeMet) bili su najzatupljenije specijacije selena. Biofortifikacija selenom je također povećala sadržaj ukupnih fenola i flavonoida te aminokiselina, a posebno kod tretmana s nižom koncentracijom selena.

Sun i sur. (2020.) su u svom istraživanju ispitivali utjecaj različitih oblika selena na rast i razvoj, akumulaciju selena te fiziološke parametre divlje breskve (*Prunus persica* L.). Biljke su rasle u plastičnim posudama napunjenim s mješavinom sitnog pijeska i vermikulita te je selen dodan naknadno u obliku selenita ( $\text{Se}^{4+}$ ), selenata ( $\text{Se}^{6+}$ ), selenometionina ( $\text{Se}^{2-}$ ) te kao elementarni selen ( $\text{Se}^0$ ) u koncentraciji od 1.0 mg/kg tla. Dobiveni rezultati su pokazali da su svi oblici selena utjecali na povećanje duljine izbojaka, promjera stabljike i suhe mase biljke u usporedbi s kontrolom. Biljke divlje breskve pokazale su različitu sposobnost akumulacija selena. Tretmani selenom povećali su koncentraciju selena u lišću, stabljici i korijenu. Najveće koncentracije selena u listu i stabljici utvrđene su kod tretmana Se u obliku selenata ( $\text{Se}^{6+}$ ), a zatim slijede selenometionin ( $\text{Se}^{2-}$ ) > selenit ( $\text{Se}^{4+}$ ) > elementarni selen ( $\text{Se}^0$ ) > kontrola. Najveća koncentracija selena u korijenu se kreće prema slijedećem redoslijedu: selenometionin ( $\text{Se}^{2-}$ ) > selenat ( $\text{Se}^{6+}$ ) > selenit ( $\text{Se}^{4+}$ ) > elementarni selen ( $\text{Se}^0$ ) > kontrola. S druge strane, najuspješnija translokacija selena iz korijena u list utvrđena je kod primjene selenata ( $\text{Se}^{6+}$ ), a zatim slijede kontrola > selenit ( $\text{Se}^{4+}$ ) > selenometionin ( $\text{Se}^{2-}$ ) > elementarni selen ( $\text{Se}^0$ ).

#### 1.1.5. Nanobiotehnologija

Nanotehnologija je omogućila pristupačnost selena ljudima, životinjama ili biljkama u nano obliku. Kao i ostali nanomaterijali, SeNPs posjeduju jedinstvena kemijska, fizikalna i biološka svojstva te su jedinstvene funkcionalnosti zbog veličine samih čestica (Skalickova i sur., 2016). Ova svojstva su povezana s malom površinom s obzirom na volumen što čini SeNPs manje interaktivnim u biološkim sustavima, dok je samo oslobađanje selena s njihove površine sporo. Tijekom posljednjeg desetljeća, SeNPs su privukle sve veću pažnju zbog svojih povećanih antioksidacijskih aktivnosti i smanjene toksičnosti u usporedbi s ostalim oblicima selena (Zhang i sur., 2005.; Zhang i sur., 2008.). SeNPs imaju širok raspon mogućnosti za uporabu u prehrani ljudi i liječenju bolesti. U usporedbi s ostalim vrstama nanočestica koje se trenutno koriste u biomedicini, SeNPs su učinkovitije jer su razgrađive *in vivo*. SeNPs su izvrsne bioraspoloživosti te imaju jedinstvene fizikalno-kemijske karakteristike s visokim omjerom između površine i volumena te stoga pokazuju izvanredne



biološke učinke kao što su antimikrobna, antioksidacijska, protutumorska i protuupalna aktivnost, a pokazuju manju toksičnost u usporedbi s ostalim oblicima selena (Tran i Webster, 2011.; Kong i sur., 2014. ; Ramamurthy i sur., 2013.; Wang i sur., 2014.; Zhang i sur., 2008.; Kojouri i sur., 2012.; Shakibaie i sur., 2013.). Također, dokazano je da tretman selenom u obliku nanočestica utječe na fiziološke procese u biljkama mijenjajući razinu i aktivnost određenih enzima (Quiterio-Gutiérrez i sur. 2019.).

El Lateef Gharib i sur. (2019.) su u svom istraživanju ispitivali utjecaj folijarne primjene selenata i SeNPs na rast i razvoj, mineralni sastav te enzimatske i neenzimatske pokazatelje antioksidativnog odgovora kod graha (*Vigna unguiculata* L.). Temeljem dobivenih rezultata utvrđeno je da folijarna primjena selenata ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ) i SeNPs utječe na fiziološke procese i mineralnu ravnotežu biljaka. Primjena selenata ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ) i selenovih nano čestica (SeNPs) pri koncentraciji od 6.25  $\mu\text{M}$  rezultirala je značajnim povećanjem svakog morfološkog i biokemijskog svojstva, posebice težine i kvalitete sjemena. Nadalje, primjena SeNPs bila je učinkovitija od primjene selenata ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ) pri svim korištenim koncentracijama kod svih ispitivanih svojstava.

Cilj istraživanja Li i sur. (2020.) bio je usporediti utjecaj selenata ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ), selenita ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) te selenovih nanočestica (SeNPs) na fitotoksičnost, akumulaciju i translokaciju selena kod češnjaka (*Alium sativum* L.). Temeljem dobivenih rezultata utvrdili su da je fitotoksičnost kod selenovih nanočestica (SeNPs) bila značajno niža u usporedbi sa selenatom ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ) i selenitom ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ). Što se tiče akumulacije i translokacije, selenove nanočestice (SeNPs) i selenit ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) su bili skloni zadržati se u korijenu, dok se selenat ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ) lako translocirao u list.

Nadalje, Neysanian i sur. (2020.) su u svom istraživanju ispitivali utjecaj folijarne primjene selenata i selenovih nanočestica (SeNPs) u koncentraciji od 3 i 10  $\text{mg L}^{-1}$  na poboljšanje rasta, produktivnost, kvalitetu ploda nakon berbe te pokazatelje antioksidativnog odgovora kod rajčice (*Solanum lycopersicum* L.). Utvrdili su da oba oblika selena u koncentraciji od 3  $\text{mg L}^{-1}$  povećavaju nadzemnu masu te masu korijena rajčice. Također, primjena selena u nižoj koncentraciji obogaćuje plod rajčice te ga čini dugotrajnim nakon berbe, dok je pri višoj dozi inducirana umjerena toksičnost i ograničena proizvodnja ploda. Tretmani s oba oblika selena doveli su također do povećanja aktivnosti enzima CAT i APX te do povećanja koncentracije tiola i topljivih fenola. Primjena selena u koncentraciji od 3  $\text{mg L}^{-1}$  povećala je koncentraciju Mg, Fe i Zn u plodu. Akumulirani sadržaj selena kod biljaka tretiranih sa selenovim nanočesticama je bio značajno veći u usporedbi s biljkama

tretiranih sa selenatom što implicira na veću učinkovitost nano oblika selena u smislu biofortifikacije. Međutim, oba oblika selena primijenjena u većoj koncentraciji ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) utjecala su na povišenu koncentraciju  $\text{H}_2\text{O}_2$  i razinu lipidne peroksidacije, a što ukazuje na prooksidativno djelovanje, odnosno pojava oksidativnog stresa kod biljaka rajčice.

U istraživanju koje su proveli Tocai i sur. (2018.) ispitan je utjecaj biofortifikacije tijekom klijanja sjemena kres salate (*Lepidium sativum* L.) na sadržaj fenola i ukupnu antioksidativnu aktivnost. Selen je primijenjen u obliku selenovih nanočestica (SeNPs). Sjeme kres salate je klijalo u plastičnim posudama te su SeNPs svakodnevno primijenjene folijarno u različitim koncentracijama (10, 50, 100 ppm) tijekom 8 dana. Obradom podataka su utvrdili da je tretman selenovim nanočesticama (SeNPs) pri koncentraciji od 50 ppm značajno utjecao na koncentraciju ukupnih fenola u klicama kres salate u usporedbi s kontrolnim tretmanom, dok kod tretmana pri koncentraciji od 10 i 100 ppm nisu utvrdili značajno povećanje koncentracije ukupnih fenola. Međutim, ovi tretmani su značajno povećali antioksidativnu aktivnost kod klijanaca kres salate u usporedbi s kontrolnim tretmanom.

U istraživanju Wang i sur. (2020.) cilj je bio ispitati utjecaj primjene SeNPs na usvajanje, translokaciju te biotransformaciju selena kod presadnica riže (*Oryza sativa* L.) uzgojene u hidroponu te usporediti sa selenitom ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) i selenatom ( $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ). Utvrdili su da je stopa usvajanja selena u korijenu u obliku selenovih nanočestica (SeNPs) bila značajno sporija u usporedbi sa selenitom i selenatom. U slučaju primjene SeNPs i selenita, selen se prvenstveno akumulirao u korijenu, a ne u nadzemnom dijelu, dok je kod tretmana selenatom uočen suprotan trend. Apsorbirane SeNPs i selenit brzo su transformirani u organske oblike, pri čemu je selenometionin (SeMet) bio najdominantnija vrsta i u korijenu i u nadzemnom dijelu biljke. Međutim, nakon tretmana selenatom, anorganski oblik (Se(VI)) je ostao kao najdominantnija vrsta, a samo je mala količina transformirana u organske oblike.

Lyu i sur. (2022.) su istražili utjecaj folijarne primjene SeNPs na akumulaciju i translokaciju selena kod pšenice (*Triticum aestivum* L.). U istraživanju su korištene su SeNPs različitih veličina (50, 100, 200 nm) i koncentracija Se (0, 2, 5, 25,  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Primjena SeNPs je značajno povećala koncentraciju selena u zrnu pšenice. Primjena SeNPs većeg promjera rezultirala je značajno većom koncentracijom selena u zrnu, bržom transformacijom selena te većom koncentracijom dostupnog selena u tlu.

### *1.1.6. Utjecaj bioraspoloživosti selena na ljudsko zdravlje*

Selen je esencijalni element koji je neophodan za normalno funkcioniranje ljudskog organizma. Količina ovog elementa prisutna u prirodi i ljudskom organizmu vrlo je raznolika ovisno o geografskoj regiji i prehrani (Galan-Chilet, 2014.). Nadalje, selen ima jedan od najužih raspona između njegove nedovoljne količine u prehrani (ispod 40 µg/dan) i toksičnosti (iznad 400 µg/dan) (Kapur i sur., 2017.). Preporučeni dnevni unos selena je stoga oko 40 µg za odrasle žene i 50 µg za muškarce (Yasin i sur., 2014.) Prema Hocman (2012.) unos 150 – 300 µg selena dnevno smatra se dostatnim za zaštitu ljudskog organizma bez izazivanja toksičnosti.

Pérez-Corona i sur. (2011.) navode da se u ovisnosti o spolu, muškarcima preporučuje unos od 40-70 µg/dan, a ženama od 45 µg/dan-55 µg/dan. Rayman (2000.) tvrdi da bi dnevna doza unosa selena trebala iznositi 400-450 µg Se na dan.

Prema tome, toksičnost selena je promjenljiva i ovisi o njegovoj koncentraciji i kemijskom obliku pri čemu je redoslijed toksičnosti selena oblika slijedeći: natrij selenit > selenov sulfid > elementarni selen (Nuttall, 2006.). Najčešće korišteni oblik dodataka prehrani koji sadrže selen je anorganski u obliku natrijevog selenita, zatim organski selenometionin (SeMet) ili selenizirani kvasci bogati selenometioninom (SeMet). Najmanju bioraspoloživost od nabrojanih ima anorganski selenit. Dosada su uspješno sintetizirani mnogi stabilni organski spojevi selena, koji se koriste kao antioksidansi, inhibitori enzima, antitumorski i antiinfektivni agensi, induktori citokinina i imunomodulatori (Parnham i Graf, 1991; Sies i Masumoto, 1997).

Selen se nalazi u katalitičkoj domeni nekoliko selenoproteina, poput glutation-peroksidaze, tioredoksin-reduktaze i jodotironin-dejodibaza koji imaju važnu ulogu u uklanjanju slobodnih radikala, zaštiti od oksidacijskog stresa, jačanju imunološkog sustava, smanjenju toksičnosti lijekova čime značajno doprinose u borbi protiv bolesti (Meplan, 2011; Kaur i sur., 2014).

Do danas je identificirano 30 različitih selenoproteina sisavaca iz 25 gena. Strukturno se sastoje od 21 aminokiseline. Otkrio ih je dr. William Hoekstra sa Sveučilišta Wisconsin 1973. godine (Kieliszek, 2022.). Selenocistein (SeCys) i selenometionin (SeMet) ključni su oblici selenoproteina i prirodno su prisutni u različitim izvorima. Selenocistein (SeCys) se nalazi u životinjskim tkivima i u proteinima koji sadrže selen, dok se selenometionin (SeMet) dobiva iz kvasca, algi, bakterija i biljaka (Kieliszek, 2022.). Selen ima ključnu ulogu

u staničnom metabolizmu, bitna je komponenta enzima koji štite tijelo od oksidacijskog stresa i ima važnu ulogu u metabolizmu štitnjače, ljudskoj plodnosti i mnogim drugim vitalnim funkcijama (El-Ramady i sur., 2014; Reilly 2006; Tapiero i sur., 2003; Cox i Bastiaans, 2007.). Nedostatak selena u ljudskoj prehrani uzrokuje usporavanje rasta, smanjen metabolizam kostiju, abnormalnosti u funkciji štitnjače, kardiovaskularne bolesti i disfunkciju imunološkog sustava (Reeves i Hoffman, 2009.). Seleno-aminokiseline, selenocistein (SeCys) i selenometionin (SeMet) su odgovorne za biomedicinske učinke selena u dodacima prehrani (Dumont i sur., 2006). Dugotrajan nedostatak selena u ljudskom organizmu dovodi do ozbiljnih bolesti. Nedostatak ovog elementa nepovoljno utječe na rad kardiovaskularnog sustava i može biti izravan uzrok infarkta (Shahid i sur., 2018.). Selen također štiti osobe zaražene virusom hepatitisa (B ili C) protiv progresije stanja u rak jetre (Yu i sur. 1997.). Steinbrenner i Sies (2013.) navode kako nedostatak selena u svakodnevnoj prehrani može negativno utjecati i na rad živčanog sustava. Kod osoba s nedostatkom selena uočava se razvoj depresije ili intenziviranje anksioznosti (Pillai, 2014.). Selen je neophodan za plodnost muškaraca. Koncentracija selena u sjemenoj plazmi u pozitivnoj je korelaciji s koncentracijom spermatozoida u skupini subfertilnih muškaraca (Oldereid i sur., 1998.). Barrington i sur. (1996.) su otkrili značajno nižu koncentraciju selena u serumu kod žena koje su imale pobačaje u prvom tromjesečju ili ponovljene pobačaje. Također, selen je neophodan za uspješnu reprodukciju životinja (Underwood, 1977; Stuart i Oehme, 1982.). Štoviše, selen ima veliki utjecaj na funkcionalnost ljudskog mozga, a suplementacija selenom smanjuje epileptičke napadaje kod djece (Ramaekers i sur., 1994.). Kao što je navedeno i ranije, nizak status selena u organizmu povezan je i sa značajno većom učestalošću depresije i drugih negativnih stanja raspoloženja kao što su anksioznost i zbunjenost (Hawkes i Hornbostel, 1996; Finley i Penland, 1998.). Međutim, višak selena u prehrani obično uzrokuje komplikacije slične simptomima trovanja hranom kao što su proljev, mučnina i povraćanje (Kieliszek, 2022.). Rani toksični učinak predoziranja selenom je poremećaj endokrine funkcije, posebice sinteze hormona štitnjače. Produljeni unos dnevnih doza selena od 1,0 mg ili više može uzrokovati različite nuspojave. Dugotrajna doza od 2,4-3 mg na dan dovela bi do simptoma kao što su oštećenje skeletnog sustava i srčanog mišića dok su gubitak kose i promjene na noktima najčešći prijavljeni simptomi kronične toksičnosti selena (Dodig i Čepelak, 2004.).

## 1.2. Cilj istraživanja

Prema opisanoj problematici o nedostatku selena u ljudskoj ishrani, njegovoj važnosti te potencijalnoj toksičnosti, ovo istraživanje ima više postavljenih ciljeva, a to su:

1. Razvoj različitih modela biofortifikacije mladog lisnatog povrća tj. špinata i rukole selenom – konvencionalni pristup uz primjenu selenata te nanobiotehnološki pristup uz primjenu selenovih nanočestica
2. Optimizacija proizvodnje lisnatog povrća biofortificiranog selenom u sustavu plutajućeg hidropona
3. Odabir optimalnog modela biofortifikacije u ovisnosti o obliku i koncentraciji selena za obje vrste lisnatog povrća u cilju zadovoljavanja preporučenog dnevnog unosa selena u ljudski organizam
4. Utvrđivanje učinka primijenjenih modela biofortifikacije na rast i razvoj špinata i rukole te sadržaj makro- i mikroelemenata
5. Utvrđivanje učinka primijenjenih modela biofortifikacije selenom na intenzitet peroksidacije lipida kao pokazatelj oksidativnog stresa te enzimatske i neenzimatske pokazatelje antioksidativnog odgovora u mladim listovima špinata i rukole

S obzirom na postavljene ciljeve istraživanja, hipoteze su kako slijedi:

1. Špinat i rukola spadaju u različite skupine biljaka prema bioakumulaciji i usvajanju selena. Sukladno tome, očekuje se različit stupanj usvajanja selena u ovisnosti o biljnoj vrsti kao i njegova translokacija kroz biljku od korijena do lista koji ujedno predstavlja jestivi dio špinata i rukole.
2. Biofortifikacija s različitim kemijskim oblikom selena tj. selenatom ili selen nanočesticama će utjecati na usvajanje i translokaciju makro- i mikroelemenata kod obje ispitane vrste
3. Biofortifikacija s različitim kemijskim oblikom selena će utjecati na rast i razvoj špinata i rukole, a očekuje se pojačan rast i razvoj biljaka fortificiranih s optimalnom dozom selena.
4. Biofortifikacija s različitim kemijskim oblikom selena će utjecati na promjenu koncentracije pojedinih fiziološko biokemijskih pokazatelja kao što su biljni

pigmenti, askorbinska kiselina te na promjenu aktivnosti antioksidativnih enzima uključenih u odgovor biljke na tretman različitim oblicima u mladom lišću špinata i rukole.

## **2. MATERIJAL I METODE RADA**

### **2.1. Lokalizet**

Istraživanje je provedeno u plasteniku Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek koji je smješten na Livani, istočna Hrvatska (45°32' sjeverne širine, 18°44' istočne širine). Plastenik koji je korišten u svrhu ovog istraživanja je bio ukupne površine od 120 m<sup>2</sup>. Plastenik je bio pokriven jednostrukom etilen-vinil-acetatnom folijom visoke kakvoće i UV stabilnosti. Konstrukcija plastenika je suvremena gdje radna visina iznosi 2,60 m te podrazumijeva automatsko pokretne bočne ventilacijske otvore s obje strane pogonjene elektromotorom spojenim na senzor temperature i vlage preko upravljačke jedinice. Plastenik spada u kategoriju grijanih zaštićenih prostora te je opremljen samostalnom jedinicom za grijanje (termogen) koja kao gorivo koristi lož ulje. Na podu se nalazio vodopropustan polietilenski agrotekstil crne boje koji je imao funkciju malča te sprječavao rast i razvoj korova.

### **2.2. Materijal i opis pokusa**

Kao materijal u dvogodišnjem pokusu je korišteno sjeme rukole (Tricia, Enza Zaden, Nizozemska) i špinata (Rembour F1, Bejo Zaden, Nizozemska) koje je posijano u polistirenske kontejnere sa 40 sjetvenih mjesta. U svako sjetveno mjesto je posijano po tri sjemenke špinata i rukole te je nakon nicanja obavljeno prorjeđivanje tako da ostanu dvije biljke po sjetvenom mjestu. Na taj način, ukupno je bilo 80 biljaka po kontejneru u 2 kontejnera što je ukupno 160 biljaka po jednoj varijanti pokusa. Polistirenski kontejneri su prethodno napunjeni vermikulitom i komercijalnim supstratom (Klassmann Potgrond P) u volumnom omjeru 1:1.

U cilju biofortifikacije selenom te procjene utjecaja različitog kemijskog oblika selena (selenat i SeNPs), kontejneri s biljkama su nakon pojave 4. ili 5. lista premješteni u plutajući hidropun tj. u bazene napunjene hranjivom otopinom uz dodatak različitih oblika i koncentracije selena. s različitim oblicima i različitom koncentracijom selena.



**Slika 4.** Bazeni napunjeni hranjivom otopinom (Foto: B. Ravnjak)

Sustav plutajućeg hidropona temelji se na principu plitkih bazena ispunjenih hranjivom otopinom u kojoj na površini plutaju kontejneri s biljkama u kojima je korijen potpuno uronjen u vodu. Za ovakav tip uzgoja je neophodna i zračna pumpa koja se koristi za opskrbu kisika u vodi. Bazeni su bili dimenzija 80 x 120 cm te dubine 30 cm, dok je visina hranjive otopine tj. medija iznosila 20 cm što je ukupno 200 litara hranjive otopine po jednom bazenu (Slika 4.). Hranjiva otopina za plutajući hidropon je sastavljena prema Hoagland-ovoj recepturi te je koncentracija svih esencijalnih elemenata umanjena za 50 % kako se preporučuje u slučaju uzgoja lisnatog povrća. Soli korištene za sastavljanje bazne hranjive otopine su nabavljene od proizvođača Gram-mol d.o.o.(Hrvatska), TTT d.o.o. (Hrvatska) ili Haifa Chemicals (Haifa, Izrael). U Tablici 1. slijedi pregled recepture za hranjivu otopinu upotrijebljenu tijekom vegetacijskog pokusa. Treba napomenuti da je sastav hranjive otopine u svim varijantama pokusa bio identičan, a mijenjana je samo koncentracija selena.





**Slika 5.** Mjerenje pH vrijednosti u hranjivoj otopini (Foto: B. Ravnjak)

pH i EC vrijednosti te vrijednosti količine otopljenog kisika u hranjivim otopinama svakodnevno su mjerene. pH vrijednosti mjerene su pomoću prijenosnog pH-metra pH3310 (WTW®) te je prosječna vrijednosti pH hranjivih otopina iznosila 6,5 (Slika 5.). pH vrijednost hranjivih otopina korigirana je dodavanjem nitratne kiseline (Fisher). Uređajem Eutech Cond 6+ (Thermo scientific®) mjerena je EC vrijednost hranjive otopine te je prosječna vrijednost na početku vegetacije iznosila 2,3 mS/cm, dok je na kraju vegetacije EC vrijednost iznosila 2,0 mS/cm. Koncentracije otopljenog kisika u hranjivim otopinama prosječno su iznosile 8,03 mg/L (91,50 %). Koncentracije otopljenog kisika mjerene su pomoću prijenosnog uređaja SevenGo Duo Pro (Mettler Toledo®) (Slika 6.).



**Slika 6.** Mjerenje koncentracije otopljenog kisika u hranjivoj otopini (Foto: B. Ravnjak)

### 2.2.1. Biofortifikacijski pokus tijekom 2019. godine

Istraživanje je provedeno tijekom dvije vegetacijske godine (2019. i 2020.). Prvu vegetacijsku godinu odlikuje pokus gdje je selen dodan u obliku selenata i u obliku SeNPs koje su stabilizirane polivinilpirolidonom (PVP-om). Slijedeće godine je selen dodan u 4 različita oblika i to u obliku selenata i 3 različite vrste SeNPs što je kasnije detaljnije opisano. U prvoj godini vegetacije (2019.) sjetva je obavljena 10.04.2019. godine. Rukola je nikla treći dan nakon sjetve, a nicanje je trajalo ukupno 6 dana. Špinat je počeo nicati 8 dana nakon sjetve te je nicanje trajalo do 11. dana poslije sjetve. Kontejneri s biljkama su 15. dan nakon sjetve premješteni u plutajući hidropon (Slika 7.). Tijekom cijelog pokusa, temperatura u plasteniku je iznosila 19,5 – 21 °C tijekom dana te od 14,5 – 16 °C tijekom noći.

**Tablica 1.** Recept za hranjivu otopinu korištenu tijekom vegetacijskog pokusa sa špinatom i rukolom u obje godine

Komponenta	Bazna otopina	ml po 1L hranjive otopine
<b>Makroelementi</b>		
2M KNO <sub>3</sub>	202 g/L	1,25
2M Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O	236 g/0.5L	1,25
Fe EDDHA	15 g/L	0,75
2M MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	493 g/L	0,5
1M NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	80 g/L	0,5
<b>Mikroelementi</b>		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86 g/L	0,5
MnCl <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O	1,81 g/L	0,5
ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0,22 g/L	0,5
CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O	0,051 g/L	0,5
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O	0,12 g/L	0,5
<b>Fosfor u obliku fosfata</b>		
1M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH to 6.0)	136 g/L	0,25



**Slika 7.** Biljke špinata i rukole u plutajućem hidroponu u prvoj vegetacijskoj godini (Foto: B. Ravnjak 2019.)

Vegetacijski pokus (Slika 7.) je bio postavljen prema slučajnom blok rasporedu u 4 ponavljanja (10 sjetvenih mjesta ili 20 biljaka po ponavljanju) kao dvofaktorijski - 4 koncentracije i 2 kemijska oblika selena uz kontrolnu varijantu. Prema tome, ukupno je bilo 9 tretmana označenih kao tretmani: PVP40, PVP80, PVP160, PVP320, K, SEL40, SEL80, SEL160 i SEL320.

Selen je bio primijenjen u slijedećim koncentracijama po varijantama pokusa:

1. SeNPs-PVP40 -  $40 \mu\text{mol Se/m}^3$
2. SeNPs-PVP80 -  $80 \mu\text{mol Se/m}^3$
3. SeNPs-PVP160 -  $160 \mu\text{mol Se/m}^3$
4. SeNPs-PVP320 -  $320 \mu\text{mol Se/m}^3$
5. K – Kontrola
6. SEL40 –  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  -  $40 \mu\text{mol Se/m}^3$
7. SEL80–  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  -  $80 \mu\text{mol Se/m}^3$
8. SEL160 –  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  -  $160 \mu\text{mol Se/m}^3$
9. SEL320–  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  -  $320 \mu\text{mol Se/m}^3$

Biljke rukole i špinata su uzorkovane 34. tj. 35. dan nakon sjetve kada su dosegle tehnološku zrelost za berbu kao mlado lisnato povrće za salatu tj. svježju upotrebu (tzv. babyleaf povrće). Po 20 biljaka iz svakog ponavljanja je uzorkovano za analizu mineralnog sastava, a preostalih 20 biljaka po ponavljanju je uzorkovano za analizu enzimatskih i neenzimatskih pokazatelja oksidativnog stresa. Prethodno su obavljena mjerenja svih morfoloških parametara rasta i razvoja u trenutku same berbe tj. uzorkovanja.

### *2.2.2. Biofortifikacijski pokus tijekom 2020. godine*

U drugoj godini vegetacije (2020.) sjetva je obavljena 01.10.2020. godine. Rukola je nikla 3-4 dana nakon sjetve, a nicanje je trajalo ukupno 6-7 dana. Špinat je počeo nicati 8-9 dana nakon sjetve te je nicanje trajalo do 12. dana poslije sjetve. Kontejneri s biljkama su 16. dan nakon sjetve premješteni u plutajući hidropon. Tijekom cijelog pokusa, temperatura u plasteniku je iznosila 19,5 – 22 °C tijekom dana te od 14,5 – 16 °C tijekom noći. Vegetacijski pokus je bio postavljen prema split-plot shemi u 4 ponavljanja (20 biljaka po ponavljanju) kao višefaktorijski. Selen je primijenjen u 4 različita kemijska oblika i to u obliku selenata te 3 vrste SeNPs. SeNPs su bile obložene tj. stabilizirane polisorbitom (PS-SeNPs), huminskom kiselinom (HA-SeNPs) i polivinilpirolidonom (PVP-SeNPs). U pokusu je bilo ukupno 9 različitih tretmana (8 različitih strategija biofortifikacije i 1 kontrolni tretman bez dodatka selena) (Slika 8.).



**Slika 8.** Biljke špinata i rukole u plutajućem hidroponu u drugoj vegetacijskoj godini  
(Foto: B.Ravnjak 2020.)

Sukladno opisanom, selen je bio primijenjen u slijedećim koncentracijama po varijantama pokusa:

1. SeNPs-PS80 -  $80 \mu\text{mol Se/m}^3$
2. SeNPs-PS160  $160 \mu\text{mol Se/m}^3$
3. SeNPs-PS320 -  $320 \mu\text{mol Se/m}^3$
4. SeNPs-PVP320 -  $320 \mu\text{mol Se/m}^3$
5. K – Kontrola
6. SeNPs-HA80 -  $80 \mu\text{mol Se/m}^3$
7. SeNPs-HA160 -  $160 \mu\text{mol Se/m}^3$
8. SeNPs-HA320 -  $320 \mu\text{mol Se/m}^3$
9. SEL320 –  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  -  $320 \mu\text{mol Se/m}^3$

Pokus se 2020. godine sastojao od prethodnih varijanata jer je zaključeno kako se biljke rukole i špinata mogu biofortificirati s najvišim primijenjenim koncentracijama (u

cilju postizanja optimalne količine Se u jestivim dijelovima biljke) selenata u obliku selenata i PVP-SeNPs tijekom 2019. godine te su ponovljene varijante SeNPs-PVP320 - 320  $\mu\text{mol Se/m}^3$  i SEL-320 –  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  - 320  $\mu\text{mol Se/m}^3$  koje su bile u pokusu i 2019. godine. S obzirom na uspješnu optimizaciju dodatne dvije vrste SeNPs iste su uključene u biofortifikacijski pokus, ali i s nižim koncentracijama kako bi se utvrdilo usvajanje i učinak novih primijenjenih SeNPs-PS i SeNPs-HA. Sinteza SeNPs korištenih u obje godine istraživanja je opisana dalje u ovom poglavlju, a rezultati karakterizacije su prikazani u poglavlju *Rezultati*.

Biljke rukole i špinata su uzorkovane 38. tj. 39. dan nakon sjetve kada su dosegle tehnološku zrelost za berbu te su biljke uzorkovane na isti način kao i prethodne vegetacije.

### **2.3. Analize vegetativnih pokazatelja razvoja biljaka**

Po završetku istraživanja, kada su biljke dospjele u fazu tehnološke zriobe obavljeno je uzorkovanje biljnog materijala. Uzorkovane su cijele biljke špinata i rukole te su zabilježeni morfološki pokazatelji (broj biljaka i listova, dužina i masa korijena, dužina i masa listova) svake biljke posebno. Odvojeni korijen i nadzemna masa odvagani su, spakirani u papirnate vrećice s pripadajućom oznakom te stavljeni u sušionik na sušenje radi daljnje obrade za analizu biljne tvari.

### **2.4. Kemijske analize biljne tvari**

#### *2.4.1. Priprema uzoraka biljnog materijala*

Uzorci korijena i lista biljaka sušeni su u sušioniku (Kambic®) na 105 °C 1 sat radi prekidanja enzimatske aktivnosti u biljnom tkivu, a nakon toga je sušenje nastavljeno na temperaturi 70 °C do konstantne mase. Nakon sušenja uzorci su samljeveni na mlinu (Retsch GM200 – heavy metal free tehnologija) te im je dodijeljen laboratorijski broj.

#### *2.4.2. Određivanje koncentracije N*

Određivanje koncentracije dušika provedeno je nakon razaranja biljne tvari na bloku za razaranje (Kjeldahl - Büchii B-324) uz pomoću smjese kiselina koja se sastoji 96 %



koncentrirane sulfatne kiseline (LabExpert) i 4 % perklorne kiseline (LabExpert) uz dodatak 30 % vodikovog peroksida (Fisher).

Uzorci od 1 gram suhe biljne tvari preneseni se u kivetu za razaranje te su preliveni s 5 ml smjese sulfatne i perklorne kiseline te s 2 ml vodikovog peroksida. Nakon što je biljna tvar upila smjesu kiselina, pipetom je postupno dodano ukupno 10 ml vodikovog peroksida.

Uzorci su na bloku za razaranje zagrijani na temperaturi do 360 °C sve dok otopina smjesa nije postala potpuno bistra. Ohlađena otopina se oprezno razrijedila dodatkom oko 50 ml deionizirane vode te se filtrirala kroz filter papir u odmjerne tikvice od 100 ml.

Destilacija dušika provedena je istiskivanjem amonijaka iz otopine uzorka (40 %- tnom otopinom natrijevog hidroksida) u predložak poznatog volumena 0,01 mol dm<sup>-3</sup> sulfatne kiseline. Neutralizacijom dijela sulfatne kiseline destilacijom amonijaka u predlošku je dobiven amonijev sulfat. Količina nastalog amonijevog sulfata ekvivalentna je količini dušika koji je bio u uzorku biljne tvari. Titracijom predloška nakon destilacije, odnosno neutralizacijom preostale kiseline u predlošku s 0,02 mol dm<sup>-3</sup> natrijevim hidroksidom utvrđuje se utrošak kiseline destiliranim amonijakom (Vukadinović i Bertić, 1989.). Koncentracija dušika izražena je u % dušika u suhoj tvari analiziranih biljka.

#### *2.4.3. Određivanje koncentracije Ca, Mg, K, P, S, Cu, Fe, Mn i Zn*

Određivanje koncentracije Ca, Mg, K, P, S, Cu, Fe, Mn i Zn u uzorku biljne tvari zasnovano je na korištenju osnovne otopine uzorka koja je dobivena digestijom sa smjesom kiselina. Uzorci biljnog materijala razoreni su mokrim postupkom u mikrovalnoj pećnici (CEM MARS 6).

U teflonsku posudu odvagano je 0,5 g suhog uzorka biljnog materijala pomoću analitičke vage (Kern®) te preliveno sa 6 ml 65 % HNO<sub>3</sub> (Fisher) i 2 ml 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fisher).

Nakon postupka digestije, ohlađena otopina je kvantitativno prenesena u tube za centrifugiranje od 50 ml (Sarstedt®) te nadopunjena do oznake s destiliranom vodom.

Koncentracije makro i mikroelemenata mjerene su izravno iz razrijeđenog digestata uzorka pomoću ICP-OES tehnike (PerkinElmer Optima 2100 DV) te su izražene u mg kg<sup>-1</sup> biljnog materijala.

#### 2.4.4. Određivanje koncentracije selena

Nakon mikrovalne digestije, koncentracije selena u otopini digestiranih biljnih materijala određene su pomoću ICP-MS tehnike (Agilent 7500 Series). Korištena su dva referentna materijala: BCR129 (Hay Powder, European Commission) i 1567b (Wheat Flour, Standard reference material, National Institute of Standards and Technology) te su pripremljeni na isti način kao i biljni uzorci.

Koncentracija Se u suhim uzorcima listova je poslužila i za izračun ukupnog sadržaja Se u svježoj tvari lista putem izračunavanja postotka suhe tvari lista i udjela vode pa je ukupan sadržaj selena u svježim listovima dobiven pomoću slijedeće formule:

$$\text{Ukupan sadržaj Se u svježoj tvari} = \text{Se mg kg}^{-1} \text{ suhe tvari} \times (1 - (\text{H}_2\text{O \%}/100))$$

Ukupan sadržaj Se u svježoj tvari lista je izračunat kako bi se procijenila uspješnost biofortifikacije u cilju optimizacije sustava te točnog prikaza unosa Se u ljudski organizam konzumacijom 200 g svježih listova rukole ili špinata.

### 2.5. Određivanje fiziološko-biokemijskih pokazatelja u listovima špinata i rukole

#### 2.5.1. Određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata

Koncentracija klorofila određuje se metodom koju je opisao Lichtenthaler (1987.), ekstrakcijom pigmenata iz usitnjenog tkiva biljke (0,1 g) dodatkom 1 ml 80 %-tnog acetona. Nakon ekstrakcije, homogenati su centrifugirani 15 min pri 22 000 x-g i na temperaturi od +4 °C. Supernatant je dekantiran u epruvete, a postupak ekstrakcije je ponovljen još nekoliko puta do obezbojenja taloga, pri čemu su dobiveni ekstrakti pulirani. U puliranim razrijeđenim ekstraktima fotosintetski pigmenti su određivani spektrofotometrijskim mjerenjem apsorbancije na tri valne duljine: 470 nm, 645 nm i 662 nm. Rezultati su izraženi u mg klorofila, odnosno karotenoida po g svježe tvari (mg/g svježe tvari).

#### 2.5.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Iz etanolnih ekstrakta listova rukole i špinata sadržaj ukupnih fenola određuje se spektrofotometrijski, metodom po Folin-Ciocalteu (Singleton i Rossi, 1965.). Metoda se



bazira na reakciji Folin-Ciocalteu reagensa (kompleks fosfomolibdenske-fosfovolframske kiseline) s reducirajućim reagensom (fenolni spoj) pri čemu dolazi do pojave plave boje. U reakcijsku smjesu dodaje se 20 µl etanolnog ekstrakta, 1,58 ml dH<sub>2</sub>O i 100 µl Folin-Ciocalteu reagensa uz miješanje na rotacijskoj miješalici. Nakon toga treba pričekati najmanje 30 s, a najviše 8 min i u tom vremenskom periodu dodati u uzorke 300 µl zasićene otopine Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> te dobro vorteksirati. Uzorci se zatim inkubiraju u vodenoj kupelji 1 h na 37 °C. Apsorbancija tako priređenih uzoraka se određuje pri 765 nm, a sadržaj ukupnih fenola u etanolnim ekstraktima se računa iz baždarnog pravca u kojem se galna kiselina koristi kao standard.

### *2.5.3. Određivanje koncentracije askorbinske kiseline (AA)*

Koncentracija askorbinske kiseline određena je spektrofotometrijski metodom koju su opisali Benderitter i sur. (1998.). Askorbinska kiselina se određuje u svježe pripremljenim vodenim ekstraktima biljnog tkiva. U usitnjeno tkivo (0,2 g) dodan 1 ml dH<sub>2</sub>O. Nakon homogeniziranja miješanjem na vibracijskoj miješalici, homogenati su centrifugirani 5 min pri 6 000 g na temperaturi od +4 °C. Dobivenom supernatantu (300 µl) dodano je 100 µl 13 %-tne otopine trikloroetene kiseline (TCA), 25 µl dH<sub>2</sub>O i 75 µl reagensa 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH). Reakcijska smjesa potom je inkubirana 60 min u vodenoj kupelji na +37 °C. Uz svaku probu, na isti je način pripremljena i slijepa proba, osim što je u slijepu probe reagens DNPH dodan tek nakon inkubacije na kupelji, kako bi izostala reakcija. Nakon inkubacije u reakcijsku smjesu dodano je 500 µl 65 %-tne H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, koja je potom promiješana na vibracijskoj miješalici. U slijepu probu je, uz H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, dodan i reagens DNPH. Apsorbancija dobivene otopine mjerena je pri valnoj duljini od 520 nm. Koncentracija askorbinske kiseline određena je pomoću jednadžbe pravca standardnog dijagrama u kojem su kao standardi korištene rastuće koncentracije askorbinske kiseline. Rezultati su izraženi u mg askorbinske kiseline po 100 grama svježe tvari (mg 100 g<sup>-1</sup> svježe tvari).

### *2.5.4. Određivanje ukupne antioksidacijske aktivnosti*

Ukupna antioksidacijska aktivnost etanolnih ekstrakata listova rukole i špinata određuje se metodom po Brand-Williamsu (Brand-Williams i sur., 1995.) koja se zasniva na

redukciji DPPH· (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala. U zatvorene mikroeprovete se doda 50 µl etanolnog ekstrakta i dopuni se do volumena od 1 ml otopinom DPPH. Slijepa proba se priređuje na isti način samo što se umjesto uzorka dodaje čisti etanol. Reakcija se odvija u čvrsto zatvorenim mikroeprevetama uz lagano miješanje pri 20 °C tijekom 15 min. Apsoorbancija tako priređenih uzoraka se određuje pri 515 nm, a ukupna antioksidacijska aktivnost etanolnih ekstrakata se računa iz baždarnog pravca u kojem se Trolox koristi kao standard i izražava se u ekvivalentima Troloxa.

#### *2.5.5. Određivanje ukupnog, reduciranog i oksidiranog glutationa*

Količina ukupnog (tGSH), reduciranog i oksidiranog GSH određena je metodom koju su opisali Akerboom i sur. (1981.) te Nair i sur. (1991.). Usitnjeno tkivo (0,1 g) je homogenizirano u 1 ml 5 % 5-sulfosalicilne kiseline (SSA). Nakon inkubacije na ledu u trajanju od 10 min, homogenat je centrifugiran 15 min pri 22 000 g na +4 °C. Dobiveni deproteinizirani supernatant korišten je za mjerenje tGSH, GSH i GSSG. Za mjerenje tGSH (tGSH = GSSG + GSH) i GSSG korištena je kinetička metoda u kojoj GSH uzrokuje kontinuiranu redukciju 5,5-ditiobis (2-nitrobenzoične kiseline) (DTNB) pri čemu nastaje žuto obojeni produkt 5-tio-2-nitrobenzoična kiselina (TNB), dok se nastali GSSG reciklira pomoću GR-a i NADPH. Porast apsoorbancije, do kojeg dolazi nastankom TNB-a, mjeri se na 412 nm. Količina GSH izračunata je iz razlike tGSH i GSSG-a, i izražena u nmol/g svježe tvari.

#### *2.5.6. Određivanje produkata lipidne peroksidacije (LPO)*

Količina produkata LPO određena je metodom koju su opisali Verma i Dubey (2003.), mjerenjem TBARS-a, uglavnom MDA. Usitnjeno tkivo je ekstrahirano s 1 ml 0,1 %-tne otopine trikloroctene kiseline (TCA). Nakon 10 min inkubacije na ledu, homogenati su centrifugirani 5 min pri 6 000 g na temperaturi od +4 °C. Supernatantu (0,5 ml) je dodan 1 ml otopine 0,5 %-tne tiobarbiturne kiseline u 20 %-tnoj otopini TCA. Reakcijska smjesa je promiješana na vibracijskoj miješalici te potom inkubirana 30 min u vodenoj kupelji na +95 °C, prilikom čega dolazi do raspada lipidnih peroksida te nastaju produkti (većinom MDA) koji reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom. Nakon isteka inkubacije, reakcija je zaustavljena držanjem 10 min na ledu, nakon čega je reakcijska smjesa centrifugirana 10

min pri 22 000 g na temperaturi od +4 °C. Apsorbancija dobivenog supernatanta je mjerena pri valnim duljinama od 532 nm i 600 nm, pri čemu se apsorbcija pri 600 nm oduzima od apsorbcije pri 532 nm zbog korekcije za nespecifičnu reakciju. Količina TBARS-a tj. MDA određena je pomoću jednadžbe pravca standardnog dijagrama, a kao standard korišten je 1,1,3,3- tetrametoksipropan. Rezultati su izraženi kao nmol po gramu svježe tvari (nmol g<sup>-1</sup> svježe tvari).

#### 2.5.7. Mjerenje aktivnosti enzima askorbat-peroksidaze (APX)

Aktivnost APX određena je metodom koju su opisali Nakano i Asada (1981.). Reakcijska smjesa sastojala se od 930 µl 50 mM kalij-fosfatnog pufera s 0,1 mM EDTA, 10 µL askorbinske kiseline koncentracije 50 mM i 50 µl (5 x razrijeđenog uzorka) proteinskog ekstrakta. Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi, reakcija je započeta dodatkom 10 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (12 mM). Pad apsorbcije mjereno je spektrofotometrijski pri 290 nm svake sekunde tijekom 2 min. Specifična aktivnost enzima izražena je kao količina (µmol) razgrađenog askorbata po minuti po gramu proteina, odnosno u jedinicama aktivnosti APX po gramu proteina (U/g proteina; U = µmol min<sup>-1</sup> proteina).

#### 2.5.8. Mjerenje aktivnosti enzima katalaze (CAT)

Aktivnost CAT određena je metodom po Aebi-u (1984.). Neposredno prije mjerenja pripremljena je reakcijska smjesa koja se sastoji od 0,036 % otopine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u 50 mM kalijfosfatnom puferu (pH=7,0). Aktivnost enzima mjerena je u UV-kiveti, pri čemu je u 1950 µl reakcijske smjese dodano 50 µl proteinskog ekstrakta. Pad apsorbcije praćen je spektrofotometrijski pri 240 nm svakih 10 sekundi tijekom perioda od 100 sekundi. Specifična aktivnost enzima izražena je kao količina (µmol) razgrađenog H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> po minuti po gramu proteina, odnosno u jedinicama aktivnosti CAT po gramu proteina (U g<sup>-1</sup> proteina; U = µmol min<sup>-1</sup> proteina).

#### 2.5.9. Mjerenje aktivnosti enzima glutation-reduktaze (GR)

Aktivnost GR u enzimskim ekstraktima određena je prema metodi koju su opisali Dolphin i suradnici (1989.). Metoda se temelji na redukciji GSSG-a uz prisustvo GR-a te

NADPH kao reducensa. U UV kivetu dodano je 400  $\mu\text{l}$  reakcijskog pufera (100 mM kalij-fosfatni pufer pH 7.5, 1 mM EDTA) 500  $\mu\text{l}$  2 mM otopine GSSG, 50  $\mu\text{L}$  enzimskog ekstrakta te 50  $\mu\text{l}$  2 mM otopine NADPH. Enzimaska reakcija započinje odmah nakon dodatka NADPH, a prati se pad apsorbancije na 340 nm svakih 10 sekundi kroz 3 minute. Pad apsorbancije se javlja zbog oksidacije NADPH odnosno smanjenja količine NADPH. Jedna jedinica enzima reducira 1  $\mu\text{mol}$  GSSG po minuti pri pH 7.6 i 25 °C. Specifična aktivnost GR izražena je kao količina ( $\mu\text{mol}$ ) NADPH po minuti po gramu proteina koristeći ekstinkcijski koeficijent ( $\epsilon = 6.220 \text{ mM}^{-1}\times\text{cm}^{-1}$ ), odnosno u jedinicama aktivnosti GR po gramu proteina ( $U\times\text{g}^{-1}$  proteina;  $U = \mu\text{mol}\times\text{min}^{-1}$ ).

#### 2.5.10. Mjerenje aktivnosti enzima glutation-s-transferaze (GST)

Aktivnost GST u enzimskim ekstraktima određena je prema metodi koju su opisali Mannervik (1985.). U UV kivetu dodano je 975  $\mu\text{l}$  reakcijskog smjese (100 mM kalij-fosfatni pufer pH 6.5, 1 mM EDTA) te 25  $\mu\text{l}$  enzimskog ekstrakta. Reakcija se mjeri promatranjem konjugacije 1-kloro, 2,4-dinitrobenzena (CDNB) s reduciranim glutationom (GSH). Prati se rast apsorbancije na 340 nm svakih 10 sekundi kroz 3 minute. Jedna jedinica enzima konjugirati 0.01  $\mu\text{mol}$  CDNB po minuti pri 25 °C. Specifična aktivnost GST izražena je u jedinicama po gramu proteina ( $U\times\text{g}^{-1}$  proteina;  $U = \mu\text{mol}\times\text{min}^{-1}$ ).

#### 2.5.11. Mjerenje aktivnosti enzima glutation-peroksidaze (GPX)

Aktivnost GPX-a određena je prema modificiranoj metodi koju je opisao Wendel (1980.), a koristi  $\text{H}_2\text{O}_2$  kao supstrat. Metoda je modificirana i prilagođena za kinetičko mjerenje u mikrotitarskim pločicama s 96 jažica. Metoda se zasniva na redukciji  $\text{H}_2\text{O}_2$  u  $\text{H}_2\text{O}$  pomoću GPX-a pri čemu se GSH oksidira u GSSG. Nastali GSSG reducira se natrag u GSH pomoću GR-a pri čemu se NADPH oksidira u  $\text{NADP}^+$ . Smanjenje apsorbancije, koje nastaje zbog smanjenja količine NADPH-a, prati se na 340 nm. Reakcijska smjesa sastojala se od 0.12 mM NADPH, 3.2 U GR-a, 1 mM GSH i proteinskog ekstrakta u 50 mM kalij-fosfatnom puferu s 0.4 mM EDTA (pH 7.0), u ukupnom volumenu od 300  $\mu\text{l}$ . Nakon 5 min inkubacije reakcija je započeta dodatkom  $\text{H}_2\text{O}_2$  u konačnoj koncentraciji od 0.0007 % (w/w). Pad apsorbancije praćen je na 340 nm tijekom 5 min. Specifična aktivnost GPX-a računata je

koristeći molarni ekstinkcijski koeficijent za NADPH ( $\epsilon = 6.220 \text{ mM/cm}$ ), a izražena je u jedinicama aktivnosti GPX-a po gramu proteina ( $\text{U/g proteina}$ ,  $\text{U} = \mu\text{mol/min}$ ).

#### 2.5.12. Mjerenje aktivnosti enzima superoksida-dismutaze (SOD)

Aktivnost SOD-a u proteinskim ekstraktima određena je prema modificiranoj metodi Beauchampa i Fridovicha (1971.). Aktivnost je mjerena kao stupanj inhibicije redukcije supstrata nitro plave tetrazolijeve soli (NBT) superoksidnim radikalom. Jedna jedinica SOD-a inhibira stopu redukcije NBT-a za 50 % u povezanom sustavu pomoću ksantin-oksidaze (XOD) i ksantina. Reakcijska smjesa za kinetičko mjerenje aktivnosti SOD-a sastojala se 825  $\mu\text{l}$  75  $\mu\text{M}$  NBT-a otopljenog u 50 mM kalij-fosfatnom puferu (pH 7.8) s dodatkom 0.1 mM EDTA, 75  $\mu\text{l}$  10.8 mM otopine ksantina i 50  $\mu\text{l}$  proteinskog ekstrakta. Nakon 5 min ekvibracije, reakcija je pokrenuta dodatkom XOD-a u konačnoj koncentraciji 0.0025 U/ml. Porast apsorbancije praćen je spektrofotometrijski na valnoj duljini 560 nm svakih 30 sekundi tijekom 4 min. Aktivnost SOD je izračunata koristeći postotak inhibicije redukcije NBT-a, a izražena je u jedinicama aktivnosti SOD po mg proteina ( $\text{U/mg proteina}$ ;  $\text{U} = \mu\text{mol/min proteina}$ ).

#### 2.6. Sinteza selenovih nanočestica (SeNPs)

Sinteza selenovih nanočestica temeljeni se na redukciji natrijevog selenita ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) u elementarni oblik dodavanjem askorbinske kiseline kao reducensa (Slika 9.). Sinteza se sastoji od tri faze, a to su: redukcija, nukleacija te rast i stabilizacija. U fazi nukleacije ioni selenata ( $\text{Se}^{+4}$ ) reduciraju u elementarni oblik Se (0) koji tada stvara nukleuse. Nukleusi služe kao osnova za daljnji rast nanočestica. Površinski agensi se tada vežu na nanočesticu i stabiliziraju je. Kao površinski stabilizatori korišteni su huminska kiselina (HA), polisorbitat (Tween 20 ili PS) i polivinilpirilidon (PVP). Stabilizacija nanočestica može biti elektrostatske ili steričke prirode. Nanočestice obložene huminskom kiselinom su stabilizirane elektrostatskim interakcijama, dok su PVP i polisorbitat (Tween 20) selenove nanočestice sterički stabilizirane (iako imaju slab negativan naboj).

### 2.6.1. *Sinteza selenovih nanočestica stabiliziranih s polivinilpirolidonom (PVP)*

Sinteza selenovih nanočestica stabiliziranih polivinilpirolidonom (PVP) temeljila se prema metodama Li i sur. (2016.), Ye i sur. (2017.) i Selmani i sur. (2020.).

Ukupni volumen reakcijske smjese u tikvici je 30 ml. U tikvicu se doda 23.37 ml ultračiste vode (UPW), 3 ml PVP-a (1 %) i miješa 15 min na magnetskoj mješalici na 500 rpm. Nakon toga se doda 3.3 ml askorbinske kiseline (Ask) (0.1 M). Za kraj se dodaje 0.33 ml natrijevog selenita ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ), kap po kap. Tijekom dodavanja selenita reakcijska smjesa ima karakterističnu narančastu boju. Nakon 20 minuta, reakcijska smjesa se centrifugira 20 minuta na 13751 g (10000 rpm) u Falcon tubama od 50 ml. Nanočestice se potom spuste na dno tube. Talog sa nanočesticama se skupi pipetom. Supernatant treba biti bezbojan i proziran, što je znak da u supernatantu nisu zaostale nanočestice. Ako se nanočestice nisu spustile, preostali supernatant se treba ponovno centrifugirati te izdvojiti nanočestice.



**Slika 9.** Sintetiziranje selenovih nanočestica (Foto: B. Ravnjak)

### 2.6.2. *Sinteza selenovih nanočestica stabiliziranih s polisorbatom (Tween 20)*

Sinteza selenovih nanočestica stabiliziranih s polisorbatom temeljila se prema modificiranoj metodi Vahdati i sur. (2020.).

Ukupni volumen reakcijske smjese u tikvici je 100 ml. 90 ml natrijevog selenita ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) (0,0012 M) se ulije u tikvicu s okruglim dnom. Reakcijska smjesa se miješa na magnetskoj mješalici na 400 rpm. Zatim se doda 2 ml askorbinske kiseline kap po kap. Nakon toga se doda 0.01 ml (10  $\mu\text{l}$ ) polisorbata (Tween 20) u reakcijsku smjesu. Postupak s dodavanjem askorbinske kiseline i polisorbatom (Tween 20) se ponavlja dok ukupan volume dodane askorbinske kiseline bude 10 ml. Smjesa se miješa 20 minuta. Nakon 20 minuta, reakcijska smjesa se centrifugira 20 minuta na 19802 g (12000 rpm) u Falcon tubama od 50 ml. Nanočestice se spuste na dno Falcon tube. Talog sa nanočesticama se skupi pipetom. Supernatant treba biti bezbojan proziran, što je znak da u supernatantu nisu zaostale nanočestice. Ako se nanočestice nisu spustile, preostali supernatant se treba ponovno centrifugirati te izdvojiti nanočestice.

### 2.6.3. *Sinteza selenovih nanočestica stabiliziranih s huminskom kiselinom*

Sinteza selenovih nanočestica stabiliziranih s huminskom kiselinom temeljila se prema metodama Ye i sur. (2017.), Vahdati i sur. (2020.) i Selmani i sur. (2020.) uz dodatne modifikacije. Ukupni volumen reakcijske smjese je 30 ml. 10 mL natrijevog selenita ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) (0.001 M) se doda u tikvicu zajedno s 10 mL huminske kiseline (0,001 %). Smjesa se miješa 5 minuta na magnetskoj mješalici na 450 rpm. Nakon toga se dodaje Ask (0,01 M) kap po kap uz konstantno miješanje. Reakcija se ostavi 20 minuta nakon čega se smjesa centrifugira 15 minuta na 15000 g u Falcon tubama od 50 ml. Nanočestice se spuste na dno Falcon tube. Talog sa nanočesticama se skupi pipetom. Supernatant treba biti bezbojan i proziran, što je znak da u supernatantu nisu zaostale nanočestice. Ako se nanočestice nisu spustile, preostali supernatant se treba ponovno centrifugirati te izdvojiti nanočestice.

#### 2.6.4. Karakterizacija i vizualizacija selenovih nanočestica

Vizualizacija SeNPs provedena je metodom transmisijske elektronske mikroskopije (TEM). Uzorci su pripremljeni pipetiranjem jedne kapi otopine SeNPs na vrh Formvar® polimerom obloženu bakrenu mrežicu, koja je osušena na zraku pri sobnoj temperaturi (SPI Supplies, West Chester, PA, SAD) i ostavljajući je sušiti 24 h na sobnoj temperaturi. Mikroskop (TEM 902A, Carl Zeiss Meditec Ag, Jena, Njemačka) je radio u modu svjetlog polja uz ubrzanje naponom od 80 kV. Slike su dobivene pomoću fotoaparata Canon PowerShot S50 (Canon, Tokio, Japan) koji je bio spojen na mikroskop. Metode dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS) i elektroforetskog raspršenja svjetlosti (ELS) korištene su za mjerenje hidrodinamičkog promjera ( $d_H$ ) odnosno zeta potencijala ( $\zeta$ ) SeNPs. Mjerenja su provedena na uređaju Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK) opremljen zelenim laserom (532 nm). Intenzitet raspršene svjetlosti bio je detektiran pod kutom od  $173^\circ$ . Sva mjerenja su obavljena na sobnoj temperaturi. Za analizu podataka korišten je program Zetasizer software 6.32 (Malvern Instruments, Malvern, UK). Rezultati distribucije hidrodinamičkog promjera dobiveni su korištenjem funkcije distribucije veličine i volumena čestica, a  $d_H$  se prikazuje kao prosječna vrijednost 10 mjerenja. Površinski naboj svih SeNPs je izražen kao zeta potencijal ( $\zeta$ ) te je izračunat korištenjem Henryjeve jednadžbe uz aproksimaciju prema Smoluchovskom temeljeno na elektroforetskoj mobilnosti čestica. Vrijednosti zeta potencijala ( $\zeta$ ) u mV (milivolt) su prikazane kao prosjek 5 mjerenja. Koncentracija selena u talogu tj. baznim smjesama nakon centrifugiranja u sklopu postupka sinteze SeNPs je određena tehnikom induktivno spregnute plazme s masenom spektrometrijom (ICP-MS) na uređaju Agilent 7500 Series. Uzorci SeNPs su razrijeđeni do 1000 puta ultračistom vodom te je određena koncentracija Se i preračunata na konačnu koncentraciju baznih smjesa SeNPs u cilju određivanja volumena koji se treba dodati u temeljnu hranjivu otopinu kako bi se dobile prethodno navedene koncentracije Se prema opisanim tretmanima.

#### 2.7. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka obrađena je analizom varijance (ANOVA) podataka svih ispitivanih svojstava 9 tretmana na dvije biljne vrste. Za statističku obradu podataka korišten je statistički paket SAS 9.4. (SAS Institute Inc, Cary, NC), a za usporedbu srednjih



vrijednosti izračunate su najmanje značajne razlike LSD (engl. Least Significant Differences) za statističku značajnost  $p < 0,05$  u skladu s Fisherovim testom. Značajna razlika između srednjih vrijednosti u svim tablicama obilježena je u skladu s Duncan-ovim slovnim označavanjem, gdje su srednje vrijednosti koje se međusobno ne razlikuju obilježene istim slovom.

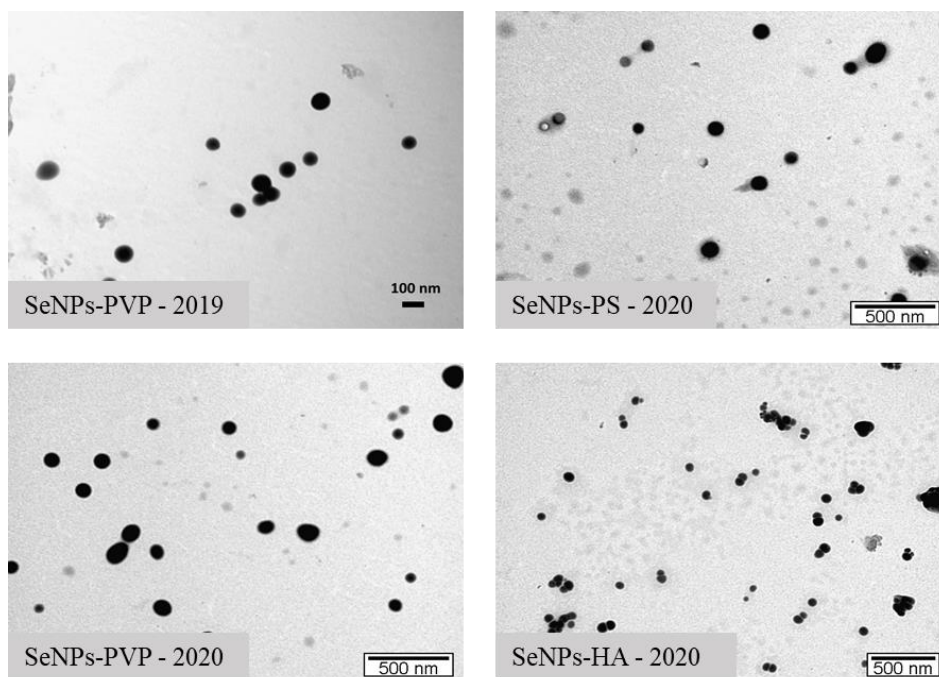
### 3. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

#### 3.1. Fizikalno-kemijska svojstva selenovih nanočestica (SeNPs)

Selenove nanočestice korištene u biofortifikacijskim pokusima u ovom istraživanju su navedene u tablici 2. Oblik i vizualizacija nanočestica je određena TEM mikroskopom kako je prije opisano (Slika 10.).

**Tablica 2.** Vrste selenovih nanočestica korištene u istraživanju s prikazom omotača i oblika utvrđenog transmisijskom elektronskom mikroskopijom.

Vrsta SeNPs	Omotač/stabilizator	Oblik
SeNPs-PVP	Polivinilpirolidon	Sferičan
SeNPs-PS	Polisorbat	Sferičan
SeNPs-HA	Huminska kiselina	Sferičan



**Slika 10.** Snimke selenovih nanočestica stabilizirane polivinilpirolidonom, polisorbatom i huminskom kiselinom. Mjerilo je 100 ili 500 nm.

Hidrodinamički promjer ( $d_H$ ) kod svih vrsta nanočestica u najvećem postotku (više od 70 %) je iznosio ispod 80 nm. Prosječno najmanje nanočestice prema ukupnoj distribuciji veličine se dobiju oblaganjem polisorbatom gdje je gotovo 100 % SeNPs-PS prosječne veličine 72,6

nm. Nakon njih slijede nanočestice obložene huminskom kiselinom, dok su nanočestice obložene PVP-om ukupno najvećeg promjera. Ipak, treba napomenuti kako su kod pojedinih DLS mjerenja SeNPs dobivene vrijednosti jedne veličine na ukupnom volumenu (100 %) uzorka nanočestica. Prosječne vrijednosti hidrodinamičkog promjera i zeta potencijala su prikazane u tablici 3. Što se tiče zeta potencijala  $\zeta$  (milivolti), prosječni površinski naboj PVP-SeNPs je iznosio -24,5 tj. -30,3 mV. Površinski naboj PS-SeNPs je iznosio -29,1 mV dok je prosječni površinski naboj HA-SeNPs iznosio -31,2 mV. SeNPs-PVP sintetizirane 2019. godine su ukupno bile nešto većeg promjera uz manju vrijednost zeta potencijala (Tablica 3).

**Tablica 3.** Hidrodinamički promjer ( $d_H$ ) i zeta potencijal ( $\zeta$ ) različitih SeNPs dobiveni mjerenjem dinamičkim i elektroforetskim raspršenjem svjetlosti.

Vrsta SeNPs (sinteza)	$d_H$ / nm (volumni %)	$\zeta$ / mV
SeNPs-PVP (2019)	108.3 ± 24.7 (100%)	-24.5 ± 2.1
SeNPs-PVP (2020)	79,1 ± 11,9 (71 %)	-30,3 ± 0,9
SeNPs-PS (2020)	72,6 ± 8,1 (99 %)	-29,1 ± 2,4
SeNPs-HA (2020)	74,20 ± 5,2 (72 %)	-31,2 ± 0,6

Prema navedenom, sintetizirane različite vrste selenovih nanočestica su bile negativnog naboja dok im se distribucija veličina blago razlikovala, a sve su okruglog oblika. Mjerenja su provedena na više ponovljenih sinteza od kojih su uzorci nanočestica pulirani. Nakon sinteze, izmjerena je koncentracija Se u SeNPs, a podatci za obje godine su prikazani u tablici 4.

**Tablica 4.** Koncentracija Se u uzorcima nakon sinteze različitih SeNPs

Vrsta SeNPs	Se (ppm)
<b>2019</b>	
SeNPs-PVP	11880
<b>2020</b>	
SeNPs-PVP	12270
SeNPs-PS	8925
SeNPs-HA	3156

### 3.2. Biofortifikacijski pokus tijekom 2019. – špinat

#### 3.2.1. Morfološki pokazatelji rasta i razvoja špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Prosječan broj listova po biljci kod ispitivanih tretmana iznosio je 8,19. Statistički značajno veći broj listova u usporedbi s kontrolom utvrđen je kod tretmana SEL160 (9,33) i SEL320 (9,13), dok je najmanji broj listova po biljci utvrđen kod tretmana SeNPs-PVP80, ali nije utvrđena statistički značajna razlika (6,95) u usporedbi s kontrolom. Općenito, utvrđen je veći broj listova po biljci kod biofortificiranih biljaka, osim kod tretmana SeNPs-PVP80. Što se tiče rasta korijena, značajno najkraći korijen utvrđen je kod tretmana SeNPs-PVP40 (41,10 cm), dok je najduži korijen izmjeren kod tretmana SeNPs-PVP320 (50,90 cm). Kod kontrole je dužina korijena iznosila 49,20 cm (Tablica 5.).

**Tablica 5.** Broj listova po biljci i dužina korijena špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP)

Tretman	Broj listova po biljci	Dužina korijena
SeNPs-PVP40	8,30 ± 0,55 <sup>a</sup>	41,10 ± 1,53 <sup>d</sup>
SeNPs-PVP80	6,95 ± 0,93 <sup>d</sup>	48,00 ± 2,35 <sup>bc</sup>
SeNPs-PVP160	8,76 ± 0,78 <sup>abc</sup>	49,70 ± 1,40 <sup>ab</sup>
SeNPs-PVP320	7,63 ± 0,83 <sup>cd</sup>	50,90 ± 2,23 <sup>a</sup>
K	7,50 ± 0,78 <sup>cd</sup>	49,20 ± 1,77 <sup>ab</sup>
SEL40	7,82 ± 1,13 <sup>bcd</sup>	47,90 ± 1,93 <sup>bc</sup>
SEL80	8,31 ± 0,96 <sup>abcd</sup>	45,90 ± 0,90 <sup>c</sup>
SEL160	9,33 ± 0,6 <sup>a</sup>	49,50 ± 1,63 <sup>ab</sup>
SEL320	9,13 ± 1,44 <sup>a</sup>	46,40 ± 1,02 <sup>c</sup>
<b>Prosjek</b>	<b>8,19</b>	<b>47,62</b>
<b>Minimum</b>	<b>6,95</b>	<b>41,10</b>
<b>Maksimum</b>	<b>9,33</b>	<b>50,90</b>

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

Biofortifikacija s oba kemijska oblika selena utjecala su na povećanje svježe mase listova po biljci u odnosu na kontrolu. Najveće svježe mase listova kod oba oblika selena utvrđene su pri koncentraciji od 160  $\mu\text{mol Se}/\text{m}^3$  hranjive otopine (SeNPs-PVP160 i

SEL160). Prosječno veće suhe mase listova po biljci utvrđene su kod tretmana selenatom u odnosu na kontrolu te SeNPs tretmane. Suha masa lista kod kontrole iznosila je 0,92 g, dok je značajno veća vrijednost u usporedbi s kontrolom utvrđena kod tretmana SEL80 (1,25 g). Najveća svježa masa korijena utvrđena je kod tretmana SeNPs-PVP80 (4,26 g), dok je najmanja svježa masa korijena utvrđena kod tretmana SEL40 (2,56 g), ali ne i statistički značajno u usporedbi s kontrolom. Kod kontrole je svježa masa korijena iznosila 3,31 g. Očekivano, najveća suha masa korijena utvrđena je kod tretmana SeNPs-PVP80 (0,25 g), a najmanja kod tretmana SEL40 (0,13 g). Prosječna vrijednost suhe mase korijena kod kontrolnih biljaka iznosila je 0,18 g (Tablica 6.).

**Tablica 6.** Svježa i suha masa špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP)

Tretman	Svježa masa lista po biljci	Suha masa lista po biljci	Svježa masa korijena po biljci	Suha masa korijena po biljci
SeNPs-PVP40	15,80 ± 0,71 <sup>abc</sup>	1,04 ± 0,07 <sup>abc</sup>	3,53 ± 0,74 <sup>abc</sup>	0,18 ± 0,03 <sup>abcd</sup>
SeNPs-PVP80	15,76 ± 2,50 <sup>abc</sup>	0,89 ± 0,13 <sup>bc</sup>	4,26 ± 0,60 <sup>a</sup>	0,25 ± 0,07 <sup>a</sup>
SeNPs-PVP160	18,22 ± 3,78 <sup>a</sup>	1,03 ± 0,13 <sup>abc</sup>	2,86 ± 0,53 <sup>bc</sup>	0,19 ± 0,03 <sup>abcd</sup>
SeNPs-PVP320	14,24 ± 2,14 <sup>bc</sup>	0,81 ± 0,16 <sup>c</sup>	3,16 ± 0,76 <sup>bc</sup>	0,17 ± 0,04 <sup>bc</sup>
K	15,35 ± 1,90 <sup>abc</sup>	0,92 ± 0,09 <sup>bc</sup>	3,31 ± 0,89 <sup>abc</sup>	0,18 ± 0,04 <sup>abcd</sup>
SEL40	13,83 ± 3,03 <sup>c</sup>	0,87 ± 0,18 <sup>c</sup>	2,56 ± 0,72 <sup>c</sup>	0,13 ± 0,04 <sup>d</sup>
SEL80	17,91 ± 2,44 <sup>ab</sup>	1,25 ± 0,14 <sup>a</sup>	3,40 ± 0,55 <sup>abc</sup>	0,20 ± 0,04 <sup>abc</sup>
SEL160	19,05 ± 5,32 <sup>a</sup>	1,20 ± 0,15 <sup>ab</sup>	3,77 ± 0,80 <sup>ab</sup>	0,23 ± 0,05 <sup>ab</sup>
SEL320	16,96 ± 4,03 <sup>abc</sup>	1,09 ± 0,16 <sup>abc</sup>	3,00 ± 0,88 <sup>bc</sup>	0,15 ± 0,05 <sup>cd</sup>
<b>Prosjek</b>	<b>16,35</b>	<b>1,01</b>	<b>3,32</b>	<b>0,19</b>
<b>Minimum</b>	<b>13,83</b>	<b>0,87</b>	<b>2,56</b>	<b>0,13</b>
<b>Maksimum</b>	<b>19,05</b>	<b>1,25</b>	<b>4,26</b>	<b>0,25</b>

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina (P < 0.05).

### 3.2.2. Sadržaj makroelemenata u korijenu špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Sadržaj N u korijenu špinata se kretao od 3,14 % kod tretmana SeNPs-PVP160 do 4,17 % kod tretmana SEL40. Općenito, veći sadržaj N utvrđen je kod tretmana selenatom u odnosu na tretmane SeNPs i kontrolu. Također, u odnosu na kontrolu utvrđen je manji sadržaj N kod svih SeNPs tretmana, osim kod tretmana SeNPs-PVP40. Općenito, biofortifikacija s oba oblika Se je utjecala na manji sadržaj P u korijenu špinata. Prema tome, značajno manji sadržaj P u usporedbi s kontrolom (0,76 %) utvrđen je kod svih tretmana biofortifikacije, osim kod tretmana SEL40 (0,76 %). Kod tretmana SeNPs zabilježen je trend smanjivanja sadržaja P povećanjem koncentracije Se u hranjivoj otopini. Slično je i kod tretmana selenatom, osim kod najveće koncentracije Se gdje je utvrđen porast sadržaja P u odnosu na prethodna 2 tretmana (Tablica 7.).

**Tablica 7.** Sadržaj makroelemenata u korijenu špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP)

Tretman	N (%)	P (%)	K (%)	Ca (%)	Mg (%)
SeNPs-PVP40	3,76 ± 0,05 <sup>cd</sup>	0,69 ± 0,01 <sup>b</sup>	6,67 ± 0,04 <sup>c</sup>	0,80 ± 0,05 <sup>d</sup>	1,48 ± 0,14 <sup>f</sup>
SeNPs-PVP80	3,25 ± 0,03 <sup>f</sup>	0,62 ± 0,01 <sup>c</sup>	6,98 ± 0,30 <sup>b</sup>	0,87 ± 0,04 <sup>c</sup>	2,35 ± 0,04 <sup>a</sup>
SeNPs-PVP160	3,14 ± 0,07 <sup>g</sup>	0,58 ± 0,01 <sup>e</sup>	5,34 ± 0,04 <sup>ef</sup>	0,98 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,24 ± 0,01 <sup>b</sup>
SeNPs-PVP320	3,25 ± 0,10 <sup>f</sup>	0,52 ± 0,01 <sup>f</sup>	6,03 ± 0,07 <sup>d</sup>	0,94 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,88 ± 0,01 <sup>c</sup>
K	3,69 ± 0,09 <sup>de</sup>	0,76 ± 0,01 <sup>a</sup>	8,70 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,70 ± 0,01 <sup>e</sup>	1,72 ± 0,01 <sup>d</sup>
SEL40	4,17 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,76 ± 0,01 <sup>a</sup>	6,95 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,67 ± 0,01 <sup>e</sup>	1,33 ± 0,01 <sup>g</sup>
SEL80	3,87 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,62 ± 0,01 <sup>c</sup>	5,41 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,83 ± 0,01 <sup>d</sup>	1,57 ± 0,01 <sup>e</sup>
SEL160	3,62 ± 0,04 <sup>e</sup>	0,60 ± 0,02 <sup>d</sup>	5,26 ± 0,06 <sup>ef</sup>	0,97 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,81 ± 0,03 <sup>c</sup>
SEL320	3,82 ± 0,06 <sup>bc</sup>	0,69 ± 0,01 <sup>b</sup>	5,19 ± 0,15 <sup>f</sup>	0,89 ± 0,01 <sup>c</sup>	1,42 ± 0,01 <sup>f</sup>
Prosjek	3,62	0,65	6,28	0,85	1,76
Minimum	3,14	0,52	5,19	0,67	1,33
Maksimum	4,17	0,76	8,70	0,98	2,35

Sadržaj makroelemenata izražen je u % suhe tvari korijena špinata. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

Također, tretmani biofortifikacije su utjecali na smanjeni sadržaj K u korijenu špinata. Prema tome, značajno manji sadržaj K u usporedbi s kontrolom (8,70%) utvrđen je kod svih tretmana biofortifikacije. Općenito, utvrđen je veći sadržaj K kod SeNPs tretmana u odnosu na tretmane selenatom. Kod tretmana selenatom, sadržaj K se smanjivao povećanjem koncentracije Se. Suprotno, utvrđen je veći sadržaj Ca kod SeNPs tretmana u odnosu na tretmane selenatom i kontrolu. Najveći sadržaj Ca utvrđen je kod tretmana SeNPs-PVP160 (0,98 %), dok je najmanji sadržaj Ca utvrđen kod tretmana SEL40 (0,67 %). SeNPs tretmani utjecali su i na povećanje sadržaja Mg u odnosu na tretmane selenatom i kontrolu. Značajno najveći sadržaj Mg utvrđen je kod tretmana SeNPs-PVP80 (2,35 %), dok je značajno najmanji utvrđen kod tretmana SEL80 (1,33 %) (Tablica 7.).

### *3.2.3. Sadržaj makroelemenata u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs*

Sadržaj N u listovima špinata se kretao od 4,38 % kod tretmana SeNPs-PVP320 do 4,79 % kod tretmana SeNPs-PVP80. Kod tretmana selenatom utvrđen je blagi porast sadržaja N povećanjem koncentracije Se. Značajno veći sadržaj N utvrđen je kod tretmana SeNPs-PVP80 u usporedbi s gotovo svim tretmanima biofortifikacije i kontrolom. Kod kontrole sadržaj N iznosio je 4,39 %. Najveći sadržaj P utvrđen je kod tretmana SeNPs-PVP40 (0,65 %), a najmanji kod tretmana SEL160 (0,52 %). Značajno manji sadržaj P u usporedbi s kontrolom utvrđen je kod tretmana SeNPs-PVP160, SEL80 i SEL160. Kod sadržaja K i listu, najveći sadržaj kod oba kemijska oblika Se utvrđen je pri najnižim koncentracijama Se (SeNPs-PVP40 i SEL40), ali nije utvrđena statistički značajna razlika u usporedbi s kontrolom. Ipak, značajno niži sadržaj K u usporedbi s kontrolom utvrđen je kod tretmana SEL160 (10,97 %). Sadržaj Ca kretao se od 0,81 % kod tretmana SeNPs-PVP80 do 1,06 % kod tretmana SEL40. Kod kontrole je sadržaj Ca iznosio 1,00 %. Općenito, veće vrijednosti sadržaja Mg utvrđene su kod tretmana selenatom u odnosu na SeNPs tretmane. Općenito, u odnosu na kontrolu tretmani biofortifikacije nisu značajno utjecali na povećanje sadržaja Mg (Tablica 8.).

**Tablica 8.** Sadržaj makroelemenata u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP)

Tretman	N (%)	P (%)	K (%)	Ca (%)	Mg (%)
SeNPs-PVP40	4,40 ± 0,25 <sup>b</sup>	0,65 ± 0,03 <sup>a</sup>	12,47 ± 0,82 <sup>a</sup>	1,05 ± 0,06 <sup>ab</sup>	1,43 ± 0,16 <sup>bcd</sup>
SeNPs-PVP80	4,79 ± 0,27 <sup>a</sup>	0,61 ± 0,06 <sup>ab</sup>	11,32 ± 0,99 <sup>bc</sup>	0,81 ± 0,09 <sup>c</sup>	1,35 ± 0,14 <sup>d</sup>
SeNPs-PVP160	4,42 ± 0,12 <sup>b</sup>	0,57 ± 0,03 <sup>bcd</sup>	12,09 ± 0,40 <sup>ab</sup>	0,96 ± 0,08 <sup>abc</sup>	1,39 ± 0,04 <sup>cd</sup>
SeNPs-PVP320	4,38 ± 0,19 <sup>b</sup>	0,61 ± 0,04 <sup>abc</sup>	11,64 ± 0,58 <sup>abc</sup>	0,91 ± 0,13 <sup>bc</sup>	1,42 ± 0,09 <sup>bcd</sup>
<b>K</b>	4,39 ± 0,12 <sup>b</sup>	0,62 ± 0,03 <sup>ab</sup>	12,01 ± 0,28 <sup>ab</sup>	1,00 ± 0,15 <sup>ab</sup>	1,49 ± 0,09 <sup>abcd</sup>
<b>SEL40</b>	4,52 ± 0,12 <sup>b</sup>	0,63 ± 0,04 <sup>ab</sup>	12,13 ± 0,56 <sup>ab</sup>	1,06 ± 0,09 <sup>ab</sup>	1,59 ± 0,04 <sup>a</sup>
<b>SEL80</b>	4,51 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,55 ± 0,03 <sup>cd</sup>	11,69 ± 0,53 <sup>abc</sup>	0,94 ± 0,07 <sup>bc</sup>	1,50 ± 0,10 <sup>abc</sup>
<b>SEL160</b>	4,54 ± 0,12 <sup>ab</sup>	0,52 ± 0,04 <sup>d</sup>	10,97 ± 0,99 <sup>c</sup>	1,13 ± 0,22 <sup>a</sup>	1,53 ± 0,09 <sup>ab</sup>
<b>SEL320</b>	4,58 ± 0,16 <sup>ab</sup>	0,62 ± 0,05 <sup>ab</sup>	11,96 ± 0,28 <sup>abc</sup>	0,96 ± 0,06 <sup>bc</sup>	1,42 ± 0,10 <sup>bcd</sup>
<b>Prosjek</b>	<b>4,51</b>	<b>0,60</b>	<b>11,81</b>	<b>0,98</b>	<b>1,46</b>
<b>Minimum</b>	<b>4,38</b>	<b>0,52</b>	<b>10,97</b>	<b>0,81</b>	<b>1,35</b>
<b>Maksimum</b>	<b>4,79</b>	<b>0,65</b>	<b>12,47</b>	<b>1,13</b>	<b>1,59</b>

Sadržaj makroelemenata izražen je u % suhe tvari lista špinata. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

#### 3.2.4. Sadržaj mikroelemenata u korijenu špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Značajno veći sadržaj Fe u usporedbi s ostalim tretmanima biofortifikacije i kontrole utvrđen je kod tretmana SeNPs-PVP80 (9576,00 mg/kg<sup>-1</sup>), dok je značajno manji sadržaj Fe u usporedbi s ostalim tretmanima biofortifikacije i kontrolom utvrđen kod tretmana SEL40 (3957,50 mg/kg<sup>-1</sup>). Kod tretmana selenatom se povećao sadržaj Fe uslijed povećanja koncentracije Se, osim pri najvećoj koncentraciji gdje je zabilježen manji sadržaj Fe u odnosu na prethodni tretman. Općenito, sadržaj Mn je bio veći kod tretmana selenatom u odnosu na SeNPs tretmane. Kod kontrole, sadržaj Mn je iznosio 3334,00 mg/kg<sup>-1</sup>. Značajno veći sadržaj Mn u usporedbi sa svim biofortificiranim biljkama i kontrolom utvrđen je kod tretmana SEL40. Općenito, biofortifikacija s oba oblika Se je utjecala na smanjeni sadržaj Zn u listovima špinata u usporedbi s kontrolom. Kod tretmana SeNPs i selenatom utvrđen je trend opadanja sadržaja Zn povećanjem koncentracije Se. Značajno veći sadržaj Cu u usporedbi s ostalim tretmanima biofortifikacije i kontrolom utvrđen je kod tretmana SeNPs-



PVP80 (35,60 mg/kg<sup>-1</sup>). Općenito, utvrđen je veći sadržaj Cu kod SeNPs tretmana u usporedbi s tretmanima selenatom (Tablica 9.).

**Tablica 9.** Sadržaj mikroelemenata u korijenu špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP)

Tretman	Fe (mg/kg <sup>-1</sup> )	Mn (mg/kg <sup>-1</sup> )	Zn (mg/kg <sup>-1</sup> )	Cu (mg/kg <sup>-1</sup> )
SeNPs-PVP40	5867,00 ± 301,30 <sup>ef</sup>	3249,00 ± 266,73 <sup>c</sup>	46,07 ± 2,26 <sup>b</sup>	19,83 ± 2,27 <sup>e</sup>
SeNPs-PVP80	9576,00 ± 250,57 <sup>a</sup>	2622,00 ± 127,01 <sup>e</sup>	43,05 ± 1,59 <sup>c</sup>	35,60 ± 1,59 <sup>a</sup>
SeNPs-PVP160	8484,50 ± 19,05 <sup>b</sup>	2850,00 ± 27,71 <sup>d</sup>	43,29 ± 0,26 <sup>c</sup>	30,78 ± 0,26 <sup>b</sup>
SeNPs-PVP320	6464,50 ± 124,13 <sup>d</sup>	2242,50 ± 45,61 <sup>f</sup>	38,40 ± 0,40 <sup>d</sup>	25,08 ± 0,40 <sup>c</sup>
K	6085,50 ± 60,62 <sup>de</sup>	3334,00 ± 6,92 <sup>c</sup>	61,25 ± 0,64 <sup>a</sup>	23,72 ± 0,65 <sup>c</sup>
SEL40	3957,50 ± 27,13 <sup>g</sup>	3863,00 ± 6,92 <sup>a</sup>	42,39 ± 1,30 <sup>c</sup>	16,07 ± 1,30 <sup>g</sup>
SEL80	5519,50 ± 69,85 <sup>f</sup>	3219,00 ± 72,74 <sup>c</sup>	38,12 ± 0,20 <sup>d</sup>	18,04 ± 0,20 <sup>f</sup>
SEL160	7311,00 ± 8,08 <sup>c</sup>	3234,00 ± 53,11 <sup>c</sup>	39,34 ± 0,37 <sup>d</sup>	22,06 ± 0,37 <sup>d</sup>
SEL320	6158,50 ± 97,57 <sup>de</sup>	3512,00 ± 57,73 <sup>b</sup>	38,10 ± 0,01 <sup>d</sup>	15,87 ± 0,10 <sup>g</sup>
Prosjek	6602,67	3125,06	43,34	23,01
Minimum	3957,50	2242,50	38,10	16,07
Maksimum	9576,60	3863,00	61,25	35,60

Sadržaj mikroelemenata izražen je u mg kg<sup>-1</sup> suhe tvari korijena špinata. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina (P < 0.05).

### 3.2.5. Sadržaj mikroelemenata u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Tretmani biofortifikacije nisu značajno utjecali na povećanje sadržaja Fe u listu špinata. Najveći sadržaj Fe utvrđen je kod tretmana SeNPs-PVP320 (535,65 mg/kg<sup>-1</sup>), a najniži kod tretmana SeNPs-PVP40 (309,18 mg/kg<sup>-1</sup>). Kod kontrole, sadržaj Fe je iznosio 389,08 mg/kg<sup>-1</sup>. Općenito, tretmani biofortifikacije nisu utjecali niti na povećanje sadržaja Mn u listovima špinata. Najveći sadržaj Mn utvrđen je kod tretmana SeNPs-PVP160 (203,12 mg/kg<sup>-1</sup>), ali ne i statistički značajan u usporedbi s kontrolom. Sadržaj Zn kretao se od 31,55 mg/kg<sup>-1</sup> kod tretmana SEL160 do 59,87 mg/kg<sup>-1</sup> kod tretmana SeNPs-PVP160. Sadržaj Zn kod svih tretmana selenatom bio je značajno manji u usporedbi s kontrolom, osim kod tretmana SEL40 gdje nije utvrđena značajna razlika. Kod SeNPs tretmana ističe se tretman

PVP160 na kojem je utvrđen značajno veći sadržaj Zn u usporedbi s ostalim tretmanima biofortifikacije i kontrolom. Općenito, utvrđen je veći sadržaj Cu kod tretmana SeNPs u odnosu na tretmane selenatom i kontrolu. Značajno veći sadržaj Cu utvrđen je kod tretmana SeNPs-PVP160 i SeNPs-PVP320 u usporedbi s tretmanima selenatom i kontrolom. Sadržaj Cu kod kontrole iznosio je 6,57 mg/kg<sup>-1</sup> (Tablica 10.).

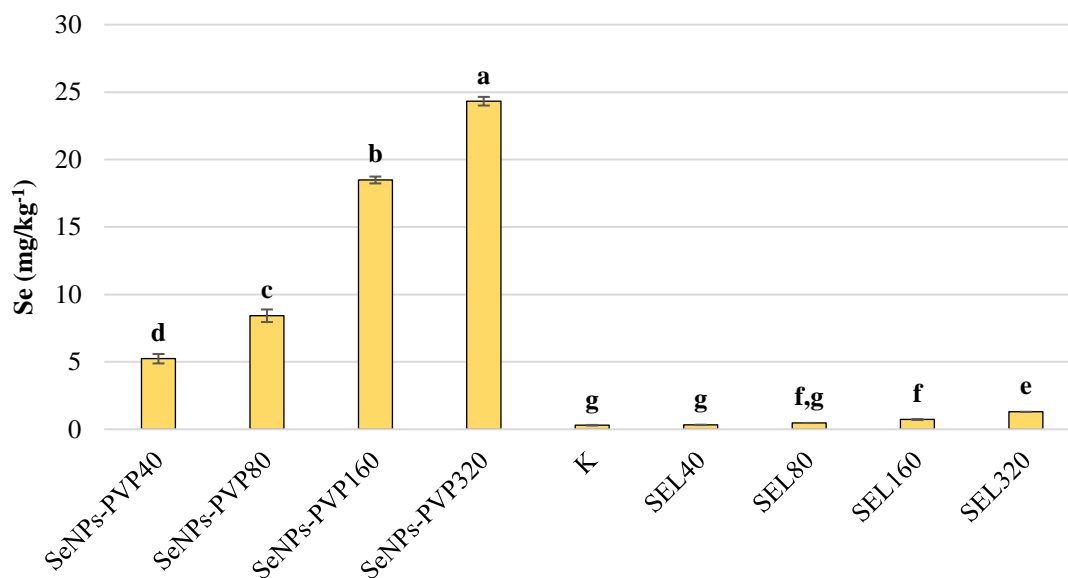
**Tablica 10.** Sadržaj mikroelemenata u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP)

Tretman	Fe (mg/kg <sup>-1</sup> )	Mn (mg/kg <sup>-1</sup> )	Zn (mg/kg <sup>-1</sup> )	Cu (mg/kg <sup>-1</sup> )
SeNPs-PVP40	309,17 ± 59,92 <sup>b</sup>	150,82 ± 13,04 <sup>c</sup>	43,63 ± 1,31 <sup>bcd</sup>	7,24 ± 0,50 <sup>ab</sup>
SeNPs-PVP80	500,90 ± 41,26 <sup>ab</sup>	169,15 ± 12,15 <sup>bc</sup>	40,02 ± 6,19 <sup>d</sup>	7,28 ± 0,32 <sup>ab</sup>
SeNPs-PVP160	434,02 ± 42,36 <sup>ab</sup>	203,12 ± 20,06 <sup>a</sup>	59,87 ± 6,72 <sup>a</sup>	7,68 ± 0,72 <sup>a</sup>
SeNPs-PVP320	535,65 ± 50,29 <sup>a</sup>	164,67 ± 11,80 <sup>bc</sup>	44,54 ± 3,20 <sup>bcd</sup>	7,77 ± 0,66 <sup>a</sup>
K	389,07 ± 35,37 <sup>ab</sup>	178,07 ± 16,90 <sup>ab</sup>	49,59 ± 3,59 <sup>b</sup>	6,57 ± 0,72 <sup>bc</sup>
SEL40	429,62 ± 38,89 <sup>ab</sup>	167,07 ± 22,09 <sup>bc</sup>	47,80 ± 5,25 <sup>bc</sup>	6,75 ± 0,72 <sup>bc</sup>
SEL80	487,30 ± 60,57 <sup>ab</sup>	165,55 ± 8,88 <sup>bc</sup>	42,36 ± 3,20 <sup>cd</sup>	5,95 ± 0,85 <sup>cd</sup>
SEL160	344,80 ± 48,41 <sup>ab</sup>	183,02 ± 22,75 <sup>ab</sup>	31,55 ± 4,91 <sup>e</sup>	5,12 ± 0,73 <sup>d</sup>
SEL320	351,75 ± 44,45 <sup>ab</sup>	181,60 ± 17,41 <sup>ab</sup>	42,41 ± 4,53 <sup>cd</sup>	6,66 ± 0,50 <sup>bc</sup>
<b>Prosjek</b>	<b>420,26</b>	<b>173,68</b>	<b>44,64</b>	<b>6,78</b>
<b>Minimum</b>	<b>309,17</b>	<b>150,82</b>	<b>31,55</b>	<b>5,12</b>
<b>Maksimum</b>	<b>535,65</b>	<b>203,12</b>	<b>59,87</b>	<b>7,77</b>

Sadržaj mikroelemenata izražen je u mg kg<sup>-1</sup> suhe tvari lista rukole. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina (P < 0.05).

### 3.2.6. Sadržaj Se u korijenu špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Tretmani biofortifikacije značajno su utjecali na povećanje sadržaja Se u korijenu špinata. Suprotno rezultatima zabilježenim u listovima špinata, sadržaj Se u korijenu je bio značajno veći kod tretmana SeNPs u usporedbi s tretmanima selenatom. Sadržaj Se kod tretmana SeNPs kretao se od 5,23 mg/kg<sup>-1</sup> kod tretmana SeNPs-PVP40 do 24,32 mg/kg<sup>-1</sup> kod tretmana SeNPs-PVP320. Kod tretmana selenatom sadržaj Se kretao se od 0,33 mg/kg<sup>-1</sup> kod tretmana SEL40 do 1,29 mg/kg<sup>-1</sup> kod tretmana SEL320. Kod kontrole sadržaj Se je iznosio 0,30 mg/kg<sup>-1</sup> (Grafikon 1.).



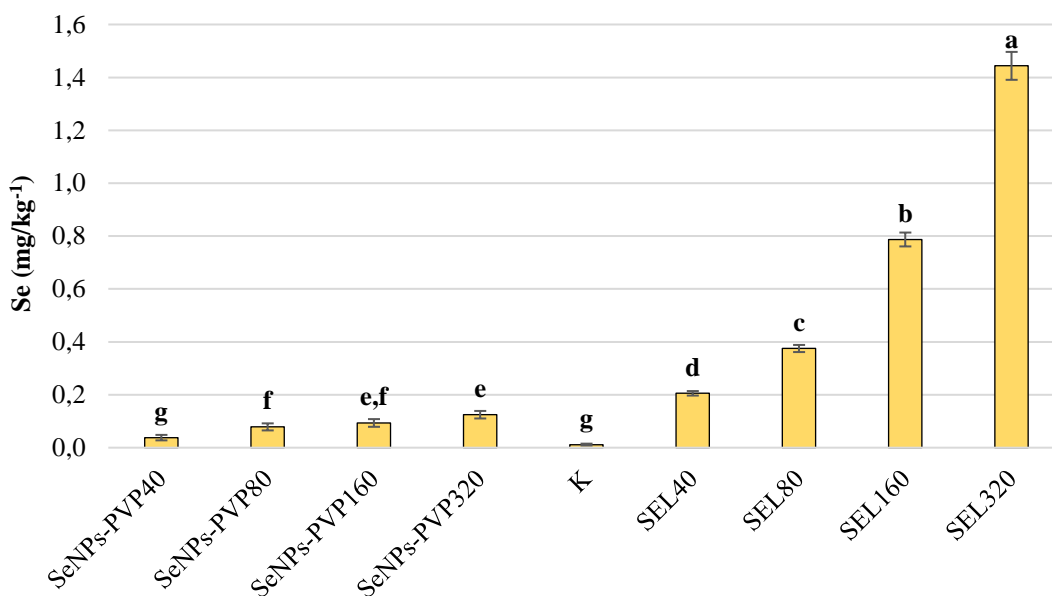
**Grafikon 1.** Sadržaj Se u korijenu špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Sadržaj Se izražen je u  $\text{mg kg}^{-1}$  suhe tvari korijena špinata. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

### 3.2.7. Sadržaj Se u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

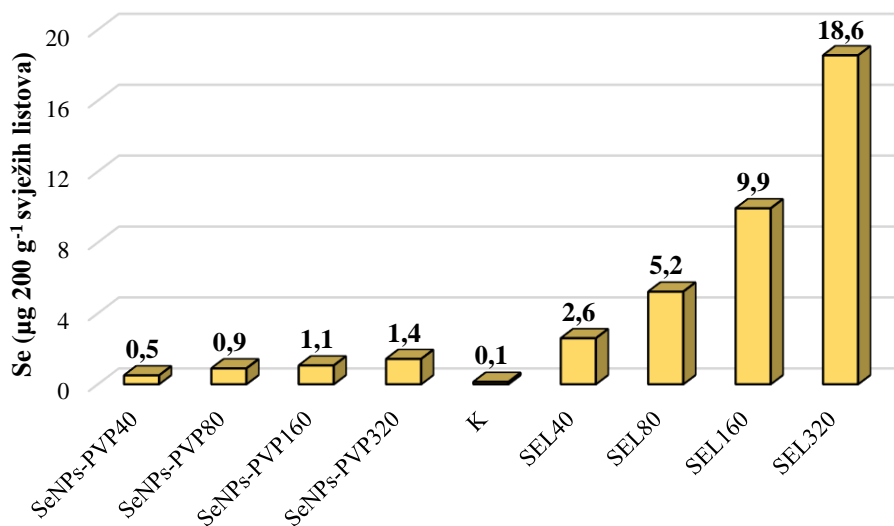
Biofortifikacija biljaka je značajno povećala koncentraciju Se u listovima špinata. Sadržaj Se u listu špinata se povećavao kako je rasla koncentracija Se dodanog u hranjivu otopinu i to kod svih biofortificiranih biljaka. Općenito, utvrđen je značajno veći sadržaj Se u listu kod tretmana selenatom u uspoređi sa SeNPs tretmanima. Sadržaj Se kod SeNPs tretmana kretao se od  $0,038 \text{ mg/kg}^{-1}$  (SeNPs-PVP40) do  $0,125 \text{ mg/kg}^{-1}$  (SeNPs-PVP320). Kod tretmana selenatom sadržaj Se kretao se od  $0,205 \text{ mg/kg}^{-1}$  (SEL40) do  $1,444 \text{ mg/kg}^{-1}$  (SEL320). Kod kontrole, sadržaj Se iznosio je  $0,011 \text{ mg/kg}^{-1}$  suhe tvari lista (Grafikon 2.).

Ukupan sadržaj selena u svježim listovima je izračunat kako je opisano u poglavlju *Materijal i metode*. Grafikon 3. prikazuje ukupan sadržaj Se ( $\mu\text{g}$ ) u 200 g svježih listova špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Iz podataka je vidljivo kako se kod biofortifikacije špinata selenatom u najvećoj koncentraciji (SEL320) zadovolji već oko 34 % dnevnih potreba (izračunato na bazi  $50 \mu\text{g dan}^{-1}$ ) odraslog čovjeka za selenom. Konzumacija svježih

listova špinata biofortificiranih SeNPs rezultira unosom male količine selena te zadovoljava tek neznatan dio dnevnih potreba (Grafikon 3.).



**Grafikon 2.** Sadržaj Se u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Sadržaj Se izražen je u mg kg<sup>-1</sup> suhe tvari listovima špinata. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina (P < 0.05).



**Grafikon 3.** Ukupan sadržaj Se (µg) u 200 g svježih listova špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP)

### 3.2.8. Koncentracije fotosintetskih pigmenata u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Tretmani biofortifikacije nisu značajno utjecali na koncentraciju Chl a, Chl b, Chl a + b i Chl a/Chl b te omjeri u listovima špinata u usporedbi s kontrolom. Najveće koncentracije Chl a, Chl b i Chl a + b utvrđene su kod dva SeNPs tretmana s nižom koncentracijom Se (SeNPs-PVP40 i SeNPs-PVP80). Ipak, biofortifikacija je utjecala na koncentraciju Car u listovima špinata. Kod tretmana SeNPs-PVP40 je utvrđeno značajno povećanje koncentracije Car u usporedbi s kontrolom. Također, tretmani biofortifikacije su utjecali na povećanje omjera Car/Chl a + Chl b. Kod tretmana SeNPs-PVP320 je utvrđeno značajno povećanje omjera Car/Chl a + Chl b u usporedbi s kontrolom. Općenito, utvrđen je veći omjer Chl a/Chl b i Car/Chl a + Chl b kod SeNPs tretmana u usporedbi s tretmanima selenatom (Tablica 11.).

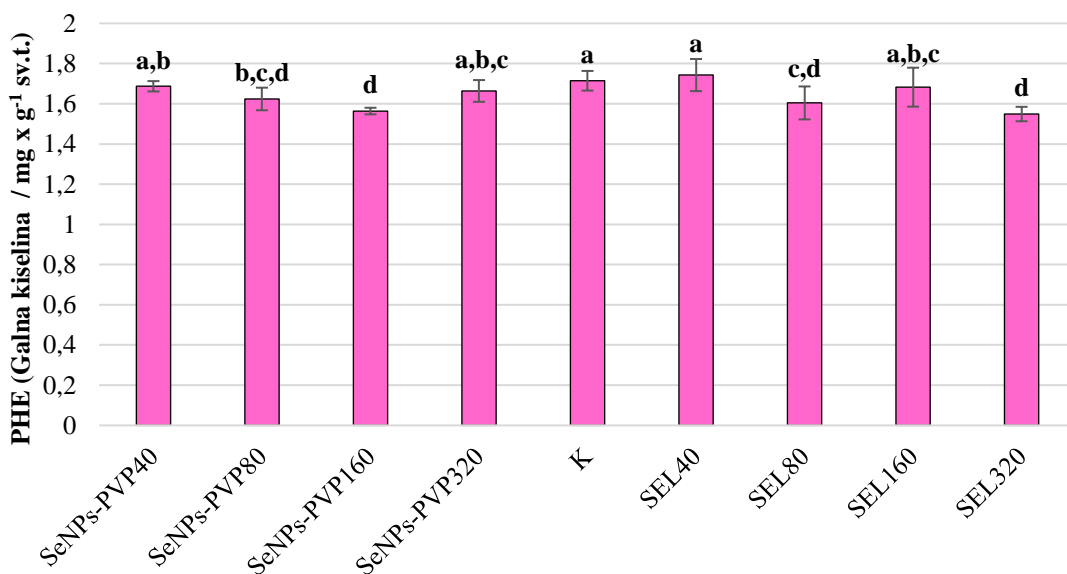
**Tablica 11.** Koncentracije fotosintetskih pigmenata u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP)

Tretman	Chl a (mg/g sv.t.)	Chl b (mg/g sv.t.)	Chl a+b (mg/g sv.t.)	Car (mg/g sv.t.)	Chl a/Chl b (mg/g sv.t.)	Car/Chl a + Chl b (mg/g sv.t.)
SeNPs-PVP40	0,62 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,83 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,18 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,95 ± 0,04 <sup>ab</sup>	0,21 ± 0,01 <sup>b</sup>
SeNPs-PVP80	0,61 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,20 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,81 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,02 <sup>ab</sup>	3,01 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,01 <sup>bc</sup>
SeNPs-PVP160	0,53 ± 0,05 <sup>b</sup>	0,17 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,70 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>cd</sup>	3,01 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,01 <sup>b</sup>
SeNPs-PVP320	0,57 ± 0,03 <sup>ab</sup>	0,19 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,75 ± 0,04 <sup>ab</sup>	0,17 ± 0,01 <sup>abc</sup>	3,01 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>a</sup>
K	0,56 ± 0,06 <sup>ab</sup>	0,19 ± 0,03 <sup>ab</sup>	0,75 ± 0,09 <sup>ab</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>bcd</sup>	2,96 ± 0,10 <sup>ab</sup>	0,21 ± 0,01 <sup>bc</sup>
SEL40	0,57 ± 0,03 <sup>ab</sup>	0,20 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,77 ± 0,04 <sup>ab</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>abc</sup>	2,91 ± 0,10 <sup>b</sup>	0,21 ± 0,01 <sup>b</sup>
SEL80	0,53 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,19 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,72 ± 0,05 <sup>b</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>d</sup>	2,82 ± 0,05 <sup>c</sup>	0,21 ± 0,01 <sup>c</sup>
SEL160	0,60 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,20 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,81 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,01 <sup>ab</sup>	2,93 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,21 ± 0,01 <sup>bc</sup>
SEL320	0,56 ± 0,03 <sup>ab</sup>	0,19 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,76 ± 0,04 <sup>ab</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>bcd</sup>	2,90 ± 0,02 <sup>bc</sup>	0,21 ± 0,01 <sup>c</sup>
<b>Prosjek</b>	<b>0,57</b>	<b>0,19</b>	<b>0,77</b>	<b>0,16</b>	<b>2,94</b>	<b>0,21</b>
<b>Minimum</b>	<b>0,52</b>	<b>0,17</b>	<b>0,70</b>	<b>0,15</b>	<b>2,82</b>	<b>0,21</b>
<b>Maksimum</b>	<b>0,62</b>	<b>0,21</b>	<b>0,83</b>	<b>0,18</b>	<b>3,01</b>	<b>0,22</b>

Rezultati su izraženi u miligramima klorofila, odnosno karotenoida po gramu svježe tvari (mg x g<sup>-1</sup> sv.t.) te su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina (P < 0.05).

### 3.2.9. Ukupan sadržaj fenolnih spojeva (PHE) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Tretmani biofortifikacije nisu značajno utjecali na povećanje sadržaja PHE u listovima špinata. Prema tome, značajno manji sadržaj PHE u usporedbi s kontrolom utvrđen je kod tretmana SeNPs-PVP80, SeNPs-PVP160, SEL80 i SEL320. Veći sadržaj PHE u usporedbi s kontrolom utvrđen je kod tretmana SEL40, ali nije utvrđena statistički značajna razlika (Grafikon 4.).

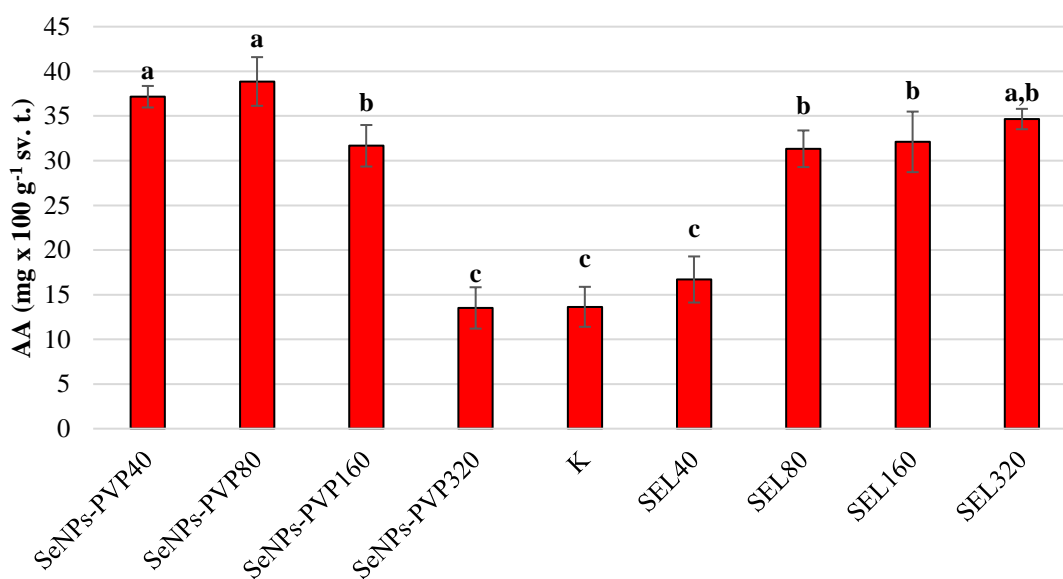


**Grafikon 4.** Ukupan sadržaj fenolnih spojeva u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi kao miligram galne kiseline na gram svježe tvari (g<sup>-1</sup> sv.t.) te su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina (P < 0.05).

### 3.2.10. Koncentracija askorbinske kiseline (AA) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Biofortifikacija s oba oblika Se je značajno utjecala na koncentracije AA kod špinata. S primjenom SeNPs značajno veća koncentracija AA u usporedbi s kontrolom utvrđena je kod svih tretmana osim kod tretmana s najvećom primijenjenom koncentracijom Se (SeNPs-PVP320). Obrnuto, kod tretmana selenatom najniža koncentracija AA utvrđena je pri

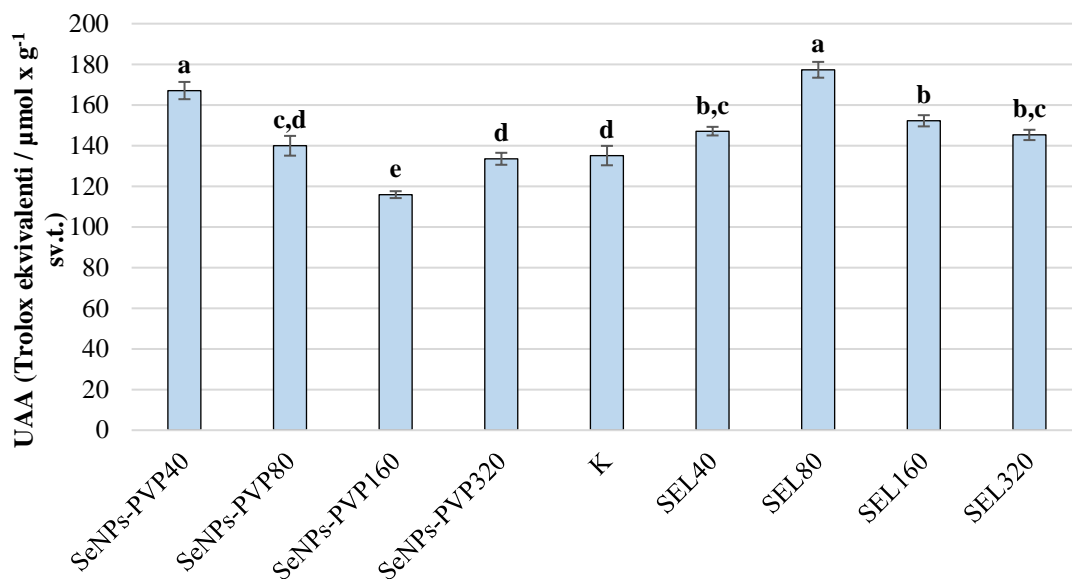
najnižoj primijenjenoj koncentraciji Se, tj. kod tretmana SEL40, dok je kod ostalih tretmana selenatom utvrđena značajno veća količina AA u usporedbi s kontrolom (Grafikon 5.).



**Grafikon 5.** Ukupna koncentracija AA u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi u miligramima askorbinske kiseline na 100 g svježe tvari (mg x 100g sv.t.) te su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

### 3.2.11. Ukupna antioksidativna aktivnost (UAA) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Općenito, biofortifikacija s oba oblika Se je značajno utjecala na ukupnu antioksidativnu aktivnost (UAA). Primjena SeNPs pri koncentraciji od  $40 \mu\text{mol m}^{-3}$  (SeNPs-PVP40) rezultirala je značajnim povećanjem UAA u usporedbi s kontrolom, dok ostali SeNPs tretmani nisu značajno utjecali na povećanje UAA. Nadalje, svi tretmani selenatom značajno su povećali UAA u odnosu na kontrolu (Grafikon 6.).

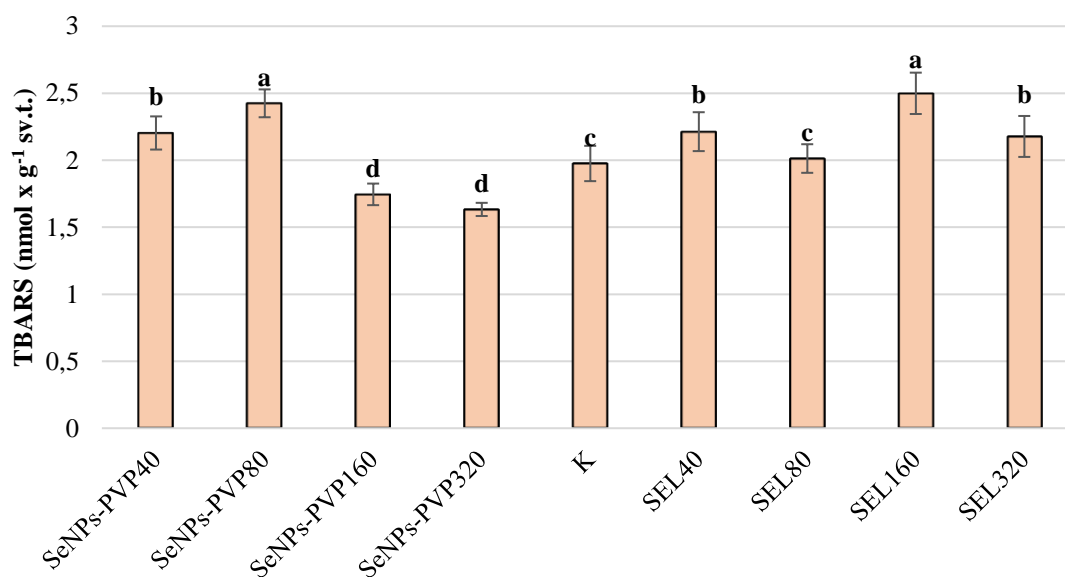


**Grafikon 6.** UAA u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi u mikromolima Troloxa na gram svježeg uzorka ( $\mu\text{mol} \times \text{g}^{-1} \text{ sv.t.}$ ) te su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

### 3.2.12. Intenzitet lipidne peroksidacije (LPO) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Tretmani biofortifikacije su značajno utjecali na promjene intenziteta LPO kod špinata. Značajno manji intenzitet LPO utvrđen je kod primjene veće koncentracije SeNPs i to kod tretmana SeNPs-PVP160 i SeNPs-PVP320 u usporedbi s kontrolom, dok je značajno veći intenzitet LPO utvrđen kod tretmana SeNPs-PVP80. Kod tretmana selenatom uglavnom je utvrđen povećan intenzitet LPO u usporedbi s kontrolom (Grafikon 7.).

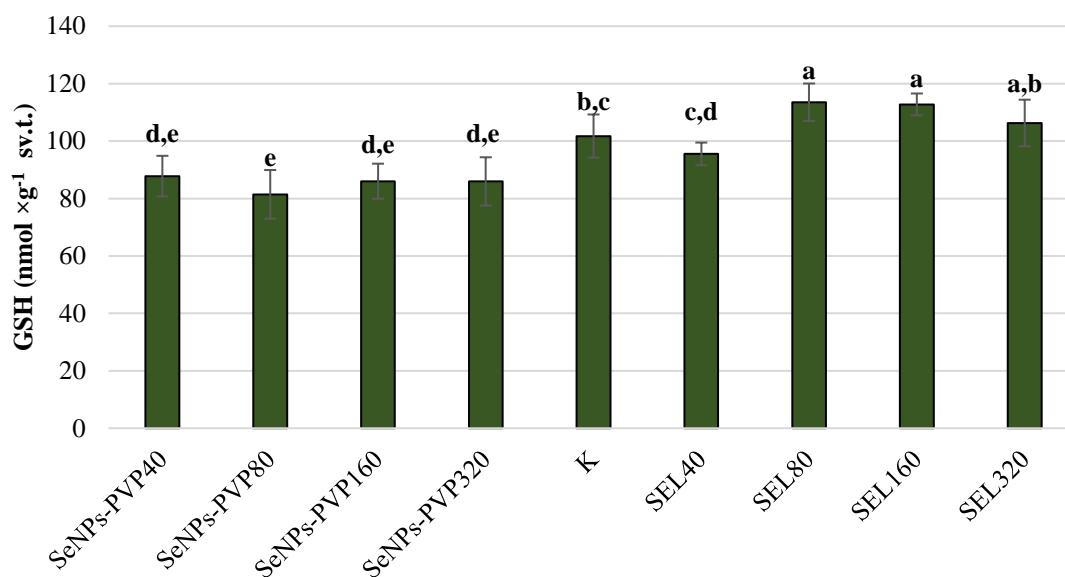




**Grafikon 7.** Intenzitet LPO (TBARS (nmol x g<sup>-1</sup> sv.t.) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi u nmol po gramu svježe tvari (nmol x g<sup>-1</sup> sv.t.) te su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina (P < 0.05).

### 3.2.13. Koncentracija reduciranog glutationa (GSH) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

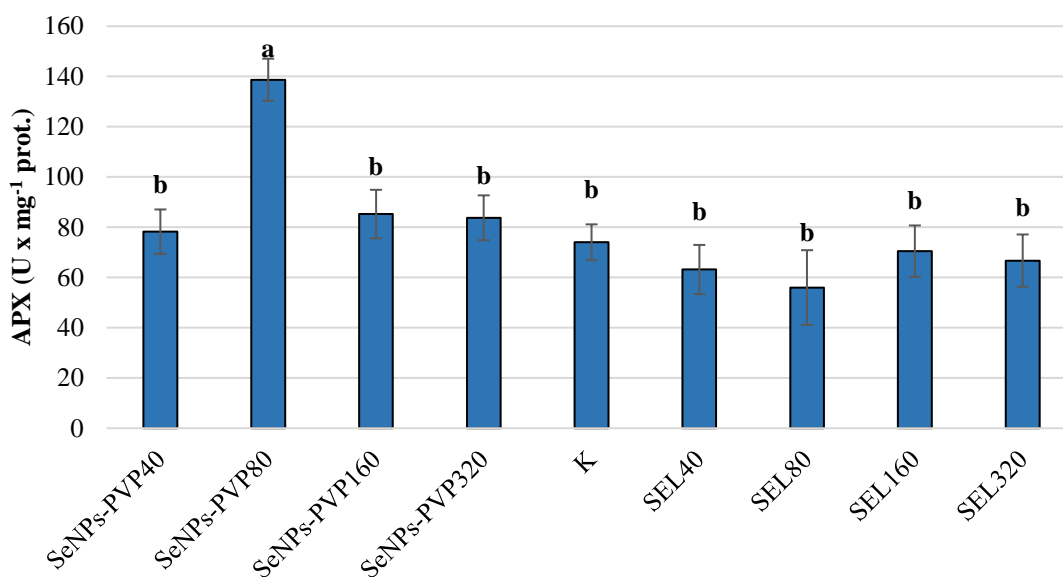
Općenito, biofortifikacija s oba oblika Se je značajno utjecala na koncentraciju GSH kod špinata. Kod svih SeNPs tretmana je utvrđeno značajno smanjenje koncentracije GSH u usporedbi s kontrolom, dok je kod tretmana selenatom utvrđeno povećanje koncentracije GSH, od kojih je kod tretmana SEL80 i SEL160 utvrđeno statistički značajno povećanje (Grafikon 8.).



**Grafikon 8.** Koncentracija GSH u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi u nmol po gramu svježje tvari (nmol × g<sup>-1</sup> sv.t.) te su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina (P < 0.05).

#### 3.2.14. Aktivnost enzima askorbat peroksidaze (APX) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

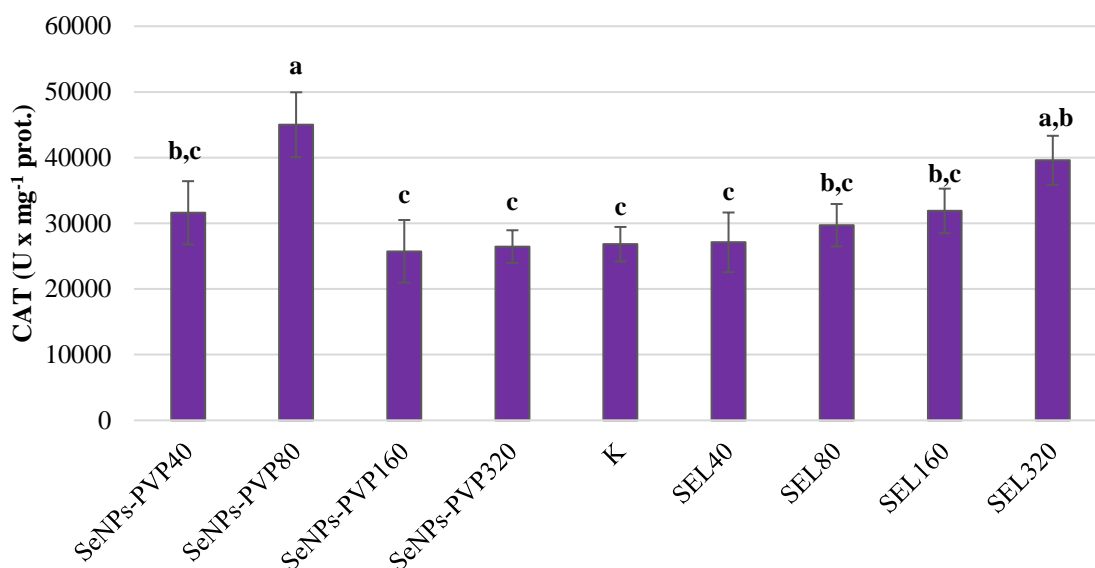
Primjena SeNPs pri koncentraciji od 80 μmol m<sup>-3</sup> (SeNPs-PVP80) rezultirala je značajnim povećanjem aktivnosti enzima APX u usporedbi s ostalim tretmanima biofortifikacije i kontrole. Tretmani selenatom nisu utjecali na aktivnosti enzima APX. Općenito, manja aktivnost APX zabilježena je kod tretmana selenatom u odnosu na SeNPs tretmane (Grafikon 9.).



**Grafikon 9.** Aktivnost enzima APX u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi jedinicama aktivnosti APX po miligramu proteina ( $U \times mg^{-1} \text{ prot.}$ ) te su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

### 3.2.15. Aktivnost enzima katalaze (CAT) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

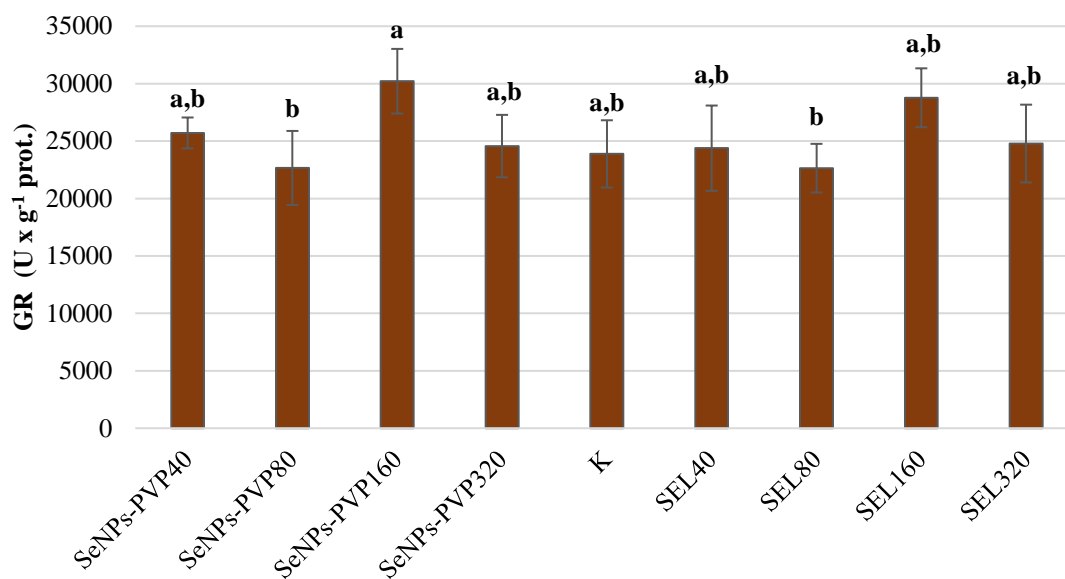
Tretmani biofortifikacije su značajno utjecali na aktivnost enzima CAT u listovima špinata. Kod SeNPs tretmana je utvrđeno povećanje aktivnosti enzima CAT u usporedbi s kontrolom, od kojih se jedino tretman SeNPs-PVP80 značajno razlikovao. Kod tretmana selenatom, aktivnosti enzima CAT su rasle povećanjem koncentracije dodanog Se te je značajno veća aktivnost enzima CAT u usporedbi s kontrolom utvrđena jedino kod tretmana SEL320 (Grafikon 10.).



**Grafikon 10.** Aktivnost enzima CAT u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi jedinicama aktivnosti CAT po miligramu proteina ( $U \times mg^{-1} \text{ prot.}$ ) te su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

### 3.2.16. Aktivnost enzima glutathion-reduktaze (GR) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

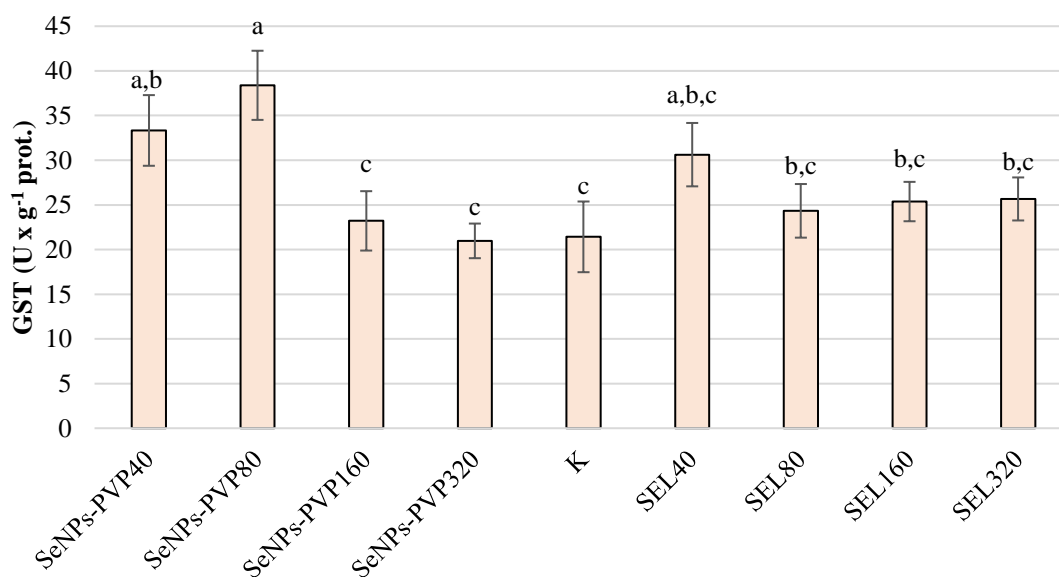
Općenito, tretmani biofortifikacije s oba oblika Se nisu značajno utjecali na aktivnosti GR kod špinata u usporedbi s kontrolom. Najveća aktivnost GR utvrđena je kod tretmana SeNPs-PVP160, dok je najmanja aktivnost utvrđena kod tretmana SEL40 (Grafikon 11.).



**Grafikon 11.** Aktivnost enzima GR u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi jedinicama aktivnosti GR po gramu proteina ( $U \times g^{-1} \text{ prot.}$ ) te su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

### 3.2.17. Aktivnost enzima glutation-S-transferaze (GST) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

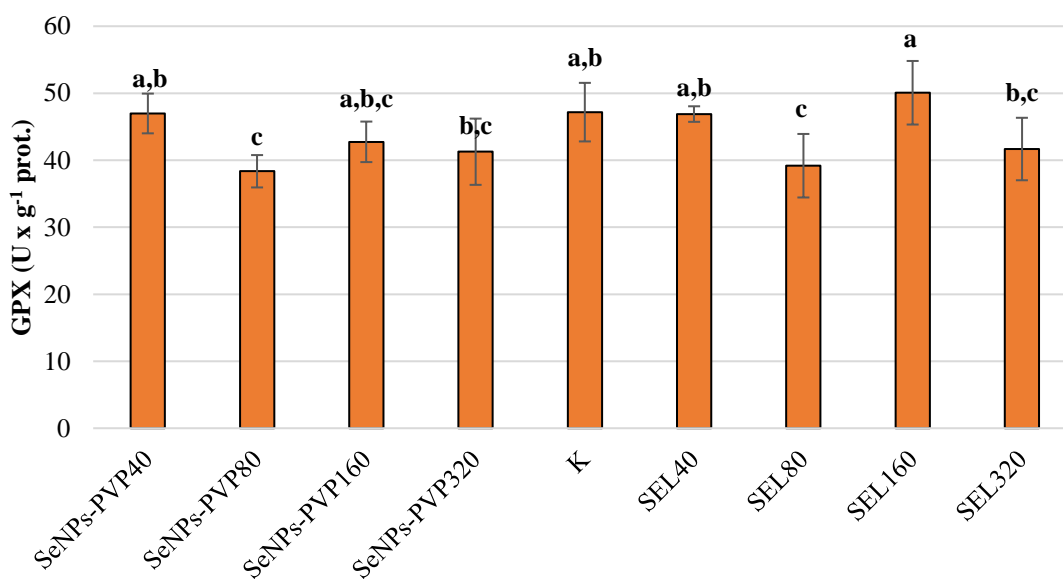
Općenito, biofortifikacija s oba oblika Se je značajno utjecala na aktivnosti GST u listovima špinata. Kod svih SeNPs tretmana je utvrđeno povećanje aktivnost GST-a u usporedbi s kontrolom te je kod tretmana SeNPs-PVP40 i SeNPs-PVP80 utvrđena značajna razlika. Također, kod svih tretmana selenatom utvrđena je veća aktivnost enzima GST u usporedbi s kontrolom, ali ne i statistički značajna razlika (Grafikon 12.).



**Grafikon 12.** Aktivnost enzima GST u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi jedinicama aktivnosti GST po gramu proteina ( $U \times g^{-1} \text{ prot.}$ ) te su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

### 3.2.18. Aktivnost enzima glutation-peroksidaze (GPX) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

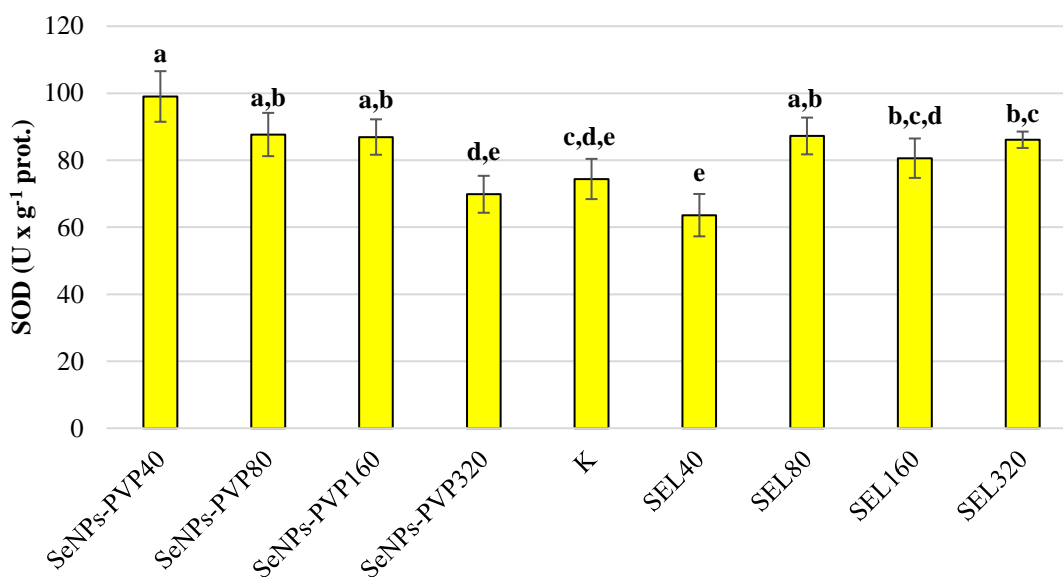
Tretmani biofortifikacije uglavnom nisu značajno utjecali na aktivnosti enzima GPX kod špinata. Najveća aktivnost GPX utvrđena je kod tretmana SEL160, ali u usporedbi s kontrolom nije utvrđeno značajno povećanje. Značajno manja aktivnost enzima GPX u usporedbi s kontrolom utvrđena je kod primjene  $80 \mu\text{mol m}^{-3}$  Se, tj. kod tretmana SeNPs-PVP80 i SEL80 (Grafikon 13.).



**Grafikon 13.** Aktivnost enzima GPX u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi jedinicama aktivnosti GPX po gramu proteina ( $U \times g^{-1} \text{ prot.}$ ) te su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

### 3.2.19. Aktivnost enzima superoksid-dismutaze (SOD) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Biofortifikacijski tretmani su značajno utjecali na aktivnosti enzima SOD kod špinata. Kod SeNPs tretmana utvrđeno je značajno povećanje aktivnosti enzima SOD u odnosu na kontrolu, osim kod tretmana SeNPs-PVP320. Kod SeNPs tretmana aktivnost enzima SOD se smanjivala povećanjem koncentracije Se. Tretman SEL80 je značajno utjecao na povećanje aktivnost enzima SOD u usporedbi s kontrolom, dok ostali tretmani selenatom nisu značajno utjecali na aktivnost enzima SOD (Grafikon 14.).



**Grafikon 14.** Aktivnost enzima SOD u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi jedinicama aktivnosti SOD po gramu proteina ( $U \times g^{-1} \text{ prot.}$ ) te su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

### 3.3. Biofortifikacijski pokus tijekom 2019. – rukola

#### 3.3.1. Morfološki pokazatelji rasta i razvoja rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Prosječan broj listova po biljci kod kontrole iznosio je 9,54. Najmanji broja listova po biljci utvrđen je kod tretmana SeNPs-PVP40 (8,74), dok je najveći broj listova utvrđen kod tretmana SEL80 (10,79). Ipak, kod SeNPs tretmana utvrđen je porast broja listova po biljci povećanjem koncentracije selena. Prosječna dužina korijena po biljci iznosila je 29,20 cm. Najduži korijen izmjeren je kod tretmana SEL80 (31,30 cm), dok je najkraći korijen izmjeren kod tretmana SEL160 (28,10 cm). Kod kontrole, prosječna dužina korijena po biljci iznosila je 30,80 cm, a značajno kraći korijen u usporedbi s kontrolom izmjeren je kod tretmana SeNPs-PVP40 i SEL160 (Tablica 12.).



**Tablica 12.** Broj listova po biljci i dužina korijena rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP)

Tretman	Broj listova po biljci	Dužina korijena
SeNPs-PVP40	8,74 ± 0,74 <sup>b</sup>	28,50 ± 1,31 <sup>c</sup>
SeNPs-PVP80	9,25 ± 0,60 <sup>ab</sup>	30,80 ± 1,43 <sup>ab</sup>
SeNPs-PVP160	9,82 ± 1,15 <sup>ab</sup>	29,30 ± 1,17 <sup>bc</sup>
SeNPs-PVP320	10,11 ± 1,31 <sup>ab</sup>	30,70 ± 1,04 <sup>ab</sup>
K	9,54 ± 0,51 <sup>ab</sup>	30,80 ± 1,89 <sup>ab</sup>
SEL40	9,86 ± 0,51 <sup>ab</sup>	29,65 ± 1,68 <sup>bc</sup>
SEL80	10,79 ± 2,21 <sup>a</sup>	31,60 ± 1,72 <sup>a</sup>
SEL160	9,02 ± 0,38 <sup>b</sup>	28,10 ± 0,78 <sup>c</sup>
SEL320	9,23 ± 0,92 <sup>ab</sup>	29,70 ± 1,12 <sup>abc</sup>
<b>Prosjek</b>	<b>9,56</b>	<b>29,90</b>
<b>Minimum</b>	<b>8,74</b>	<b>28,10</b>
<b>Maksimum</b>	<b>10,79</b>	<b>31,60</b>

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

Svježa masa lista po biljci varirala je među ispitivanim tretmanima. Niže vrijednosti u odnosu na kontrolu (5,42 g) utvrđene su kod SeNPs tretmana SeNPs-PVP40 i SeNPs-PVP80. Najveća svježa masa lista po biljci utvrđena je kod tretmana SEL320 i iznosila je 6,88 g, ali u usporedbi s kontrolom se nije značajno razlikovala. Općenito, veće svježe mase listova po biljci utvrđene su kod tretmana selenatom u odnosu na SeNPs tretmane i kontrolu. Prosječne vrijednosti suhe mase lista rukole kod SeNPs tretmana u skladu su s vrijednostima svježe mase lista te su najveće vrijednosti utvrđene kod tretmana SeNPs-PVP160 i SeNPs-PVP320. Kod tretmana SEL80 utvrđena je najveća suha masa listova (0,51 g) dok je kod kontrole ona iznosila 0,38 g. Biofortifikacija selenom nije značajno utjecala na povećanje svježe mase korijena. Nešto niže svježe mase korijena po biljci u odnosu na kontrolu (0,93 g) utvrđene su kod tretmana SeNPs-PVP40 i SEL160 (0,85 g) dok su najveće svježe mase korijena utvrđene kod tretmana SeNPs-PVP160 i SeNPs-PVP320 (1,11 g). Kod suhe mase korijena su pak javile značajne razlike te je najveća suha masa korijena u iznosu od 0,09 g izmjerena kod tretmana SEL320. Prosječna vrijednost suhe mase korijena kod nebiofortificiranih biljaka rukole iznosila je 0,06 g (Tablica 13.).

**Tablica 13.** Svježa i suha masa rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP)

Tretman	Svježa masa lista po biljci	Suha masa lista po biljci	Svježa masa korijena po biljci	Suha masa korijena po biljci
<b>SeNPs-PVP40</b>	5,13 ± 0,49 <sup>b</sup>	0,36 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,85 ± 0,18 <sup>a</sup>	0,05 ± 0,01 <sup>c</sup>
<b>SeNPs-PVP80</b>	5,28 ± 0,28 <sup>b</sup>	0,36 ± 0,13 <sup>b</sup>	0,97 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,05 ± 0,01 <sup>bc</sup>
<b>SeNPs-PVP160</b>	6,86 ± 0,49 <sup>a</sup>	0,45 ± 0,06 <sup>ab</sup>	1,11 ± 0,24 <sup>a</sup>	0,06 ± 0,01 <sup>bc</sup>
<b>SeNPs-PVP320</b>	6,47 ± 1,09 <sup>ab</sup>	0,43 ± 0,06 <sup>ab</sup>	1,11 ± 0,20 <sup>a</sup>	0,07 ± 0,02 <sup>ab</sup>
<b>K</b>	5,42 ± 0,85 <sup>ab</sup>	0,38 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,92 ± 0,26 <sup>a</sup>	0,06 ± 0,01 <sup>bc</sup>
<b>SEL40</b>	6,48 ± 0,9 <sup>ab</sup>	0,46 ± 0,06 <sup>b</sup>	1,01 ± 0,14 <sup>a</sup>	0,07 ± 0,02 <sup>ab</sup>
<b>SEL80</b>	6,31 ± 0,88 <sup>ab</sup>	0,51 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,98 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,07 ± 0,01 <sup>ab</sup>
<b>SEL160</b>	5,65 ± 0,33 <sup>ab</sup>	0,41 ± 0,06 <sup>ab</sup>	0,86 ± 0,23 <sup>a</sup>	0,06 ± 0,01 <sup>bc</sup>
<b>SEL320</b>	6,88 ± 0,99 <sup>a</sup>	0,50 ± 0,9 <sup>a</sup>	1,06 ± 0,20 <sup>a</sup>	0,09 ± 0,02 <sup>a</sup>
<b>Prosjek</b>	<b>6,05</b>	<b>0,43</b>	<b>0,99</b>	<b>0,06</b>
<b>Minimum</b>	<b>5,13</b>	<b>0,36</b>	<b>0,85</b>	<b>0,05</b>
<b>Maksimum</b>	<b>6,86</b>	<b>0,51</b>	<b>1,11</b>	<b>0,09</b>

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ )

### 3.3.2. Sadržaj makroelemenata u korijenu rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Sadržaj N u korijenu rukole se kretao od 3,07 % kod tretmana SeNPs-PVP160 do 4,22 % kod tretmana SEL160. Općenito, veći sadržaj N u korijenu rukole utvrđen je kod biofortifikacije selenatom u odnosu na biofortifikaciju SeNPs i kontrolu, od kojih su tretmani SEL40, SEL80, SEL160 značajno povećali sadržaj N u usporedbi s ostalim tretmanima biofortifikacije i kontrole. Značajno najniži sadržaj P utvrđen je kod tretmana SeNPs-PVP160 (0,96 %) u usporedbi s ostalim tretmanima biofortifikacije i kontrolom. Općenito, značajno veći sadržaj P utvrđen je kod kontrole u usporedbi s oba primijenjena oblika Se. Također, tretmani biofortifikacije su utjecali i na smanjeni sadržaj K u korijenu rukole. Prema tome, značajno veći sadržaj K utvrđen je kod kontrole (5,49 %) u usporedbi sa svim tretmanima biofortifikacije. Sadržaj Ca se kretao od 0,82 % kod tretmana SeNPs-PVP320

do 0,99 % kod tretmana SeNPs-PVP40 koji je bio i značajno najveći. Kod kontrole, sadržaj Ca iznosio je 0,85 %. Kao i kod K tretmani biofortifikacije su utjecali na smanjeni sadržaj Mg u korijenu rukole. Prema tome, značajno veći sadržaj Mg utvrđen je kod kontrole (1,72 %) u usporedbi sa svim biofortificiranim biljkama (Tablica 14.).

**Tablica 14.** Sadržaj makroelemenata u korijenu rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP)

Tretman	N (%)	P (%)	K (%)	Ca (%)	Mg (%)
SeNPs-PVP40	3,98 ± 0,03 <sup>b</sup>	1,34 ± 0,03 <sup>b</sup>	4,55 ± 0,01 <sup>d</sup>	0,99 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,28 ± 0,04 <sup>de</sup>
SeNPs-PVP80	3,97 ± 0,17 <sup>b</sup>	1,17 ± 0,01 <sup>e</sup>	3,87 ± 0,01 <sup>f</sup>	0,89 ± 0,02 <sup>c</sup>	1,36 ± 0,05 <sup>c</sup>
SeNPs-PVP160	3,07 ± 0,12 <sup>d</sup>	0,96 ± 0,05 <sup>g</sup>	3,15 ± 0,03 <sup>g</sup>	0,95 ± 0,03 <sup>b</sup>	1,22 ± 0,06 <sup>e</sup>
SeNPs-PVP320	3,96 ± 0,04 <sup>b</sup>	1,30 ± 0,04 <sup>c</sup>	4,86 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,82 ± 0,03 <sup>d</sup>	1,32 ± 0,02 <sup>cd</sup>
K	3,91 ± 0,04 <sup>b</sup>	1,40 ± 0,02 <sup>a</sup>	5,49 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,85 ± 0,03 <sup>d</sup>	1,72 ± 0,02 <sup>a</sup>
SEL40	4,10 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,31 ± 0,03 <sup>bc</sup>	4,69 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,90 ± 0,01 <sup>c</sup>	1,11 ± 0,01 <sup>f</sup>
SEL80	4,15 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,17 ± 0,03 <sup>e</sup>	4,85 ± 0,04 <sup>d</sup>	0,84 ± 0,01 <sup>d</sup>	1,34 ± 0,05 <sup>c</sup>
SEL160	4,22 ± 0,14 <sup>a</sup>	1,21 ± 0,01 <sup>d</sup>	4,46 ± 0,01 <sup>e</sup>	0,83 ± 0,02 <sup>d</sup>	1,12 ± 0,02 <sup>f</sup>
SEL320	3,76 ± 0,02 <sup>c</sup>	1,08 ± 0,02 <sup>f</sup>	4,64 ± 0,10 <sup>c</sup>	0,96 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,61 ± 0,05 <sup>b</sup>
<b>Prosjeak</b>	<b>3,90</b>	<b>1,23</b>	<b>4,60</b>	<b>0,89</b>	<b>1,38</b>
<b>Minimum</b>	<b>3,07</b>	<b>0,96</b>	<b>3,15</b>	<b>0,82</b>	<b>1,11</b>
<b>Maksimum</b>	<b>4,22</b>	<b>1,40</b>	<b>5,49</b>	<b>0,99</b>	<b>1,72</b>

Sadržaj makroelemenata izražen je u % suhe tvari korijena rukole. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

### 3.3.3. Sadržaj makroelemenata u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Sadržaj N u listu rukole se kretao od 4,33 % kod tretmana SeNPs-PVP320 do 4,90 % kod tretmana SEL160. Općenito, veće vrijednosti N utvrđene su kod tretmana selenatom u odnosu na tretmane SeNPs i kontrolu. Nadalje, biofortifikacija SeNPs je utjecala na smanjeni sadržaj N u listovima rukole, a značajno manji sadržaj N u usporedbi s kontrolom je utvrđen kod tretmana SeNPs-PVP160 i SeNPs-PVP320. Sadržaj P kod kontrole iznosio je 0,79 %, a nešto veći sadržaj utvrđen je kod tretmana SeNPs-PVP80 i SEL40, iako ne statistički značajan. Najmanji sadržaj P utvrđen je kod tretmana SeNPs-PVP320. Sadržaj K

se kod biofortifikacije SeNPs smanjivao povećanjem koncentracije Se, dok se kod tretmana selenatom povećavao povećanjem koncentracije Se. Kod tretmana SEL320 utvrđen je značajno veći sadržaj K u usporedbi s ostalim tretmanima. Sadržaj Ca se pak kretao od 2,71 % kod tretmana SeNPs-PVP320 do 3,07 % kod kontrole. Značajno niži sadržaj Ca u usporedbi s kontrolom utvrđen je kod tretmana SeNPs-PVP40, SeNPs-PVP160, SeNPs-PVP320, SEL80 i SEL320. Što se tiče sadržaja Mg, biofortifikacija s oba oblika Se je utjecala na manji sadržaj Mg u listovima rukole kao i u slučaju Ca. Sukladno navedenom, značajno manji sadržaj Mg u usporedbi s kontrolom utvrđen je kod tretmana SeNPs-PVP40, SeNPs-PVP160, SEL80 i SEL160 (Tablica 15.).

**Tablica 15.** Sadržaj makroelemenata u listu rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP)

Tretman	N (%)	P (%)	K (%)	Ca (%)	Mg (%)
SeNPs-PVP40	4,70 ± 0,14 <sup>abc</sup>	0,73 ± 0,05 <sup>bc</sup>	6,81 ± 0,08 <sup>b</sup>	2,79 ± 0,05 <sup>bc</sup>	0,95 ± 0,02 <sup>bc</sup>
SeNPs-PVP80	4,66 ± 0,18 <sup>bc</sup>	0,81 ± 0,06 <sup>ab</sup>	6,53 ± 0,038 <sup>bc</sup>	2,89 ± 0,19 <sup>abc</sup>	0,97 ± 0,08 <sup>ab</sup>
SeNPs-PVP160	4,57 ± 0,25 <sup>c</sup>	0,73 ± 0,03 <sup>bc</sup>	6,47 ± 0,43 <sup>bc</sup>	2,78 ± 0,13 <sup>bc</sup>	0,93 ± 0,06 <sup>bc</sup>
SeNPs-PVP320	4,33 ± 0,13 <sup>d</sup>	0,72 ± 0,08 <sup>c</sup>	6,20 ± 0,33 <sup>c</sup>	2,71 ± 0,21 <sup>c</sup>	0,88 ± 0,04 <sup>c</sup>
K	4,81 ± 0,12 <sup>ab</sup>	0,79 ± 0,04 <sup>abc</sup>	6,69 ± 0,31 <sup>bc</sup>	3,07 ± 0,16 <sup>a</sup>	1,05 ± 0,07 <sup>a</sup>
SEL40	4,87 ± 0,24 <sup>ab</sup>	0,81 ± 0,03 <sup>a</sup>	6,75 ± 0,31 <sup>b</sup>	2,99 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,00 ± 0,04 <sup>ab</sup>
SEL80	4,86 ± 0,12 <sup>ab</sup>	0,76 ± 0,07 <sup>abc</sup>	6,90 ± 0,19 <sup>b</sup>	2,78 ± 0,07 <sup>bc</sup>	0,94 ± 0,03 <sup>bc</sup>
SEL160	4,90 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,74 ± 0,02 <sup>abc</sup>	6,86 ± 0,49 <sup>b</sup>	2,94 ± 0,04 <sup>ab</sup>	0,96 ± 0,02 <sup>bc</sup>
SEL320	4,86 ± 0,19 <sup>ab</sup>	0,74 ± 0,02 <sup>abc</sup>	7,65 ± 0,36 <sup>a</sup>	2,72 ± 0,11 <sup>c</sup>	0,97 ± 0,10 <sup>ab</sup>
<b>Prosjek</b>	<b>4,74</b>	<b>0,76</b>	<b>6,76</b>	<b>2,87</b>	<b>0,92</b>
<b>Minimum</b>	<b>4,33</b>	<b>0,72</b>	<b>6,20</b>	<b>2,71</b>	<b>0,88</b>
<b>Maksimum</b>	<b>4,90</b>	<b>0,81</b>	<b>7,65</b>	<b>3,07</b>	<b>1,05</b>

Sadržaj makroelemenata izražen je u % suhe tvari listova rukole. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina (P < 0.05).

### 3.3.4. Sadržaj mikroelemenata u korijenu rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Značajno veći sadržaj Fe i Mn utvrđen je u korijenu u odnosu na listove rukole. Općenito, biofortifikacija s oba oblika Se je utjecala na smanjeni sadržaj Fe i Mn u listovima

rukole. Prema tome, značajno manji sadržaj Fe i Mn u usporedbi s kontrolom utvrđen je kod svih tretmana biofortifikacije. Nadalje, dok je općenito već sadržaj Fe utvrđen kod tretmana selenatom, veći sadržaj Mn je utvrđen kod SeNPs tretmana. Sadržaj Zn kretao se od 66,63 mg/kg<sup>-1</sup> kod tretmana SEL320 do 121,55 mg/kg<sup>-1</sup> kod tretmana SEL40. Kod tretmana selenatom utvrđen je trend opadanja sadržaja Zn povećanjem koncentracije Se, dok su kod SeNPs tretmana utvrđene najveće vrijednosti Zn na najnižoj i najvećoj koncentraciji Se (SeNPs-PVP40 i SeNPs-PVP320). Sadržaj Zn kod kontrole iznosio je 106,60 mg/kg<sup>-1</sup>.

Što se tiče sadržaja Cu, kod biofortificiranih biljaka je utvrđen smanjeni sadržaj Cu u korijenu rukole. Prema tome, značajno manji sadržaj Cu u usporedbi s kontrolom utvrđen je kod svih tretmana biofortifikacije. Općenito, sadržaj mikroelemenata u korijenu rukole nema pravilan trend sukladno tretmanima (Tablica 16.).

**Tablica 16.** Sadržaj mikroelemenata u korijenu rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP)

Tretman	Fe (mg/kg <sup>-1</sup> )	Mn (mg/kg <sup>-1</sup> )	Zn (mg/kg <sup>-1</sup> )	Cu (mg/kg <sup>-1</sup> )
SeNPs-PVP40	7467,50 ± 310,04 <sup>de</sup>	1687,50 ± 53,96 <sup>b</sup>	110,75 ± 1,32 <sup>b</sup>	15,18 ± 1,19 <sup>c</sup>
SeNPs-PVP80	8544,00 ± 91,22 <sup>b</sup>	1504,50 ± 25,98 <sup>c</sup>	87,88 ± 0,96 <sup>c</sup>	14,07 ± 0,51 <sup>cd</sup>
SeNPs-PVP160	6876,50 ± 586,01 <sup>f</sup>	1177,00 ± 79,67 <sup>f</sup>	88,63 ± 2,66 <sup>c</sup>	14,75 ± 1,04 <sup>cd</sup>
SeNPs-PVP320	7226,00 ± 377,58 <sup>ef</sup>	1721,00 ± 56,58 <sup>b</sup>	111,70 ± 2,42 <sup>b</sup>	14,99 ± 0,59 <sup>c</sup>
K	9537,00 ± 152,42 <sup>a</sup>	2120,50 ± 35,21 <sup>a</sup>	106,30 ± 0,46 <sup>b</sup>	23,06 ± 1,38 <sup>a</sup>
SEL40	8299,50 ± 277,70 <sup>bc</sup>	1413,50 ± 27,13 <sup>d</sup>	121,55 ± 3,29 <sup>a</sup>	13,70 ± 0,65 <sup>d</sup>
SEL80	7514,50 ± 256,92 <sup>de</sup>	1390,00 ± 12,70 <sup>d</sup>	91,74 ± 1,69 <sup>c</sup>	20,55 ± 0,54 <sup>b</sup>
SEL160	7851,50 ± 303,10 <sup>cd</sup>	1141,50 ± 30,60 <sup>f</sup>	87,75 ± 12,18 <sup>c</sup>	12,20 ± 0,38 <sup>e</sup>
SEL320	8626,00 ± 449,42 <sup>b</sup>	1262,50 ± 29,44 <sup>e</sup>	66,62 ± 0,10 <sup>d</sup>	21,39 ± 0,40 <sup>b</sup>
<b>Prosjek</b>	<b>8147,950</b>	<b>1553,850</b>	<b>97,924</b>	<b>17,299</b>
<b>Minimum</b>	<b>6876,500</b>	<b>1141,500</b>	<b>66,625</b>	<b>12,208</b>
<b>Maksimum</b>	<b>9537,000</b>	<b>2120,500</b>	<b>121,550</b>	<b>23,060</b>

Sadržaj mikroelemenata izražen je u mg kg<sup>-1</sup> suhe tvari korijena rukole. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina (P < 0.05).

### 3.3.5. Sadržaj mikroelemenata u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Biofortifikacija s oba oblika Se je utjecala na smanjeni sadržaj Fe u listovima rukole. Prema tome, značajno manji sadržaj Fe u usporedbi s kontrolom ( $493,95 \text{ mg/kg}^{-1}$ ) utvrđen je kod svih tretmana biofortifikacije. Općenito, sadržaj Fe se povećavao kod SeNPs tretmana s povećanjem koncentracije Se, osim kod tretmana s najvećom koncentracijom Se (SeNPs-PVP320). Suprotno, kod tretmana selenatom se sadržaj Fe smanjivao povećanjem koncentracije Se sve do tretmana SEL320 gdje je zabilježeno značajno povećanje Fe. Također, kod biofortificiranih biljaka je utvrđen smanjeni sadržaj Mn u listovima rukole, a značajno manji sadržaj Mn u usporedbi s kontrolom ( $199,77 \text{ mg/kg}^{-1}$ ) je utvrđen kod tretmana SeNPs-PVP40 ( $159,12 \text{ mg/kg}^{-1}$ ), SeNPs-PVP160 ( $163,92 \text{ mg/kg}^{-1}$ ), SEL80 ( $168,42 \text{ mg/kg}^{-1}$ ) i SEL320 ( $159,27 \text{ mg/kg}^{-1}$ ). Tretmani biofortifikacije nisu značajno utjecali niti na povećanje sadržaja Zn u listovima rukole (Tablica 17.).

**Tablica 17.** Sadržaj mikroelemenata u listu rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP)

Tretman	Fe ( $\text{mg/kg}^{-1}$ )	Mn ( $\text{mg/kg}^{-1}$ )	Zn ( $\text{mg/kg}^{-1}$ )	Cu ( $\text{mg/kg}^{-1}$ )
SeNPs-PVP40	$281,02 \pm 14,72^b$	$159,12 \pm 14,72^c$	$72,82 \pm 12,04^{bc}$	$5,48 \pm 0,42^{abc}$
SeNPs-PVP80	$317,97 \pm 25,74^b$	$197,65 \pm 25,75^a$	$78,36 \pm 9,17^{abc}$	$6,20 \pm 0,82^a$
SeNPs-PVP160	$330,65 \pm 6,09^b$	$163,92 \pm 6,09^{bc}$	$66,78 \pm 2,63^c$	$5,87 \pm 0,33^{ab}$
SeNPs-PVP320	$308,67 \pm 22,03^b$	$184,47 \pm 22,03^{ab}$	$82,02 \pm 13,14^{ab}$	$4,88 \pm 0,16^c$
K	$493,95 \pm 13,96^a$	$199,77 \pm 13,96^a$	$74,39 \pm 6,48^{abc}$	$5,70 \pm 0,67^{abc}$
SEL40	$299,05 \pm 7,35^b$	$178,60 \pm 7,35^{abc}$	$85,70 \pm 5,33^a$	$5,19 \pm 0,49^{bc}$
SEL80	$256,90 \pm 11,51^b$	$168,42 \pm 11,50^{bc}$	$78,19 \pm 6,22^{abc}$	$5,00 \pm 0,31^{bc}$
SEL160	$247,32 \pm 7,61^b$	$183,67 \pm 7,61^{ab}$	$67,06 \pm 4,07^c$	$5,09 \pm 0,11^{bc}$
SEL320	$366,15 \pm 12,07^b$	$159,27 \pm 12,70^c$	$47,36 \pm 2,43^d$	$5,36 \pm 0,50^{abc}$
Prosjek	<b>339,56</b>	<b>179,47</b>	<b>72,71</b>	<b>5,45</b>
Minimum	<b>247,32</b>	<b>159,27</b>	<b>47,36</b>	<b>4,88</b>
Maksimum	<b>493,95</b>	<b>199,77</b>	<b>85,70</b>	<b>6,20</b>

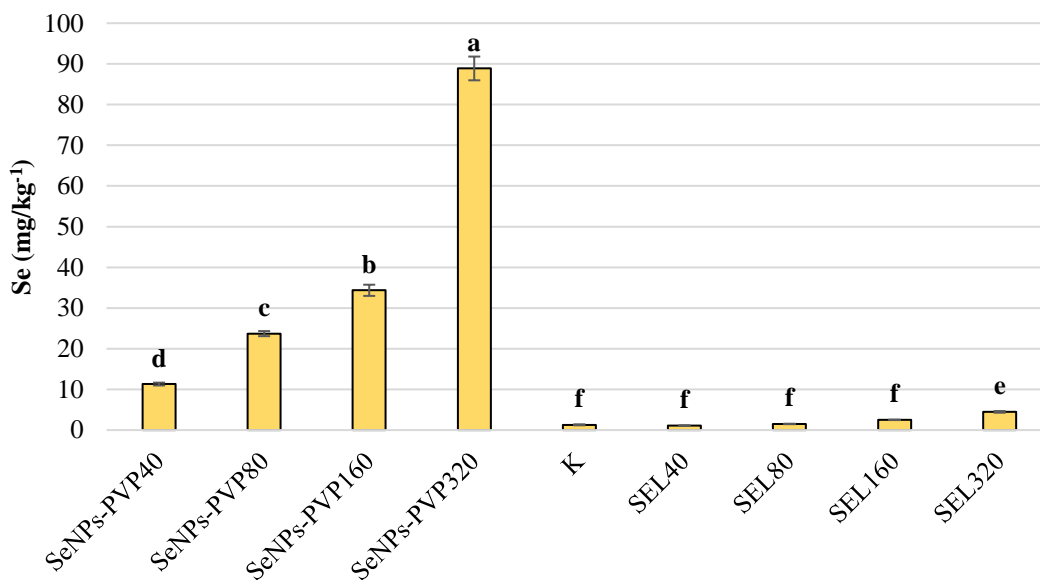
Sadržaj mikroelemenata izražen je u  $\text{mg kg}^{-1}$  suhe tvari lista rukole. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

Najveći sadržaj Zn utvrđen je kod tretmana SEL40 ( $85,70 \text{ mg/kg}^{-1}$ ), dok je najmanji sadržaj utvrđen kod tretmana SeNPs-PVP160 ( $66,78 \text{ mg/kg}^{-1}$ ). Zanimljivo, kod tretmana selenatom sadržaj Zn se smanjivao povećanjem koncentracije Se. Sadržaj Cu varirao je među

tretmanima, a najveći sadržaj Cu utvrđen je kod tretmana SeNPs-PVP80 (6,21 mg/kg<sup>-1</sup>), dok je najmanji sadržaj Cu utvrđen kod tretmana SeNPs-PVP320 (4,88 mg/kg<sup>-1</sup>). Sadržaj Cu kod kontrole iznosio je 5,70 mg/kg<sup>-1</sup> te se nije značajno razlikovao u usporedbi sa svim tretmanima biofortifikacije (Tablica 17.).

### 3.3.6. Sadržaj Se u korijenu rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Očekivano, kod biofortificiranih biljka je utvrđeno značajno povećanje sadržaja Se u korijenu rukole. Sadržaj Se u korijenu je bio značajno veći kod biofortifikacije SeNPs u usporedbi s biofortifikacijom selenatom (Grafikon 15.).



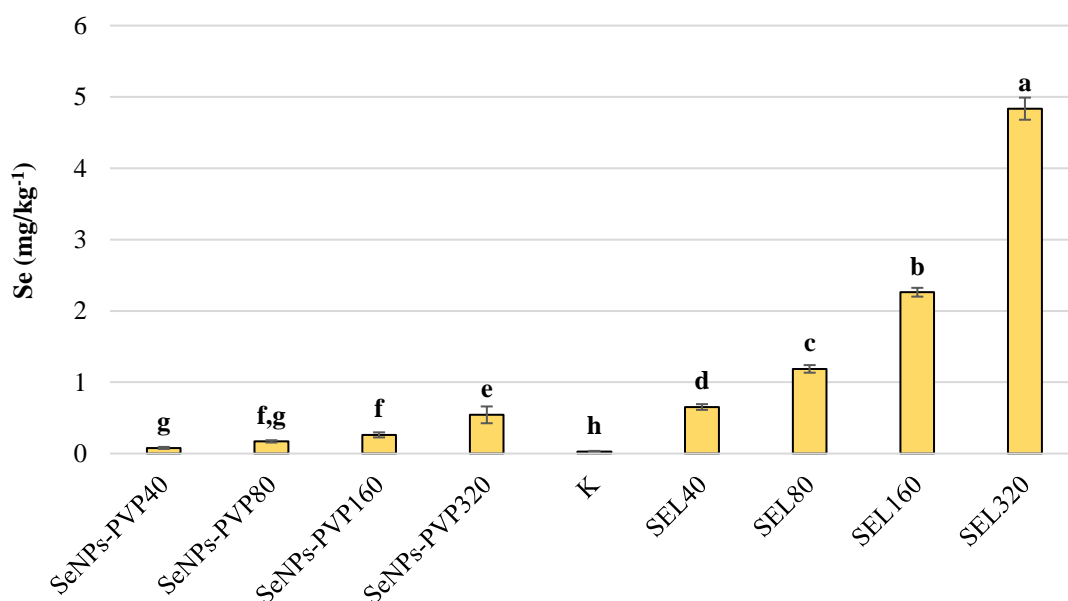
**Grafikon 15.** Sadržaj Se u korijenu rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Sadržaj Se izražen je u mg kg<sup>-1</sup> suhe tvari korijena rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

Sadržaj Se kod tretmana SeNPs kretao se od 11,31 mg/kg<sup>-1</sup> kod tretmana SeNPs-PVP40 do 88,88 mg/kg<sup>-1</sup> kod tretmana SeNPs-PVP320 što je ujedno i bio značajno najveći sadržaj Se u usporedbi s ostalim tretmanima biofortifikacije. Kod tretmana selenatom, sadržaj Se kretao

se od 1,09 mg/kg<sup>-1</sup> (SEL40) do 4,47 mg/kg<sup>-1</sup> (SEL320). Kod kontrole, sadržaj Se je iznosio 1,30 mg/kg<sup>-1</sup> (Grafikon 15.).

### 3.3.7. Sadržaj Se u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

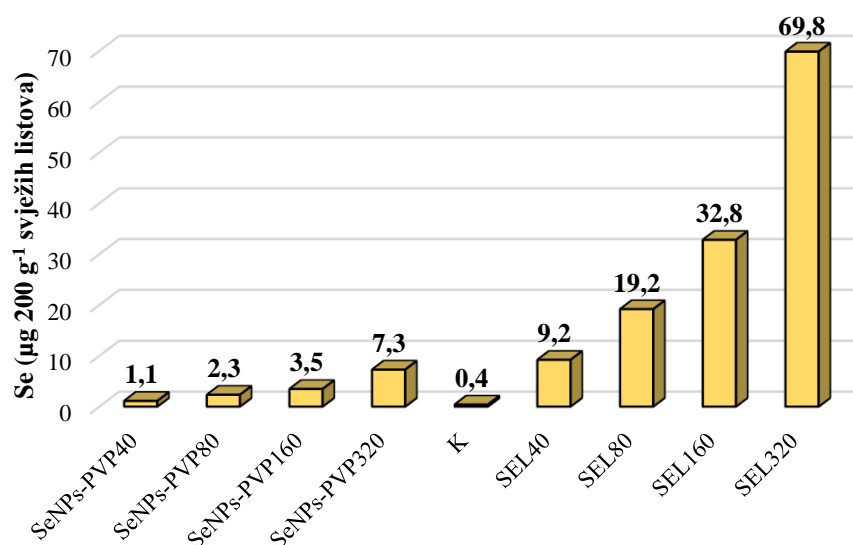
Kao i kod korijena, biofortifikacija biljaka je značajno utjecala na povećanje sadržaja Se u listovima rukole što potvrđuje hipotezu ovog istraživanja. Utvrđen je trend povećanja sadržaja Se u listovima rukole kod biofortifikacije s oba kemijska oblika Se uslijed povećanja koncentracije Se u hranjivoj otopini. Suprotno u usporedbi s trendom zapaženim kod korijena, utvrđen je značajno veći sadržaj Se kod tretmana selenatom u uspoređi sa SeNPs tretmanima. Sadržaj Se kod SeNPs tretmana kretao se od 0,079 mg/kg<sup>-1</sup> kod tretmana SeNPs-PVP40 do 0,543 mg/kg<sup>-1</sup> kod tretmana SeNPs-PVP320. Kod tretmana selenatom sadržaj Se kretao se od 0,653 mg/kg<sup>-1</sup> kod tretmana SEL40 do 4,835 mg/kg<sup>-1</sup> kod tretmana SEL320. Očekivano, kod kontrole sadržaj Se je bio neznatan te je iznosio 0,007 mg/kg<sup>-1</sup> (Grafikon 16.).



**Grafikon 16.** Sadržaj Se u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Sadržaj Se izražen je u mg kg<sup>-1</sup> suhe tvari listova rukole. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina (P < 0.05).



Što se tiče ukupnog sadržaja Se u svježim listovima rukole, biofortifikacija selenatom je rezultirala visokim sadržajem Se. U slučaju konzumacije 200 g svježih listova rukole iz tretmana SEL320, unese se 69,80  $\mu\text{g}$  Se što iznosi čak 140 % prosječnih dnevnih potreba čovjeka za selenom. Konzumacijom svježih listova rukole biofortificirane SeNPs, pri najvećoj primijenjenoj koncentraciji Se (SeNPs-PVP320) se unese oko 14,6 % prosječnih dnevnih potreba čovjeka (Grafikon 17.).



**Grafikon 17.** Ukupan sadržaj Se ( $\mu\text{g}$ ) u 200 g svježih listova rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP)

### 3.3.8. Koncentracije fotosintetskih pigmenta u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Općenito, tretmani biofortifikacije su utjecali na koncentraciju Chl a, Chl b, Chl a + b te Car u usporedbi s kontrolom. Najveća koncentracija Chl a, Chl b, Chl a + b te Car utvrđena je kod tretmana SeNPs-PVP160 koji se značajno razlikovao u usporedbi s kontrolom. Tretmani selenatom nisu značajno utjecali na povećanje koncentracije Chl a, Chl b, Chl a + b i Car u usporedbi s kontrolom. Općenito, biofortifikacija s oba oblika Se nije značajno utjecala na povećanje omjera Chl a/Chl b, dok je značajno veći omjer Car/Chl a + Chl b u usporedbi s kontrolom utvrđen kod tretmana SeNPs-PVP40 i SEL320 (Tablica 18.)

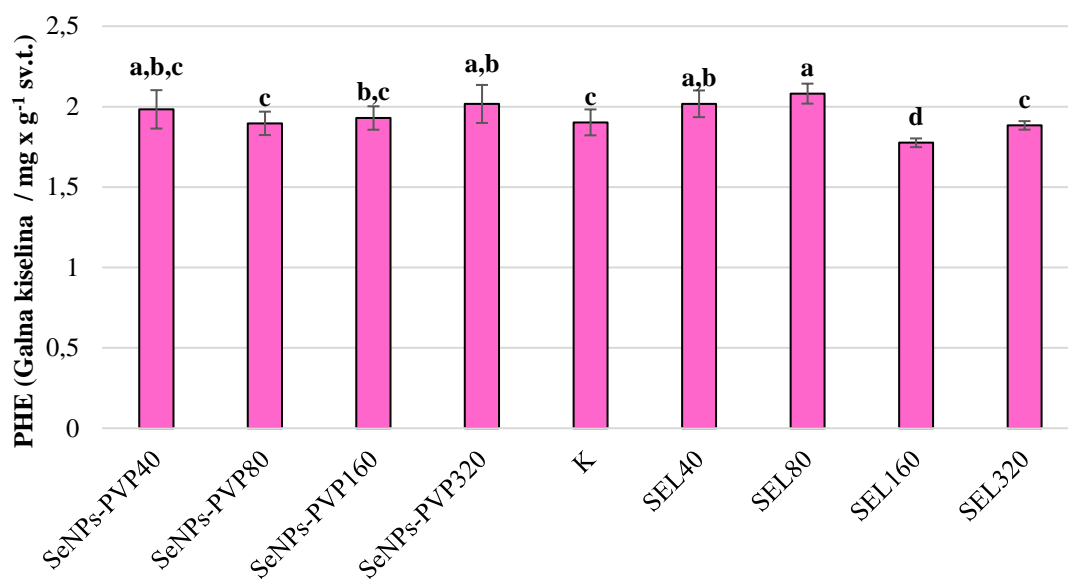
**Tablica 18.** Koncentracije biljnih pigmenta u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP).

Tretman	Chl a (mg/g sv.t.)	Chl b (mg/g sv.t.)	Chl a+b (mg/g sv.t.)	Car (mg/g sv.t.)	Chl a/Chl b (mg/g sv.t.)	Car/Chl a + Chl b (mg/g sv.t.)
SeNPs-PVP40	0,52 ± 0,03 <sup>ab</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,69 ± 0,04 <sup>ab</sup>	0,10 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,20 ± 0,03 <sup>ab</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>ab</sup>
SeNPs-PVP80	0,48 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,63 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>bc</sup>	3,22 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,14 ± 0,01 <sup>abcd</sup>
SeNPs-PVP160	0,53 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,70 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,01 <sup>ab</sup>	3,15 ± 0,07 <sup>ab</sup>	0,14 ± 0,01 <sup>abcd</sup>
SeNPs-PVP320	0,48 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,63 ± 0,04 <sup>c</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>bc</sup>	3,24 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,14 ± 0,01 <sup>bcd</sup>
K	0,47 ± 0,03 <sup>c</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,62 ± 0,03 <sup>c</sup>	0,08 ± 0,01 <sup>c</sup>	3,18 ± 0,05 <sup>ab</sup>	0,14 ± 0,01 <sup>cd</sup>
SEL40	0,48 ± 0,02 <sup>bc</sup>	0,16 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,64 ± 0,05 <sup>bc</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>abc</sup>	3,07 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>abc</sup>
SEL80	0,50 ± 0,01 <sup>abc</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,65 ± 0,02 <sup>abc</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>abc</sup>	3,15 ± 0,06 <sup>ab</sup>	0,14 ± 0,01 <sup>abcd</sup>
SEL160	0,48 ± 0,03 <sup>c</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,63 ± 0,04 <sup>bc</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>c</sup>	3,18 ± 0,04 <sup>ab</sup>	0,13 ± 0,01 <sup>d</sup>
SEL320	0,48 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,63 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,10 ± 0,01 <sup>abc</sup>	3,07 ± 0,10 <sup>b</sup>	0,15 ± 0,02 <sup>a</sup>
Prosjek	0,49	0,15	0,65	0,09	3,16	0,14
Minimum	0,47	0,15	0,62	0,08	3,07	0,13
Maksimum	0,53	0,15	0,70	0,10	3,24	0,15

Rezultati su izraženi u miligramima klorofila, odnosno karotenoida po gramu svježe tvari ( $\text{mg} \times \text{g}^{-1}$  sv.t.) te su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

### 3.3.9. Ukupan sadržaj fenolnih spojeva (PHE) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

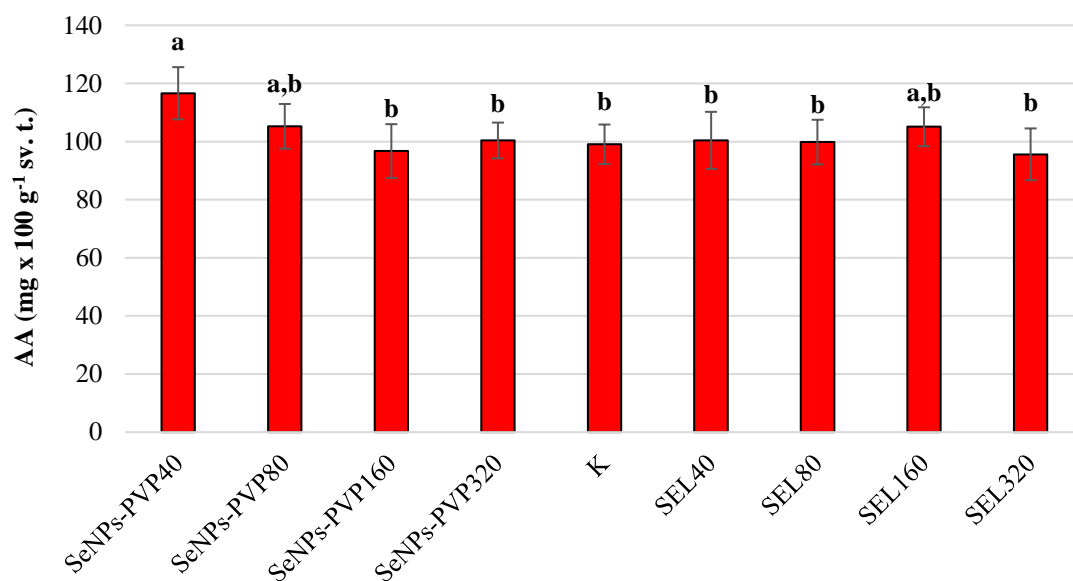
Općenito, biofortifikacija s oba oblika Se je utjecala na sadržaj PHEu listovima rukole. Nadalje, kod SeNPs tretmana značajno veći sadržaj PHE u usporedbi s kontrolom utvrđen je kod tretmana SeNPs-PVP320. Kod tretmana selenatom, značajno veći sadržaj PHE u usporedbi s kontrolom utvrđen je kod tretmana SEL40 i SEL80, dok je značajno manji sadržaj PHE u usporedbi s kontrolom utvrđen kod tretmana SEL160. Prema tome, nije bilo jasnih trendova ovisnosti sadržaja ukupnih fenola u ovisnosti o metodi biofortifikacije i koncentraciji primijenjenog Se (Grafikon 18.).



**Grafikon 18.** Ukupan sadržaj PHE u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi kao miligram galne kiseline na gram svježe tvari ( $\text{mg} \times \text{g}^{-1} \text{sv.t.}$ ) te su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

### 3.3.10. Koncentracija askorbinske kiseline (AA) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

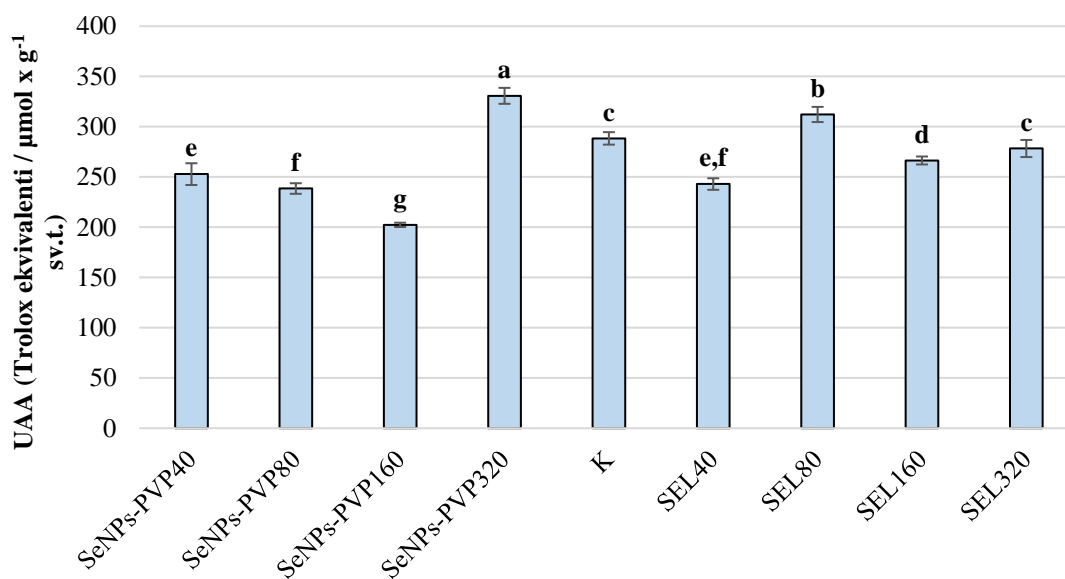
Koncentracija AA u listovima rukole je bila pod utjecajem biofortifikacijskih tretmana. Kod SeNPs-PVP40 tretmana je utvrđena najveća koncentracija AA koja se značajno razlikovala u usporedbi s kontrolom. U slučaju primjene selenata kao izvora Se, najveća koncentracija AA je izmjerena kod tretmana SEL160, ali ne i statistički značajna u usporedbi s kontrolom (Grafikon 19.).



**Grafikon 19.** Ukupna koncentracija AA u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi miligramima askorbinske kiseline na 100 g svježe tvari ( $\text{mg} \times 100\text{g}^{-1}$  sv.t.) te su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

### 3.3.11. Ukupna antioksidativna aktivnost (UAA) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

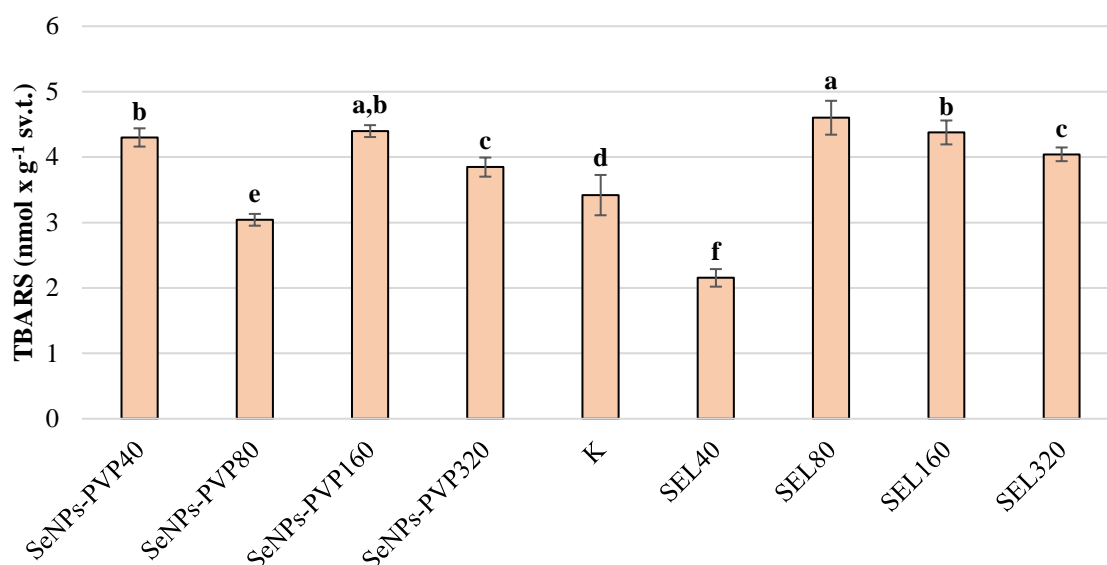
Biofortifikacija biljaka Se je značajno utjecala na UAA kod rukole. Kod SeNPs tretmana u odnosu na kontrolu, značajno povećanje UAA utvrđeno je kod tretmana SeNPs-PVP320, dok je na ostalim SeNPs tretmanima utvrđeno značajno smanjenje UAA. Kod tretmana selenatom, značajno veća UAA u usporedbi s kontrolom utvrđena je kod tretmana SEL80, dok je kod ostalih tretmana selenatom utvrđeno smanjenje UAA (Grafikon 20.).



**Grafikon 20.** UAA u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi u mikromolima Troloxa na 100 grama svježeg uzorka ( $\mu\text{mol} \times 100 \text{ g}^{-1}$  sv.t.) te su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

### 3.3.12. Intenzitet lipidne peroksidacije (LPO) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

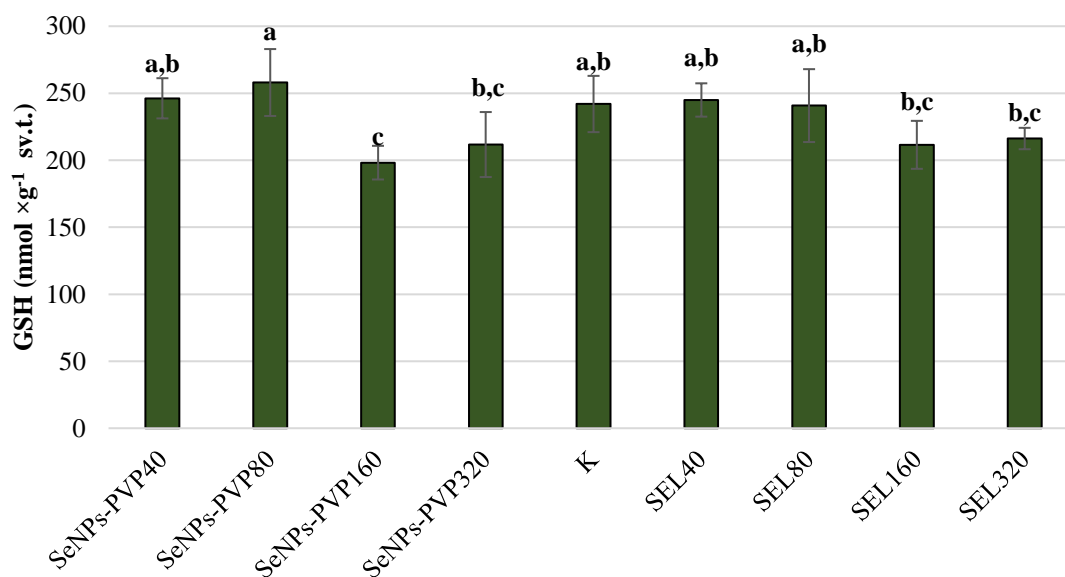
Biofortifikacija s oba oblika Se je značajno utjecala na promjenu intenziteta LPO kod rukole, a značajno niži intenzitet LPO u usporedbi s kontrolom utvrđen je kod tretmana SeNPs-PVP80 i SEL40, dok su svi ostali tretmani biofortifikacije imali značajno veći intenzitet LPO u usporedbi s kontrolom (Grafikon 21.).



**Grafikon 21.** Intenzitet LPO (TBARS (nmol x g<sup>-1</sup> sv.t.) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi u nmol po gramu svježe tvari (nmol x g<sup>-1</sup> sv.t.) te su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina (P < 0.05).

### 3.3.13. Koncentracija reduciranog glutation (GSH) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

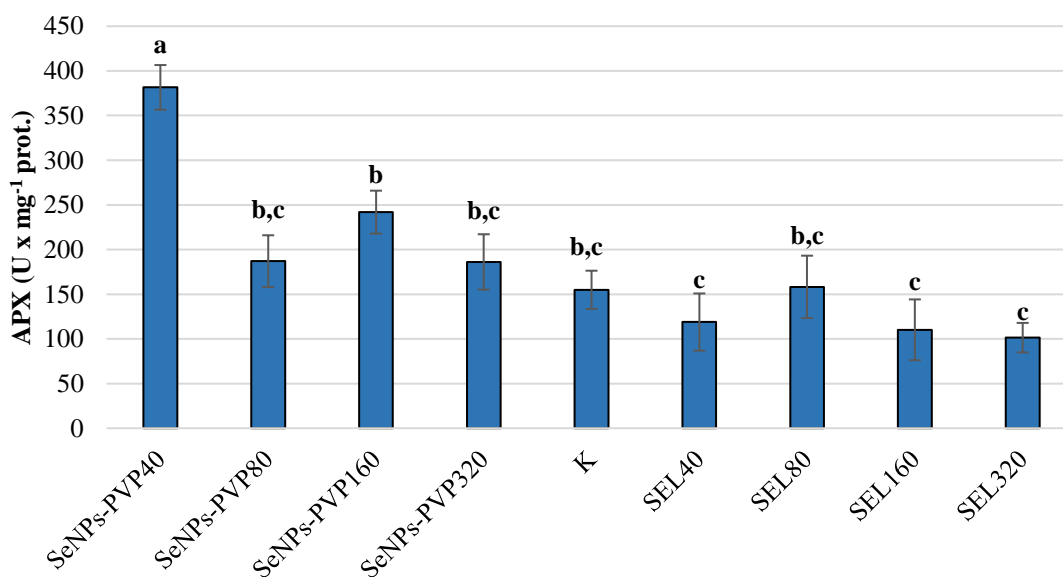
Tretmani biofortifikacije nisu značajno utjecali na koncentraciju GSH kod rukole, dok je kod pojedinih tretmana izmjerena značajno niža koncentracija GSH u usporedbi s kontrolnim biljkama. Najveća koncentracija GSH utvrđena je kod tretmana SeNPs-PVP80, a najmanja koncentracija GSH izmjerena je kod tretmana SeNPs-PVP160 (Grafikon 22.).



**Grafikon 22.** Koncentracija GSH u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi u nmol po gramu svježeg tvari (nmol × g<sup>-1</sup> sv.t.) te su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina (P < 0.05).

#### 3.3.14. Aktivnost enzima askorbat-peroksidaze (APX) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Općenito, biofortifikacija s oba oblika Se je utjecala na promjenu aktivnosti enzima APX kod rukole. Primjena SeNPs rezultirala je povećanjem aktivnosti APX u usporedbi s kontrolom, od čega je kod tretmana SeNPs-PVP40 utvrđena značajna razlika. Kod svih tretmana selenatom je utvrđeno smanjenje aktivnosti enzima APX u usporedbi s kontrolom (Grafikon 23.).

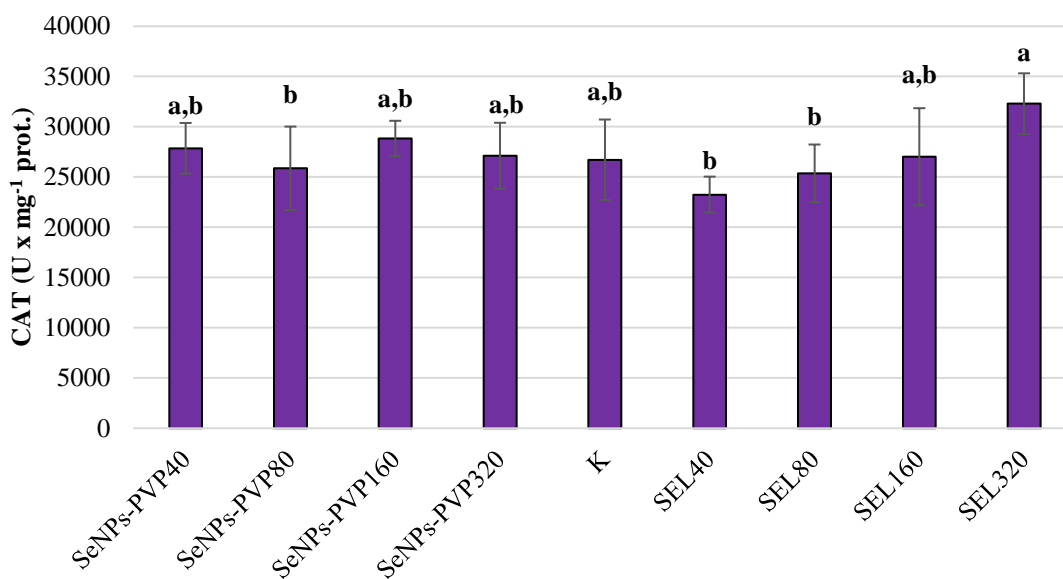


**Grafikon 23.** Aktivnost enzima APX u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi jedinicama aktivnosti APX po miligramu proteina ( $U \times mg^{-1} \text{ prot.}$ ) te su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

### 3.3.15. Aktivnost enzima katalaze (CAT) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Biofortifikacija s oba oblika Se nije značajno utjecala na aktivnosti enzima CAT kod rukole u usporedbi s kontrolnim biljkama. Međutim, utvrđen je trend povećanja aktivnosti CAT usred povećanja koncentracije Se kod biofortifikacije selenatom. Prema tome, najveća aktivnost CAT utvrđena je kod tretmana SEL320, dok je najmanja aktivnost utvrđena kod tretmana SEL40 (Grafikon 24.).

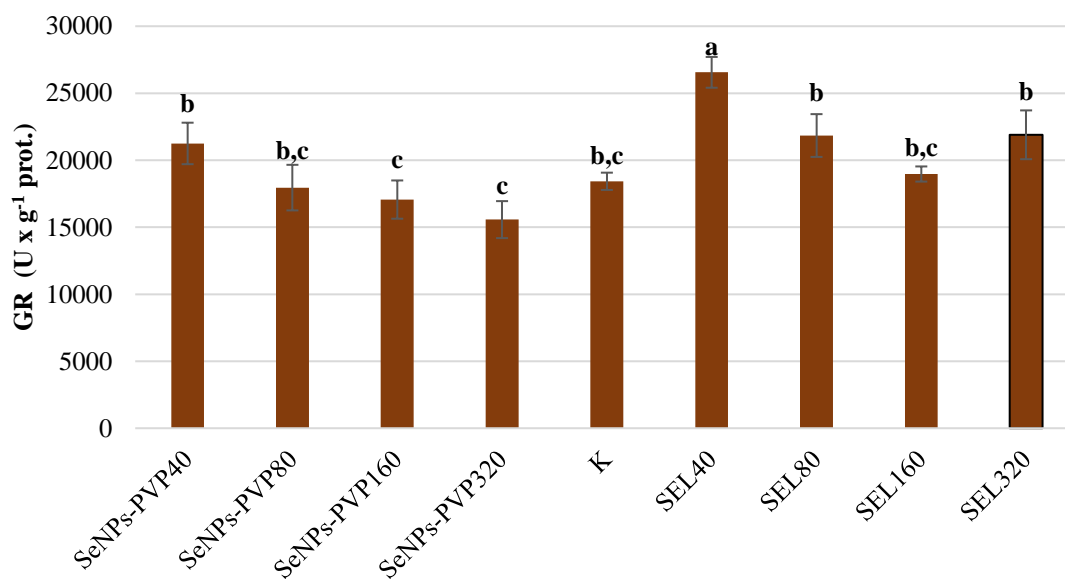




**Grafikon 24.** Aktivnost enzima CAT u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi jedinicama aktivnosti CAT po miligramu proteina ( $U \times mg^{-1} \text{ prot.}$ ) te su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

### 3.3.16. Aktivnost enzima glutation-reduktaze (GR) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

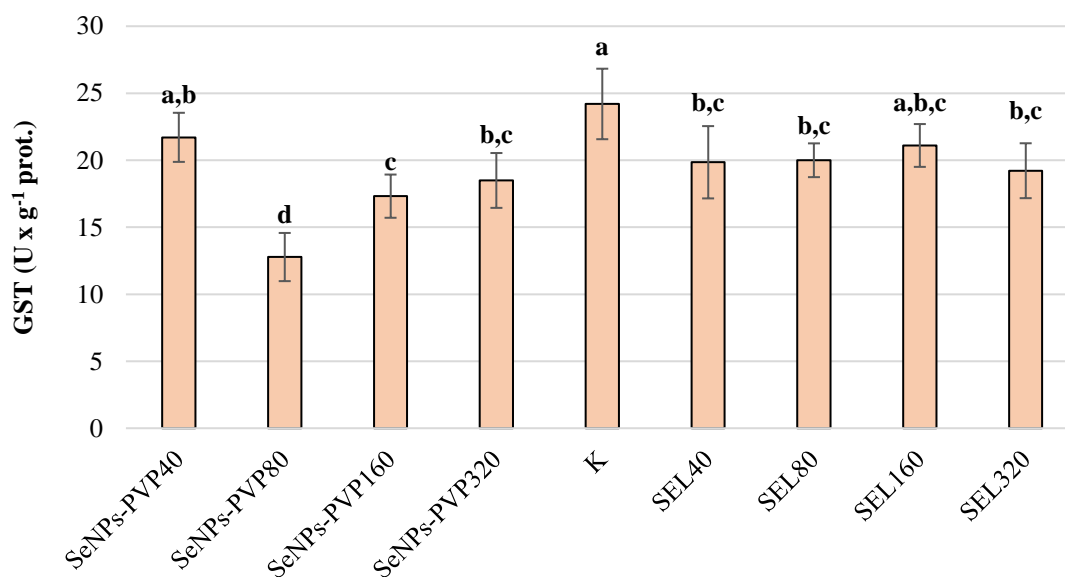
Općenito, biofortifikacijski tretmani su utjecali na promjenu aktivnosti GR u listovima rukole. Kod SeNPs tretmana, aktivnost GR se smanjivala povećanjem koncentracije Se te je utvrđena manja aktivnost enzima GR u odnosu na kontrolu osim kod tretmana SeNPs-PVP40. Sličan trend utvrđen je i kod tretmana selenatom, osim što je kod najveće koncentracije Se (SEL320) zabilježena veća aktivnost enzima GR u odnosu na prethodna dva tretmana selenatom. Nadalje, na svim tretmanima selenatom utvrđene su veće aktivnosti enzima GR u odnosu na kontrolu, od kojih je kod tretmana SEL40 utvrđena i značajna razlika (Grafikon 25.).



**Grafikon 25.** Aktivnost GR u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi jedinicama aktivnosti GR po gramu proteina ( $U \times g^{-1} \text{ prot.}$ ) te su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

### 3.3.17. Aktivnost enzima glutation-S-transferaze (GST) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

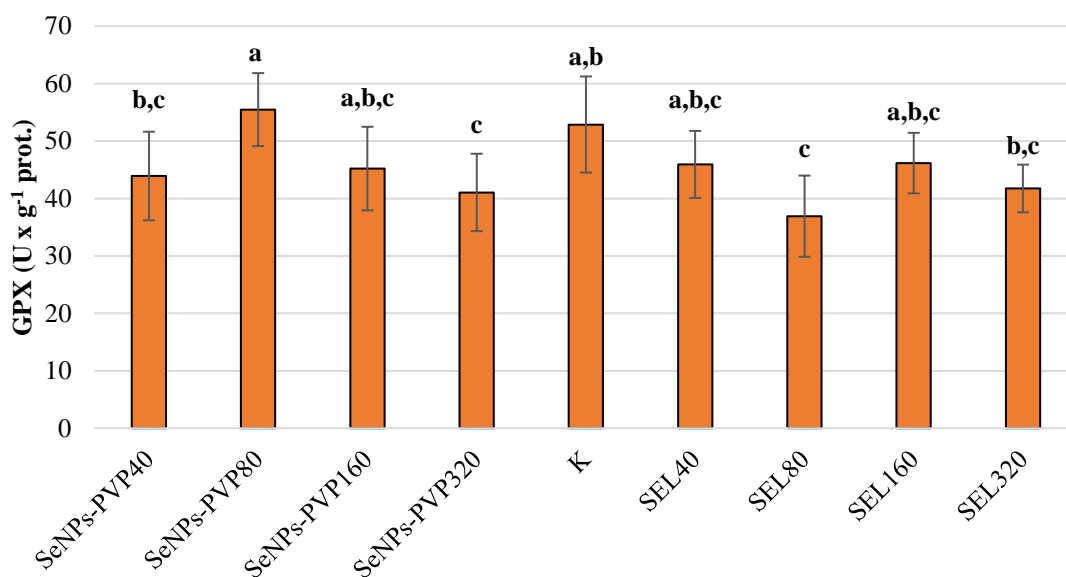
Tretmani biofortifikacije su općenito utjecali na aktivnosti GST kod rukole. Prema tome, značajno manja aktivnost enzima GST u usporedbi s kontrolom utvrđena je kod tretmana SeNPs-PVP80, SeNPS-PVP160, SeNPs-PVP320, SEL40, SEL80 i SEL320. S obzirom na dobivene rezultate aktivnosti GST-a, nije uočena pravilna ovisnost o primijenjenim tretmanima sukladno obliku i koncentraciji Se (Grafikon 26.).



**Grafikon 26.** Aktivnost enzima GST u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi jedinicama aktivnosti GST po gramu proteina ( $U \times g^{-1} \text{ prot.}$ ) te su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

### 3.3.18. Aktivnost enzima glutation-peroksidaze (GPX) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

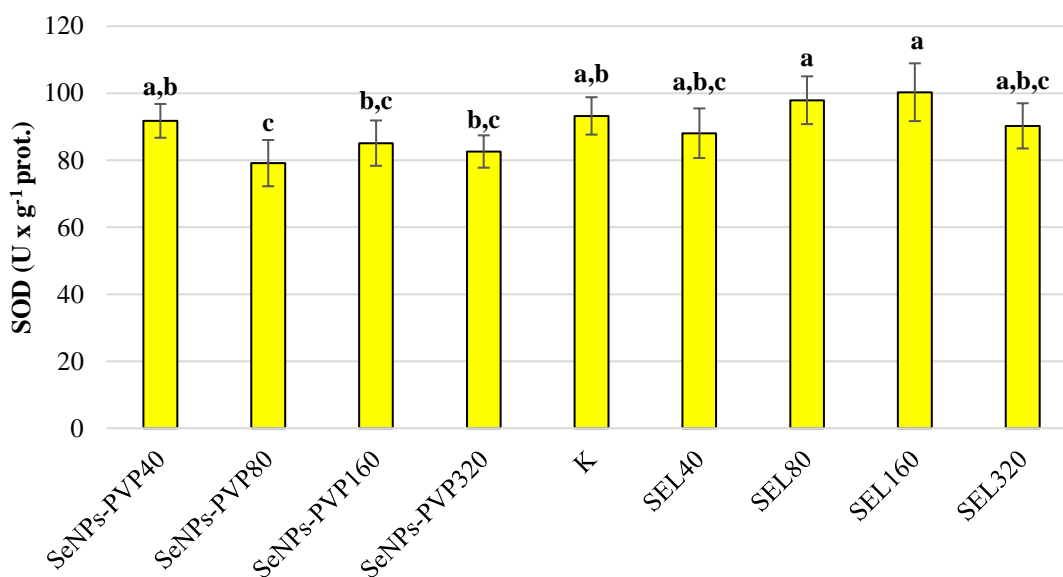
U usporedbi s kontrolnim tj. nefortificiranim biljkama, aktivnost GPX je bila smanjena kod biofortificiranih biljaka uz iznimku tretmana SeNPs-PVP80 gdje je bila veća, ali ne značajno. Značajno manja aktivnost enzima GPX u usporedbi s kontrolom utvrđena je kod tretmana SeNPs-PVP320 i SEL80 (Grafikon 27.). Općenito, promjena aktivnosti GPX-a je varirala u ovisnosti o tretmanima bez pravilnog trenda uslijed promjene koncentracije te u ovisnosti o obliku primijenjenog Se.



**Grafikon 27.** Aktivnost enzima GPX u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi jedinicama aktivnosti GPX po gramu proteina ( $U \times g^{-1} \text{ prot.}$ ) te su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

### 3.3.19. Aktivnost enzima superoksid-dismutaze (SOD) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Biofortifikacija rukole selenovim nanočesticama (SeNPs) je utjecala na smanjenje aktivnosti enzima SOD kod rukole. Prema tome, kod svih SeNPs tretmana je utvrđena manja aktivnost enzima SOD u usporedbi s kontrolom iako je samo kod tretmana SeNPs-PVP80 utvrđena značajno manja aktivnost. Kod tretmana selenatom, veća aktivnost SOD izmjerena je kod tretmana SEL80 i SEL160, ali razlika nije bila statistički značajna. Prosječno, manje vrijednosti SOD su izmjerene u slučaju biofortifikacije SeNPs u usporedbi sa selenatom (Grafikon 28.).



**Grafikon 28.** Aktivnost enzima SOD u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi jedinicama aktivnosti SOD po gramu proteina ( $U \times g^{-1} \text{ prot.}$ ) te su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

### 3.4. Biofortifikacijski pokus tijekom 2020. - špinat

Tijekom druge godine istraživanja pokus je bio modificiran te su dodana još dva biofortifikacijska tretmana selenovim nanočesticama. Nakon uspješne optimizacije sinteze selenovih nanočestica stabiliziranih polisorbitom te huminskom kiselinom iste su primijenjene kao novi oblik Se u biofortifikacijskim pokusima. Tretmani su prethodno opisani u poglavlju Materijal i metode. Zbog jasnijeg prikaza i interpretacije, ovdje su prikazani rezultati za tretmane s najvećom koncentracijom selena koja je rezultirala optimalno povećanim sadržajem Se u svježoj tvari biljke u cilju zadovoljenja dijela dnevnih potreba čovjeka za selenom.

### 3.4.1. Morfološki pokazatelji rasta i razvoja špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Biofortifikacija špinata selenom kod oba primijenjena oblika utjecala je na povećanje broja listova po biljci. Najmanji broj listova utvrđen je kod kontrole (7,46), dok je značajno veći broj listova u usporedbi s kontrolom utvrđen kod tretmana SEL320 (9,23).

Prosječna dužina korijena po biljci iznosila je 50,66 cm. Značajno najduži korijen u usporedbi s ostalim biofortificiranim tretmanima i kontrolom izmjeren je kod tretmana SeNPs-HA320 (56,20 cm). Najkraći korijen izmjeren je kod tretmana SeNPs-PS320 (47,80 cm). Kod kontrole, prosječna dužina korijena je iznosila 50,80 cm (Tablica 19.).

**Tablica 19.** Broj listova po biljci i dužina korijena špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbitom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP)

Tretman	Broj listova po biljci	Dužina korijena
SeNPs-PS320	8,17 ± 0,44 <sup>ab</sup>	47,80 ± 1,57 <sup>c</sup>
SeNPs-HA320	7,53 ± 0,93 <sup>b</sup>	56,20 ± 1,41 <sup>a</sup>
SeNPs-PVP320	8,04 ± 1,11 <sup>ab</sup>	50,30 ± 0,80 <sup>b</sup>
K	7,46 ± 0,53 <sup>b</sup>	50,80 ± 0,80 <sup>b</sup>
SEL320	9,23 ± 1,77 <sup>a</sup>	48,20 ± 1,54 <sup>c</sup>
<b>Prosjek</b>	<b>8,08</b>	<b>50,66</b>
<b>Minimum</b>	<b>7,46</b>	<b>47,80</b>
<b>Maksimum</b>	<b>9,23</b>	<b>56,20</b>

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

Općenito, veće svježe mase listova po biljci utvrđene su kod SeNPs tretmana u odnosu na tretman SEL320 (7,15 g) i kontrolu (7,08), ali značajno samo kod tretmana SeNPs-PS320 (8,49 g). Prosječne vrijednosti suhe mase listova u skladu su s vrijednostima svježe mase listova te su također kod SeNPs tretmana utvrđene značajno veće vrijednosti u usporedbi s tretmanom SEL320 (0,40 g) i kontrolom (0,45 g). Također, kod SeNPs tretmana je prosječno utvrđena i veća svježa masa korijena u odnosu na tretman SEL320 (0,61 g) te

kontrolu (0,71), ali značajno samo kod tretmana SeNPs-PVP320 (0,79 g). Međutim, najveća suha masa korijena utvrđena je kod tretmana SeNPs-PS320 (0,04 g), dok je najmanja utvrđena kod tretmana SEL320 (0,03 g) (Tablica 20.).

**Tablica 20.** Svježa i suha masa špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbitom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP).

Tretman	Svježa masa lista po biljci	Suha masa lista po biljci	Svježa masa korijena po biljci	Suha masa korijena po biljci
SeNPs-PS320	8,49 ± 0,84 <sup>a</sup>	0,57 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,76 ± 0,27 <sup>ab</sup>	0,04 ± 0,01 <sup>a</sup>
SeNPs-HA320	7,65 ± 1,01 <sup>ab</sup>	0,47 ± 0,04 <sup>c</sup>	0,77 ± 0,24 <sup>ab</sup>	0,03 ± 0,01 <sup>ab</sup>
SeNPs-PVP320	8,03 ± 0,88 <sup>ab</sup>	0,50 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,79 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,03 ± 0,01 <sup>ab</sup>
K	7,08 ± 0,35 <sup>b</sup>	0,45 ± 0,07 <sup>d</sup>	0,71 ± 0,09 <sup>b</sup>	0,03 ± 0,01 <sup>ab</sup>
SEL320	7,15 ± 1,40 <sup>b</sup>	0,40 ± 0,06 <sup>c</sup>	0,61 ± 0,30 <sup>c</sup>	0,03 ± 0,01 <sup>b</sup>
<b>Prosjeak</b>	<b>7,68</b>	<b>0,47</b>	<b>0,73</b>	<b>0,03</b>
<b>Minimum</b>	<b>7,08</b>	<b>0,40</b>	<b>0,61</b>	<b>0,03</b>
<b>Maksimum</b>	<b>8,49</b>	<b>0,57</b>	<b>0,79</b>	<b>0,04</b>

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

#### 3.4.2. Sadržaj makroelemenata u korijenu špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Sadržaj N u korijenu špinata se kretao od 3,59 % kod tretmana SeNPs-HA320 i kontrole do 3,89 % kod tretmana SeNPs-PS320. Općenito, veći sadržaj N utvrđen je kod SeNPs tretmana u odnosu na tretman SEL320 i kontrolu. Najveći sadržaj N utvrđen je kod tretmana SeNPs-PS320 (3,89 %) i SeNPs-PVP320 (3,87 %), a razlika je bila značajna u usporedbi s ostalim tretmanima biofortifikacije i kontrolom. Također, na povećanje sadržaja P najviše su utjecali SeNPs tretmani. Kod svih SeNPs tretmana utvrđen je značajno veći sadržaj P u usporedbi s tretmanom SEL320 i kontrolom. I sadržaj K je bio pod utjecajem biofortifikacijskih tretmana te je značajno najveći sadržaj K utvrđen kod tretmana SeNPs-HA320 (5,52 %) u usporedbi s ostalim tretmanima biofortifikacije i kontrolom. Najniži

sadržaj K utvrđen je kod tretmana SEL320 (4,58 %). Sadržaj S kretao se od 0,33 % kod kontrole do 0,36 % kod tretmana SeNPs-PVP320. Najmanji sadržaj S utvrđen je kod kontrole te se značajno razlikovao u usporedbi sa svim tretmanima biofortifikacije uz iznimku tretmana SeNPs-HA320. Kod sadržaja Ca u korijenu špinata utvrđeni su suprotni rezultati u usporedbi s ostalim makroelementima. Općenito, biofortifikacija s oba oblika Se je utjecala na smanjeni sadržaj Ca u korijenu špinata. Prema tome, kod kontrolnih biljaka je utvrđen značajno veći sadržaj Ca (1,00 %) u usporedbi sa svim tretmanima biofortifikacije. Nadalje, biofortifikacija s oba oblika Se je utjecala na značajno povećanje sadržaja Mg u korijenu špinata. Značajno najveći sadržaj Mg utvrđen je kod tretmana SeNPs-PS320 (1,60 %), dok je značajno najmanji sadržaj Mg utvrđen kod kontrole (1,24 %) (Tablica 21.)

**Tablica 21.** Sadržaj makroelemenata u korijenu špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbitom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP)

Tretman	N (%)	P (%)	K (%)	S (%)	Ca (%)	Mg (%)
SeNPs-PS320	3,89 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,74 ± 0,04 <sup>a</sup>	5,13 ± 0,07 <sup>b</sup>	0,34 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,94 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,60 ± 0,01 <sup>a</sup>
SeNPs-HA320	3,59 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,71 ± 0,04 <sup>b</sup>	5,52 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,33 ± 0,01 <sup>cd</sup>	0,90 ± 0,01 <sup>c</sup>	1,49 ± 0,01 <sup>b</sup>
SeNPs-PVP320	3,87 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,59 ± 0,02 <sup>c</sup>	4,66 ± 0,07 <sup>d</sup>	0,36 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,91 ± 0,01 <sup>c</sup>	1,35 ± 0,05 <sup>c</sup>
K	3,59 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,54 ± 0,04 <sup>d</sup>	4,86 ± 0,12 <sup>c</sup>	0,33 ± 0,01 <sup>d</sup>	1,00 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,24 ± 0,07 <sup>d</sup>
SEL320	3,60 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,53 ± 0,04 <sup>d</sup>	4,58 ± 0,07 <sup>d</sup>	0,33 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,94 ± 0,02 <sup>b</sup>	1,38 ± 0,06 <sup>c</sup>
<b>Prosjek</b>	<b>3,71</b>	<b>0,62</b>	<b>4,95</b>	<b>0,34</b>	<b>0,94</b>	<b>1,41</b>
<b>Minimum</b>	<b>3,59</b>	<b>0,53</b>	<b>4,58</b>	<b>0,33</b>	<b>0,30</b>	<b>1,24</b>
<b>Maksimum</b>	<b>3,89</b>	<b>0,74</b>	<b>5,52</b>	<b>0,36</b>	<b>1,00</b>	<b>1,60</b>

Sadržaj makroelemenata izražen je u % suhe tvari korijena špinata. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

### 3.4.3. Sadržaj makroelemenata u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Sadržaj N u listovima špinata se kretao od 4,86 % kod kontrole do 5,03 % kod tretmana SeNPs-PS320 koji je ujedno bio i značajno veći uspoređujući s tretmanima SeNPs-PVP320 (4,86 %), SEL320 (4,87 %) te kontrolom (4,86 %). Biofortifikacija s oba oblika Se



je utjecala na smanjeni sadržaj P u listu špinata, a značajno manji sadržaj P u usporedbi s kontrolom utvrđen je kod svih tretmana osim SeNPs-HA320. Također, tretmani biofortifikacije su utjecali i na smanjeni sadržaj K u listu špinata, a značajno manji sadržaj K u usporedbi s kontrolom utvrđen je kod tretmana SeNPs-PVP320 (9,07 %) i SEL320 (9,24 %). Sadržaj K u listovima kontrolnih biljaka iznosio je prosječno 10,54 %. Nadalje, tretmani biofortifikacije utjecali su na smanjeni sadržaj S u listovima špinata. Prema tome, kod kontrole utvrđen je najveći sadržaj S (0,41 %) te je bio značajno veći u usporedbi s tretmanima SeNP-sHA320 (0,37 %) i SeNPs-PVP320 (0,36 %). Najmanji sadržaj S u listovima špinata je izmjeren u slučaju biofortifikacije selenovim nanočesticama stabiliziranim polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP320; 0,82 %). Sadržaj Ca u listu špinata se pak kretao od 0,82 % kod tretmana SeNPs-PVP320 do 1,14 % kod tretmana SeNPs-PS320. Kod kontrole utvrđen je sadržaj Ca od 1,07 %. S obzirom na dobivene rezultate, biofortifikacijski tretmani su imali različit učinak na sadržaj Ca u listovima špinata. Što se tiče sadržaja Mg, tretmani biofortifikacije nisu imali značajan utjecaj (Tablica 22.).

**Tablica 22.** Sadržaj makroelemenata u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbitom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP)

Tretman	N (%)	P (%)	K (%)	S (%)	Ca (%)	Mg (%)
SeNPs-PS320	5,03 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,77 ± 0,01 <sup>b</sup>	9,96 ± 0,18 <sup>ab</sup>	0,40 ± 0,01 <sup>ab</sup>	1,14 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,36 ± 0,08 <sup>a</sup>
SeNPs-HA320	4,94 ± 0,16 <sup>ab</sup>	0,79 ± 0,04 <sup>ab</sup>	9,59 ± 0,11 <sup>ab</sup>	0,37 ± 0,01 <sup>bc</sup>	0,93 ± 0,10 <sup>bc</sup>	1,20 ± 0,01 <sup>a</sup>
SeNPs-PVP320	4,86 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,69 ± 0,01 <sup>b</sup>	9,07 ± 0,33 <sup>b</sup>	0,36 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,82 ± 0,06 <sup>c</sup>	1,13 ± 0,06 <sup>a</sup>
K	4,86 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,90 ± 0,13 <sup>a</sup>	10,54 ± 1,65 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,07 ± 0,23 <sup>ab</sup>	1,31 ± 0,36 <sup>a</sup>
SEL320	4,87 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,77 ± 0,01 <sup>b</sup>	9,24 ± 0,09 <sup>b</sup>	0,38 ± 0,01 <sup>abc</sup>	1,01 ± 0,02 <sup>abc</sup>	1,20 ± 0,01 <sup>a</sup>
<b>Prosjek</b>	<b>4,91</b>	<b>0,78</b>	<b>9,68</b>	<b>0,38</b>	<b>0,99</b>	<b>1,24</b>
<b>Minimum</b>	<b>4,86</b>	<b>0,69</b>	<b>9,07</b>	<b>0,36</b>	<b>0,82</b>	<b>1,13</b>
<b>Maksimum</b>	<b>5,03</b>	<b>0,90</b>	<b>10,54</b>	<b>0,41</b>	<b>1,14</b>	<b>1,36</b>

Sadržaj makroelemenata izražen je u % suhoj masi listova špinata. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina (P < 0.05).

### 3.4.4. Sadržaj mikroelemenata u korijenu špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Značajno veći sadržaj Fe utvrđen je kod tretmana SeNPs-PS320 (4678,25 mg/kg<sup>-1</sup>) u usporedbi s ostalim tretmanima biofortifikacije i kontrolom. Kod tretmana SeNPs-PVP320 (3643,25 mg/kg<sup>-1</sup>) utvrđen je pak značajno najmanji sadržaj Fe. Također, značajno veći sadržaj Mn u korijenu špinata utvrđen je kod tretmana SeNPs-PS320 (413,00 mg/kg<sup>-1</sup>), a značajno najmanji kod tretmana SeNPs-HA320 (276,83 mg/kg<sup>-1</sup>).

Nadalje, biofortifikacija SeNPs je utjecala na povećanje sadržaja Zn u korijenu špinata. Prema tome, kod SeNPs tretmana je utvrđen značajno veći sadržaj Zn u usporedbi s tretmanom SEL320 i kontrolom gdje je ujedno utvrđen i najmanji sadržaj Zn (71,64 mg/kg<sup>-1</sup>). Biofortifikacija s oba oblika Se je značajno utjecala na povećanje sadržaja Cu u korijenu špinata. Najveći sadržaj Cu utvrđen je kod tretmana SeNPs-HA320 (28,10 mg/kg<sup>-1</sup>), dok je značajno najmanji sadržaj Cu utvrđen kod kontrole (20,51 mg/kg<sup>-1</sup>) (Tablica 23.).

**Tablica 23.** Sadržaj mikroelemenata u korijenu špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbitom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP)

Tretman	Fe (mg/kg <sup>-1</sup> )	Mn (mg/kg <sup>-1</sup> )	Zn (mg/kg <sup>-1</sup> )	Cu (mg/kg <sup>-1</sup> )
SeNPs-PS320	4678,25 ± 77,86 <sup>a</sup>	413,00 ± 8,05 <sup>a</sup>	91,33 ± 2,38 <sup>a</sup>	26,74 ± 0,77 <sup>a</sup>
SeNPs-HA320	4297,00 ± 160,45 <sup>b</sup>	276,83 ± 9,14 <sup>d</sup>	90,20 ± 0,76 <sup>a</sup>	28,10 ± 0,69 <sup>a</sup>
SeNPs-PVP320	3643,25 ± 95,64 <sup>d</sup>	316,90 ± 8,28 <sup>c</sup>	75,05 ± 1,63 <sup>b</sup>	22,15 ± 0,72 <sup>c</sup>
K	4119,25 ± 132,63 <sup>b</sup>	341,03 ± 1,10 <sup>b</sup>	71,64 ± 1,25 <sup>c</sup>	20,51 ± 0,89 <sup>d</sup>
SEL320	3885,50 ± 335,74 <sup>c</sup>	348,30 ± 13,99 <sup>b</sup>	72,55 ± 3,95 <sup>c</sup>	24,66 ± 1,49 <sup>b</sup>
<b>Prosjek</b>	<b>4124,65</b>	<b>339,21</b>	<b>80,15</b>	<b>24,43</b>
<b>Minimum</b>	<b>3643,25</b>	<b>276,83</b>	<b>71,64</b>	<b>20,51</b>
<b>Maksimum</b>	<b>4678,25</b>	<b>413,00</b>	<b>91,33</b>	<b>28,10</b>

Sadržaj mikroelemenata izražen je u mg/kg<sup>-1</sup> suhe tvari korijena špinata. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina (P < 0.05).

### 3.4.5. Sadržaj mikroelemenata u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Najveći sadržaj Fe utvrđen je kod tretmana SeNPs-HA320 (1024,68 mg/kg) koji se značajno razlikovao od tretmana SEL320 (721,88 mg/kg), kontrole (754,10 mg/kg) i tretmana SeNPs-PVP320 (696,48 mg/kg) kod kojeg je ujedno i utvrđen najmanji sadržaj Fe. Biofortifikacija s oba oblika Se nije značajno utjecala na sadržaj Mn u listu špinata. Najveći sadržaj Mn utvrđen je kod tretmana SeNPs-PS320 (136,95 mg/kg), dok je najmanji sadržaj utvrđen kod tretmana SeNPs-PVP320 (116,18 mg/kg). Sadržaj Zn je bio pod utjecajem biofortifikacije selenom. Prema tome, značajno niži sadržaj Zn u usporedbi s kontrolom (99,62 mg/kg) utvrđen je kod tretmana SeNPs-PVP320 (78,71 mg/kg) i SEL320 (84,93 mg/kg). Što se tiče Cu, u usporedbi s kontrolom je značajno manji sadržaj Cu izmjeren samo u listovima biljaka kod tretmana SeNPs-PVP320 (Tablica 24.).

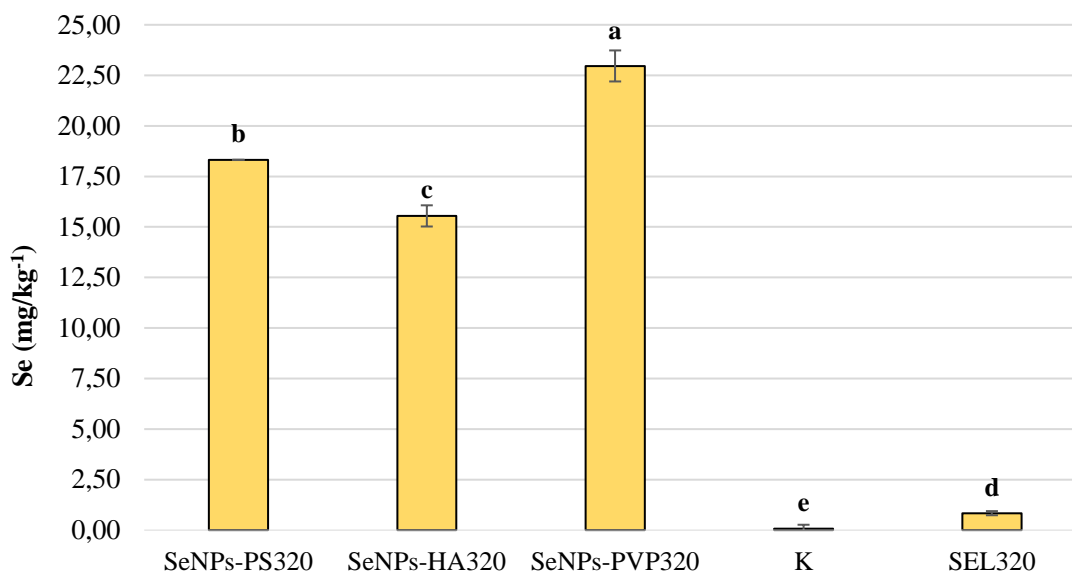
**Tablica 24.** Sadržaj mikroelemenata u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbatom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP)

Tretman	Fe (mg/kg <sup>-1</sup> )	Mn (mg/kg <sup>-1</sup> )	Zn (mg/kg <sup>-1</sup> )	Cu (mg/kg <sup>-1</sup> )
SeNPs-PS320	873,05 ± 62,93 <sup>ab</sup>	136,95 ± 8,82 <sup>a</sup>	93,51 ± 2,56 <sup>ab</sup>	13,14 ± 0,24 <sup>a</sup>
SeNPs-HA320	1024,68 ± 29,22 <sup>a</sup>	126,38 ± 1,53 <sup>a</sup>	88,88 ± 1,19 <sup>abc</sup>	13,03 ± 0,45 <sup>a</sup>
SeNPs-PVP320	696,48 ± 86,89 <sup>b</sup>	116,18 ± 9,08 <sup>a</sup>	78,71 ± 5,06 <sup>c</sup>	9,63 ± 0,97 <sup>b</sup>
K	754,10 ± 99,03 <sup>b</sup>	135,45 ± 28,90 <sup>a</sup>	99,62 ± 16,40 <sup>a</sup>	12,79 ± 2,40 <sup>a</sup>
SEL320	724,88 ± 17,46 <sup>b</sup>	131,30 ± 1,82 <sup>a</sup>	84,93 ± 1,00 <sup>bc</sup>	11,86 ± 0,27 <sup>a</sup>
<b>Prosjek</b>	<b>814,64</b>	<b>129,25</b>	<b>89,13</b>	<b>12,09</b>
<b>Minimum</b>	<b>696,48</b>	<b>116,18</b>	<b>78,71</b>	<b>9,63</b>
<b>Maksimum</b>	<b>1024,68</b>	<b>136,95</b>	<b>99,62</b>	<b>13,14</b>

Sadržaj mikroelemenata izražen je u mg/kg<sup>-1</sup> suhe tvari listova špinata. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina (P < 0.05).

### 3.4.6. Sadržaj Se u korijenu špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Sadržaj Se u korijenu špinata bio je značajno veći kod SeNPs tretmana u usporedbi s tretmanom SEL320 i kontrolom. Značajno najveći sadržaj Se utvrđen je kod tretmana SeNPs-PVP320 (22,96 mg/kg<sup>-1</sup>). Očekivano, značajno najmanji sadržaj Se je izmjeren kod kontrole u iznosu od 0,07 mg/kg<sup>-1</sup> (Grafikon 29.).



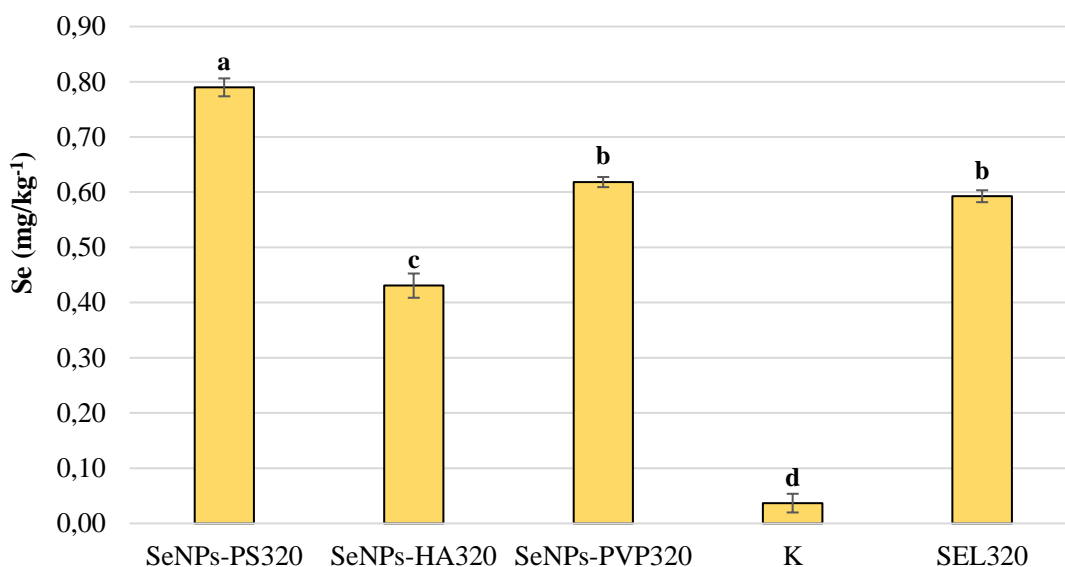
**Grafikon 29.** Sadržaj Se u korijenu špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbatom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Sadržaj Se izražen je u mg kg<sup>-1</sup> suhe tvari korijenu špinata. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

### 3.4.7. Sadržaj Se u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

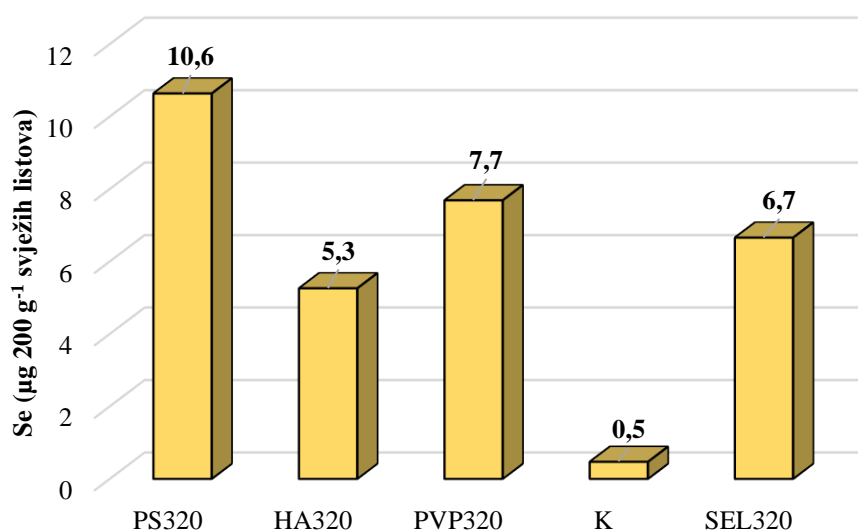
Najveći sadržaj Se u listovima špinata utvrđen je kod tretmana SeNPs-PS320 (0,78 mg/kg<sup>-1</sup>), a koji je bio značajno veći u usporedbi s ostalim tretmanima biofortifikacije i kontrolom. Očekivano, značajno najmanji sadržaj Se utvrđen je kod kontrole, a iznosio je 0,003 mg/kg<sup>-1</sup> (Grafikon 30.).

Najveći ukupan sadržaj selena u listovima špinata, sukladno sadržaju u suhoj tvari, ostvaren je biofortifikacijom špinata selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbatom (SeNPs-PS320). Konzumacijom 200 g listova iz spomenutog tretmana se zadovoljava oko 20 % prosječnih dnevnih potreba čovjeka. U slučaju biofortifikacije selenatom, u 200 g

svježih listova ukupno je bilo 6,7  $\mu\text{g}$  Se što zadovoljava oko 13,5 % prosječnih dnevnih potreba (Grafikon 31.).



**Grafikon 30.** Sadržaj Se u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbatom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Sadržaj Se izražen je u  $\text{mg kg}^{-1}$  suhe tvari listovima špinata. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).



**Grafikon 31.** Ukupan sadržaj Se ( $\mu\text{g}$ ) u 200 g svježih listova špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbatom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP).

### 3.4.8. Koncentracije fotosintetskih pigmenata kod špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Biofortifikacija SeNPs nije značajno utjecala na koncentraciju fotosintetskih pigmenata kao ni njihove omjere u listovima špinata. Međutim, primjena Se u obliku selenata rezultirala je porastom koncentracije klorofila a i b te karotenoida u odnosu na kontrolu i ostale tretmane iako je značajno veća bila samo koncentracija klorofila a (Chl a). Kod omjera fotosintetskih pigmenata nije bilo značajne razlike između kontrolnih i tretiranih biljaka (Tablica 25.).

**Tablica 25.** Koncentracije fotosintetskih pigmenata u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbatom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP)

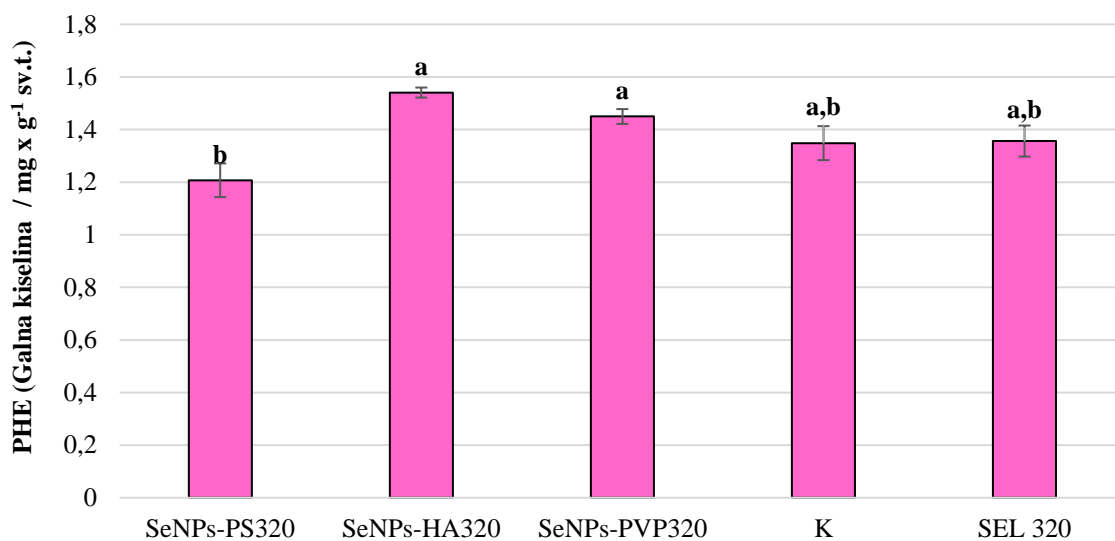
Tretman	Chl a (mg/g sv.t.)	Chl b (mg/g sv.t.)	Chl a+b (mg/g sv.t.)	Car (mg/g sv.t.)	Chla/Chlb (mg/g sv.t.)	Car/Chla + Chl b (mg/g sv.t.)
SeNPs-PS320	0,56 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,20 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,77 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,17 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,78 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>a</sup>
SeNPs-HA320	0,57 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,79 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,17 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,63 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>a</sup>
SeNPs-PVP320	0,57 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,20 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,78 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,17 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,82 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>a</sup>
K	0,57 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,21 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,78 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,17 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,79 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>a</sup>
SEL320	0,64 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,24 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,88 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,19 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,68 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,01 <sup>a</sup>
<b>Prosjek</b>	<b>0,58</b>	<b>0,21</b>	<b>0,80</b>	<b>0,17</b>	<b>2,74</b>	<b>0,22</b>
<b>Minimum</b>	<b>0,56</b>	<b>0,20</b>	<b>0,77</b>	<b>0,17</b>	<b>2,63</b>	<b>0,21</b>
<b>Maksimum</b>	<b>0,64</b>	<b>0,24</b>	<b>0,88</b>	<b>0,19</b>	<b>2,82</b>	<b>0,22</b>

Rezultati su izraženi u miligramima klorofila, odnosno karotenoida po gramu svježe tvari (mg x g<sup>-1</sup> sv.t.) te su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina (P < 0.05).

### 3.4.9. Ukupan sadržaj fenolnih spojeva (PHE) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Biofortifikacija biljaka je značajno utjecala na sadržaj PHE u listovima špinata. Najveći sadržaj PHE utvrđen je kod tretmana SENPs-HA320, ali u odnosu na kontrolu nije utvrđena značajna razlika. Najmanji sadržaj PHE utvrđen je kod tretmana SeNPs-PS320, a

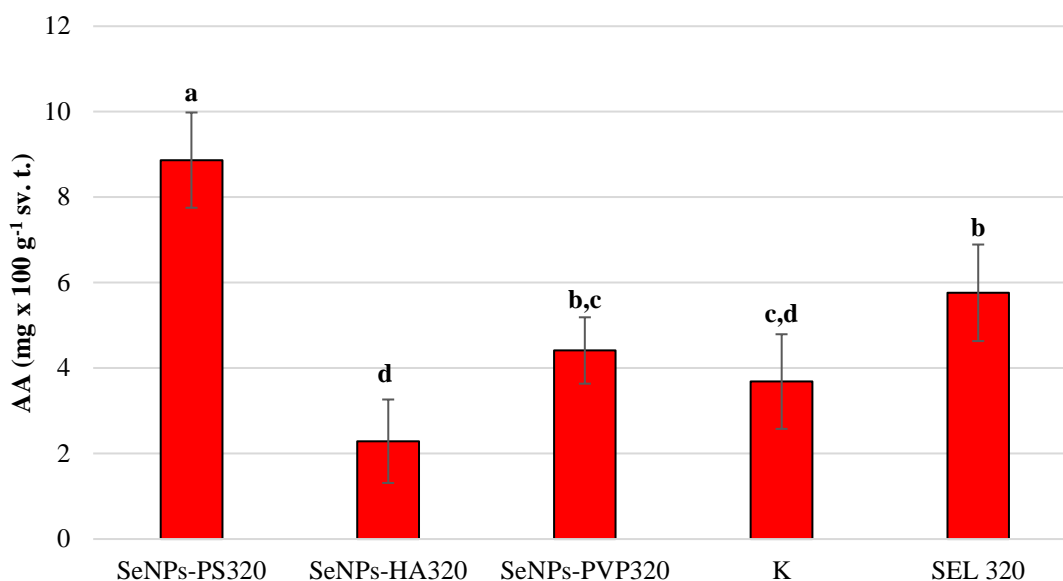
koji je bio značajno manji u odnosu na tretmane SeNPS-HA320 i SeNPs-PVP320 (Grafikon 32.)



**Grafikon 32.** Ukupan sadržaj PHE u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbatom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi kao miligram galne kiseline na gram svježe tvari ( $\text{g}^{-1}$  sv.t.) te su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

#### 3.4.10. Koncentracija askorbinske kiseline (AA) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Općenito, biofortifikacija špinata je utjecala na promjene koncentracije AA u listovima špinata. Najveća koncentracija AA utvrđena je kod tretmana SeNPs-PS320 koji se značajno razlikovao od drugih biofortifikacijskih tretmana i kontrole. Najmanja koncentracija AA je pak utvrđena kod tretmana SeNPs-HA320 koji se značajno razlikovao od ostalih tretmana, dok u usporedbi s kontrolom nije utvrđena značajna razlika (Grafikon 33.).

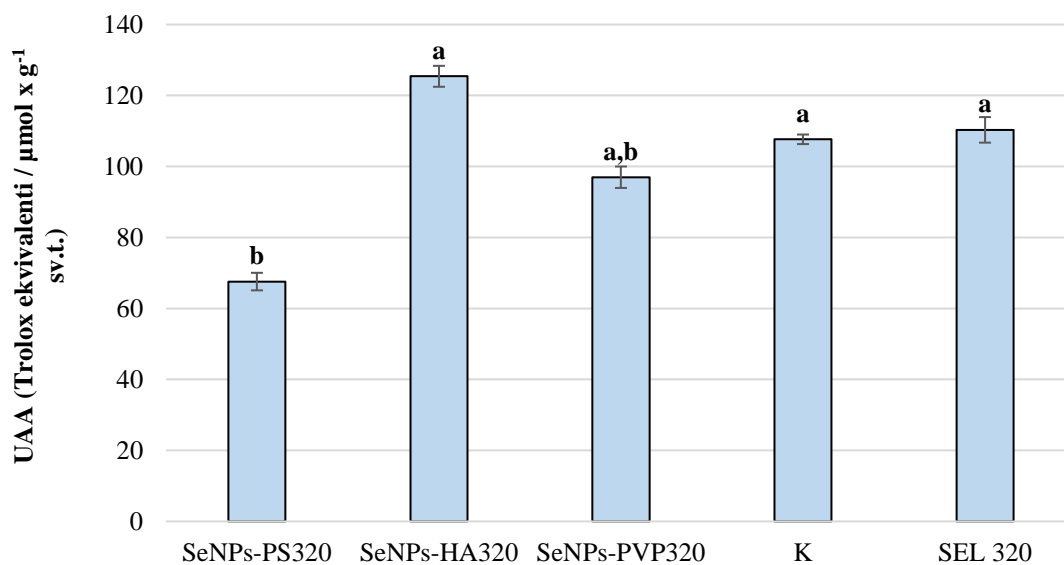


**Grafikon 33.** Ukupna koncentracija AA u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbatom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi miligramima askorbinske kiseline na 100 g svježe tvari (mg x 100g sv.t.) te su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

#### 3.4.11. Koncentracija ukupne antioksidativne aktivnosti (UAA) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Tretmani biofortifikacije selenom nisu značajno utjecali na povećanje UAA u listovima špinata. Najveća UAA utvrđena je kod tretmana SeNPs-HA320, ali u usporedbi s kontrolom nije bila značajna. Međutim, značajno manja UAA u usporedbi s kontrolom utvrđena je kod tretmana SeNPs-PS320 (Grafikon 34.).

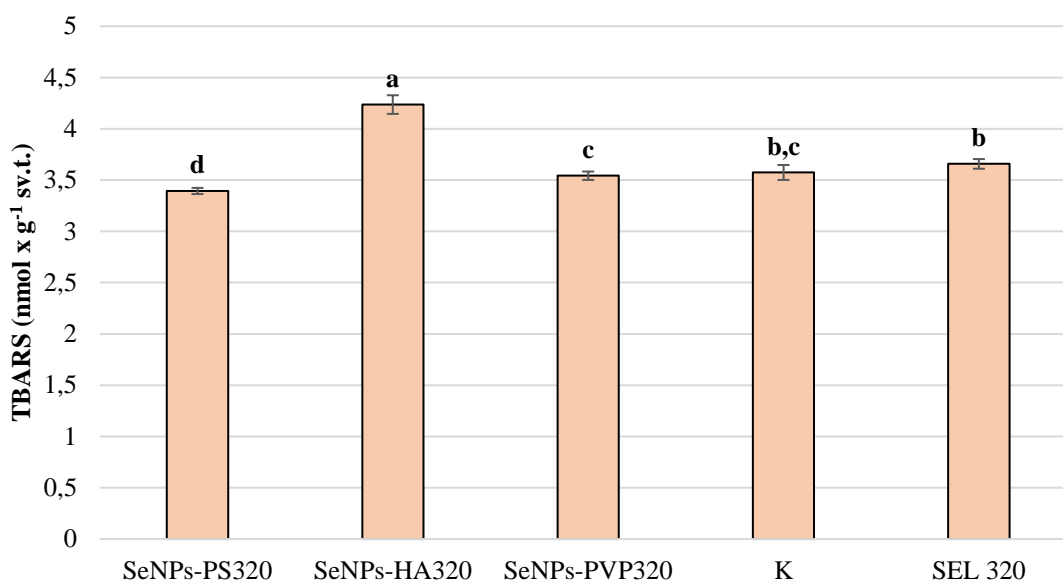




**Grafikon 34.** UAA u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbatom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi u mikromolima Troloxa na gram svježeg uzorka ( $\mu\text{mol} \times \text{g}^{-1}$  sv.t.) te su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

#### 3.4.12. Intenzitet lipidne peroksidacije (LPO) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

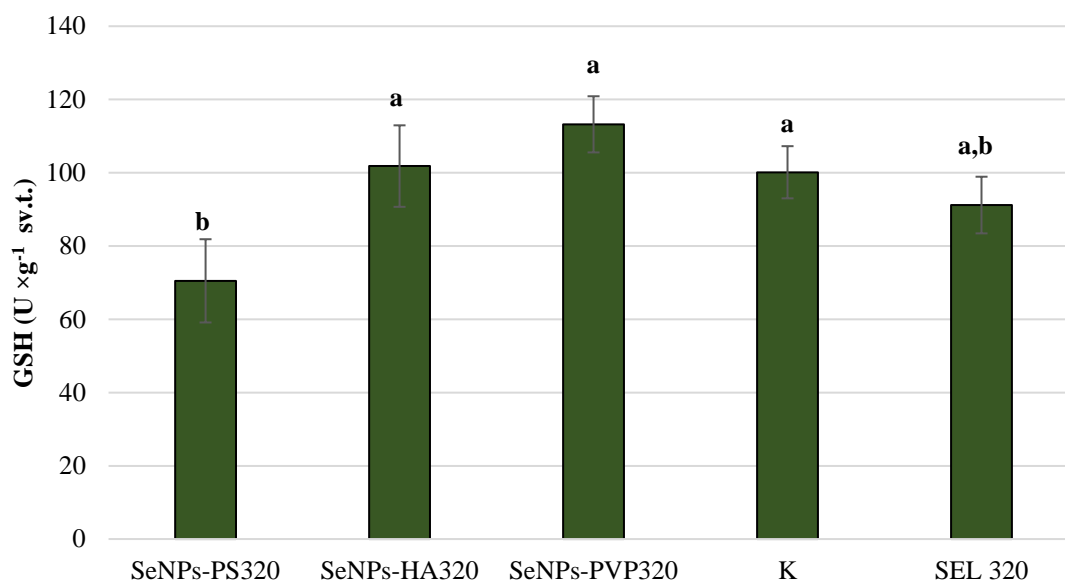
Značajno veći intenzitet LPO utvrđen je kod tretmana SeNPs-HA320 u usporedbi s ostalim tretmanima biofortifikacije i kontrolom. Kod tretmana SeNPS-PS320 je pak utvrđen značajno najmanji intenzitet LPO (Grafikon 35.).



**Grafikon 35.** Intenzitet LPO (TBARS (nmol x g<sup>-1</sup> sv.t.) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbatom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi u nmol po gramu svježe tvari (nmol x g<sup>-1</sup> sv.t.) te su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina (P < 0.05).

### 3.4.13. Koncentracija reduciranog glutationa (GSH) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

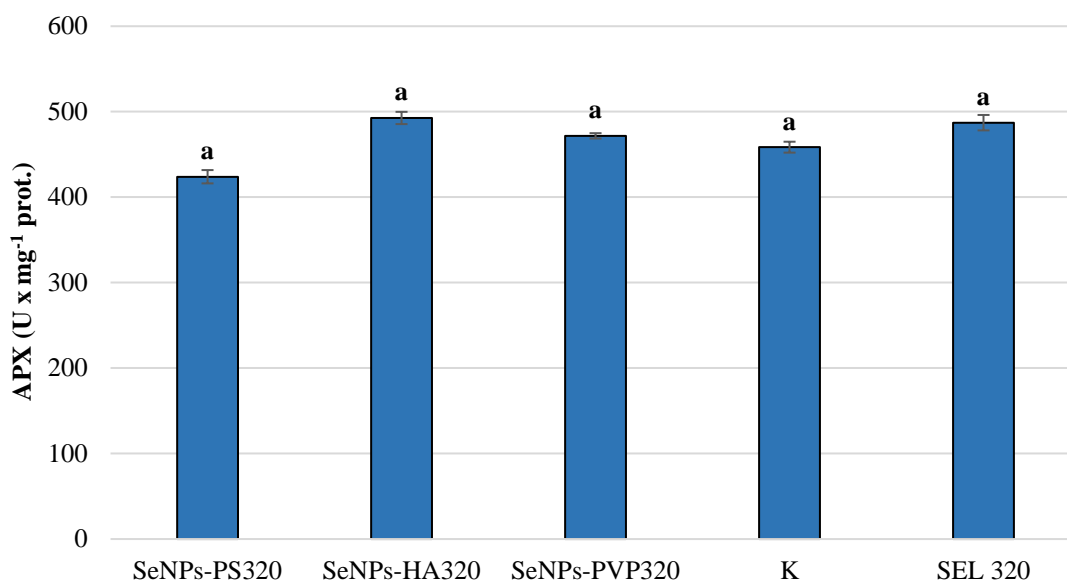
Koncentracija GSH u listovima špinata je bila pod utjecajem biofortifikacijskih tretmana. Međutim, značajno manja koncentracija GSH u usporedbi s tretmanima SeNPs-HA320 i SeNPs-PVP320 te kontrolom je izmjerena samo kod tretmana SeNPs-PS320. Između ostalih tretmana i kontrole nije bilo značajne razlike (Grafikon 36.)



**Grafikon 36.** Koncentracija GSH u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbatom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi u nmol po gramu svježe tvari (nmol × g<sup>-1</sup> sv.t.) te su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina (P < 0.05).

#### 3.4.14. Aktivnost enzima askorbat-peroksidaze (APX) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

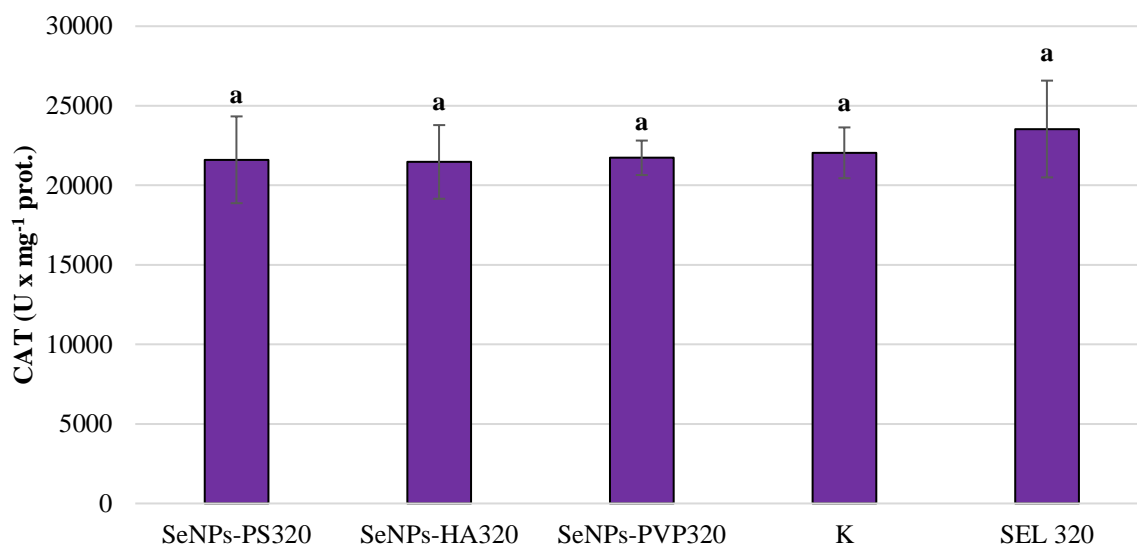
Tretmani biofortifikacije nisu značajno utjecali na aktivnost enzima APX u listovima špinata. Ipak, razlika u aktivnosti je bilo te je najveća najveća aktivnost APX utvrđena kod tretmana SeNPs-HA320, dok je najmanja aktivnost APX u tvrđena kod tretmana SeNPs-PS320 (Grafikon 37.).



**Grafikon 37.** Aktivnost enzima APX u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbitom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi jedinicama aktivnosti APX po miligramu proteina ( $U \times mg^{-1} \text{ prot.}$ ) te su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

#### 3.4.15. Aktivnost enzima katalaze (CAT) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

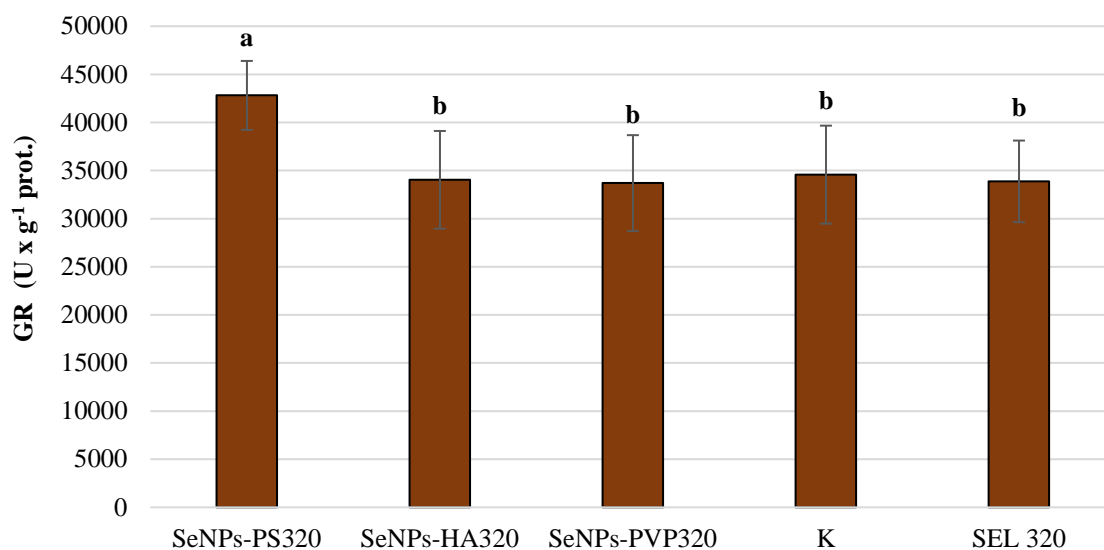
Kao i kod APX-a, tretmani biofortifikacije nisu značajno utjecali na aktivnost CAT kod špinata iako je utvrđena određena razlika između tretmana. Najveća aktivnost katalaze utvrđena je kod tretmana SEL320, dok je najmanja aktivnost CAT utvrđena kod tretmana SeNPs-HA320 (Grafikon 38.).



**Grafikon 38.** Aktivnost enzima CAT u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbatom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi jedinicama aktivnosti CAT po miligramu proteina (U x mg<sup>-1</sup> prot.) te su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina (P < 0.05).

#### 3.4.16. Aktivnost enzima glutation-reduktaze (GR) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

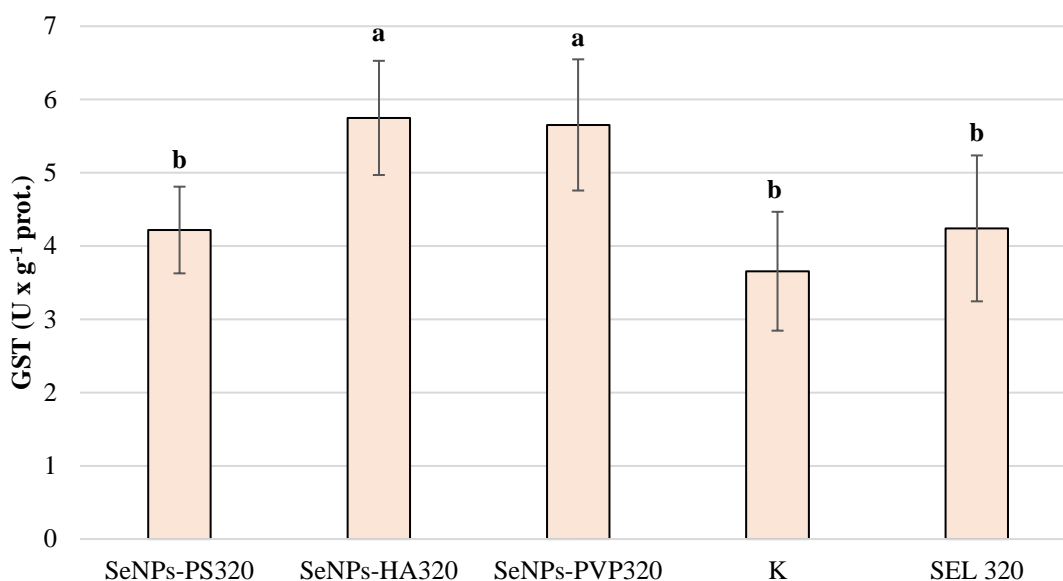
Najveća aktivnost enzima GR utvrđena je kod tretmana SeNPs-PS320 koji se ujedno i značajno razlikovao od ostalih tretmana biofortifikacije i kontrole. Između ostalih tretmana biofortifikacije i kontrole nije utvrđena statistički značajna razlika, a najmanja aktivnost GR utvrđena je kod tretmana SEL320 (Grafikon 39.).



**Grafikon 39.** Aktivnost enzima GR u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbatom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi jedinicama aktivnosti GR po gramu proteina ( $U \times g^{-1} \text{ prot.}$ ) te su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

#### 3.4.17. Aktivnost enzima glutation-S-transferaze (GST) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

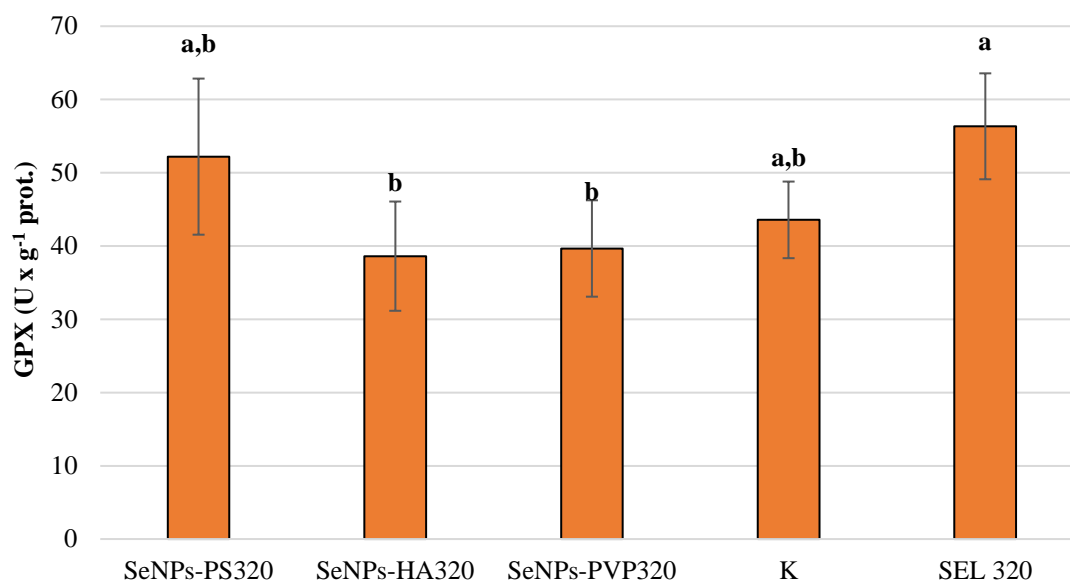
Tretmani biofortifikacije su utjecali na povećanje aktivnosti enzima GST kod špinata. Sukladno tome, veća aktivnost enzima GST utvrđena je kod SeNPs tretmana, tj. kod tretmana SeNPs-HA320 i SeNPs-PVP320 se ona značajno razlikovala od ostalih tretmana biofortifikacije i kontrole. Najmanja aktivnost enzima GST utvrđena je kod kontrole. Međutim, između kontrole i tretmana SeNPs-PS320 i SEL320 nije utvrđena značajna razlika (Grafikon 40.).



**Grafikon 40.** Aktivnost enzima GST u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbatom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi jedinicama aktivnosti GST po gramu proteina ( $U \times g^{-1} \text{ prot.}$ ) te su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

#### 3.4.18. Aktivnost enzima glutation-peroksidaze (GPX) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

U usporedbi s kontrolnim biljkama, tretmani biofortifikacije nisu značajno utjecali na aktivnost enzima GPX kod špinata. Međutim, između pojedinih tretmana se javila razlika u aktivnosti GPX. Sukladno tome, najveća aktivnost enzima GPX utvrđena je kod tretmana SEL320 koji se značajno razlikovao u usporedbi s tretmanima SeNPs-HA320 i SeNPs-PVP320. Najmanja aktivnost enzima GPX utvrđena je kod tretmana SeNPs-HA320 (Grafikon 41.).

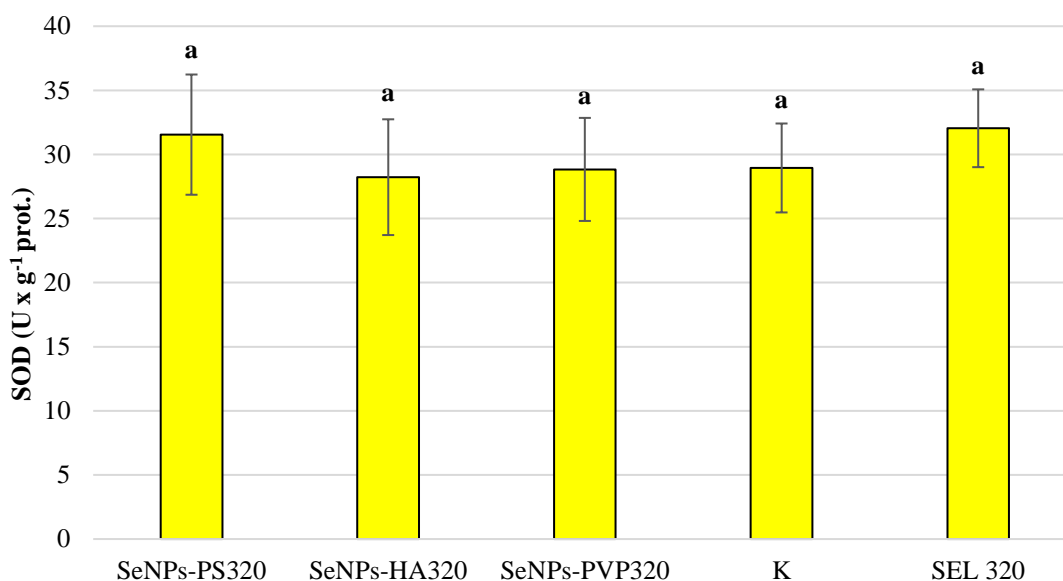


**Grafikon 41.** Aktivnost enzima GPX u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbatom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi jedinicama aktivnosti GPX po gramu proteina ( $U \times g^{-1} \text{ prot.}$ ) te su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

#### 3.4.19. Aktivnost enzima superoksid-dismutaze (SOD) u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Biofortifikacija špinata selenom u obliku selenata i SeNPs nije imala značajan utjecaj na aktivnost enzima SOD. Ipak, nešto veća aktivnost enzima GPX utvrđena je kod tretmana SeNPs-PS320, dok je najmanja aktivnost GPX utvrđena kod tretmana SeNPs-HA320 (Grafikon 42.).





**Grafikon 42.** Aktivnost enzima SOD u listovima špinata pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbatom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi jedinicama aktivnosti SOD po gramu proteina ( $U \times g^{-1} \text{ prot.}$ ) te su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

### 3.5. Biofortifikacijski pokus tijekom 2020. - rukola

#### 3.5.1. Morfološki pokazatelji rasta i razvoja rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Biofortifikacija rukole SeNPs je značajno povećala broj listova rukole u usporedbi s kontrolnim biljkama uzgajanim bez dodatka selena. Sukladno tome, prosječno najmanji broj listova utvrđen je kod kontrole (7,90) od koje se tretman SEL320 nije značajno razlikovao prema broju listova (9,88). Slično, korijen rukole je bio značajno duži kod tretmana SeNPs-PS320 i SeNPs-HA320 u usporedbi s ostalim biofortificiranim te kontrolnim biljkama. Treba istaknuti da je značajno najkraći korijen izmjeren kod kontrolnih biljaka (32,80 cm) (Tablica 26.).

**Tablica 26.** Broj listova po biljci i dužina korijena rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbitom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP)

Tretman	Broj listova po biljci	Dužina korijena
SeNPs-PS320	10,63 ± 0,98 <sup>ab</sup>	44,70 ± 0,75 <sup>a</sup>
SeNPs-HA320	12,09 ± 1,88 <sup>a</sup>	44,70 ± 1,52 <sup>a</sup>
SeNPs-PVP320	11,85 ± 1,09 <sup>ab</sup>	38,50 ± 1,36 <sup>c</sup>
K	7,90 ± 1,02 <sup>c</sup>	32,80 ± 1,66 <sup>d</sup>
SEL320	9,88 ± 0,69 <sup>bc</sup>	41,20 ± 1,53 <sup>b</sup>
<b>Prosjeak</b>	<b>10,47</b>	<b>40,38</b>
<b>Minimum</b>	<b>7,90</b>	<b>32,80</b>
<b>Maksimum</b>	<b>12,09</b>	<b>44,70</b>

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

SeNPs tretmani su utjecali i na povećanje svježe mase listova te su utvrđene značajno veće svježe mase listova u usporedbi s kontrolom (3,31 g). Kod tretmana SEL320 utvrđena je svježja masa listova od 4,09 g, ali nije bila značajno veća u usporedbi s kontrolom.

Prosječne vrijednosti i razlike u suhoj masi lista u skladu su s vrijednostima svježe mase lista te su i tu utvrđene značajno veće vrijednosti kod SeNPs tretmana u usporedbi s kontrolom (0,23 g), ali i tretmanom SEL320 (0,30 g).

Općenito, svježja masa korijena po biljci je bila značajno veća kod tretiranih biljaka uz iznimku tretmana SeNPs-HA320 (0,39 g) gdje se ona nije razlikovala u usporedbi s kontrolom (0,35 g). Značajno veće svježe mase korijena u usporedbi s kontrolom utvrđene su kod tretmana SeNPs-PS320 (0,44 g), SeNPs-PVP320 (0,43 g) i SEL320 (0,41 g).

Kod suhe mase korijena je trend razlika bio nešto drugačiji te je značajna razlika utvrđena samo kod tretmana SEL320 gdje je izmjerena manja suha masa korijena u usporedbi s kontrolom (Tablica 27.).

**Tablica 27.** Svježa i suha masa listova rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbitom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP)

Tretman	Svježa masa lista po biljci	Suha masa lista po biljci	Svježa masa korijena po biljci	Suha masa korijena po biljci
SeNPs-PS320	4,58 ± 1,04 <sup>a</sup>	0,32 ± 0,008 <sup>a</sup>	0,44 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,02 ± 0,001 <sup>ab</sup>
SeNPs-HA320	4,34 ± 0,42 <sup>a</sup>	0,32 ± 0,009 <sup>a</sup>	0,39 ± 0,09 <sup>ab</sup>	0,02 ± 0,001 <sup>ab</sup>
SeNPs-PVP320	4,53 ± 0,36 <sup>a</sup>	0,32 ± 0,009 <sup>a</sup>	0,43 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,02 ± 0,001 <sup>ab</sup>
K	3,31 ± 0,64 <sup>b</sup>	0,23 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,35 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,02 ± 0,001 <sup>a</sup>
SEL320	4,09 ± 0,39 <sup>ab</sup>	0,30 ± 0,009 <sup>b</sup>	0,41 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,02 ± 0,001 <sup>b</sup>
<b>Prosjek</b>	<b>4,22</b>	<b>0,30</b>	<b>0,40</b>	<b>0,02</b>
<b>Minimum</b>	<b>3,31</b>	<b>0,23</b>	<b>0,35</b>	<b>0,02</b>
<b>Maksimum</b>	<b>4,58</b>	<b>0,32</b>	<b>0,44</b>	<b>0,02</b>

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

### 3.5.2. Sadržaj makroelemenata u korijenu rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Značajno najveći sadržaj N u korijenu rukole utvrđen je kod tretmana SeNPs-PVP320 (4,32 %). Najmanji sadržaj N utvrđen je kod tretmana SeNPs-HA320 (3,83 %) i kontrole (3,88 %) koji su se značajno razlikovali od ostalih tretmana biofortifikacije. Sadržaj P se kretao od 1,12 % kod tretmana SeNPs-HA320 do 1,37 % kod tretmana SeNPs-PVP320. Sukladno tome, značajno najniži sadržaj P u usporedbi s ostalim tretmanima biofortifikacije i kontrolom (1,33 %) utvrđen je kod tretmana SeNPs-HA320. Biofortifikacija s oba oblika Se je utjecala na smanjeni sadržaj K u korijenu rukole. Prema tome, značajno niži sadržaj K u usporedbi s kontrolom (4,90 %) utvrđen je kod svih tretmana biofortifikacije.

Sadržaj S u korijenu rukole se kretao od 0,84 % kod tretmana SeNPs-HA320 do 1,02 % kod tretmana SeNPs-PVP320. Značajno veći sadržaj S utvrđen je kod tretmana SeNPs-PVP320 (1,02 %) u usporedbi s ostalim tretmanima biofortifikacije i kontrole. Kod kontrole sadržaj S je iznosio 0,85 %. Najveći sadržaj Ca utvrđen je kod tretmana SeNPs-PS320 (0,77 %) koji se značajno razlikovao od sadržaja Ca u korijenu ostalih biofortificiranih i kontrolnih biljaka,

dok je najniži sadržaj Ca . utvrđen kod tretmana SeNPs-PVP320 (0,73 %). Sukladno trendu zabilježenom za sadržaj K u korijenu rukole, , biofortifikacija s oba oblika Se je utjecala i na smanjeni sadržaj Mg u korijenu rukole. Prema tome, značajno veći sadržaj Mg utvrđen je kod kontrole (1,00 %) u usporedbi sa svim tretmanima biofortifikacije (Tablica 28.).

**Tablica 28.** Sadržaj makroelemenata u korijenu rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbatom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP).

Tretman	N (%)	P (%)	K (%)	S (%)	Ca (%)	Mg (%)
SeNPs-PS320	4,05 ± 0,04 <sup>b</sup>	1,21 ± 0,08 <sup>c</sup>	4,57 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,89 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,77 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,97 ± 0,02 <sup>b</sup>
SeNPs-HA320	3,83 ± 0,01 <sup>d</sup>	1,12 ± 0,09 <sup>d</sup>	4,21 ± 0,03 <sup>d</sup>	0,84 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,74 ± 0,03 <sup>bc</sup>	0,87 ± 0,03 <sup>d</sup>
SeNPs-PVP320	4,32 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,37 ± 0,08 <sup>a</sup>	4,73 ± 0,14 <sup>b</sup>	1,02 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,73 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,73 ± 0,02 <sup>e</sup>
K	3,88 ± 0,04 <sup>d</sup>	1,33 ± 0,08 <sup>b</sup>	4,90 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,85 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,75 ± 0,02 <sup>b</sup>	1,30 ± 0,01 <sup>a</sup>
SEL320	3,98 ± 0,03 <sup>c</sup>	1,06 ± 0,06 <sup>c</sup>	3,91 ± 0,07 <sup>e</sup>	0,90 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,74 ± 0,01 <sup>bc</sup>	0,92 ± 0,04 <sup>c</sup>
<b>Prosjek</b>	<b>4,01</b>	<b>1,22</b>	<b>4,46</b>	<b>0,90</b>	<b>0,75</b>	<b>0,96</b>
<b>Minimum</b>	<b>3,83</b>	<b>1,06</b>	<b>3,91</b>	<b>0,84</b>	<b>0,43</b>	<b>0,73</b>
<b>Maksimum</b>	<b>4,32</b>	<b>1,37</b>	<b>4,90</b>	<b>1,02</b>	<b>0,77</b>	<b>1,30</b>

Sadržaj makroelemenata izražen je u % suhe tvari korijena rukole. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

### 3.5.3. Sadržaj makroelemenata u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Biofortifikacija s oba oblika selena je utjecala na značajno povećanje sadržaja N u listu rukole u odnosu na kontrolne biljke. Najveći sadržaj N utvrđen je kod tretmana SeNPs-HA320 (4,85 %), a biofortificiranih biljaka nije utvrđena značajna razlika. Najveći sadržaj P u listu rukole iznosio je 0,80 % kod tretmana SeNPs-PS320 i kontrole koji su se značajno razlikovali od ostalih tretmana biofortifikacije između kojih nije bilo statistički značajne razlike. Na sadržaj K u listovima rukole biofortifikacije nije imala značajan utjecaj iako je kod kontrolnih biljaka utvrđen najniži sadržaj K (5,28 %). Općenito, biofortifikacija s oba oblika Se je utjecala na manji sadržaj S u listovima rukole. Međutim, značajno manji sadržaj S u usporedbi s kontrolom utvrđen je samo kod tretmana SeNPS-PVP320. Također,

biofortifikacija s oba oblika Se je utjecala i na manji sadržaj Ca u listovima rukole pa je kod kontrole (3,63 %) utvrđen značajno veći sadržaj Ca u usporedbi sa svim tretmanima biofortifikacije. Što se tiče Mg u listu, biofortifikacija selenom je utjecala na niži sadržaj Mg u listovima rukole. Prema tome, značajno manji sadržaj Mg u usporedbi s kontrolom utvrđen je kod svih tretmana biofortifikacije, a najmanji sadržaj Mg utvrđen je kod tretmana SeNPs-HA320 (0,99 %) (Tablica 29.).

**Tablica 29.** Sadržaj makroelemenata u listu rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbitom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP)

Tretman	N (%)	P (%)	K (%)	S (%)	Ca (%)	Mg (%)
SeNPs-PS320	4,82 ± 0,29 <sup>a</sup>	0,80 ± 0,01 <sup>a</sup>	6,04 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,19 ± 0,02 <sup>a</sup>	3,42 ± 0,05 <sup>b</sup>	1,06 ± 0,03 <sup>b</sup>
SeNPs-HA320	4,85 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,73 ± 0,07 <sup>b</sup>	5,81 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,19 ± 0,07 <sup>a</sup>	3,38 ± 0,18 <sup>b</sup>	0,99 ± 0,01 <sup>c</sup>
SeNPs-PVP320	4,75 ± 0,15 <sup>a</sup>	0,72 ± 0,01 <sup>b</sup>	5,59 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,12 ± 0,02 <sup>b</sup>	3,34 ± 0,05 <sup>b</sup>	1,01 ± 0,02 <sup>c</sup>
K	4,32 ± 0,15 <sup>b</sup>	0,80 ± 0,01 <sup>a</sup>	5,28 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,25 ± 0,02 <sup>a</sup>	3,63 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,17 ± 0,01 <sup>a</sup>
SEL320	4,76 ± 0,18 <sup>a</sup>	0,74 ± 0,01 <sup>b</sup>	5,71 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,21 ± 0,03 <sup>a</sup>	3,38 ± 0,07 <sup>b</sup>	1,02 ± 0,02 <sup>c</sup>
<b>Prosjek</b>	<b>4,70</b>	<b>0,76</b>	<b>5,69</b>	<b>1,19</b>	<b>3,43</b>	<b>1,05</b>
<b>Minimum</b>	<b>4,32</b>	<b>0,72</b>	<b>5,28</b>	<b>1,12</b>	<b>3,34</b>	<b>0,99</b>
<b>Maksimum</b>	<b>4,85</b>	<b>0,80</b>	<b>6,04</b>	<b>1,25</b>	<b>3,63</b>	<b>1,17</b>

Sadržaj makroelemenata izražen je u % suhe tvari listova rukole. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

#### 3.5.4. Sadržaj mikroelemenata u korijenu rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Biofortifikacija rukole selenom i selenovim nanočesticama je značajno utjecala na promjene sadržaja Fe u korijenu rukole. Prema tome, značajno manji sadržaj Fe u usporedbi s kontrolom (4572,25 mg/kg<sup>-1</sup>) utvrđen je kod svih tretmana biofortifikacije. Značajno najmanji sadržaj Fe utvrđen je kod tretmana SeNPs-PVP320 (2691,00 mg/kg<sup>-1</sup>). Također, tretmani biofortifikacije su utjecali na značajno smanjenje sadržaja Mn uz iznimku tretmana SeNPs-PS320 (537,35 mg/kg<sup>-1</sup>) koji se nije značajno razlikovao u usporedbi s kontrolnim biljkama gdje je izmjereno 528,70 mg/kg<sup>-1</sup> suhe tvari. Kod Zn je utvrđena značajna razlika između svih varijanata pokusa. Najveći sadržaj Zn utvrđen je kod tretmana SeNPs-HA320

(382,28 mg/kg<sup>-1</sup>), a najmanji kod tretmana SeNPs-PS320 (265,58 mg/kg<sup>-1</sup>). Nadalje, biofortifikacija selenovim nanočesticama je značajno smanjila sadržaj Cu u korijenu u odnosu na biljke biofortificirane selenatom kao i kontrolne. Također, i između kontrole i tretmana SEL320 se javila značajna razlika. Prema tome, značajno manji sadržaj Cu u korijenu rukole u usporedbi s kontrolnim biljkama (28,02 mg/kg<sup>-1</sup>) utvrđen je kod svih tretmana biofortifikacije (Tablica 30.).

**Tablica 30.** Sadržaj mikroelemenata u korijenu rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbatom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP)

Tretman	Fe (mg/kg <sup>-1</sup> )	Mn (mg/kg <sup>-1</sup> )	Zn (mg/kg <sup>-1</sup> )	Cu (mg/kg <sup>-1</sup> )
SeNPs-PS320	3246,50 ± 213,07 <sup>b</sup>	537,35 ± 8,60 <sup>a</sup>	265,58 ± 4,73 <sup>e</sup>	18,40 ± 1,33 <sup>c</sup>
SeNPs-HA320	3171,25 ± 155,11 <sup>b</sup>	498,40 ± 15,94 <sup>b</sup>	382,28 ± 5,68 <sup>a</sup>	18,23 ± 0,85 <sup>c</sup>
SeNPs-PVP320	2691,00 ± 206,07 <sup>c</sup>	503,93 ± 19,53 <sup>b</sup>	328,35 ± 9,69 <sup>b</sup>	17,79 ± 0,58 <sup>c</sup>
K	4572,25 ± 120,76 <sup>a</sup>	528,70 ± 12,36 <sup>a</sup>	289,75 ± 5,00 <sup>d</sup>	28,02 ± 0,48 <sup>a</sup>
SEL320	3179,25 ± 368,67 <sup>b</sup>	496,70 ± 13,90 <sup>b</sup>	299,75 ± 2,69 <sup>c</sup>	20,78 ± 0,09 <sup>b</sup>
<b>Prosjek</b>	<b>3372,05</b>	<b>513,02</b>	<b>313,14</b>	<b>20,64</b>
<b>Minimum</b>	<b>2691,00</b>	<b>496,70</b>	<b>265,58</b>	<b>17,79</b>
<b>Maksimum</b>	<b>4572,25</b>	<b>537,35</b>	<b>382,28</b>	<b>28,02</b>

Sadržaj mikroelemenata izražen je u mg/kg<sup>-1</sup> suhe tvari korijena rukole. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina (P < 0.05).

### 3.5.5. Sadržaj mikroelemenata u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Općenito, u listovima rukole je sadržaj svih izmjerenih mikroelemenata bio višestruko manji u usporedbi s vrijednostima sadržaja istih u korijenu rukole. Biofortifikacija s oba oblika Se je značajno utjecala na sadržaj Fe u listovima rukole. Prema tome, značajno manji sadržaj Fe u usporedbi s kontrolom (854,90 mg/kg<sup>-1</sup>) utvrđen je kod tretmana SeNPs-HA320 (529,63 mg/kg<sup>-1</sup>) i SEL320 (634,80 mg/kg<sup>-1</sup>). Nadalje, kod sadržaja Mn nije bilo značajnih razlika između svih varijanata pokusa, dok je sadržaj Zn bio pod utjecajem biofortifikacijskih tretmana. Najveći sadržaj Zn je izmjeren kod tretmana SeNPs-HA320

(109,45 mg kg<sup>-1</sup>), a najmanji kod tretmana SeNPs-PS320 (83,08 mg kg<sup>-1</sup>). Kod sadržaja bakra je uočen gotovo suprotan trend u usporedbi sa sadržajem Zn. Sukladno tome, najveći sadržaj Cu utvrđen je kod tretmana SeNPs-PS320 (11,37 mg/kg<sup>-1</sup>), a najmanji kod SeNPs-HA320 (7,77 mg kg<sup>-1</sup>) iako nije bilo značajnih razlika u usporedbi s kontrolnim tretmanom (Tablica 31.).

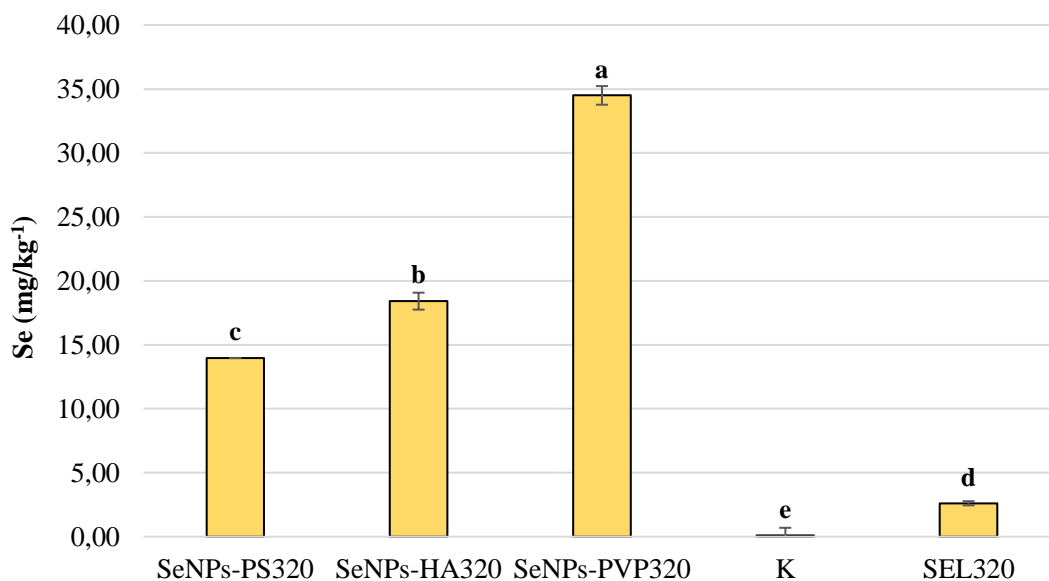
**Tablica 31.** Sadržaj mikroelemenata u listu rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbatom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP)

Tretman	Fe (mg/kg <sup>-1</sup> )	Mn (mg/kg <sup>-1</sup> )	Zn (mg/kg <sup>-1</sup> )	Cu (mg/kg <sup>-1</sup> )
SeNPs-PS320	857,73 ± 85,15 <sup>a</sup>	120,93 ± 1,96 <sup>a</sup>	83,08 ± 1,90 <sup>c</sup>	11,37 ± 0,24 <sup>a</sup>
SeNPs-HA320	529,63 ± 90,00 <sup>c</sup>	116,68 ± 2,54 <sup>a</sup>	109,45 ± 2,57 <sup>a</sup>	7,77 ± 0,34 <sup>b</sup>
SeNPs-PVP320	768,68 ± 26,69 <sup>a</sup>	115,83 ± 2,43 <sup>a</sup>	97,45 ± 0,83 <sup>b</sup>	8,20 ± 0,19 <sup>b</sup>
K	854,90 ± 37,37 <sup>a</sup>	119,63 ± 2,71 <sup>a</sup>	94,94 ± 2,19 <sup>b</sup>	9,75 ± 0,20 <sup>ab</sup>
SEL320	634,80 ± 16,54 <sup>b</sup>	114,65 ± 2,09 <sup>a</sup>	86,74 ± 0,92 <sup>c</sup>	7,81 ± 0,17 <sup>b</sup>
<b>Prosjek</b>	<b>729,15</b>	<b>117,54</b>	<b>94,33</b>	<b>8,98</b>
<b>Minimum</b>	<b>529,63</b>	<b>114,65</b>	<b>83,08</b>	<b>7,77</b>
<b>Maksimum</b>	<b>857,73</b>	<b>120,93</b>	<b>109,45</b>	<b>11,37</b>

Sadržaj mikroelemenata izražen je u mg/kg<sup>-1</sup> suhe tvari listova rukole. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina (P < 0.05).

### 3.5.6. Sadržaj Se u korijenu rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Očekivano, utvrđen je značajno veći sadržaj Se u korijenu rukole kod biofortificiranih biljaka u odnosu na kontrolne. Značajno najveći sadržaj Se izmjeren je u korijenu biljaka kod tretmana SeNPs-PVP320 (34,50 mg/kg<sup>-1</sup>), dok je značajno najmanji i neznatan sadržaj Se izmjeren kod kontrolnih biljaka (0,10 mg/kg<sup>-1</sup>) (Grafikon 43.).

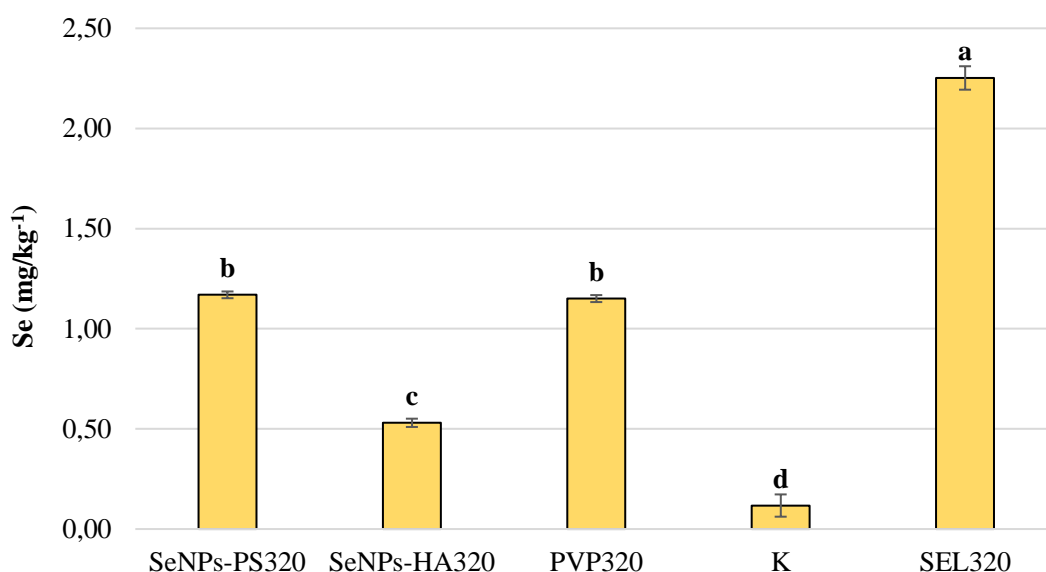


**Grafikon 43.** Sadržaj Se u korijenu rukole rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbatom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Sadržaj Se izražen je u  $\text{mg kg}^{-1}$  suhe tvari korijena rukole. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

### 3.5.7. Sadržaj Se u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

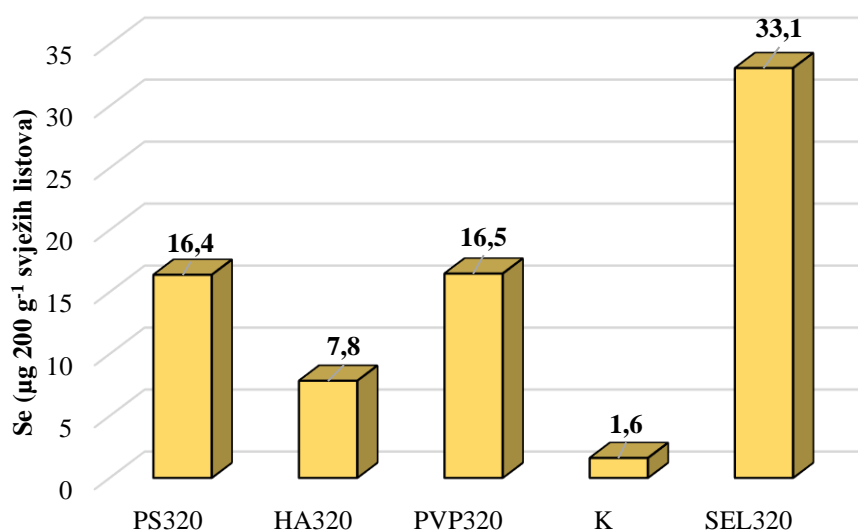
S obzirom na značajno veći sadržaj Se u listovima biofortificiranih biljaka, potvrđena je jedna od hipoteza istraživanja. Najveći sadržaj Se izmjeren je kod tretmana SEL320 ( $2,25 \text{ mg/kg}^{-1}$ ) te je bio značajno veći u odnosu na SeNPs tretmane i kontrolu. Najveći sadržaj Se u slučaju biofortifikacije SeNPs je izmjeren kod tretmana SeNPs-PS320 ( $1,17 \text{ mg/kg}^{-1}$ ). Kod kontrole sadržaj Se je bio neznatan te je iznosio  $0,11 \text{ mg/kg}^{-1}$ . U usporedbi sa špinatom koji je usvojio više Se u slučaju biofortifikacije selenom u obliku SeNPs, rukola bolje usvaja Se u obliku selenata (Grafikon 44.).





**Grafikon 44.** Sadržaj Se u listu rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbatom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Sadržaj Se izražen je u  $\text{mg kg}^{-1}$  suhe tvari lista rukole. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

Biofortifikacija rukole u ovom istraživanju je bila uspješnija u usporedbi sa špinatom. Prema tome, konzumacijom 200 g svježih listova rukole iz tretmana SEL320 u organizam se unese 33,1  $\mu\text{g}$  Se što zadovoljava oko 65 % prosječnih dnevnih potreba. Biofortifikacija selenom u obliku SeNPs rezultirala je manjim sadržajem ukupnog selena pa konzumacijom iste količine listova rukole iz tretmana SeNPs-PS320 i SeNPs-PVP320 zadovoljava se oko 33 % prosječnih dnevnih potreba čovjeka za selenom. Tretman SeNPs-HA320 rezultirao je nižim rezultatom ukupnog sadržaja Se u listovima rukole kao i kod špinata (Grafikon 45.).



**Grafikon 45.** Ukupan sadržaj Se (µg) u 200 g svježih listova rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbatom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP).

### 3.5.8. Koncentracije fotosintetskih pigmenta u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Tretmani biofortifikacije nisu značajno utjecali na koncentraciju klorofila a (Chl a) u usporedbi s kontrolnim tretmanom, iako je najveća koncentracija Chl a izmjerena kod tretmana SeNPs-PS320 te je bila značajno veća u usporedbi s kontrolom. Također, kod tretmana SeNPs-PS320 utvrđeno je značajno povećanje koncentracije klorofila b (Chl b) u usporedbi s ostalim tretmanima biofortifikacije, ali kontrolom. Tretmani biofortifikacije nisu značajno utjecali na koncentraciju karotenoida (Car). Tretmani biofortifikacije su utjecali na smanjen omjer Chl a/Chl b. Prema tome, najveći omjer Chl a/ Chl b utvrđen je kod kontrole, a u usporedbi s kontrolom značajno manji omjer klorofila a i b utvrđen je kod tretmana SeNPs-PS320. Što se tiče omjera karotenoida i klorofila a+b, najmanji omjer je utvrđen opet kod tretmana SeNPs-PS320, ali ne i značajno manji u usporedbi s kontrolom (Tablica 32.).

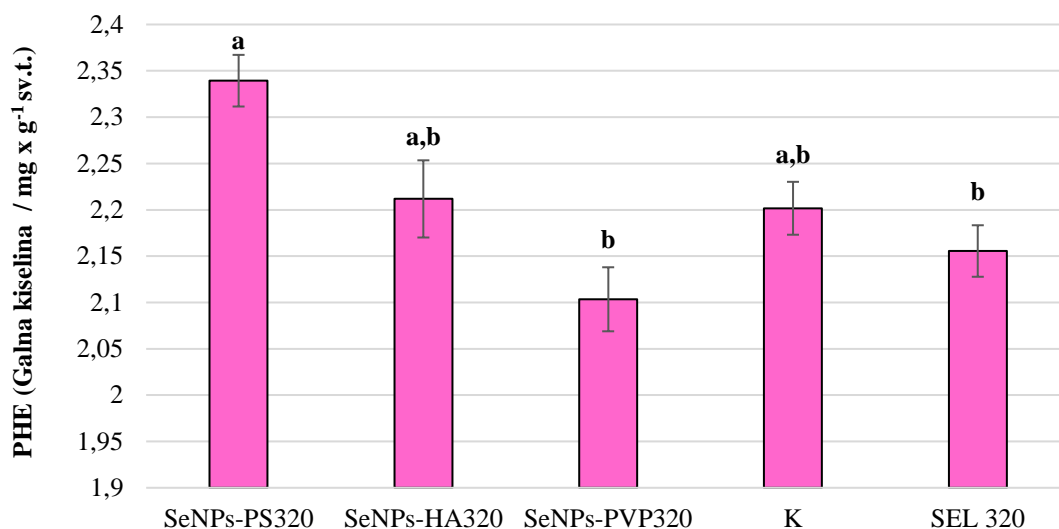
**Tablica 32.** Koncentracije biljnih pigmenta u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbitom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP)

Tretman	Chl a (mg/g sv.t.)	Chl b (mg/g sv.t.)	Chl a+b (mg/g sv.t.)	Car (mg/g sv.t.)	Chla/Chlb (mg/g sv.t.)	Car/Chla + Chl b (mg/g sv.t.)
SeNPs-PS320	0,50 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,18 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,68 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,72 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,14 ± 0,01 <sup>b</sup>
SeNPs-HA320	0,42 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,14 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,56 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,08 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,93 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>ab</sup>
SeNPs-PVP320	0,41 ± 0,05 <sup>b</sup>	0,14 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,55 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,91 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>a</sup>
K	0,46 ± 0,04 <sup>ab</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,62 ± 0,06 <sup>ab</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,99 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>ab</sup>
SEL320	0,44 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,59 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,83 ± 0,07 <sup>ab</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>a</sup>
<b>Prosjek</b>	<b>0,45</b>	<b>0,15</b>	<b>0,60</b>	<b>0,09</b>	<b>2,88</b>	<b>0,15</b>
<b>Minimum</b>	<b>0,41</b>	<b>0,14</b>	<b>0,55</b>	<b>0,08</b>	<b>2,72</b>	<b>0,14</b>
<b>Maksimum</b>	<b>0,50</b>	<b>0,18</b>	<b>0,68</b>	<b>0,10</b>	<b>2,99</b>	<b>0,16</b>

Rezultati su izraženi u miligramima klorofila, odnosno karotenoida po gramu svježe tvari (mg x g<sup>-1</sup> sv.t.) te su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina (P < 0.05).

### 3.5.9. Ukupan sadržaj fenolnih spojeva (PHE) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

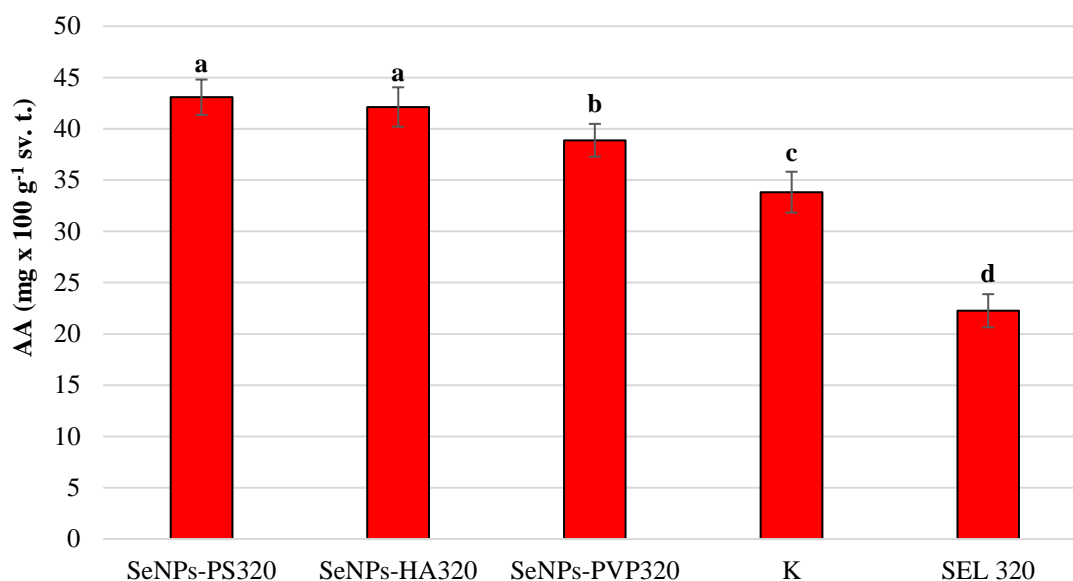
Najveći sadržaj PHE utvrđen je kod tretmana SeNPs-PS320 te je bio značajno veći u usporedbi s tretmanima SeNPs-PVP320 i SEL320. Najniži sadržaj PHE utvrđen je pak kod tretmana SeNPs-PVP320. Međutim, sadržaj PHE u listovima rukole se nije značajno razlikovao između kontrolnih i biofortificiranih biljaka (Grafikon 46.).



**Grafikon 46.** Ukupan sadržaj PHE u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbatom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi kao miligram galne kiseline na gram svježe tvari ( $\text{g}^{-1}$  sv.t.) te su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

### 3.5.10. Koncentracija askorbinske kiseline (AA) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

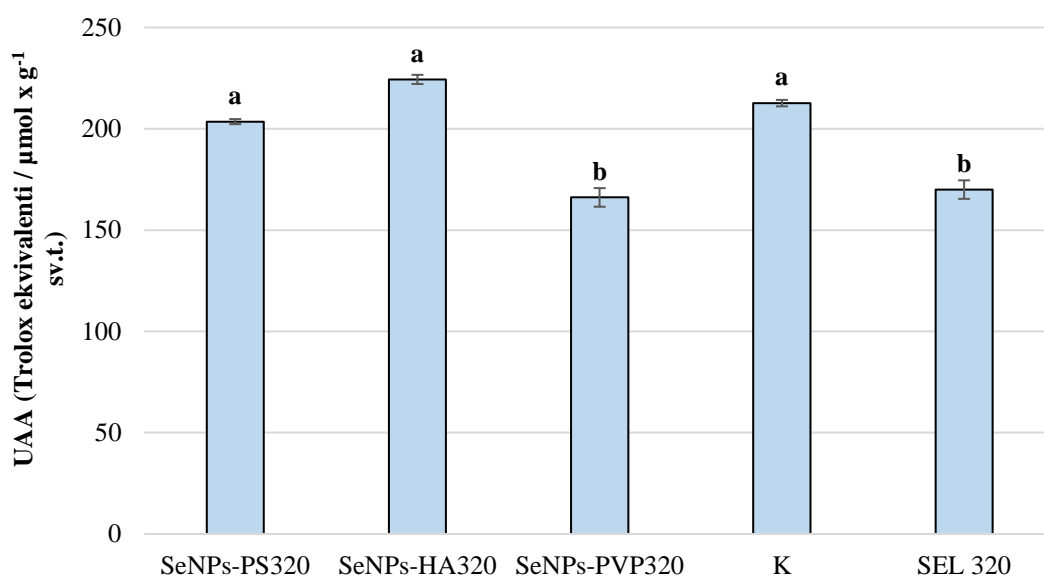
Općenito, biofortifikacija selenovim nanočesticama je uzrokovala pojačanu sintezu AA u listovima rukole. Prema tome, značajno veća koncentracija AA u usporedbi s kontrolnim biljkama je izmjerena kod svih SeNPs tretmana. Međutim, u slučaju biofortifikacije selenom u obliku selenata (SEL320), koncentracija AA je bila značajno manja u usporedbi s kontrolnim biljkama (Grafikon 47.).



**Grafikon 47.** Ukupna koncentracija AA u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbatom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi miligramima askorbinske kiseline na 100 g svježe tvari (mg x 100g sv.t.) te su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

### 3.5.11. Koncentracija ukupne antioksidativne aktivnosti (UAA) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

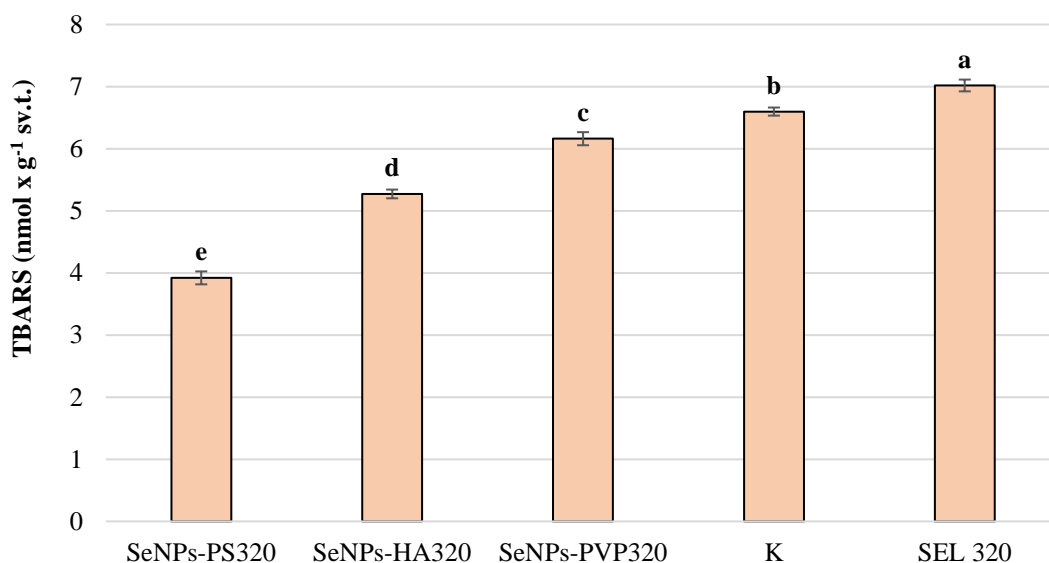
UAA je bila pod utjecajem pojedinih biofortifikacijskih tretmana te je značajno manja UAA utvrđena kod tretmana SeNPs-PVP320 i SEL320. Najveća vrijednost UAA utvrđena je kod tretmana SeNPs-HA320, ali u usporedbi s kontrolom nije utvrđena značajna razlika (Grafikon 48.).



**Grafikon 48.** UAA u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbatom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi u mikromolima Troloxa na gram svježeg uzorka ( $\mu\text{mol} \times \text{g}^{-1}$  sv.t.) te su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

### 3.5.12. Intenzitet lipidne peroksidacije (LPO) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

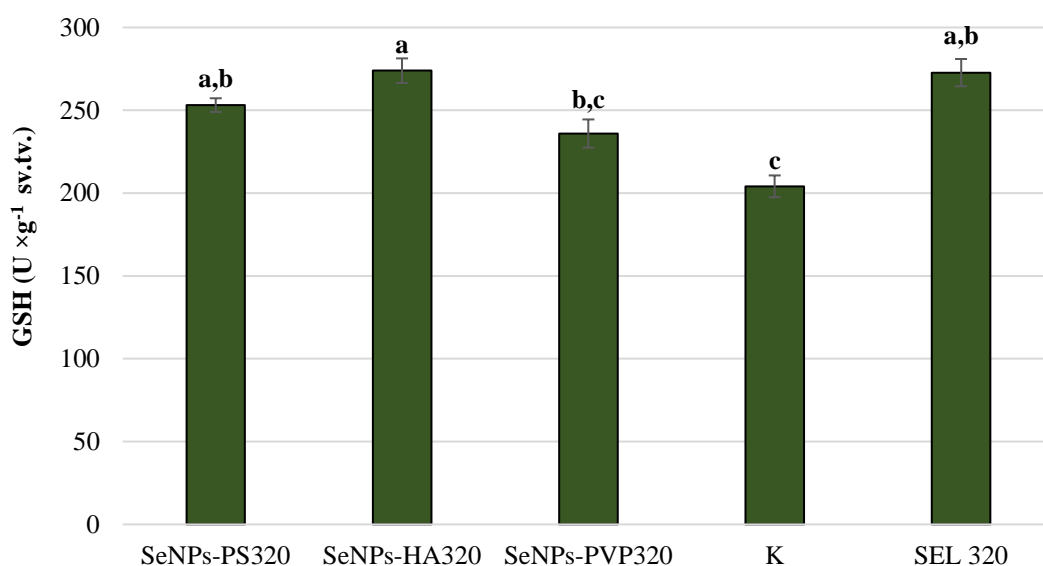
Tretmani biofortifikacije su značajno utjecali na intenzitet LPO kod rukole. Značajno veći intenzitet LPO u usporedbi sa svim ostalim varijantama pokusa je utvrđen kod tretmana SEL320. Zanimljivo, kod svih SeNPs tretmana je utvrđena značajno manji intenzitet LPO u usporedbi s kontrolom (Grafikon 49.).



**Grafikon 49.** Intenzitet LPO (TBARS (nmol x g<sup>-1</sup> sv.t.) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbatom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi u nmol po gramu svježe tvari (nmol x g<sup>-1</sup> sv.t.) te su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina (P < 0.05).

### 3.5.13. Koncentracije reduciranog glutationa (GSH) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Općenito, tretmani s oba oblika selena su utjecali na povećanje koncentracije GSH kod rukole. Kod tretmana SeNPs-PS320 utvrđena je najveća koncentracije GSH u usporedbi sa svim tretmanima biofortifikacije te je bila značajna u usporedbi s tretmanima SeNPs-PVP320 i kontrolom. Najniža koncentracija GSH utvrđena je u listovima kontrolnih biljaka te se značajno razlikovala od svih tretmana biofortifikacije osim od tretmana SeNPs-PVP320 (Grafikon 50.).

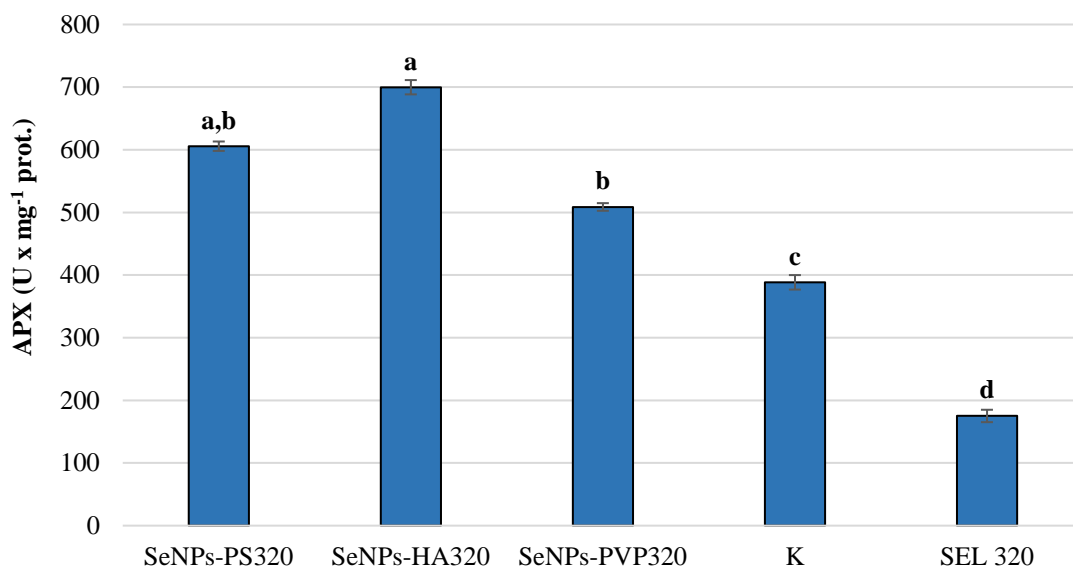


**Grafikon 50.** Koncentracije GSH u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbatom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi u nmol po gramu svježe tvari (nmol × g<sup>-1</sup> sv.t.) te su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina (P < 0.05).

#### 3.5.14. Aktivnost enzima askorbat-peroksidaze (APX) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Suprotno rezultatima kod špinata, tretmani biofortifikacije su značajno utjecali na promjene aktivnosti enzima APX kod rukole. Kod SeNPs tretmana utvrđena je značajno veća aktivnost enzima APX u odnosu na tretman SEL320 i kontrolu. Sukladno navedenom, najveća aktivnost APX utvrđena je kod tretmana SeNPs-HA320, a najmanja aktivnost je utvrđena kod tretmana SEL320 koja je ujedno bila i značajno najmanja (Grafikon 51.).

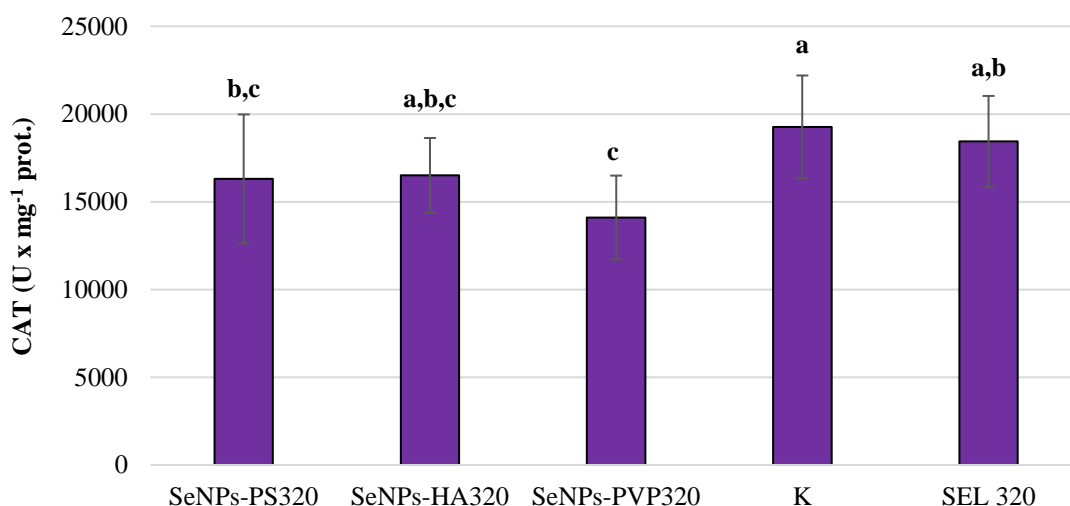




**Grafikon 51.** Aktivnost enzima APX u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbatom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi jedinicama aktivnosti APX po miligramu proteina ( $U \times mg^{-1} \text{ prot.}$ ) te su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

### 3.5.15. Aktivnost enzima katalaze (CAT) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

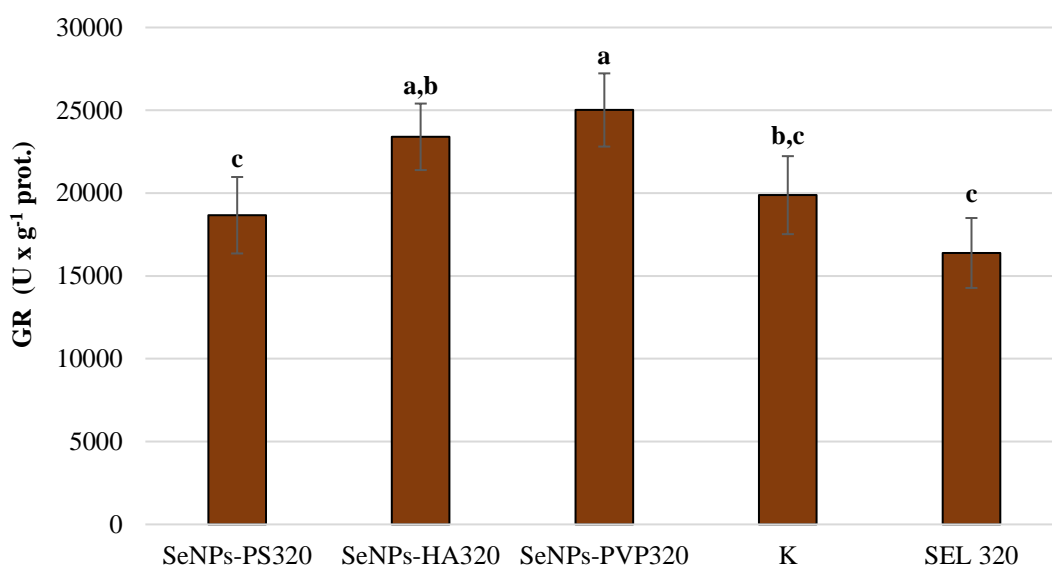
Ukupno, biofortifikacija rukole selenom u ovom istraživanju je utjecala na smanjenje aktivnosti CAT u usporedbi s kontrolom. Značajno manja aktivnost CAT je izmjerena kod biofortifikacije SeNPs i to kod tretmana SeNPs-PS320 i SeNPs-PVP320 kod kojeg je ujedno izmjerena i najmanja aktivnost enzima CAT (Grafikon 52.).



**Grafikon 52.** Aktivnost enzima CAT u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbatom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi jedinicama aktivnosti CAT po miligramu proteina ( $U \times mg^{-1} \text{ prot.}$ ) te su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

### 3.5.16. Aktivnost enzima glutation-reduktaze (GR) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

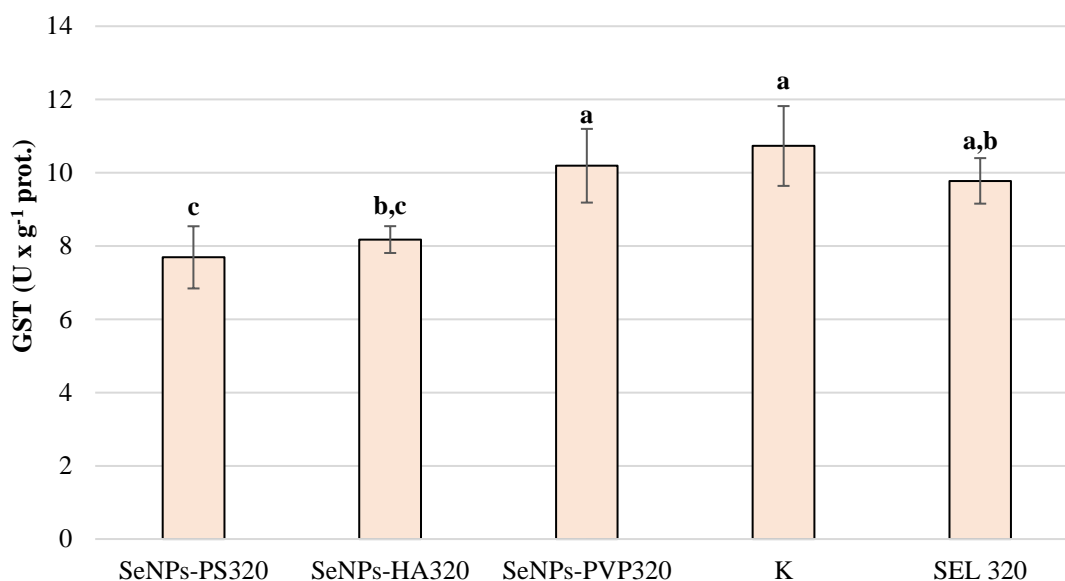
Općenito, biofortifikacijski tretmani su utjecali na promjene aktivnost enzima GR u listovima rukole. Kod tretmana SeNPs-PVP320 je utvrđena značajno veća aktivnost enzima GR u usporedbi sa svim tretmanima biofortifikacije i kontrolom uz iznimku tretmana SeNPS-HA320. Najmanja aktivnost enzima GR utvrđena je kod tretmana SEL320 tj. kod primjene selena u obliku selenata (Grafikon 53.).



**Grafikon 53.** Aktivnost enzima GR u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbatom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi jedinicama aktivnosti GR po gramu proteina ( $U \times g^{-1}$  prot.) te su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

### 3.5.17. Aktivnost enzima glutation-S-transferaze (GST) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

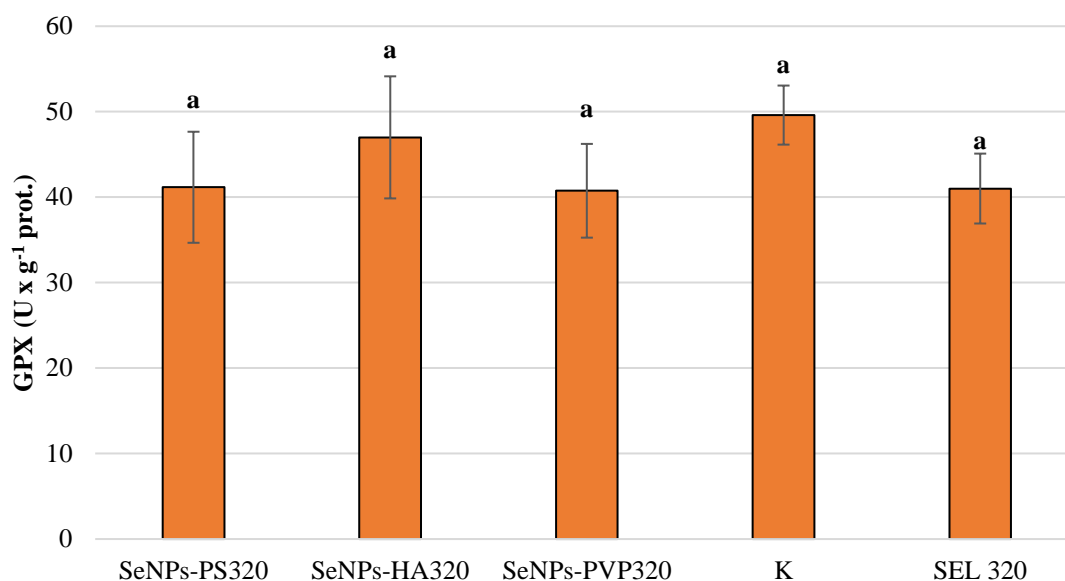
Suprotno rezultatima kod špinata, najveća aktivnost enzima GST kod rukole utvrđena je kod kontrole, a koja se značajna razlikovala od tretmana SeNPs-PS320 i SeNPs-HA320. Najmanja aktivnost GST utvrđena je kod tretmana SeNPs-PS320 koja se nije značajno razlikovala samo u usporedbi s tretmanom SeNPS-HA320 (Grafikon 54.).



**Grafikon 54.** Aktivnost enzima GST u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbatom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi jedinicama aktivnosti GST po gramu proteina (U x g<sup>-1</sup> prot.) te su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina (P < 0.05).

### 3.5.18. Aktivnost enzima glutation-peroksidaze (GPX) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

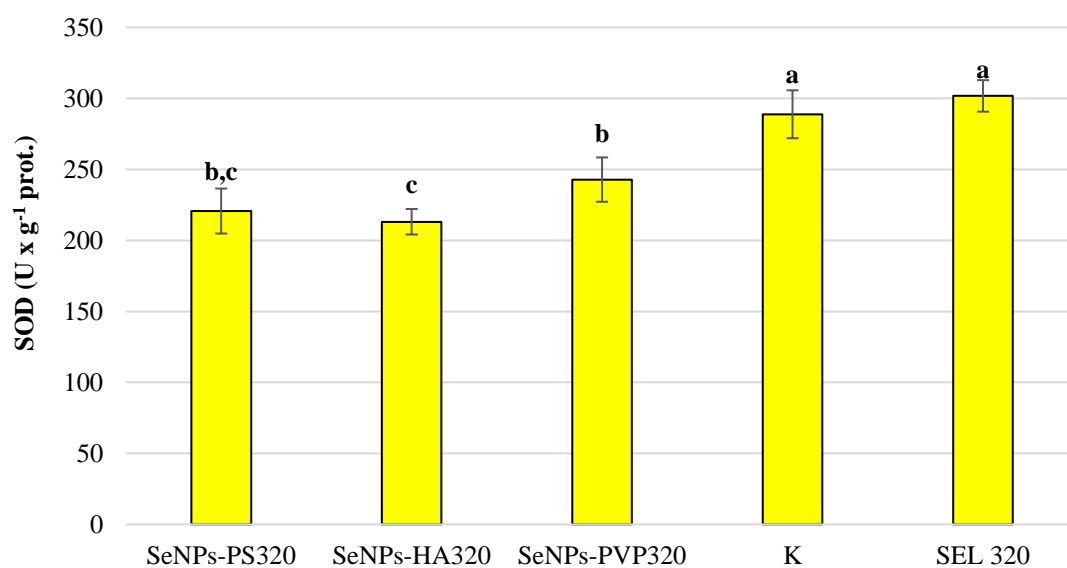
Općenito, tretmani biofortifikacije nisu značajno utjecali na aktivnost enzima GPX u listovima rukole. Nešto veća aktivnost enzima GPX izmjerena je kod kontrolnih biljaka i slična kod tretmana SeNPs-HA320, a najmanja aktivnost enzima GPX utvrđena je kod tretmana SeNPs-PVP320 s gotovo istim vrijednostima izmjerenim kod preostala dva tretmana. (Grafikon 55.).



**Grafikon 55.** Aktivnost enzima GPX u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbatom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi jedinicama aktivnosti GPX po gramu proteina ( $U \times g^{-1} \text{ prot.}$ ) te su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

### 3.5.19. Aktivnost enzima superoksid-dismutaze (SOD) u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i SeNPs

Biofortifikacija rukole selenovim nanočesticama je utjecala na značajno smanjenje aktivnosti enzima SOD u listovima rukole u usporedbi s kontrolnim biljkama. Najveća aktivnost enzima SOD je utvrđena kod tretmana SEL320, ali se nije značajno razlikovala od aktivnosti utvrđene u listovima kontrolnih biljaka. Najmanja aktivnost enzima SOD utvrđena je kod tretmana SeNPs-HA320 (Grafikon 56.).



**Grafikon 56.** Aktivnost enzima SOD u listovima rukole pod utjecajem biofortifikacije selenatom i selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbatom (SeNPs-PS), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) i polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP). Rezultati su izraženi jedinicama aktivnosti SOD po gramu proteina ( $U \times g^{-1} \text{ prot.}$ ) te su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Fisherovim LSD testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ( $P < 0.05$ ).

#### 4. RASPRAVA

Biofortifikacija različitim kemijskim oblicima selena u ovom istraživanju je utjecala na rast i razvoj špinata i rukole. Međutim, učinak biofortifikacije je bio ovisan o primijenjenoj koncentraciji i obliku Se. U prvoj godini vegetacije (2019.), biofortifikacija različitim oblicima Se značajno je utjecala na povećanje broja listova kod špinata (Tablica 5.), budući da je kod pojedinih tretmana i oba oblika Se utvrđen značajno veći broj listova u usporedbi s kontrolom. Također, tretmani biofortifikacije su utjecali na prosječno veći broj listova rukole (Tablica 12.) u usporedbi s kontrolom, ali razlika nije bila statistički značajna. Općenito, kod SeNPs tretmana utvrđen je linearan trend povećanja broja listova rukole uslijed povećanja koncentracije Se u hranjivoj otopini. Rezultati ovog istraživanja su u skladu s rezultatima istraživanja Nayan i sur. (2020.) koji su ispitali učinak biofortifikacije selenom u obliku selenata u različitim koncentracijama (60, 120 i 180 g ha<sup>-1</sup>), gdje su dobivenim rezultatima utvrdili značajno povećanje broja listova špinata (*Spinacia oleracea* L.) kod biofortificiranih biljaka u usporedbi s kontrolnim. Također, u istraživanju koje su proveli Thuc i sur. (2021.), biofortifikacija selenom u različitim koncentracijama (0, 5, 10, 20, 40 mg/L) značajno je povećala broj listova kod sezama (*Sesamum indicum* L.) koji je uzgajan u uvjetima sušnog stresa. U našem istraživanju tijekom druge godine vegetacije (2020.) su također utvrđeni značajni učinci biofortifikacije s oba oblika Se na broj listova kod špinata i rukole (Tablica 19. i 26.). Općenito, kod špinata značajno veći broj listova utvrđen je kod SeNPs tretmana, dok je kod rukole utvrđen kod tretmana selenatom. Iz ovoga proizlazi kako su dvije ispitivane vrste različito reagirale na oblik primijenjenog selena. Drugačiji učinak različitih oblika Se na rast i razvoj sadnica divlje breskve utvrdili su Sun i sur. (2020.) u svom istraživanju gdje su primijenili Se u obliku selenita, selenata, elementarnog Se i selenometionina. Organski oblik Se u obliku selenometionina se najbolje usvajao, a izražen pozitivan učinak na parametre rasta i razvoja je imao elementarni Se.

U prvoj i drugoj godini pokusa dužina korijena je značajno ovisila o biofortifikacijskim tretmanima. U prvoj godini pokusa pojedini tretmani biofortifikacije su uzrokovali značajno skraćivanje korijena (Tablica 5. i 12.), dok je u drugoj godini utvrđen značajno duži korijen kod pojedinih tretmana biofortifikacije u usporedbi s kontrolom (Tablica 19. i 26.). Stoga, kod špinata i rukole najveća dužina korijena utvrđena je kod tretmana SeNPs-HA320, što je i očekivano budući da huminska kiselina ima pozitivan utjecaj na rast korijena kod viših biljaka (Chen i sur., 2004; Rose i sur., 2014.) te može i

indirektno djelovati potičući sintezu specifičnih spojeva koji pojačavaju odgovor biljke na stres (De Hita i sur., 2020.).

Nadalje, u istraživanju Saffaryazdi i sur. (2012.) ispitan je utjecaj biofortifikacije selenom u obliku selenita u različitim koncentracijama (1, 2, 4, 6 i 10 mg L<sup>-1</sup>) na rast i razvoj špinata (*Spinacia oleracea* L.) u sustavu plutajućeg hidropona kao i u našem istraživanju. Dobivenim rezultatima su utvrdili da biofortifikacija selenom u nižim koncentracijama (1 i 2 mg L<sup>-1</sup>) povećava dužinu korijena, dok primjena većih koncentracija selena (6 i 10 mg L<sup>-1</sup>) značajno smanjuje dužinu korijena špinata. Treba napomenuti kako su koncentracije primijenjenog selena u našem istraživanju bile značajno manje te su preračunate na dovoljnu količinu Se u hranjivoj otopini u cilju optimalne biofortifikacije biljaka. Stoga, rezultati našeg istraživanja su u skladu s rezultatima prethodnog istraživanja.

Galić i sur. (2021.) su u svom istraživanju utvrdili da biofortifikacija matovilca (*Valerianella locusta* L.) selenom ne utječe značajno na povećanje svježe i suhe mase listova. Također, Mezeyova i sur. (2016.) su utvrdili isto u svom istraživanju u kojem su selenom biofortificirali bosiljak (*Ocimum basilicum* L.). Međutim, postoje brojna istraživanja koja ukazuju na suprotno, tj. da biofortifikacija selenom značajno utječe na povećanje svježe i suhe mase biljnih dijelova te općenito na povećanje biomase kod različitih biljnih vrsta (Esringu i sur., 2015; Sabatino i sur., 2019; Golubkina i sur., 2017.). Također, treba napomenuti da primjene velikih koncentracija Se mogu utjecati negativno na razvoj biljaka, na način da utječu na smanjenje ukupne biomase biljaka (Hawrylak-Nowak 2013; Ulhassan i sur., 2019.). U prvoj godini vegetacije ovog istraživanja, tretmani biofortifikacije nisu značajno utjecali na povećanje svježe mase listova i korijena kod obje ispitivane vrste (Tablica 6. i 13.). Međutim, pojedini tretmani biofortifikacije značajno su utjecali na povećanje suhe mase korijena i listova u usporedbi s kontrolom kod špinata i rukole. Kod špinata, značajno veća suha masa listova u usporedbi s kontrolom utvrđena je kod tretmana SEL80. Tretman SEL80 se pokazao najboljim i kod rukole gdje je također utvrđena najveća vrijednost suhe mase listova koja se značajno razlikovala od kontrole. U drugoj vegetacijskoj godini tretmani biofortifikacije su značajnije utjecali na povećanje svježe i suhe mase listova i korijena kod obje ispitivane vrste (Tablica 20. i 27.). Općenito, SeNPs tretmani su značajno utjecali na povećanje svježe i suhe mase listova špinata i rukole u usporedbi s kontrolom i tretmanom SEL320. Kod obje ispitivane vrste, biofortifikacija selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbitom (SeNPs-PS320) je rezultirala najvećom svježom i suhom masom listova. Također, na biofortificiranim biljkama zabilježene su značajno veće vrijednosti



svježe mase korijena u usporedbi s kontrolom. Najveća svježa masa korijena kod špinata utvrđena je kod tretmana SeNPs-PVP320, dok je najveća masa korijena kod rukole utvrđena kod tretmana SeNPs-PS320. Međutim, tretmani biofortifikacije nisu značajno utjecali na povećanje suhe mase korijena kod obje ispitivane vrste. Prema tome, biofortifikacija s različitim oblicima Se u našem istraživanju je imala i različit učinak na rast i razvoj špinata i rukole gdje primjena SeNPs ima značajniju ulogu u poticanju rasta i razvoja.

Dušik (N) ima središnju ulogu u povećanju prinosa usjeva i poboljšanju kvalitete usjeva u svim oblicima intenzivne poljoprivrede. Međutim, učinak N na apsorpciju Se iz biljaka može biti dvosmjernan (Zhou i sur., 2020.). Velikim brojem dosadašnjih istraživanja utvrđeno je da značajnu ulogu u procesu obogaćivanja biljaka selenom ima upravo dušik (Izydorczyk i sur., 2021; Reis i sur., 2018; Duncan i sur., 2017.), a što upućuje na sinergizam između ova dva elementa što je potvrđeno i u ovom istraživanju. Naime, biofortifikacija s oba oblika Se je značajno utjecala na povećanje sadržaja N kod ispitivanih vrsta i u korijenu i listovima u oba provedena pokusa uz iznimku sadržaja N u listovima rukole tijekom prvog biofortifikacijskog pokusa. Sukladno zadnje navedenom, sadržaj N kod listova rukole u prvoj vegetacijskoj godini se smanjivao povećanjem koncentracije Se u obliku SeNPs. Slične rezultate u svom istraživanju su dobili Pannico i sur. (2020.) gdje se sadržaj N u biljkama korijandra (*Coriandrum sativum* L.) te zelenog i crvenog bosiljka (*Ocimum basilicum* L.) značajno smanjivao povećanjem koncentracije Se u obliku selenata (0, 8, i 16  $\mu$ M). Općenito, u prvoj vegetacijskoj godini najveći sadržaj N u korijenu špinata i rukole utvrđen je kod tretmana selenatom (SEL40 i SEL160) (Tablica 7. i 14.). Također, u listovima rukole najveći sadržaj N utvrđen je kod tretmana selenatom (SEL160) (Tablica 15.), dok je najveći sadržaj N u listovima špinata utvrđen kod SeNPs tretmana (SeNPs-PVP80) (Tablica 8.). Kako je već prije navedeno, u drugoj vegetacijskoj godini u korijenu i listovima obje ispitivane vrste utvrđena su značajna povećanja sadržaja N u usporedbi s kontrolom (Tablica 21; 22; 28. i 29.). Općenito, u drugoj vegetacijskoj godini veći sadržaj N utvrđen je kod SeNPS tretmana. Najveći sadržaj N u korijenu i listovima špinata utvrđen je kod tretmana SeNPS-PS320. U korijenu rukole najveći sadržaj N utvrđen je kod tretmana SeNPs-PVP320, dok je u listovima utvrđen kod tretmana SeNPs-HA320.

Fosfor (P) je drugi najvažniji makroelement u smislu ograničavanja rasta biljaka. P je gradivni element u nukleinskim kiselinama, fosfolipidima, fosfoproteinima i raznim drugim metabolitima koji obuhvaćaju mnoge fiziološke aspekte rasta i razvoja biljaka (Ajmera i sur., 2019.). Biljke apsorbiraju P i Se kada su prisutni u anionskom obliku jer

imaju slične ionske radijuse te fizikalna i kemijska svojstva. Stoga se očekuje da kompeticija s anionima Se utječe na apsorpciju i akumulaciju P u biljkama (Zhou i sur., 2020.). Liu i sur. (2004.) u svom istraživanju na riži (*Oryza Sativa* L.) navode da je interakcija između Se i P bila značajna. S povećanjem opskrbe P, koncentracija Se u korijenu se značajno smanjila. Pojedina ispitivanja su utvrdila suprotno tj. pozitivnu korelaciju u usvajanju ova dva elementa (Zhang i sur., 2017; Pannico i sur., 2020; Moteshare Zadeh i sur., 2020.). Stoga, pravilna primjena P ključna je za kontrolu koncentracije Se u poljoprivrednim proizvodima. U prvoj vegetacijskoj godini ovog istraživanja biofortifikacija špinata i rukole Se je općenito uzrokovala smanjene sadržaja P u korijenu i listovima . U listovima špinata i rukole utvrđen je najveći sadržaj P kod tretmana s najmanjom primijenjenom koncentracijom Se tj. SeNPs-PVP40 i SEL40, ali u usporedbi s kontrolom nije utvrđena značajna razlika (Tablica 8. i 15.). U drugoj vegetacijskoj godini su utvrđeni gotovo suprotni rezultati. Za razliku od prve godine vegetacije u drugoj vegetacijskoj godini u korijenu špinata i rukole utvrđen je značajno veći sadržaj P kod SeNPs tretmana tj. SeNPs-PS320 i SeNPs-PVP320 u usporedbi s kontrolom (Tablica 21. i 28.), dok je najveći sadržaj P u listovima ispitivanih vrsta utvrđen kod kontrole (Tablica 22. i 29.). S obzirom na dobivene rezultate ovog istraživanja u obje godine, ne može se naći direktna poveznica utjecaja biofortifikacije Se u obliku selenata i SeNPs na usvajanje P te njegovu translokaciju u nadzemni dio.

Kalij (K) je najzastupljeniji anorganski kation, a važan je za osiguravanje optimalnog rasta biljaka. K je aktivator desetaka važnih enzima, sinteze proteina, transporta šećera, metabolizma N i C te je važan za proces fotosinteze. Također, ima važnu ulogu u formiranju prinosa i poboljšanju kvalitete (Xu i sur., 2020.). Brojna istraživanja upućuju na pozitivnu korelaciju između K i Se tijekom apsorpcije od strane biljke. Moteshare Zadeh i sur. (2019.) su u svom istraživanju ispitali utjecaj biofortifikacije Se u obliku selenata na sadržaj pojedinih elemenata ishrane kod lucerne (*Medicago sativa* L.). Utvrdili su značajno povećanje sadržaja K kod lucerne tretirane Se u usporedbi s kontrolom. Također, Kopsel i sur. (2000.) otkrili su da se sadržaj K u listovima kupusa (*Brassica oleracea* L.) linearno povećavao s porastom koncentracije Se u hranjivoj otopini. Suprotno tome, Hawrylak-Nowak (2008.) je u svom istraživanju utvrdila da povećavanje koncentracije Se značajno utječe na smanjenje sadržaja K u kukuruzu (*Zea mays* L.). U ovom istraživanju tretmani biofortifikacije su različito utjecali na sadržaj K između ispitivanih vrsta u obje vegetacijske godine. U prvoj godini vegetacije tretmani biofortifikacije su značajno utjecali na smanjenje sadržaja K u korijenu špinata i rukole (Tablica 7. i 15.), dok je najveći sadržaj K u listovima

špinata utvrđen kod tretmana SeNPS-PVP40 koji se nije značajno razlikovao od kontrole (Tablica 8.). Međutim, najveći sadržaj K u listovima rukole utvrđen je kod tretmana SEL320 koji se značajno razlikovao od kontrole (Tablica 16.). Prema tome, sukladno prethodnim navodima, i u ovom istraživanju je potvrđeno da biofortifikacija Se različito utječe na usvajanje i translokaciju K s obzirom na biljnu vrstu, ali i oblik Se.

Općenito, kod rukole se sadržaj K kod SeNPs tretmana smanjivao povećanjem koncentracije Se, dok se kod tretmana selenatom povećavao povećanjem koncentracije Se. Slične rezultate su zabilježili El Lateef Gharib i sur. (2019.) koji su utvrdili da se povećavanjem koncentracije SeNPs smanjuje koncentracija K u listovima crnog graha (*Vigna unguiculata* L.).

Kalcij (Ca) je bitan nutrijent za rast i razvoj biljaka, a regulira ekspresiju gena, održava funkciju stanica, potiče rast i razvoj biljaka te poboljšava otpornost biljaka na stres (Weng i sur., 2022.). Biofortifikacija biljaka Se u prvoj vegetacijskoj godini različito je utjecala na sadržaj Ca u korijenu i listovima istraživanih vrsta. Sadržaj Ca u korijenu špinata i rukole je bio značajno veći kod većine tretmana biofortifikacije u usporedbi s kontrolom (Tablica 7. i 15.). Suprotno tome, sadržaj Ca u listovima špinata i rukole se nije značajno povećao pod utjecajem tretmana biofortifikacije (Tablica 8. i 16.). Općenito, u drugoj vegetacijskoj godini tretmani biofortifikacije su imali različit utjecaj na sadržaj Ca u korijenu i listovima ispitivanih vrsta. Sadržaj Ca u korijenu špinata i listovima rukole se značajno smanjio kod biofortificiranih biljaka (Tablica 21. i 29.). Suprotno, značajno povećanje sadržaja Ca utvrđeno je u korijenu rukole kod tretmana SeNPs-PS320 (Tablica 28.). Slično rezultatima našeg istraživanja, Castillo-Godina i sur. (2016.) su utvrdili da primjena Se u obliku selenata u koncentracijama od 2 i 5 mg L<sup>-1</sup> ne utječe na povećanje sadržaja Ca u listovima, stabljici i plodu rajčice (*Solanum lycopersicum* L.). Pannico i sur. (2019.) su također dobili slične rezultate jer su utvrdili da biofortifikacija salate (*Lactuca sativa* L.) selenom (0-40 μM Se) ne utječe na povećanje sadržaja Ca u listovima salate.

Magnezij (Mg) je esencijalan element za biljke zbog sudjelovanja u procesima regulacije enzima, regulacije pH u stanicama, ionske ravnoteže te je ključni element u strukturi klorofila (Buturi i sur., 2021.). Newman i sur. (2021.) su u svom istraživanju ispitali utjecaj biofortifikacije bosiljka (*Ocimum basilicum* L.), korijandra (*Coriandrum sativum* L.) te zimskog luka (*Allium fistulosum* L.) različitim koncentracijama Se (0-10 mg L<sup>-1</sup>) na sadržaj pojedinih elemenata ishrane među kojima i na Mg. Utvrdili su da primjena različitih koncentracija Se ne utječe na promjenu sadržaja Mg kod ispitivanih vrsta. Rios i sur. (2013.)

su istražili utjecaj biofortifikacije različitih koncentracija Se u obliku selenita i selenata ( $0-120 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) na nutritivni status salate (*Lactuca sativa* L.). Utvrdili su da se sadržaj Mg u listovima salate značajno smanjivao prilikom povećavanja koncentracije selenita i selenata što je u skladu se rezultatima našeg istraživanja gdje je utvrđeno da su biofortifikacijski tretmani smanjili sadržaj Mg u korijenu i listovima rukole u oba biofortifikacijska pokusa (Tablica 15; 16; 28. i 29.). Međutim, kod špinata su tretmani biofortifikacije utjecali na značajno povećanje sadržaja Mg u korijenu u oba pokusa (Tablica 7. i 21.). Također, tretmani biofortifikacije su utjecali i na povećanje sadržaja Mg u listovima špinata, ali nije utvrđena značajna razlika u usporedbi s kontrolom (Tablica 8. i 22.). Kao i kod sadržaja K, učinak biofortifikacijskih tretmana na sadržaj Mg korijenu i listovima je ovisio o biljnoj vrsti.

Željezo (Fe) jedan je od najzastupljenijih elemenata u okolišu, a ipak treći najograničeniji nutrijent u biljkama prvenstveno zbog svoje niske topljivosti i oblika u kojem se nalazi u tlu. Fe je neophodno za mnoge vitalne procese kao što su sinteza DNK, proizvodnja energije, pretvorba energije i redukcija dušika. Fe se natječe s drugim prijelaznim metalima kao što su Cu, Zn i Mn za unos, transport i kemijske reakcije unutar biljnih stanica (Rai i sur., 2021.). Sadržaj Fe u korijenu i listu u našem istraživanju je bio pod značajnim utjecajem biofortifikacijskih tretmana, ali je također bio ovisan o biljnoj vrsti. Stoga, ponešto drugačiji trendovi sadržaja Fe su utvrđeni kod špinata i rukole. U istraživanju koje su proveli Selim i sur. (2022.) na klicama lucerne (*Medicago interexta* L.) utvrdili su da biofortifikacija SeNPs značajno utječe na povećanje sadržaja Fe. Također, Rios i sur. (2013.) navode da biofortifikacije Se u obliku selenita i selenata značajno utječe na povećanje sadržaja Fe kod salate (*Lactuca sativa* L.) što je u skladu s rezultatima našeg istraživanja gdje je utvrđeno da su biofortifikacijski tretmani utjecali na povećanje sadržaja Fe kod špinata u oba pokusa (Tablica 10. i 24.). Pannico i sur. (2020.) su istraživali utjecaj biofortifikacije različitih koncentracije Se na mineralni sastav četiri različite biljne vrste. Dobivenim rezultatima su utvrdili da biofortifikacija Se različito utječe na sadržaj Fe kod ispitivanih biljaka. Kod dvije biljne vrste zeleni bosiljak (*Ocimum basilicum* L.) i kineski kupus (*Brassica rapa* L.) utvrdili da biofortifikacija Se utječe na smanjenje sadržaja Fe u biljkama kao i u našem istraživanju u slučaju rukole, dok su kod druge dvije vrste (korijander (*Coriandrum sativum* L.) i ljubičasti bosiljak (*Ocimum basilicum* L. ) utvrdili suprotno, tj. da biofortifikacija Se značajno utječe na povećanje sadržaja Fe u biljkama.

Mangan (Mn) je bitan element za biljke, sudjeluje u nekoliko metaboličkih procesa, uglavnom u fotosintezi i kao kofaktor mnogih enzima. Mn ima bitnu ulogu u fotosustavu II

(PSII), koji osigurava potrebne elektrone za fotosintezu. Prekomjerne koncentracije Mn u biljnim tkivima mogu promijeniti različite procese, kao što su aktivnost enzima, apsorpcija, translokacija i iskorištavanje drugih mineralnih elemenata (Ca, Mg, Fe i P), uzrokujući oksidativni stres (Millaleo i sur., 2010.). Sadržaj Mn u korijenu i listovima u našem istraživanju se su se također razlikovao u ovisnosti o biljnoj vrsti. Biofortifikacija različitim oblicima Se je u prvoj vegetacijskoj godini utjecala na smanjenje sadržaja Mn kod korijena i listova rukole (Tablica 17. i 18.). U drugoj vegetacijskoj godini tretmani biofortifikacije nisu značajno utjecali na promjenu sadržaja Mn kod lista rukole, dok je kod korijena rukole značajno veći sadržaj utvrđen kod tretmana SeNPs-PS320 i kontrole u usporedbi s ostalim tretmanima biofortifikacije (Tablica 30. i 31.). Sadržaj Mn u listovima špinata nije bio pod utjecajem tretmana biofortifikacije u obje vegetacijske godine (Tablica 10. i 24.), dok je biofortifikacija Se kod pojedinih tretmana utjecala na povećan sadržaj Mn u korijenu špinata (Tablica 9. i 23.). U istraživanju koje su proveli Mimmo i sur. (2017.) biofortifikacija Se u različitim koncentracijama (10  $\mu$ M Se i 100  $\mu$ M Se) u obliku selenata nije značajno utjecala na povećanje sadržaja Mn kod korijena, izdanaka i ploda jagode (*Fragaria*  $\times$  *ananassa*). Također, slične rezultate su utvrdili i Newman i sur. (2021.) na bosiljku (*Ocimum basilicum* L.) i korijandru (*Coriandrum sativum* L.) te Rios i sur. (2013.) na salati (*Lactuca sativa* L.). Dakle, većina istraživanja potvrđuje kako Se ne utječe na sadržaj Mn što je potvrđeno i u našem istraživanju u slučaju sadržaja Mn u listovima rukole i špinata, dok su pojedini biofortifikacijski tretmani imali učinak na sadržaj Mn u korijenu obje vrste.

Cink (Zn) je važan mikroelement za rast i razvoj biljaka te je uključen u mnoge metaboličke procese biljaka. Zn je aktivator i kofaktor 300 enzima kao što su karboanhidraza, dehidrogenaza, alkalne fosfataze, fosfolipaze i RNA polimeraze u metabolizmu proteina, šećera, nukleinskih kiselina i masti, fotosintezi biljaka i biosintezi auksina (Bayanati i sur. 2022.). U našem istraživanju, primjena biofortifikacije s oba oblika Se je utjecala na značajno smanjenje sadržaja Zn u korijenu špinata u prvoj vegetacijskoj godini (Tablica 9.), dok je u listu špinata utvrđen suprotan rezultat, gdje je značajno najveći sadržaj Zn utvrđen kod tretmana SeNPs-PVP160 (Tablica 10.). Također, pojedini tretmani biofortifikacije su i na povećanje sadržaja Zn u korijenu i listu rukole u prvoj vegetacijskoj godini (Tablica 17. i 18.). Međutim, nije uočen jasan trend utjecaja biofortifikacije na sadržaj Zn kod obje vrste. U drugoj vegetacijskoj godini biofortifikacija biljaka Se je ukupno utjecala na povećanje sadržaja Zn kod korijena i listova ispitivanih vrsta iako je u nekim slučajevima utvrđen i suprotan učinak. Općenito, najveće koncentracije Zn u korijenu i

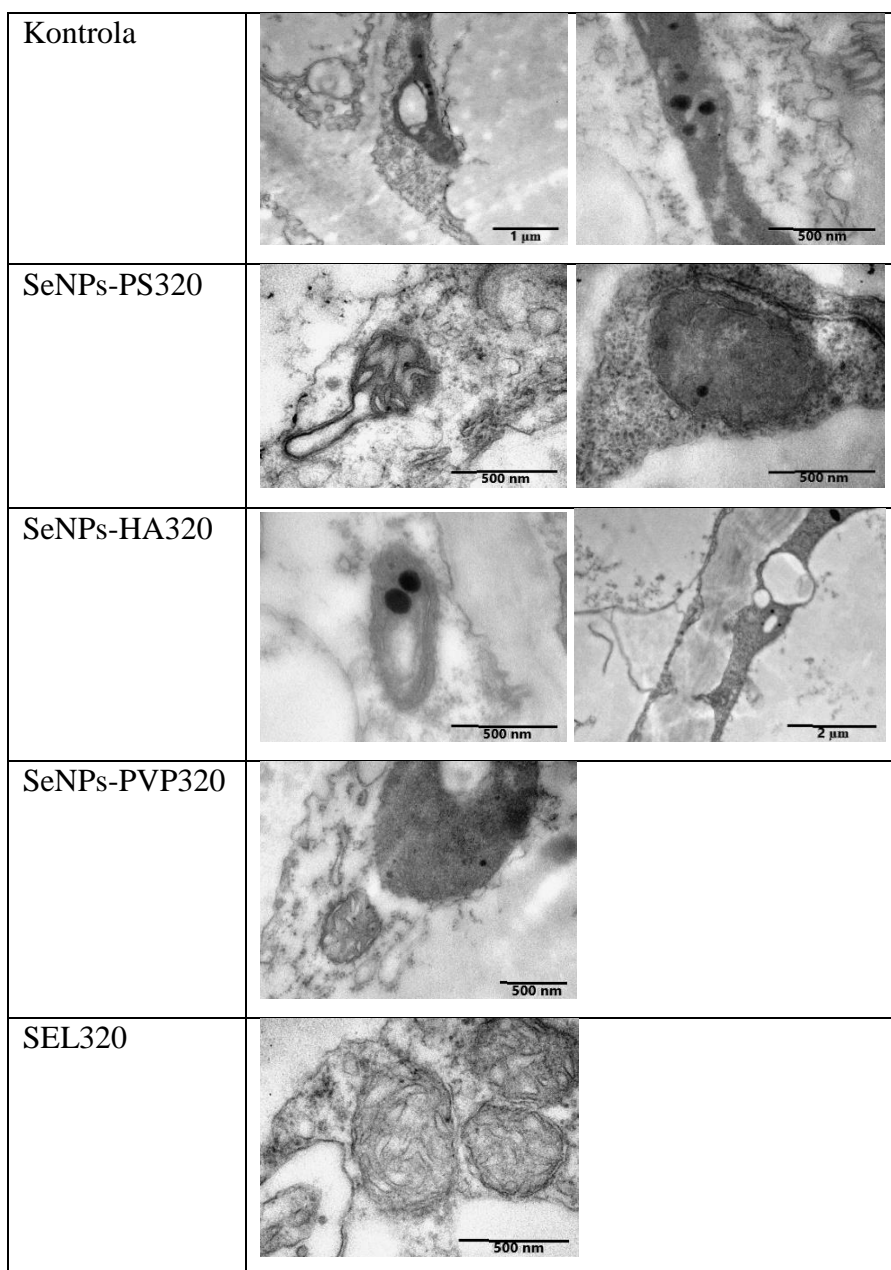
listovima špinata i rukole utvrđene su kod SeNPs tretmana u usporedbi s tretmanima selenatom i kontrolom (Tablica 23; 24; 30. i 31.). U istraživanju Selim i sur. (2022.), utvrđeno je da biofortifikacija Se u obliku SeNPs značajno utječe na povećanje sadržaja Zn u jednoj vrsti djeteline (*Medicago interexta* L.). Slične rezultate dobili su Moteshare Zadeh i sur. (2019.) kada su istraživali utjecaj biofortifikacije različitim koncentracijama Se u obliku selenata. Utvrdili su da biofortifikacija selenom značajno utječe na sadržaj Zn u korijenu i izdancima lucerne (*Medicago sativa* L.). Također, Puccineli i sur. (2022.) su utvrdili povećanje sadržaja Zn u salati (*Lactuca sativa* L.) kao posljedicu biofortifikacije Se u obliku selenata u koncentracijama 1 i 3 mg L<sup>-1</sup>.

Bakar (Cu) je bitan metal i mikroelement za normalan rast i razvoj biljaka, iako je također potencijalno toksičan. Sudjeluje u brojnim fiziološkim procesima i bitan je kofaktor za mnoge metaloproteine, ali u slučaju njegovog suviška dolazi do inhibicije rasta stanica te inhibicije različitih staničnih procesa (Yruela, 2005.). U našem istraživanju je utvrđeno da biofortifikacija Se utječe na usvajanje Cu kod obje vrste. Kod špinata je općenito utvrđen povećan sadržaj Cu u korijenu i listovima iako ne uvijek značajno veći (Tablica 9; 10; 23. i 24.). Što se tiče rukole, biofortifikacija Se je urokovala smanjenje sadržaja Cu u korijenu te nije imala značajniji utjecaj na sadržaj Cu u listovima (Tablica 17; 18; 30. i 31.). Također, kod obje vrste je sadržaj Cu bio i pod utjecajem kemijskog oblika Se. Različit utjecaj kemijskih oblika Se su utvrdili i Rios i sur. (2013.) u svom istraživanju gdje su dokazali da Se u obliku selenita značajno povećava sadržaj Cu u usporedbi s kontrolom, dok primjena Se u obliku selenata značajno smanjuje sadržaj Cu kod salate (*Lactuca sativa* L.). Nadalje, u istraživanju Nascimento da Silva i Cadore (2019.) utvrđeno je i da različite koncentracije te oblik Se (selenit i selenat) uzrokuju smanjenje sadržaja Cu kod salate (*Lactuca sativa* L.)

Biljke mogu igrati važnu ulogu u prevladavanju nedostatka Se u ishrani u različitim regijama svijeta. Selenit, selenat kao i SeNPs su tri glavne vrste Se u okolišu. Stoga je usvajanje, transport i transformacija Se u biljci usko povezana s njegovim kemijskim oblicima kao i primijenjenim koncentracijama (Li i sur., 2020.). Razlike u usvajanju te sadržaju Se kod obje vrste u ovom istraživanju uspoređujući SeNPs i selenat su rezultat različitih mehanizama usvajanja putem korijena te translokacije sve do listova biljaka. Poznato je da se selenat uglavnom akumulira u izdancima, a nakon usvajanja se prenosi sulfatnim transporterima do kloropasta te započinje redukciju do selenita (Li i sur., 2008.). Mehanizam kojim se SeNPs apsorbiraju još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. Jedna od opće prihvaćenih mogućnosti jest da se apsorpcija događa unutarstanično i izvanstanično kroz

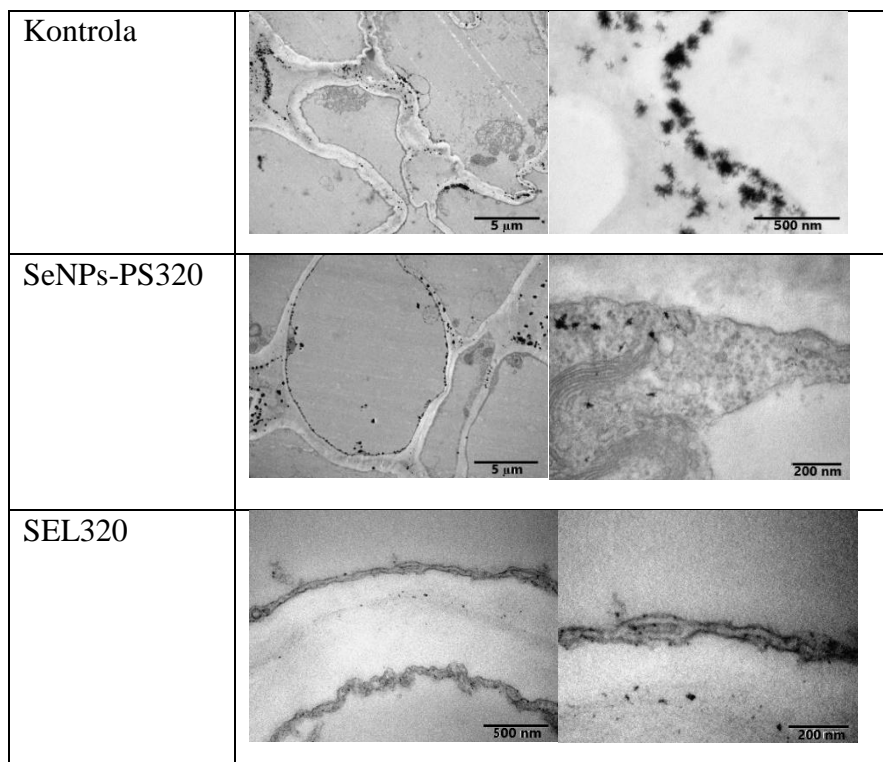
tkiva, sve do ksilema. Način na koji SeNPs prolaze kroz Kasparijev pojas još nije jasan. Također, moguće je da SeNPs veće od 20 nm povećavaju pore, potičući stvaranje šupljina koje ulaze putem endocitoze ili čak kroz transmembranske proteine ili ionske kanale (Garcia Marquez i sur., 2020; Nair i sur., 2010.). U prvom biofortifikacijskom pokusu sadržaj Se se kod oba kemijska oblika u korijenu i listovima ispitivanih vrsta povećavao kako je rasla primijenjena koncentracija Se u hranjivoj otopini za uzgoj biljaka (Tablica 1; 2; 15. i 16.). Prema tome, utvrđen je linearan trend povećavanja sadržaja Se u korijenu i listovima ispitivanih vrsta kod svih tretmana biofortifikacije što je u korelaciji s brojnim dosadašnjim istraživanjima (Rios i sur., 2013; do Nascimento da Silva i Cadore, 2019; Fan i sur., 2015; Puccinelli i sur., 2019.), a što i potvrđuje jednu od hipoteza ovog istraživanja. U korijenu špinata i rukole kod SeNPs tretmana utvrđen je značajno veći sadržaj Se u usporedbi s kontrolom i tretmanima selenatom. Ovakav trend je zapažen tijekom oba pokusa. Suprotno tome, značajno najveći sadržaj Se u listovima špinata i rukole je utvrđen kod tretmana selenatom u usporedbi s SeNPs tretmanima i kontrolom. Općenito, primjena Se u obliku SeNPs rezultirala je značajnim povećanjem koncentracije Se u korijenu špinata koja je bila i do 20 puta veća u usporedbi s biljkama biofortificiranim selenatom. Suprotno, koncentracija Se u listu špinata bila je prosječno 8 puta veća u slučaju biofortifikacije sa selenatom. Rezultati prvog pokusa su u skladu s rezultatima koje su dobili Wang i sur. (2020.) kada su istraživali utjecaj biofortifikacije Se u obliku SeNPs, selenita i selenata na usvajanje i translokaciju Se od korijena do lista riže (*Oryza sativa* L.). Utvrdili su da se selen u obliku SeNPs dobro usvaja te je njegova koncentracija u korijenu veća u usporedbi s biljkama biofortificiranih selenatom. Suprotno, kod tretmana selenatom, sadržaj Se je bio značajno veći u listu u usporedbi sa SeNPs tretmanom. Također, Li i sur. (2019.) su imali slično istraživanje gdje su u hidroponskim uvjetima biofortificirali češnjak (*Allium sativum* L.) s tri oblika Se, tj. selenitom, selenatom i SeNPs u različitim koncentracijama (0, 0.01, 0.1, 1, 10, 50 mg/L). Zaključili su da se selen u obliku SeNPs najslabije translocirao do listova i lukovice češnjaka, dok je najbolja translokacija Se od korijena do listova i lukovica utvrđena kod češnjaka biofortificiranog Se u obliku selenata. U našem istraživanju tijekom drugog biofortifikacijskog pokusa, značajno veći sadržaj Se u korijenu špinata i rukole ponovo su utvrđeni kod SeNPs tretmana (Tablica 29. i 43.). Suprotno, u listovima rukole značajno najveći sadržaj Se utvrđen je kod tretmana SEL320 tj. u slučaju kada je Se primijenjen u obliku selenata (Tablica 30. i 34.). Prethodno navedena istraživanja te rezultati ovog istraživanja kod rukole ukazuju da se biofortifikacijom SeNPs selen slabije translocira

do lista, tj. zadržava se u korijenu. Međutim, tijekom drugog pokusa sadržaj Se u listovima špinata je bio najveći kod tretmana SeNPs-PS320, a manji sadržaj Se u listu u usporedbi s biofortifikacijom selenatom (SEL320) je izmjeren kod tretmana SeNPs-HA320 (Grafikon 28.). Kontrola je očekivano uvijek imala značajno najmanji sadržaj Se. S ciljem detekcije i procjene sudbine tj. transformacije SeNPs u špinatu i rukoli, tijekom drugog pokusa uzeti su uzorci presjeka lista i korijena koji su snimljeni na transmisijskom elektronskom mikroskopu (TEM 902A, Carl Zeiss Meditec Ag, Jena, Njemačka). Na slikama 11 i 12. su prikazani presjeci korijena rukole i špinata.



**Slika 11.** TEM slike presjeka korijena rukole kod različitih biofortifikacijskih tretmana





**Slika 12.** TEM slike presjeka korijena špinata kod različitih biofortifikacijskih tretmana

Odabrane slike s TEM-a (kod kojih su detektirane nakupine veće elektronske gustoće) ne dokazuju sa sigurnošću detekciju SeNPs ili agregata selena. Detektirane su nakupine čestica koje bi mogle odgovarati opisu nanočestica Se (oko 100 nm, nešto veće elektronske gustoće od organskih molekula koje izgrađuju stanice), no jednake takve nakupine i čestice nađene su i u kontrolnim uzorcima koji nisu tretirani selenom. TEM slike listova nisu prikazane jer također ne potvrđuju detekciju SeNPs. Sukladno tome, ne može se sa sigurnošću tvrditi da li je došlo do prekomjernog nakupljanja SeNPs u korijenu rukole i špinata pa visoka koncentracija Se u korijenu biljaka biofortificiranih SeNPs u ovom istraživanju ostaje nerazjašnjena. Iako, veća koncentracija i poboljšana translokacija SeNPs tijekom druge godine istraživanja je vjerojatno rezultat općenito manjeg promjera SeNPs kako je opisano i navedeno u tablici 3. Također, da manji promjer i veličina čestice utječu na poboljšano usvajanje i translokaciju Se u obliku SeNPs potvrđuje istraživanje koje su proveli Hu i sur. (2018.) gdje su utvrdili pojačanu akumulaciju SeNPs u korijenu pšenice u slučaju manjeg promjera nanočestica.

Klorofili su esencijalni tetrapiroli odgovorni za prikupljanje sunčeve energije i prijenos elektrona u procesu fotosinteze (Sali i sur., 2018.). Osim toga, klorofil ima značajnu

ulogu u prehrani ljudi. Visoka razina klorofila u zelenom povrću povećava njegovu važnost u smislu bioloških funkcija i zaštitne uloge protiv niza kroničnih bolesti. Osim što pokazuje antioksidativno djelovanje, klorofil ima antimutageno te antikancerogeno djelovanje (Yilmaz i sur., 2016.). Karotenoidi u biljkama djeluju kao pomoćni pigmenti koji prikupljaju svjetlost i proširuju raspon apsorpcije svjetlosti, a također igraju vrlo važnu ulogu u zaštiti fotosintetskog aparata (Swapnil i sur., 2021.). U prvom biofortifikacijskom pokusu tretmani biofortifikacije su općenito uzrokovali povećanje sadržaja fotosintetskih pigmenta kod rukole i špinata uz pojedine iznimke (Tablica 11. i 18.). Ovaj rezultat je u korelaciji s istraživanjem El Lateef Gharib i sur. (2020.) u kojem su također ispitivali utjecaj biofortifikacije selenatom i SeNPs u četiri različite koncentracije Se (6,25, 12,5, 25 i 50  $\mu\text{M}$ ) na koncentraciju fotosintetskih pigmenta kod graha (*Vigna unguiculata* L.). Analizom rezultata su utvrdili da su značajno najveće sadržaje svih fotosintetskih pigmenta u listovima graha utvrđene kod tretmana s najmanjom koncentracijom Se (6,25  $\mu\text{M}$ ) kod oba primijenjena oblika. Također, povećavanjem tretmana Se sadržaj fotosintetskih pigmenta se značajno smanjivo te je kod najvećih primijenjenih koncentracija Se (50  $\mu\text{M}$ ) utvrđena najmanja koncentracija fotosintetskih pigmenta. Također, brojna istraživanja ukazuju da primjena Se u manjim koncentracija utječe na povećanje sadržaja fotosintetskih pigmenta (Sali i sur., 2018; Mateus i sur., 2021.) što je potvrđeno u drugoj vegetacijskoj godini gdje je biofortifikacija s oba oblika Se uzrokovala povećanje sadržaja svih fotosintetskih pigmenta (Tablica 25. i 32.). Kod špinata, najveća koncentracija Chl a i Chl b i Car utvrđena je kod tretmana SEL320, od čega je koncentracija Chl a bila značajno veća od one kod kontrolnih biljaka. Kod rukole je najveća koncentracija svih fotosintetskih pigmenta utvrđena kod tretmana SeNPs-PS320, ali u usporedbi s kontrolom nije utvrđena značajna razlika.

Fenolni spojevi (PHE) su sekundarni metaboliti biljaka koji imaju aromatski prsten koji nosi najmanje jednu hidroksilnu skupinu. PHE su dobri donori elektrona jer njihove hidroksilne skupine mogu izravno pridonijeti antioksidativnom djelovanju. Prema brojnim izvješćima u literaturi, PHE imaju važnu ulogu inhibiciji slobodnih radikala, razgradnji peroksida, inaktivaciji metala ili hvatanju singletnog kisika u biološkim sustavima i sprječavaju pojavu oksidativnih oštećenja (Wojdyło i sur., 2007.). U okviru ovog istraživanja, koncentracija PHE u prvoj vegetacijskoj godini kod špinata nije bila pod značajnim utjecajem tretmana biofortifikacije, dok je kod rukole utvrđeno značajno povećanje koncentracije PHE (Grafikon 4. i 18.). U usporedbi s kontrolom značajno veće

koncentracije PHE utvrđene su kod SeNPs-PVP320, SEL40 i SEL80. U drugoj vegetacijskoj godini tretmani biofortifikacije nisu značajno utjecali na povećanje koncentraciju PHE kod obje ispitivane vrste. Kod špinata najveća koncentracija PHE utvrđena je kod tretmana SeNPS-HA320, dok je kod rukole najveća koncentracija PHE utvrđena kod tretmana SeNPS-PS320 (Grafikon 32. i 46.). U istraživanju Zahedi i sur., (2019.) ispitivali su utjecaj biofortifikacije Se u obliku SeNPs i selenata u dvije koncentracije (1 i 2  $\mu$ M) na šipku (*Punica granatum* L.). Analizom rezultata su utvrdili da biofortifikacija s oba oblika Se značajno povećava koncentraciju PHE. Da biofortifikacija Se značajno utječe na povećanje koncentracije PHE utvrdili su i Shafiq i sur., 2019; Morales-Espinoza i sur., 2019; He i sur., 2020.

Askorbinska kiselina (AA) je antioksidans koji utječe na mitozu i rast stanica u biljkama, a važan je kofaktor za nekoliko enzima uključenih u sintezu niza sekundarnih metabolita uključujući fitohormone i zaštitu od oksidativnog stresa (Golubkina i sur., 2019.). U obje godine vegetacije, pojedini tretmani biofortifikacije su imali značajan utjecaj na povećanje koncentracije AA kod obje ispitivane vrste. U prvoj godini vegetacije, najveće koncentracije AA kod obje ispitivane vrste utvrđene su kod tretmana SeNPs-PVP40 i SeNPs-PVP80, što predstavlja tretmane s manjim primjenama koncentracijama Se (Grafikon 5. i 19.). Kod rukole oba navedena tretmana su bili značajno veći u usporedbi s kontrolom i svim tretmanima biofortifikacije osim tretmana SEL320. Također, svi tretmani selenatom su značajno utjecali na povećanje koncentracije AA u usporedbi s kontrolom, osim tretmana SEL40. Kao i kod rezultata utvrđenih kod špinata, u listovima rukole je također najveća koncentracija AA utvrđena kod tretmana SeNPs-PV40 koji se značajno razlikovao u usporedbi s kontrolom. Tretmani selenatom nisu značajno utjecali na povećanje koncentracije AA. U drugoj vegetacijskoj godini kod špinata najveća koncentracija AA utvrđena je kod tretmana SeNPS-PS320, dok je kod rukole značajno najveća koncentracija utvrđena kod tretmana SeNPs-PS320 i SeNPs-HA320 (Grafikon 33. i 47.). Općenito, u ovom istraživanju veće koncentracije AA su utvrđene kod SeNPs tretmana u usporedbi s tretmanima selenatom. Osim što Wang i sur. (2021) navode da su SeNPs manje toksične i biokompatibilnije od drugih kemijskih oblika Se, treba napomenuti da se prilikom sinteze SeNPs kao biokompatibilno i nisko toksično redukcijsko sredstvo koristila upravo askorbinska kiselina. Rezultati ovog istraživanja su u korelaciji s brojnim dosadašnjim istraživanjima u kojima je također utvrđeno značajno povećanje koncentracije AA uslijed primjene različitih oblika Se (Golubkina i sur., 2019; Huang i sur., 2019; He i sur., 2020.).

Ukupni antioksidativna aktivnost (UAA) biljaka ne ovisi samo o njegovom sadržaju i sastavu fenola, već i o sadržaju drugih antioksidansa, primjerice askorbinske kiseline. Osim toga mogao bi postojati sinergizam ili antagonizam između ovih aktivnih spojeva (Chrpova i sur., 2010.). U ovom istraživanju utvrđeno je da su tretmani biofortifikacije značajno utjecali na povećanje vrijednosti UAA kod špinata i rukole u prvoj vegetacijskoj godini. Kod špinata primjena SeNPs pri koncentraciji od  $40 \mu\text{mol m}^{-3}$  (SeNPS-PVP40) je utjecala na značajno povećanje vrijednosti UAA u usporedbi s kontrolom (Grafikon 6. i 20.). Ovaj rezultat može se usporediti s vrijednostima PHE i AA kod špinata, gdje su također najveće vrijednosti utvrđene kod tretmana s manjim primjenama SeNPs ( $40$  i  $80 \mu\text{mol Se/m}^3$ ). U Usporedbi s SeNPs tretmanima, svi tretmani selenatom su značajno utjecali na povećanje vrijednosti UAA kod špinata u usporedbi s kontrolom. U drugoj vegetacijskoj godini biofortifikacija različitim oblicima Se nije značajno utjecala na povećanje vrijednosti UAA kod ispitivanih vrsta. Kod špinata najveće vrijednosti UAA utvrđene su kod tretmana SeNPS-HA320, dok je najmanja vrijednost UAA utvrđena kod tretmana SeNPS-PS320 kod kojeg je utvrđena značajno manja vrijednost u usporedbi s kontrolom. Kod rukole je također najveća vrijednost utvrđena kod tretmana SeNPS-HA320, dok su tretmani SeNPS-PVP320 i SEL320 utjecali na značajno smanjenje vrijednosti UAA. Vrijednosti UAA u drugoj godini vegetacije kod obje ispitivane vrste u korelaciji su s vrijednostima PHE (Grafikon 34. i 48.). Osim što brojna istraživanja upućuju na pozitivan utjecaj biofortifikacije Se na povećanje UAA (Ekanayake i sur., 2015; Wang i sur., 2013.), utjecaj na povećanje UAA je u korelaciji s povećanim koncentracijama AA i PHE (Bachiega i sur., 2016; Aryal i sur., 2019. ).

Lipidna peroksidacija (LPO) najočitiji je simptom oksidativnog stresa u biljkama, koji utječe na svojstva membrane, ograničava kapacitet ionskog transporta te u konačnici pokreće proces stanične smrti (Awasthi i sur., 2018.). Lipidna peroksidacija, koja ukazuje na stupanj oksidacijskih oštećenja u stanicama, glavni je pokazatelj učinka oksidativnog stresa (Kong i sur. 2016.). Se pri niskim koncentracijama poboljšava obrambeni sustav biljaka detoksikacijom unutarstaničnih slobodnih radikala, i povećanjem enzimske i neenzimske aktivnosti, što može pomoći biljkama da eliminiraju suvišak ROS-a i spriječe oksidativni stres (Lanza i Reis, 2021.). Tretmani biofortifikacije su različito utjecali na razinu LPO između dvije ispitivane vrste. Kod špinata značajno najmanje količine TBARS-a utvrđene su kod tretmana s primjenom većih koncentracija SeNPs i to kod tretmana SeNPs-PVP160 i SeNPs-PVP320 (Grafikon 7. i 21.). Kod tretmana s primjenom manjih koncentracija SeNPs (SeNPs-PVP40 i SeNPs-PVP80) utvrđena je značajno veća količina

TBARS-a u usporedbi s kontrolom. Općenito, kod svih tretmana selenatom utvrđena je značajno veća količina TBARS-a u usporedbi s kontrolom, osim kod tretmana SEL80. Kod rukole značajno najmanje količine TBARS-a utvrđene su kod tretmana s manjim primijenjenim koncentracijama Se, tj. kod tretmana SeNPS-80 i SEL40. Rezultati koji su dobiveni kod rukole su u korelaciji s brojim istraživanjima koje ukazuju da se primjenom manjih koncentracija Se smanjuje razina LPO (Mroczek-Zdyrska i Wójcik, 2012; Hartikainen i sur., 2000; Józwiak i Politycka, 2019.). U drugoj vegetacijskoj godini tretmani biofortifikacije su različito utjecali na količinu TBARS-a između ispitivanih vrsta. Kod špinata značajno najmanja količina TBARS-a utvrđena je kod tretmana SeNPs-PS320, dok je kod tretmana SeNPs-HA320 utvrđena značajno najveća količina TBARS-a. Ostali tretmani biofortifikacije se nisu značajno razlikovali u usporedbi s kontrolom. Analizom rezultata utvrđeno je da svi SeNPs tretmani značajno utječu na smanjenje količine TBARS-a kod rukole. Od svih SeNPs tretmana značajno najmanje količine TBARS-a utvrđene su kod tretmana SeNPs-PS320. Kod tretmana selenatom (SEL320) utvrđeno je značajno povećanje količine TBARS u usporedbi s kontrolom (Grafikon 35. i 49.)

Uz askorbinsku kiselinu (AA), glutation (GSH) je snažan antioksidans koji ima ključnu ulogu u očuvanju normalne ravnoteže između oksidacije i antioksidacije; regulira broj vitalnih funkcija stanica kao što su sinteza i popravak DNA, sinteza proteina te aktivacija i regulacija enzima u biljkama (Dawood i sur., 2020.). Analizom rezultata prve vegetacijske godine kod špinata je utvrđeno da koncentracija GSH ovisi o obliku biofortificiranog Se (Grafikon 8.). Svi SeNPs tretmani značajno utječu na smanjenje koncentracije GSH, dok tretmani selenatom utječu na povećanje koncentracije GSH, od čega je kod tretmana SEL80 i SEL160 utvrđena značajna razlika u usporedbi s kontrolom. Kod rukole koncentracija GSH je ovisila o koncentraciji primijenjenog Se. Najveće koncentracije GSH kod oba oblika Se utvrđene su kod tretmana s manjim primijenjenim koncentracijama Se (40 i 80  $\mu\text{mol Se/m}^3$ ), dok su najmanje koncentracije GSH utvrđene kod tretmana s većim primijenjenim koncentracijama Se (160 i 320  $\mu\text{mol Se/m}^3$ ) (Grafikon 22.). Prema tome, može se zaključiti da je na promjenu koncentracije GSH kod špinata utjecaj imao oblik Se, dok je kod rukole utjecaj na promjenu koncentracije GSH imala primijenjena koncentracija Se. U drugoj vegetacijskoj godini tretmani biofortifikacije nisu značajno utjecali na povećanje koncentracije GSH kod špinata te je značajno manja koncentracija u usporedbi s kontrolom utvrđena kod tretmana SeNPs-PS320 (Grafikon 36.). Kod rukole svi tretmani

biofortifikacije su značajno utjecali na povećanje koncentracije GSH, osim tretmana SeNPS-PVP320 koji se nije značajno razlikovao od kontrole (Grafikon 50.).

Glavni sustav detoksikacije  $H_2O_2$  u biljnim stanicama je ciklus askorbat-glutation, u kojem enzimi askorbat peroksidaze (APX) igraju ključnu ulogu. APX je prisutan u različitim podstaničnim odjeljcima, kao što su kloroplasti, mitohondriji i citosol. Ekspresija APX gena regulirana je kao odgovor na biotičke i abiotičke stresove, kao i tijekom razvoja biljke. APX odgovori izravno su uključeni u zaštitu biljnih stanica od nepovoljnih okolišnih uvjeta (Caverzan i sur., 2012.). U prvoj godini vegetacije kod ispitivanih vrsta značajno najveće aktivnosti enzima APX utvrđene su kod SeNPs tretmana s manjim primijenjenim koncentracijama Se, kod špinata tretman SeNPs-PVP80, dok je kod rukole značajno najveća aktivnost utvrđena kod tretmana SeNPs-PVP40 (Grafikon 9. i 23.). Kod svih tretmana selenatom utvrđene s manje aktivnosti enzima APX u usporedbi s kontrolom, ali nisu utvrđene značajne razlike. Općenito, u prvoj vegetacijskoj godini povećanje aktivnosti APX bilo je praćeno s povećanom koncentracijom AA. Ovaj rezultat je u korelaciji s istraživanjem Józwiak i Politycka, (2019.) u kojem su ispitali utjecaj djelovanja Se u koncentracijama od 1, 5 i 10  $\mu M$  na ublažavanje oksidativnog stresa kod krastavca (*Cucumis sativus* L.). Analizom rezultata su utvrdili da je najveća aktivnost enzima APX utvrđena kod primjene Se u manjim koncentracijama. U drugoj vegetacijskoj godini tretmani biofortifikacije nisu značajno utjecali na promjenu aktivnosti enzima APX kod špinata (Grafikon 37.). Kod rukole svi SeNPS tretmani su utjecali na značajno povećanje aktivnosti enzima APX, dok je tretman selenatom (SEL320) utjecao na značajno smanjenje aktivnosti APX (Grafikon 52.). Također, povećanjem aktivnosti enzima APX kod rukole popraćeno je povećanjem koncentracije AA. Općenito, u ovom istraživanju primjena SeNPs je značajno utjecala na povećanje aktivnosti enzima APX kod špinata i rukole što je u korelaciji s istraživanjem Morales-Espinoza i sur. (2019.) u kojem je primjena SeNPs utjecala na povećanje aktivnost enzima APX kod rajčice (*Solanum lycopersicum* L.). Suprotno tome, primjena tretmanima selenatom utjecala je na smanjenje aktivnosti enzima APX kod obje ispitivane vrste. Da primjena selenata utječe na smanjenje aktivnosti enzima APX utvrdili su Hawrylak-Nowak i sur. (2018.) na matovilcu (*Valerianella locusta* L.).

Katalaza (CAT) je antioksidativni enzim prisutan u svim aerobnim organizmima. Poznato je da katalizira  $H_2O_2$  u vodu i kisik na energetski učinkovit način u stanicama izloženim stresu iz okoliša. Katalaza se nalazi na svim glavnim mjestima proizvodnje  $H_2O_2$  u staničnom okruženju (kao što su peroksisomi, mitohondriji, citosol i kloroplast) viših

biljaka (Sharma i Ahmad, 2014.). U prvoj vegetacijskoj godini najveća aktivnost enzima CAT u špinatu utvrđena je kod tretmana SeNPs-PVP80 koja se značajno razlikovala od svih tretmana biofortifikacije i kontrole osim tretmana SEL320 (Grafikon 10.). Kod rukole najveća aktivnost enzima CAT utvrđena je kod tretmana SEL320, ali nije utvrđena značajna razlika između tretmana biofortifikacije i kontrole (Grafikon 24.). Općenito, kod tretmana selenatom aktivnost enzima CAT je linearno rasla povećavanjem koncentracije selenata u hranjivoj otopini kod obje ispitivane vrste. Ovaj rezultat se može usporediti s istraživanjem Kaur i Sharma (2018.) u kojem su ispitali utjecaj selenita i selenata u različitim koncentracijama (2 i 4 mg Se kg<sup>-1</sup>) na antioksidativni odgovor pšenice (*Triticum aestivum* L.). Analizom rezultata su utvrdili da se aktivnost enzima CAT linearno povećavala uslijed povećavanja koncentracija selenata i selenita. U drugoj vegetacijskoj godini tretmani biofortifikacije nisu značajno utjecali na promjenu aktivnosti CAT između ispitivanih vrsta. Najveća aktivnost enzima CAT u rukoli utvrđena je kod kontrole te je značajno manja aktivnost CAT u usporedbi s kontrolom utvrđena kod tretmana SeNPS-PS320 i SeNPS-PVP320 (Grafikon 38. i 52.).

Glutation reduktaza (GR) dio je antioksidativnog obrambenog sustava biljaka te sudjeluje u enzimskim i neenzimskim oksidacijsko redukcijskim procesima stanice. Glutation reduktaza (GR) je ovisna o NADPH za njegovu katalizu GSSG-a u GSH, i preko njega održavaju visok omjer GSH/GSSG-a u stanici (Tanwir i sur., 2021.). U prvoj vegetacijskoj godini tretman SEL40 je jedini imao utjecaj na povećanje aktivnosti enzima GR kod rukole, dok kod špinata nije utvrđena značajna razlika između tretmana biofortifikacije i kontrole (Grafikon 11. i 25.). U drugoj vegetacijskoj godini SeNPs tretmani su značajno utjecali na povećanje aktivnosti enzima GR kod obje ispitivane vrste (Grafikon 39. i 53.). Kod špinata značajno najveća aktivnost enzima GR utvrđena je kod tretmana SeNPs-PS320, a kod rukole kod tretmana SeNPs-PVP320. Ostali tretmani biofortifikacije se nisu značajno razlikovali od kontrole kod obje ispitivane vrste. Slično istraživanje proveli su Mateus i sur. (2021.) u kojem su ispitali utjecaj SeNPs i selenata u različitim koncentracijama (10, 20, 40, 80, 100 i 160 mg L<sup>-1</sup>) na antioksidativni odgovor kave (*Coffea arabica* L.). Analizom rezultata su utvrdili da biofortifikacija s oba oblika selena značajno utječe na povećanje aktivnosti enzima GR te su tretmani SeNPs imali značajnija povećanja u usporedbi s tretmanima selenatom kao i u ovom istraživanju.

Enzim glutathion-s-transferaza (GST) uklanja reaktivne molekule dodatkom glutathiona (GSH) i štiti stanicu od oksidativnog oštećenja (Kumar i Trivedi, 2018.).

Analizom rezultata u prvoj i drugoj vegetacijskoj godini utvrđeno je da biofortifikacija različitim oblicima Se ima značajan utjecaj na promjene aktivnost enzima GST u ovisnosti o biljnoj vrsti. SeNPs tretmani su značajno utjecali na povećanje aktivnosti enzima GST kod špinata u obje vegetacijske godine. U prvoj vegetacijskoj godini tretmani s manjim koncentracijama SeNPs (SeNPs-PVP40 i SeNPs-PVP80) su značajno utjecali na povećanje aktivnost enzima GST u usporedbi s kontrolom i ostalim tretmanima biofortifikacije (Grafikon 12. i 26.). SeNPs tretmani su utjecali na povećanje aktivnosti enzima GST i u drugoj vegetacijskoj godini gdje su značajno veće vrijednosti u usporedbi s kontrolom utvrđene kod tretmana SeNPS-HA320 i SeNPS-PVP320 (Grafikon 40. i 54.). Vrijednosti aktivnosti enzima GST kod tretmana selenatom se nisu značajno razlikovale od kontrole. Suprotno rezultatima utvrđenim na špinatu, kod rukole su tretmani biofortifikacije utjecali na smanjenje aktivnosti enzima GST. U prvoj vegetacijskoj godini na značajno smanjenje aktivnosti enzima GPS su utjecali svi tretmani biofortifikacije osim tretmana SeNPS-PVP40 i SEL160. Također, u drugoj vegetacijskoj godini je utvrđena značajno najveća aktivnost enzima GST kod kontrole koja se značajno razlikovala od tretmana SeNPs-PS320 i SeNPS-HA320. Iako brojna istraživanja upućuju da prisutnost Se u biljkama povećava aktivnost enzima GST (Mostofa i sur., 2017; Akbulut i Çakir, 2010.), rezultatima ovog istraživanja se može zaključiti da je aktivnost enzima GST bila pod utjecajem biljne vrste te oblika i koncentracije Se.

Glutation peroksidaza (GPX) jedan je od najvažnijih selenoenzima zbog svoje uloge u nizu bioloških funkcija uključujući detoksikaciju  $H_2O_2$  i hidroperoksida (Masuda i Goto, 2022.). Brojna dosadašnja istraživanja upućuju da primjena Se značajno utječe na povećanje aktivnosti ovog enzima. Hawrylak-Nowak i sur. (2018.) su u svom istraživanju utvrdili da se nakon primjene Se aktivnost GPX značajno povećala kod matovilca (*Valerianella locusta* L.). Također, Hartikainen i sur. (2000) su utvrdili isto nakon biofortifikacije ljulja (*Lolium perenne* L.) selenom. U ovom istraživanju nisu utvrđene takve tvrdnje. Biofortifikacija s različitim oblicima Se nije značajno utjecala na povećanje aktivnosti enzima GPX kod obje ispitivane vrste u dvije vegetacijske godine. U prvoj vegetacijskoj godini kod špinata značajno manja aktivnost enzima GPX u usporedbi s kontrolom utvrđena je kod primjene Se pri koncentraciji od  $80 \mu\text{mol m}^{-3}$ , tj. kod tretmana SeNPs-PVP80 i SEL80 (Grafikon 13.). Kod rukole značajno manja aktivnost enzima GPX u usporedbi s kontrolom utvrđena je kod tretmana SeNPs-PVP320 i SEL80 (Grafikon 27.). U drugoj vegetacijskoj godini nisu utvrđene značajne razlike između tretmana biofortifikacije i kontrole kod obje ispitivane

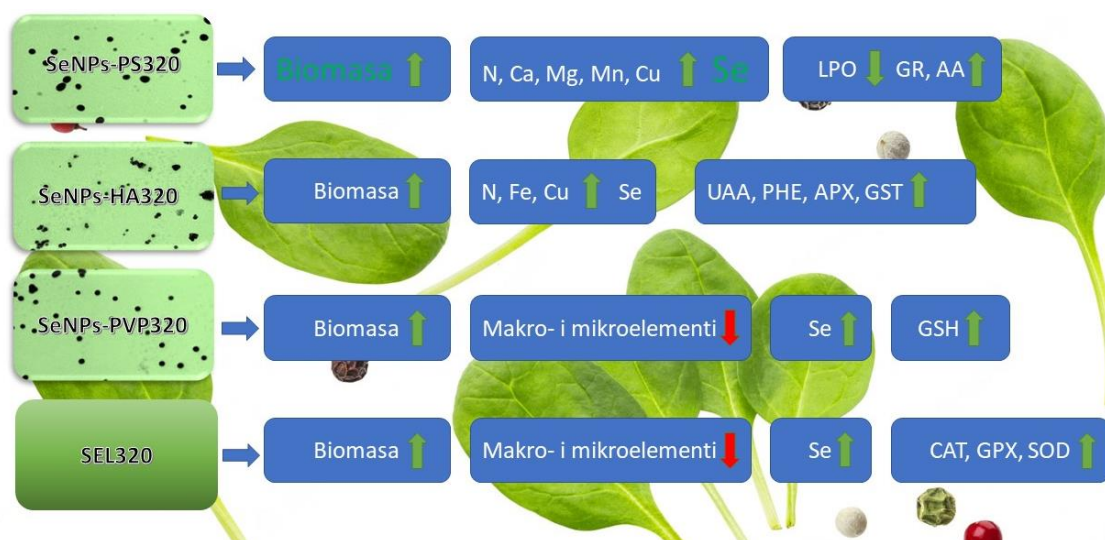


vrste (Grafikon 41. i 55.). Jedan od mogućih razloga izostanka aktivnosti enzima GPX u ovom istraživanju, odnosno smanjenja, je taj da se ovisno o biljnoj vrsti iniciraju drugi antioksidativni odgovori biljke koji mogu uključivati slične enzime.

Kada se unutra stanice pojavi povećano stvaranje ROS-a u uvjetima stresa, superoksid dismutaze (SOD) čine prvu liniju obrane (Alscher i sur., 2002.). Rezultati u prvoj vegetacijskoj godini pokazuju da biofortifikacija različitih oblika Se utječu na povećanje aktivnost enzima SOD kod špinata (Grafikon 14.). Kod SeNPs tretmana utvrđene su značajno veće aktivnosti enzima SOD u usporedbi s kontrolom osim kod tretmana s najvećom primijenjenom koncentracijom (SeNPs-PVP320). Kod tretmana selenatom značajno veća aktivnost enzima SOD u usporedbi s kontrolom utvrđena je kod tretmana SEL80. Slične rezultate zabilježili su Morales-Espinoza i sur. (2019.) u svome istraživanju gdje su biofortifikacijom SeNPs ispitivali utjecaj na antioksidativni odgovor rajčice (*Solanum lycopersicum* L.) pod uvjetima solnog stresa. Analizom rezultata su utvrdili da SeNPs tretmani značajno povećavaju aktivnosti enzima SOD. Kod rukole biofortifikacija različitim oblicima Se nije utjecala na značajno povećanje aktivnosti SOD (Grafikon 28.). U drugoj vegetacijskoj godini tretmani biofortifikacije nisu značajno utjecali na povećanje aktivnosti SOD kod obje ispitivane vrste (Grafikon 42. i 56.). Kod špinata nisu utvrđene značajne razlike između aktivnosti enzima SOD kod svih tretmana biofortifikacije i kontrole, dok je kod rukole najveća aktivnost enzima SOD utvrđena kod kontrole i tretmana SEL320 te su svi SeNPs tretmani utjecali na značajno smanjenje aktivnosti enzima SOD. Rezultati aktivnosti enzima SOD u drugoj vegetacijskoj godini su u korelaciji s brojnim istraživanjima koje ukazuju da biofortifikacije selenom ne utječe na povećanje aktivnosti enzima SOD (Lara i sur., 2019; Cavalcanti i sur., 2004.).

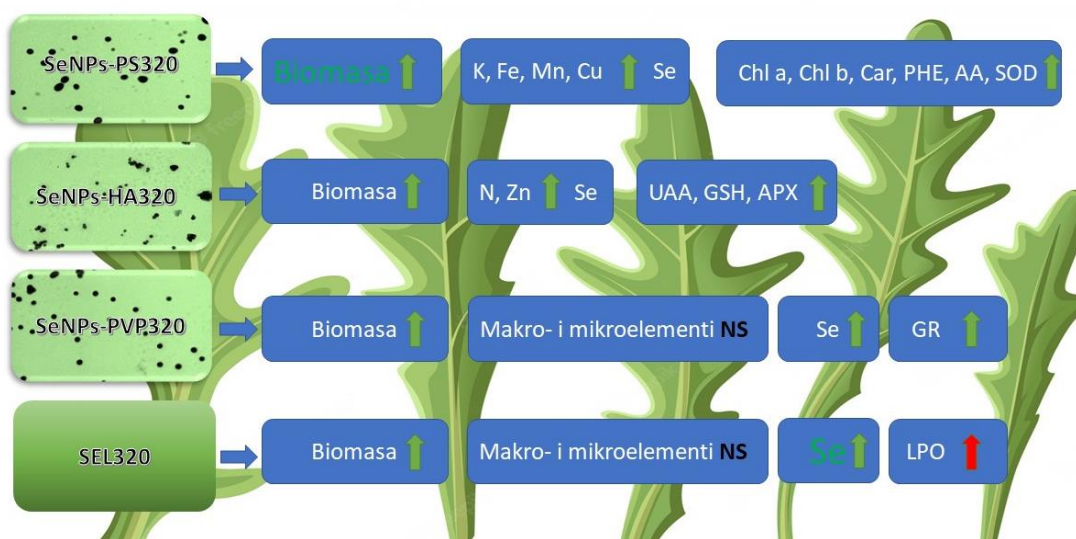
S obzirom na sve navedene učinke različitih biofortifikacijskih tretmana u ovom istraživanju, svaki tretman se odlikovao specifičnim utjecajem na ispitivane parametre kod obje vrste. Kod špinata, biofortifikacija selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbitom (SeNPs-PS320) se izdvaja kao najbolji model biofortifikacije špinata jer u usporedbi s kontrolom i ostalim tretmanima značajno povećava biomasu te sadržaj elemenata ishrane kao što su N, Ca, Mg, Mn i Cu. Također, kod ovog tretmana je i sadržaj Se u listovima špinata bio najviši. Osim toga, zabilježen je najniži intenzitet LPO te značajno veća aktivnost glutation-reduktaze (GR) i koncentracija askorbinske kiseline (AA) u listovima špinata. Istaknuti učinci primijenjenih biofortifikacijskih tretmana u drugom pokusu u usporedbi s kontrolnim biljkama špinata prikazani su na slici 13.

Biofortifikacija rukole selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbatom (SeNPs-PS320) je utjecala na značajno povećanje biomase kao i sadržaja pojedinih makro- i mikroelementa u usporedbi s kontrolom i ostalim tretmanima. Također, kod ovog tretmana je zabilježena najveća koncentracija biljnih pigmenata (Chl a, Chl b i Car), ukupnih fenola (PHE), askorbinske kiseline (AA) te aktivnost superoksid-dismutaze (SOD). Međutim, najveća koncentracija selena u listovima rukole je utvrđena kod tretmana SEL320.



**Slika 13.** Shematski prikaz istaknutih učinaka biofortifikacijskih tretmana u listovima špinata

Prema tome, u smislu poticanja rasta i razvoja biljke, usvajanja i translokacije hraniva te statusa bioaktivnih komponenata, biofortifikacija selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbatom (SeNPs-PS320) bi bio najbolji model biofortifikacije rukole. Ipak, s obzirom na najveću koncentraciju selena u listovima rukole biofortificirane selenatom (SEL320), najbolji model biofortifikacije u cilju obogaćivanja hrane selenom je biofortifikacija selenatom (Slika 14.).



**Slika 14.** Shematski prikaz istaknutih učinaka biofortifikacijskih tretmana u listovima rukole

## 5. ZAKLJUČAK

Biofortifikacija špinata i rukole selenom u obliku selenata i selenovih nanočestica (SeNPs) u uvjetima plutajućeg hidropona u ovom istraživanju je imala različite učinke na rast i razvoj, usvajanje i translokaciju elemenata ishrane te koncentraciju i aktivnost enzimatskih i neenzimatskih pokazatelja oksidativnog stresa. U drugom pokusu je primijenjeno više oblika selena uz optimiziranu sintezu SeNPs te se drugi pokus smatra referentnim u smislu procjene učinka različitih modela biofortifikacije. S obzirom na postavljene hipoteze i ciljeve ovog istraživanja zaključci su kako slijedi:

1. Biofortifikacijski tretmani u ovom istraživanju su značajno povećali sadržaj selena u korijenu i listovima obje ispitivane vrste. Sadržaj Se u korijenu špinata i rukole je bio značajno veći u slučaju biofortifikacije selenovim nanočesticama u usporedbi sa selenatom. Sadržaj Se u listu pod utjecajem biofortifikacije je bio ovisan o biljnoj vrsti te se kod špinata tijekom drugog pokusa biofortifikacija SeNPs stabiliziranih polisorbatom pokazala najboljim modelom, dok je kod rukole to bio selenat što potvrđuje dosadašnje spoznaje kako pojedine biljne vrste preferiraju određeni kemijski oblik selena. Iznimno visok sadržaj Se u korijenu u slučaju primjene SeNPs ne može se pripisati slaboj mobilnosti ili nakupljanjem SeNPs intra- i ekstracelularno jer snimke s TEM-a ne potvrđuju sigurnu detekciju SeNPs u korijenu ili bazi listova ispitivanih vrsta.
2. Iznimno brz rast i razvoj, optimalan do visok sadržaj nutrijenata i razmjerno visok sadržaj selena u korijenu i listovima rukole i špinata uzgajanih u plutajućem hidroponu ukazuje na to da je odabrana metoda uzgoja optimalna za istraživanja ovakve vrste te ostvarivanje visokih prinosa biofortificirane i funkcionalne hrane u vrlo kratkom periodu.
3. Biofortifikacija selenom utječe pozitivno na rast i razvoj te povećanje ukupne biomase jestivih dijelova špinata i rukole. Kod obje vrste, najbolji učinak je pokazala biofortifikacija selenom u obliku SeNPs stabiliziranih polisorbatom. Općenito, utjecaj na rast i razvoj listova je bio značajniji u usporedbi s utjecajem na rast i razvoj korijena. Ipak, treba naglasiti da su u usporedbi s kontrolnim biljkama, svi biofortifikacijski tretmani pozitivno utjecali na rast i razvoj rukole i špinata.
4. Sadržaj makro- i mikroelemenata ishrane u korijenu i listovima špinata i rukole je bio pod značajnim utjecajem biofortifikacijskih tretmana. U korijenu ispitivanih vrsta je utjecaj biofortifikacije selenom bio različit u ovisnosti o primijenjenom obliku te nije

uočen specifičan trend utjecaja na sadržaj elemenata ishrane. Treba napomenuti da je utjecaj biofortifikacije na mineralni sastav korijena je ovisio o biljnoj vrsti. U listu špinata je pak došlo do značajnog smanjenja sadržaja elemenata ishrane u slučaju primjene selenata u obliku selenata ili nano obliku (SeNPs-PVP320). Međutim, biofortifikacija selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbatom ili huminskom kiselinom (SeNPs-PS i SeNPs-HA) je imala pozitivan učinak na usvajanje i translokaciju makro- i mikroelemenata u listove špinata i rukole. Ističe se značajan utjecaj SeNPs-HA na povećan sadržaj N u listovima obje vrste, dok biofortifikacija SeNPs-PS ima pozitivan učinak na usvajanje i translokaciju većeg broja elemenata ishrane kod obje vrste. Prema svemu navedenom, ovdje se tretman SeNPs-PS izdvaja kao najbolji biofortifikacijski model.

5. Biofortifikacija s različitim oblicima selenata je značajno utjecala na enzimatske i neenzimatske pokazatelje oksidativnog stresa u ovisnosti o biljnoj vrsti te obliku i koncentraciji selenata. Najviše se ističe pozitivan učinak primjene SeNPs stabiliziranih polisorbatom (SeNPs-PS) koje su, ovisno o vrsti, utjecale na povećanu koncentraciju biljnih pigmenata, fenola, askorbinske kiseline, ukupnu antioksidativnu aktivnost te aktivnost pojedinih enzima u usporedbi s kontrolom, ali i drugim tretmanima. Međutim, primjena PVP-a kao stabilizatora SeNPs (SeNPs-PVP320) ili selenata (SEL320) je čak negativno utjecala na pojedine fiziološke parametre te se npr. kod rukole značajno povećao intenzitet lipidne peroksidacije kod tretmana SEL320 gdje je ujedno utvrđen i najviši sadržaj selenata što može upućivati na negativan učinak visokog sadržaja selenata.

Iako se učinak biofortifikacijskih tretmana na usvajanje i sadržaj selenata u korijenu i listovima rukole i špinata u ovom istraživanju ne može u potpunosti objasniti, ovo istraživanje je rezultiralo nizom važnih spoznaja o utjecaju primjene selenata u obliku nanočestica. Vrlo je jasna i uloga različitih stabilizatora tj. omotača SeNPs koji utječu na njihovu funkcionalnost i učinak samih SeNPs na biljni organizam te se kao najbolji model biofortifikacije pokazala primjena SeNPs-PS. Ipak, daljnja istraživanja treba fokusirati na razjašnjavanju sudbine SeNPs u biljkama te njihovoj biotransformaciji i utjecaju konzumacije biljaka biofortificiranih ovim metodama na ljudsko zdravlje. Na kraju, potrebno je uložiti dodatne napore u cilju razvoja novih SeNPs uz upotrebu prirodnih redukcijskih agenasa kako bi se dobile SeNPs poželjnih fizikalnih i kemijskih svojstava još prikladnijih za proizvodnju funkcionalnih namirnica.

## 6. LITERATURA

1. Aebi, H. (1984.): Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 52: 121–126.
2. Ahmad, P., Jaleel, C. A., Salem, M. A., Nabi, G., Sharma, S. (2010.): Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(3): 161–175.
3. Ajmera, I., Hodgman, T.C., Lu, C. (2019.): An Integrative Systems Perspective on Plant Phosphate Research. *Genes (Basel)* 10(2): 139.
4. Akbulut, M., Çakır, S. (2010.): The effects of Se phytotoxicity on the antioxidant systems of leaf tissues in barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* 48(2-3): 160–166.
5. Akerboom, T.P., Sies, H. (1981.): Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* 77: 373-382.
6. Alscher, R.G., Erturk, N., Heath, S.L. (2002.): Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 53 (372): 1331–1341.
7. Antunović, Z., Steiner, Z., Steiner, Z., Šperanda, M., Domačinović, M., Karavidović, P. (2005): Content of selenium and cobalt in soil, plants and animals in Eastern Slavonia. *Proceedings of XII International Conference Krmiva*. Opatija, Croatia. p.204.
8. Apel, K., Hirt, H. (2004.): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399.
9. Aryal, S., Baniya, M.K., Danekhu, K., Kunwar, P., Gurung, R., Koirala, N. (2019.): Total Phenolic Content, Flavonoid Content and Antioxidant Potential of Wild Vegetables from Western Nepal. *Plants (Basel)* 8(4): 96.
10. Awasthi, J.P., Saha, B., Chowardhara, B., Devi, S.S., Borgohain, P., Panda, S.K. (2018.): Qualitative Analysis of Lipid Peroxidation in Plants under Multiple Stress Through Schiff's Reagent: A Histochemical Approach. *Bio-Protocol Journal* 20(8): e2807.
11. Bachiega, P., Salgado, J. M., de Carvalho, J. E., Ruiz, A. L. T., Schwarz, K., Tezotto, T., & Morzelle, M. C. (2016.): Antioxidant and antiproliferative activities in different maturation stages of broccoli (*Brassica oleracea Italica*) biofortified with selenium. *Food Chemistry* 190: 771–776.

12. Baker, A.J.M., Brooks, R.R. (1989.): Terrestrial higher plants which accumulate metallic elements – a review of their distribution ecology and phytochemistry. *Biorecovery* 3: 81 – 126.
13. Bano I., Sajjad H., Talpur M.S.H., Leghari A., Mirbahar K.H. (2016.): Role of selenium on oxidative stress and male reproductive system. *Pakistan Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 49(4): 75–79.
14. Barickman, T.C., Kopsell, D.A., Sams, C.E. (2013.): Selenium influences glucosinolate and isothiocyanates and increases sulphur uptake in *Arabidopsis thaliana* and rapid-cycling Brassicaceae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 202–209.
15. Barnes, J., Zheng, Y., and Lyons, T. (2002.): Plant resistance to ozone: the role of ascorbate. *Air Pollution and Plant Biotechnology—Prospects for Phytomonitoring and Phytoremediation*, 235–252.
16. Barrington, J.W., Lindsay, P., James, D, Smith, S., Roberts, A. (1996.): Selenium deficiency and miscarriage: a possible link? *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 103: 130-132.
17. Bayanati, M., Al-Tawaha, A.R., Al-Taey, D., Al-Ghzawi, A.L., Abu-Zaitoon, Y., Shawaqfeh, S., Al-Zoubi, O.M., Al-Ramamneh, E.A.D., Alomari, L., Al-Tawaha, A.R., Dey, A. (2022.): Interaction between zinc and selenium bio-fortification and toxic metals (loid) accumulation in food crops. *Frontiers in Plant Science* 13: 1001992.
18. Beauchamp, C., Fridovich, I. (1971.): Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels. *Analytical Biochemistry* 44 (1): 276-287.
19. Benderitter, M., Maupoil, V., Vergely, C., Dalloz, F., Briot, F., Rochette, L. (1998.): Studies by electron paramagnetic resonance of the importance of iron in the hydroxyl scavenging properties of ascorbic acid in plasma: Effects of iron chelators. *Fundamental and Clinical Pharmacology* 12: 510-516.
20. Berrow, M.L., Ure, A.M. (1989.): Geological materials and soils. Occurrence and distribution of selenium. Florida, USA. p. 226 – 228.
21. Bisht, N., Phalswal, P., Khanna, P.K. (2022.): Selenium nanoparticles: a review on synthesis and biomedical applications. *Materials Advances* 3: 1415-1431.

22. Boldrin P., de Figueiredo M., Yang Y., (2016.): Selenium promotes sulfur accumulation and plant growth in wheat (*Triticum aestivum*). *Physiologia Plantarum* 158: 80-91.
23. Boldrin, P.F., Faquin, V., Clemente, A.D.C.S., de Andrade, T., Guilherme, L.R.G. (2018.): Genotypic Variation and Biofortification with Selenium in Brazilian Wheat Cultivars. *Journal of Environmental Quality* 47: 1371-1379.
24. Boldrin, P.F., Faquin, V., Ramos, S.J., Boldrin, K.V., Avila, F.W., Guilherme, L.R.G. (2013.): Soil and foliar application of selenium in rice biofortification. *Journal of Food Composition and Analysis* 31: 238-244.
25. Borbély, P., Molnár, A., Valyon, E., Ördög, A., Horváth-Boros, K., Csopor, D., Fehér, A., Kolbert, Z. (2021.): The Effect of Foliar Selenium (Se) Treatment on Growth, Photosynthesis, and Oxidative-Nitrosative Signalling of *Stevia rebaudiana* Leaves. *Antioxidants* 10: 72.
26. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995.): Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology* 28: 25-30.
27. Buturi, C.V., Mauro, R., Fogliano, V., Leonardi, C., Giuffrida, F. (2021.): Mineral Biofortification of Vegetables as a Tool to Improve Human Diet. *Foods* 10(2): 223.
28. Castillo-Godina, R.G., Foroughbakhch-Pournavab, R., Benavides-Mendoza, A. (2016.): Effect of Selenium on Elemental Concentration and Antioxidant Enzymatic Activity of Tomato Plants. *Journal of Agriculture, Science and Technology* 18: 233-244.
29. Cavalcanti, F.R., Oliveira, J.T.A., Martins-Miranda, A.S., Viégas, R.A. and Silveira, J.A.G. (2004.): Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. *New Phytologist*, 163: 563-571.
30. Caverzan, A., Passaia, G., Rosa, S.B., Ribeiro, C.W., Lazzarotto, F., Margis-Pinheiro, M. (2012.): Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and Molecular Biology* 35 (4): 1011-9.
31. Chen, Y., De Nobili, M., and Aviad, T. (2004.): Stimulatory effects of humic substances on plant growth. In *Soil Organic Matter in Sustainable Agriculture*, New York, USA. p. 103–129.



32. Chomchan, R., and Siripongvutikorn, S., Puttarak, P. (2017.): Selenium bio-fortification: an alternative to improve phytochemicals and bioactivities of plant foods. *Functional Foods in Health and Disease* 7(4): 263-279.
33. Choudhury, S., Panda, P., Sahoo, L., Panda, S. K. (2013.): Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signaling and Behavior*, 8(4): e23681.
34. Chrprová D., Kouřimská L., Gordon M.H., Heřmanová V., Roubíčková I., Pánek J. (2010): Antioxidant activity of selected phenols and herbs used in diets for medical conditions. *Czech Journal of Food Sciences* 28: 317–325.
35. Chu, J., Yao, X., Zhang, Z. (2010.): Responses of wheat seedlings to exogenous selenium supply under cold stress. *Biological Trace Element Research* 136: 355-363.
36. Chugh, G., Siddique, K.H.M., Solaiman, Z.M. (2021.): Nanobiotechnology for Agriculture: Smart Technology for Combating Nutrient Deficiencies with Nanotoxicity Challenges. *Sustainability* 13: 17810.
37. Cox, D.N., Bastiaans, K. (2007.): Understanding Australian consumers' perceptions of selenium and motivations to consume selenium enriched foods. *Food Quality and Preference* 18: 66–76.
38. Cruz, C.M. (2008.): Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. *Plant Signaling and Behavior* 3: 156–165.
39. Das, K., Roychoudhury, A. (2014.): Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, 2:53.
40. Dall'Acqua, S., Ertani, A., Pilon-Smits, E., Fabrega-Prats, M., Schiavon, M. (2019.): Selenium Biofortification Differentially Affects Sulfur Metabolism and Accumulation of Phytochemicals in Two Rocket Species (*Eruca Sativa* Mill. and *Diplotaxis Tenuifolia*) Grown in Hydroponics. *Plants* 8(3): 68.
41. Dawood, M.G., Sadak, M.S., Bakry, B.A., Kheder, H.H. (2020.): Effect of glutathione and/or selenium levels on growth, yield, and some biochemical constituents of some wheat cultivars grown under sandy soil conditions. *Bulletin of the National Research Centre* 44: 158.
42. De Hita, D., Fuentes, M., Fernández, V., Zamarreño, A.M., Olaetxea, M., García-Mina, J.M. (2020.): Discriminating the Short-Term Action of Root and Foliar Application of Humic Acids on Plant Growth: Emerging Role of Jasmonic Acid. *Frontiers in Plant Science* 11:493.

43. De Souza M.P., Pilon-Smiths, E.A.H., Lytle, C.M., Hwang, S., Tai, J., Honma, T.S.U., Yeh, L., Terry, N. (1998.): Rate-limiting steps in selenium assimilation and volatilization by Indian Mustard. *Plant Physiology* 117: 1487-1494.
44. Diao, M., Ma, L., Wang, J., Cui, J., Fu, A., Liu, H. (2014.): Selenium Promotes the Growth and Photosynthesis of Tomato Seedlings Under Salt Stress by Enhancing Chloroplast Antioxidant Defense System. *Journal of Plant Growth Regulation* 33 (3): 671–682.
45. Dyo Nascimento da Silva, E., Cadore, S. (2019.): Bioavailability Assessment of Copper, Iron, Manganese, Molybdenum, Selenium, and Zinc from Selenium-Enriched Lettuce. *Journal of Food Science* 84: 10.
46. Dodig, S., Čepelak, I. (2004.): The facts and controversies about selenium. *Acta Pharmaceutica* 54: 261–276.
47. Dolphin, D., Poulson, R., Avramovic, O. (1989.): *Glutathione: Chemical, Biochemical and Metabolic Aspects*. Wiley-Interscience: New York, USA. p. 67-101.
48. Dumont, E., Vanhaecke, F., Cornelis, R. (2006.): Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 385: 1304–1323.
49. Duncan, E., Maher, W., Jagtap, R., Krikowa, F., Roper, M. M., and O’Sullivan, C. A. (2017.): Selenium speciation in wheat grain varies in the presence of nitrogen and sulphur fertilisers. *Environmental Geochemistry and Health* 39: 955–966.
50. Ekanayake, L.J., Thavarajah, D., Vial, E., Schatz, B., McGee, R., Thavarajah, P. (2015.): Selenium fertilization on lentil (*Lens culinaris* Medikus) grain yield, seed delinimum concentration, and antioxidant activity. *Field Crops Research* 177: 9–14.
51. El Lateef Gharib, F.A., Zeid, I.M., Ghazi, S.M., Ahmed, E.Z. (2019.): The Response of Cowpea (*Vigna unguiculata* L) Plants to Foliar Application of Sodium Selenate and Selenium Nanoparticles (SeNPs). *Journal of Nanomaterials and Molecular Nanotechnology* 8: 4.
52. El-Ramady, H.R., Domokos-Szabolcsy, É., Neama A.A., Tarek, A.A., Tarek, A.S. (2014.): Selenium and nano-selenium in agro ecosystems. *Environmental Chemistry Letters* 12: 495.
53. Esringu, A., Ekinc, M., Usta, S., Turan, M., Dursun, A., Ercisli, S., Yildirim, E. (2015.): Selenium supplementation affects the growth, yield and selenium

- accumulation in lettuce (*Lactuca sativa* L.). Bulgarian Academy of Sciences 68: 801–810.
54. Fan, J., Wang, R., Hu, H., Huo, G., Fu, Q., Zhu, J. (2015.): Transformation and Bioavailability of Selenate and Selenite Added to a *Nicotiana tabacum* L. Planting Soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 46(11): 1362–1375.
55. Ferrarese, M., Mahmoodi, M., Quattrini, E., Schiavi, M. (2012.): Biofortification of Spinach Plants applying Selenium in the Nutrient Solution of Floating System. *Vegetable Crops Research Bulletin* 76(1): 127-136.
56. Finley, J.W., Penland, J.G. (1998.): Adequacy or deprivation of dietary selenium in healthy men: clinical and psychological findings. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine* 11: 11-27.
57. Galan-Chilet I., Tellez-Plaza M., Guallar E., De Marco G., Lopez-Izquierdo R., Gonzalez-Manzano I., Carmen Tormos M., Martin-Nuñez G.M., Rojo-Martinez G., Saez G.T. (2014.): Plasma selenium levels and oxidative stress biomarkers: A gene–environment interaction population-based study. *Free Radical Biology and Medicine* 74: 229–236.
58. Galeas, M., Zhang, L.H., Freeman, L.J., Wegner, M., Pilon-Smits, E.A.H. (2007.): Seasonal fluctuations of selenium and sulfur accumulation in selenium hyperaccumulators and related nonaccumulators. *New Phytologist* 173(3): 517-525.
59. Galić, L., Špoljarević, M., Auriga, A., Ravnjak, B., Vinković, T., Lončarić, Z. (2021.): Combining Selenium Biofortification with Vermicompost Growing Media in Lamb's Lettuce (*Valerianella locusta* L. Laterr). *Agriculture* 11: 1072.
60. Galić, L., Vinković, T., Ravnjak, B., Lončarić, Z. (2021.): Agronomic Biofortification of Significant Cereal Crops with Selenium—A Review. *Agronomy* 11(5): 1015.
61. Garcia Marquez, V., Morelos Moreno, A., Benavides Mendoza, A., Medramo Macias, J. (2020.): Ionic Selenium and Nanoselenium as Biofortifiers and Stimulators of Plant Metabolism. *Agronomy* 10: 1399.
62. Gavrilović, B., Matešić, D. (1986.): Importance of selenium quantity in soil and fodder in regard to some diseases occurring in cattle, pigs, sheep and poultry. *Selenium in Biology and Medicine*, Avi Publishing Company. Westport, USA. p. 740 – 749.

63. Golubkina, N., Zamana, S., Seredin, T., Poluboyarinov, P., Sokolov, S., Baranova, H., Krivenkov, L., Pietrantonio, L., Caruso, G. (2019.): Effect of Selenium Biofortification and Beneficial Microorganism Inoculation on Yield, Quality and Antioxidant Properties of Shallot Bulbs. *Plants (Basel)* 8(4): 102.
64. Golubkina, N.A., Kosheleva, O.V., Krivenkov, L.V., Dobrutskaya, H.G., Nadezhkin, S., Caruso, G. (2017.): Intersexual differences in plant growth, yield, mineral composition and antioxidants of spinach (*Spinacia oleracea* L.) as affected by selenium form. *Scientia Horticulturae* 225: 350–358.
65. Gupta, M., Gupta, S. (2017.): An overview of selenium uptake, metabolism, and toxicity in plants. *Frontiers in Plant Science* 7: 2074.
66. Hartikainen, H., Xue, T., Piironen, V. (2000.): Selenium as an anti-oxidant and pro-oxidant in ryegrass. *Plant Soil* 225: 193-200.
67. Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M.H.M.B., Anee, T.I., Parvin, K., Nahar, K., Mahmud, J.A., Fujita, M. (2019.): Regulation of ascorbate-glutathione pathway in mitigating oxidative damage in plants under abiotic stress. *Antioxidants* 8, 384.
68. Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M.H.M.B., Raza, A., Hawrylak-Nowak, B., Matraszek-Gawron, R., Al Mahmud, J., Nahar, K., Fujita, M. (2020.): Selenium in plants: Boon or bane?, *Environmental and Experimental Botany* 178: 104170.
69. Hasanuzzaman, M., Fujita, M. (2011.): Selenium pretreatment upregulates the antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system and confers enhanced tolerance to drought stress in rapeseed seedlings. *Biological Trace Element Research* 143: 1758-1776.
70. Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M.H.M.B., Parvin, K., Bhuiyan, T.F., Anee, T.I., Nahar, K., Hossen, M.S., Zulfiqar, F., Alam, M.M., Fujita, M. (2020.): Regulation of ROS Metabolism in Plants under Environmental Stress: A Review of Recent Experimental Evidence. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22): 8695.
71. Hawkes, W.C., Hornbostel, L. (1996.): Effects of dietary selenium on mood in healthy men living in a metabolic research unit. *Biological Psychiatry* 39: 121-128.
72. Hawrylak-Nowak, B. (2008.): Effect of Selenium on selected macronutrients in maize plants. *Journal of Elementology* 13(4): 513-519.
73. Hawrylak-Nowak, B. (2013.): Comparative effects of selenite and selenate on growth and selenium accumulation in lettuce plants under hydroponic conditions. *Plant Growth Regulation* 70: 149–157.

74. He, R., Gao, M., Shi, R., Song, S., Zhang, Y., Su, W., Liu, H. (2020.): The Combination of Selenium and LED Light Quality Affects Growth and Nutritional Properties of Broccoli Sprouts. *Molecules* 25: 4788.
75. Hernández, M., Leon, J., López-Bibiano, Y., Saldaña-Sánchez, W.D., García-Morales, S. (2018.): Comparative effect of selenite and selenate on the growth and content of photosynthetic pigments in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Biotecnología y Sustentabilidad* 3:2.
76. Hocman, G. (1988.): Chemoprevention of cancer: Selenium. *International Journal of Biochemistry* 20(2): 123 – 132.
77. Hu, T., Li, H., Li, J., Zhao, G., Wu, W., Liu, L., Wang, Q. Guo, Y. (2018.): Absorption and Bio-Transformation of Selenium Nanoparticles by Wheat Seedlings (*Triticum aestivum* L.), *Frontiers in Plant Sciences*, 9:597.
78. Huang, C., Qin, N., Sun, L., Yu, M., Hu, W., Qi, Z. (2018.): Selenium improves physiological parameters and alleviates oxidative stress in strawberry seedlings under lowtemperature lowtemperature stress. *International Journal of Molecular Sciences* 19: 1913.
79. Huang, H., Ullah, F., Zhou, D.X., Yi, M., Zhao, Y. (2019.): Mechanisms of ROS Regulation of Plant Development and Stress Responses. *Frontiers in Plants Sciences*.
80. Huang, Y., Lei, N., Xiong, Y., Liu, Y., Tong, L., Wang, F., Fan, B., Maesen, P., Blecker, C. (2022.): Influence of Selenium Biofortification of Soybeans on Speciation and Transformation during Seed Germination and Sprouts Quality. *Foods* 11: 1200.
81. Izydorzyc, G., Ligas, B., Mikula, K., Witek-Krowiak, A., Moustakas, K., Chojnacka, K. (2020.): Biofortification of edible plants with selenium and iodine – A systematic literature review. *Science of The Total Environment* 141983.
82. Józwiak, V., Politycka, B. (2019.): Effect of Selenium on Alleviating Oxidative Stress Caused by a Water Deficit in Cucumber Roots. *Plants* 8(7): 217.
83. Kapur, M., Soni, K., Kohli, K. (2017.): Green Synthesis of Selenium Nanoparticles from Broccoli, Characterization, Application and Toxicity. *Advanced Techniques in Biology and Medicine* 5(1): 198.
84. Kaur, M., Sharma, S. (2018.): Influence of selenite and selenate on growth, leaf physiology and antioxidant defense system in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 98(15): 5700-5710.

85. Kaur, N., Sharma, S., Kaur, S. (2014.): Selenium in agriculture: a nutrient or contaminant for crops? *Archives of Agronomy and Soil Science* 60: 1593–1624.
86. Kieliszek, M. (2019.): Selenium—Fascinating Microelement, Properties and Sources in Food. *Molecules* 24(7): 1298.
87. Kieliszek, M., Bano, I., Zare, H. (2022.): A Comprehensive Review on Selenium and Its Effects on Human Health and Distribution in Middle Eastern Countries. *Biological Trace Element Research* 200: 971–987.
88. Kieliszek, M., Błażej, S. (2016.): Current Knowledge on the Importance of Selenium in Food for Living Organisms: A Review. *Molecules* 21(5): 609.
89. Kılıç, C.C., Duyar, H. (2016.): A Research on Production of Rocket and Parsley in Floating System. *Journal of Agricultural Science* 8(7): 54.
90. Kojouri, G. A., Jahanabadi, S., Shakibaie, M., Ahadi, A. M. & Shahverdi, A. R. (2012.): Effect of selenium supplementation with sodium selenite and selenium nanoparticles on iron homeostasis and transferrin gene expression in sheep: A preliminary study. *Research in Veterinary Science* 93: 275–278.
91. Kong, H., Yang, J., Zhang, J., Fang, Y., Nishinari, K., Phillips, G.O. (2014.): Synthesis and antioxidant properties of gum arabic-stabilized selenium nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules* 65: 155–162.
92. Kong, W., Liu, F., Zhang, C., Zhang, J., Feng, H. (2016.): Non-destructive determination of Malondialdehyde (MDA) distribution in oilseed rape leaves by laboratory scale NIR hyperspectral imaging. *Scientific Reports* 6: 35393.
93. Kopsell, D.A., Randle, W.M., Mills, H.A. (2020.): Accumulation in leaf tissue of rapid-cycling *Brassica oleracea* responds to increasing sodium selenate concentrations. *Journal of Plant Nutrition* 23(7): 927-935.
94. Kowalska, I., Smoleń, S., Czernicka, M., Halka, M., Keska, K., Pitala, J. (2020.): Effect of Selenium Form and Salicylic Acid on the Accumulation of Selenium Speciation Forms in Hydroponically Grown Lettuce. *Agriculture* 10: 584.
95. Kumar, S., Trivedi, P.K. (2018.): Glutathione S-Transferases: Role in Combating Abiotic Stresses Including Arsenic Detoxification in Plants. *Frontiers in Plant Science* 9:751.
96. Lanza, M.G.D.B., Reis, A.R. (2021.): Roles of selenium in mineral plant nutrition: ROS scavenging responses against abiotic stresses. *Plant Physiology and Biochemistry* 164: 27-43.

97. Lara, T.S., Lessa, J.H., Souza, K.R.D., Corguinha, A.P.B., Martins, F.A.D., Lopes, G., Guilherme, L.R.G. (2019.): Selenium biofortification of wheat grain via foliar application and its effect on plant metabolism. *Journal of Food and Analysis* 81: 10-18.
98. Li, H. F., McGrath, S. P., Zhao, F. J. (2008.): Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite. *New Phytologist* 178: 92–102.
99. Li, Y., Lin, Z., Zhao, M., Xu, T., Wang, C., Xia, H. (2016.): Multifunctional seleniumnanoparticles as carriers of HSP70 siRNA to induce apoptosis of HepG2 cells. *International Journal of Nanomedicine* 11: 3065–3076.
100. Li, Y., Zhu, N., Liang, X., Zheng, L., Zhanga, C., Li, Y.F., Zhang, Z., Gao, Y., Zhao, J. (2020.): A comparative study on the accumulation, translocation and transformation of selenite, selenate, and SeNPs in a hydroponic-plant system, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 189.
101. Lichtenthaler, H.K. (1987.): Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 350-382.
102. Liu, J., Qi, W.Y., Chen, H., Song, C., Li, Q., Wang, S. (2021.): Selenium Nanoparticles as an Innovative Selenium Fertilizer Exert Less Disturbance to Soil Microorganisms. *Frontiers in Microbiology* 12: 2646.
103. Liu, Q., Wang, D.J., Jiang, X.J., Cao, Z.H. (2004.): Effects of the Interactions Between Selenium and Phosphorus on the Growth and Selenium Accumulation in Rice (*Oryza Sativa*). *Environmental Geochemistry and Health* 26: 325–330.
104. Liu, Y., Li, F., Yin, X.B., Lin, Z.Q. (2011.): Plant-based biofortification: from phytoremediation to Se-enriched agriculture products. *Green Chemistry for Environmental Sustainability*. Boca Raton, USA 341–356.
105. Lyons, G., Cakmak, I. (2012.): Agronomic Biofortification of Food Crops with Micronutrients. *Fertilizing Crops to Improve Human Health: A Scientific Review*, Chapter 4, 97-122.
106. Lyu, L., Wang, H., Liu, R., Xing, W., Li, J., Man, Y.B., Wu, F. (2022.): Size-dependent transformation, uptake, and transportation of SeNPs in a wheat–soil system. *Journal of Hazardous Materials* 424: 127323.
107. Mackowiak, C.L., Amacher, M. C. (2008.): Soil Sulfur Amendments Suppress Selenium Uptake by Alfalfa and Western Wheat grass. *Journal of Environmental Quality* 37(3): 772-779.

108. Malorgio, F., Diaz, K.E., Ferrante, A., Mensuali-Sodi, A., Pezzarossa, B. (2009.): Effects of selenium addition on minimally processed leafy vegetables grown in a floating system, *Science of Food and Agriculture* 89(13): 2243-2251.
109. Mannervik, B. (1985.): The Isoenzymes of Glutathione Transferase. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* 57: 357-417.
110. Masuda, Y., Goto, K. (2022.): *Methods in Enzymology*, Chapter Fourteen - Modeling of selenocysteine-derived reactive intermediates utilizing a nano-sized molecular cavity as a protective cradle. *Academic Press* 662: 331-36.
111. Mateus, M.P.B., Tavanti, R.F.R., Tavanti, T.R., Santos, E.F., Jalal, A., Reis, A.R., (2021.): Selenium biofortification enhances ROS scavenge system increasing yield of coffee plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 209: 111772.
112. May, M., Vernoux, T., Leaver, C., Van Montagu, M., Inze, D. (1998.): Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *Journal of Experimental Botany*, 49: 649–667.
113. Mehdi, Y., Hornick, J. L., Istasse, L., and Dufresne, I. (2013.): Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions. *Molecules* 18: 3292–3311.
114. Meplan, C. (2011.): Trace elements and ageing, a genomic perspective using selenium as an example. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 25: S11–S16.
115. Mezeyova, I., Hegedusova, A., Andrejiova, A., Hegedus, O., Golian, M. (2016.): Phytomass and content of essential oils in *Ocimum basilicum* after foliar treatment with selenium. *Agriculture and Food* ISSN 1314-8591.
116. Mikkelsen, R.L., Page, A.L., Bingham, F.T. (1989.): Factors affecting selenium accumulation by agricultural crops. In: *Selenium in agriculture and the environment*. *Soil Science Society of America Journal* 23: 65–94.
117. Millaleo, R., Reyes- Diaz, M., Ivanov, A.G., Mora, M.L., Alberdi, M. (2010.): Manganese as essential and toxic element for plants: transport, accumulation and resistance mechanisms. *Journal of soil science and plant nutrition* 10(4): 470-481.
118. Mimmo, T., Tiziani, R., Valentinuzzi, F., Lucini, L., Nicoletto, C., Sambo, P., Scampicchio, M., Pii, Y., Cesco, S. (2017.): Selenium Biofortification in *Fragaria × ananassa*: Implications on Strawberry Fruits Quality, Content of Bioactive Health Beneficial Compounds and Metabolomic Profile. *Frontiers in Plant Science* 8: 1887.



119. Morales-Espinoza, M.C., Cadenas-Pliego, G., Pérez-Alvarez, M., Hernández-Fuentes, A.D., Cabrera de la Fuente, M., Benavides-Mendoza, A., Valdés-Reyna, J., Juárez-Maldonado, A. (2019.): Se Nanoparticles Induce Changes in the Growth, Antioxidant Responses, and Fruit Quality of Tomato Developed under NaCl Stress. *Molecules* 24: 3030.
120. Mostofa, M.G., Hossain, M. A., Siddiqui, M. N., Fujita, M., Tran, L.S. P. (2017.): Phenotypical, physiological and biochemical analyses provide insight into selenium-induced phytotoxicity in rice plants. *Chemosphere* 178: 212–223.
121. Moteshare Zadeh, B., Ghorbani, S., Alikhani, H. A. (2019.): The effect of selenium biofortification in alfalfa (*Medicago sativa*). *Journal of Plant Nutrition* 1–11.
122. Moteshare Zadeh, B., Ghorbani, S., Alikhani, H.A. (2020.): Spinach (*Spinacia oleracea*) Nutritional Responses to Selenium Application. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 1–14.
123. Mroczek-Zdyrska, M., Wójcik, M. (2012.): The Influence of Selenium on Root Growth and Oxidative Stress Induced by Lead in *Vicia faba* L. minor Plants. *Biological Trace Element Research* 147: 320–328.
124. Nair, R., Varghese, S. H., Nair, B. G., Maekawa, T., Yoshida, Y., Kumar, D. S. (2010.): Nanoparticulate material delivery to plants. *Plant Science* 179(3): 154–163.
125. Nair, S., Singh, S.V., Krishan, A. (1991.): Flow cytometric monitoring of glutathione content and anthracycline retention in tumor cells. *Cytometry* 12: 336–342.
126. Nakano, Y., Asada, K. (1981.): Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22: 867–880.
127. Nayan, D.S., Zainol, R., Sukor, A.S.A., Yusoff, M.M., Ishak, C.F. (2020.): Selenium biofortification of green spinach with optimum phosphorus fertilization and selenium application timing. *Agrosystems, Geosciences and Environment* 3: 1.
128. Newman, R.G., Moon, Y., Sams, C., Tou, J.C., Waterland, N.L. (2021.): Biofortification of Sodium Selenate Improves Dietary Mineral Contents and Antioxidant Capacity of Culinary Herb Microgreens. *Frontiers in Plant Science* 12: 716437.
129. Neysanian M., Iranbakhsh A., Ahmadvand R., Oraghi Ardebili Z., Ebadi, M. (2020.): Comparative efficacy of selenate and selenium nanoparticles for improving growth, productivity, fruit quality, and postharvest longevity through modifying

- nutrition, metabolism, and gene expression in tomato; potential benefits and risk assessment. *PLoS ONE*, 16(12): e0250192.
130. Noctor, G. (2006.): Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. *Plant Cell Environ*, 29:409–425.
131. Nuttall, K. L. (2006.): Evaluating selenium poisoning. *Annals of Clinical and Laboratory Science* 36: 409–420.
132. Oldereid, N.B., Thomassen, Y., Purvis, K. (1998.): Selenium in human male reproductive organs. *Human Reproduction* 13: 2172-2176.
133. Pallem, V.L., Stretz, H.A., Wells, M.J.M. (2009.): Evaluating Aggregation of Gold Nanoparticles and Humic Substances Using Fluorescence Spectroscopy. *Environmental Science & Technology* 43: 7531–7535.
134. Pannico, A., EL-Nakhel, C., Graziani, G., Kyriacou, M., Giordano, M., Soteriou, G.A., Zarrelli, A., Ritieni, A., De Pascale, S., Rouphael, Y. (2020.): Selenium Biofortification Impacts the Nutritive Value, Polyphenolic Content, and Bioactive Constitution of Variable Microgreens Genotypes. *Antioxidants* 9(4): 272.
135. Pannico, A., El-Nakhel, C., Kyriacou, M.C., Giordano, M., Stazi, S.R., De Pascale, S., Rouphael, Y. (2019.): Combating Micronutrient Deficiency and Enhancing Food Functional Quality Through Selenium Fortification of Select Lettuce Genotypes Grown in a Closed Soilless System. *Frontiers in Plant Science* 10: 1495.
136. Parnham, M.J., Graf, E. (1991.): Pharmacology of synthetic organic selenium compounds. *Progress in Drug Research* 36: 9-47.
137. Pérez-Corona, M.T., Sánchez-Martínez, M., Valderrama, M., Rodríguez, M.E., Cámara, C., Madrid, Y., (2011.): Laboratory-scale experiments. *Food Chemistry* 124: 1050–1055.
138. Pillai R., Uyehara-Lock J.H., Bellinger F.P. (2014.): Selenium and selenoprotein function in brain disorders. *IUBMB Life* 66: 229–239.
139. Pilon-Smits, E.A.H., C.F. Quinn, W. Tapken, M. Malagoli, and M. Schiavon (2009.): Physiological functions of beneficial elements. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 267–274.
140. Puccinelli, M., Malorgio, F., Pintimalli, L., Rosellini, I., Pezzarossa, B. (2022.): Biofortification of Lettuce and Basil Seedlings to Produce Selenium Enriched Leafy Vegetables. *Horticulturae* 8: 801.

141. Puccinelli, M., Pezzarossa, B., Rosellini, I., Malorgio, F. (2020.): Selenium Enrichment Enhances the Quality and Shelf Life of Basil Leaves. *Plants* 9(6): 801.
142. Quiterio-Gutiérrez, T., Ortega-Ortiz, H., Cadenas-Pliego, G., Hernández-Fuentes, A.D., Sandoval-Rangel A., Benavides-Mendoza, A., Cabrera-de la Fuente, M., Juárez-Maldonado, A. (2019.): The Application of Selenium and Copper Nanoparticles Modifies the Biochemical Responses of Tomato Plants under Stress by *Alternaria solani*. *International Journal of Molecular Sciences* 20(8): 1950.
143. Rai, S., Singh, P.K., Mankotia, S., Swain, J., Satbhai, S.B. (2021.): Iron homeostasis in plants and its crosstalk with copper, zinc, and manganese. *Plant Stress* 1: 100008.
144. Ramaekers, V.T., Calomme, M., Vanden, B.D., Makropoulos, W. (1994.): Selenium deficiency triggering intractable seizures. *Neuropediatrics* 25: 217-223.
145. Ramamurthy, C.H., Sampath, K.S., Arun Kumar, P., Suresh Kumar, M., Sujatha, V., Prem Kumar, K., et al. (2013.): Green synthesis and characterization of selenium nanoparticles and its augmented cytotoxicity with doxorubicin on cancer cells. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 36: 1131–9.
146. Ramos, S.J., Faquin, V., Guilherme, L.R.G., Castro, E.M., Ávila, F.W., Carvalho, G.S., Oliveira, C. (2010.): Selenium biofortification and antioxidant activity in lettuce plants fed with selenate and selenite. *Plant Soil Environ* 56: 584-588.
147. Rayman, M.P. (2000.): The importance of selenium to human health. *356(9225)*: 233–241.
148. Rayman, M.P. (2008.): Food-chain selenium and human health: Emphasis on intake. *British Journal of Nutrition* 100: 254–268.
149. Reeves, M.A. and Hoffman, P.R. (2009.): The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66: 2457–2478.
150. Reich H.J., Hondal R.J. (2016.): Why nature chose selenium? *ACS Chemical Biology* 11: 821–841.
151. Reilly, C. (2006.): *Selenium in food and health*, 2<sup>nd</sup> edn. Springer, Berlin.
152. Reis, H. P. G., Barcelos, J. P. D., Furlani Junior, E., Santos, E. F., Silva, V. M., Moraes, M. F. (2018.): Agronomic biofortification of upland rice with selenium and nitrogen and its relation to grain quality. *Journal of Cereal Science* 79: 508–515.

153. Ríos, J. J., Blasco, B., Cervilla, L. M., Rosales, M. A., Sanchez-Rodriguez, E., Romero, L., Ruiz, J. M. (2008.): Production and detoxification of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in lettuce plants exposed to selenium. *Annals of Applied Biology* 154: 107-116.
154. Rios, J. J., Blasco, B., Leyva, R., Sanchez-Rodriguez, E., Rubio-Wilhelmi, M. M., Romero, L., & Ruiz, J. M. (2013.): Nutritional balance changes in lettuce plant grown under different doses and forms of selenium. *Journal of Plant Nutrition* 36(9): 1344–1354.
155. Rose, M. T., Patti, A. F., Little, K. R., Brown, A. L., Jackson, W. R., Cavagnaro, T. R. (2014.): A meta-analysis and review of plant-growth response to humic substances: practical implications for agriculture. *Advances in Agronomy* 124: 37–89.
156. Sabatino, L., Ntatsi, G., Iapichino, G., D’Anna, F., De Pasquale, C. (2019.): Effect of Selenium Enrichment and Type of Application on Yield, Functional Quality and Mineral Composition of Curly Endive Grown in a Hydroponic System. *Agronomy* 9: 207.
157. Saffaryazdi, A., Lahouti, M., Ganjeali, A., Bayat, H. (2012.): Impact of Selenium Supplementation on Growth and Selenium Accumulation on Spinach (*Spinacia oleracea* L.) Plants. *Notulae Scientia Biologicae* 4(4): 95-100.
158. Sali, A., Zeka, D., Fetahu, S., Rusinovci, I., Kaul, H.P. (2018.): Selenium supply affects chlorophyll concentration and biomass production of maize (*Zea mays* L.). *Bodenkultur* 69(4): 249-255.
159. Schiavon, M., Nardi, S., Vecchia, F.D., Ertani, A. (2020.): Selenium biofortification in the 21st century: status and challenges for healthy human nutrition. *Plant and soil* 453: 245-270.
160. Schiavon. M., Pilon, M., Malagoli, M., Pilon-Smits, E.A. (2015.): Exploring the importance of sulfate transporters and ATP sulphurylases for selenium hyperaccumulation-a comparison of *Stanleya pinnata* and *Brassica juncea* (Brassicaceae). *Frontiers in Plant Science* 6: 1-13.
161. Schwarz, K., Foltz, C.M. (1957.): Selenium as an integral part of factor-3 against dietary necrotic liver degeneration. *Journal of American Chemical Society* 79: 3292–3296.
162. Selim, S.; Akhtar, N.; El Azab, E.; Warrad, M.; Alhassan, H.H.; Abdel-Mawgoud, M.; Al Jaouni, S.K.; Abdelgawad, H. (2022.): Innovating the Synergistic Assets of  $\gamma$ -Amino Butyric Acid (BABA) and Selenium Nanoparticles (SeNPs) in Improving

- the Growth, Nitrogen Metabolism, Biological Activities, and Nutritive Value of *Medicago interexta* Sprouts. *Plants* 11: 306.
163. Selmani, A. Ulm, L., Kasemets, K., Kurvet, I., Erceg, I., Barbir, R., Pem, B., Santini, P., Marion, I.D., Vinković, T. (2020.): Stability and toxicity of differently coated selenium nanoparticles under model environmental exposure settings. *Chemosphere* 250: 126265.
  164. Shafiq, M., Qadir, A., Ahmad, S.R. (2019.): Biofortification: a sustainable agronomic strategy to increase selenium content and antioxidant activity in Garlic. *Applied Ecology and Environmental Research* 17: 1685–1704.
  165. Shahid M., Niazi N.K., Khalid S., Murtaza B., Bibi I., Rashid M.I. (2018.): A critical review of selenium biogeochemical behavior in soil-plant system with an inference to human health. *Environmental Pollution* 234: 915–934.
  166. Shakibaie, M. Shahverdi, A.R., Faramarzi, M.A., Hassanzadeh, G.R., Rahimi, H.R., Sabzevari, O. (2013.): Acute and subacute toxicity of novel biogenic selenium nanoparticles in mice. *Pharmaceutical Biology* 51: 58–63.
  167. Sharma, I., Ahmad, P. (2014.): *Catalase in Oxidative Damage to Plants*, 2014.
  168. Sies, H., Masumoto, H. (1997.): Ebselen as a glutathione peroxidase mimic and as a scavenger of peroxynitrite. *Advances in Pharmacology* 38: 229-246.
  169. Singh, M., Singh, H., Bhandari, D.K. (1980.): Interaction of selenium and sulphur on the growth and chemical composition of *raya*. *Soil Science* 129: 238-244.
  170. Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965.): Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144-158.
  171. Skalickova, S., Milosavljevic, V., Cihalova, K., Horkey, P., Richtera, L., Adam, V. (2016.): Perspective of selenium nanoparticles as a nutrition supplement. *Nutrition* 33: 83-90.
  172. Sors, T. G., Ellis, D. R., Na, G. N., Lahner, B., Lee, S., Leustek, T. (2005.): Analysis of sulfur and selenium assimilation in *Astragalus* plants with varying capacities to accumulate selenium. *The Plant Journal* 42: 785–797.
  173. Steinbrenner H., Sies H. (2013.): Selenium homeostasis and antioxidant selenoproteins in brain: Implications for disorders in the central nervous system. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 536: 152–157.

174. Stuart, L.D., Oehme, F.W. (1982.): Environmental factors in bovine and porcine abortion. *Veterinary and Human Toxicology* 24: 435-441.
175. Sun, X., Wanga, Y., Han, G., Ye, S., Zhou, X. (2020.): Effects of different selenium forms on selenium accumulation, plant growth, and physiological parameters of wild peach. *South African Journal of Botany* 131: 437-442.
176. Swaine, D.J. (1955.): The trace element content of soils. Bureau Soil ci (EB), Tech Commun 48. York, United Kingdom. p.157.
177. Swapnil, P., Meena, M., Singh, S.K., Dhuldhaj, U.P., Marawal, A. (2021.): Vital roles of carotenoids in plants and humans to deteriorate stress with its structure, biosynthesis, metabolic engineering and functional aspects, *Current Plant Biology* 26: 100203.
178. Tanwir, K., Amma, Javed, M.T., Shahid, M., Akram, M.S., Ali, Q.(2021.): Chapter 32 - Antioxidant defense systems in bioremediation of organic pollutants, *Handbook of Bioremediation Physiological, Molecular and Biotechnological Interventions* 505-521.
179. Tapiero, H., Townsend, D.M., Tew, K.D. (2003.): The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 57: 134–144.
180. Thuc, L.V., Sakagami, J., Hung, L.T., Huu, T.N., Quoc, K.N., Vi, L.L.V. (2021.): Foliar selenium application for improving drought tolerance of sesame (*Sesamum indicum* L.). *Open Agriculture* 6(1): 93-101.
181. Tocai, M., Vasile, L., Vicas, S.L. (2018.): Antioxidant Capacity and Total Phenols Content Changes on Cress (*Lepidium Sativum* L.) Sprouts after Exogenous Supply with Nano Selenium. *Natural Resources and Sustainable Development* 8(2): 131-137.
182. Tóth, R., Csapó, J. (2018.): The role of selenium in nutrition – A review. *Acta Universitatis Sapientiae, Alimentaria* 11(1): 128-144.
183. Tran, P.A., Webster, T.J. (2011.): Selenium nanoparticles inhibit *Staphylococcus aureus* growth. *International Journal of Nanomedicine* 6: 1553–1558.
184. Ulhassan, Z., Gill, R.A., Ali, S., Mwamba, T.M., Ali, B., Wang, J., Huang, Q., Aziz, R., Zhou, W. (2019.): Dual behavior of selenium: Insights into physio-biochemical, anatomical and molecular analyses of four *Brassica napus* cultivars. *Chemosphere* 225: 329-341.

185. Underwood, E.J. (1977.): Trace elements in human and animal nutrition (4th Edn.), Academic Press. New York, USA, 303-345.
186. Vahdati, M., Tohidi Moghadam, T. (2020.): Synthesis and Characterization of Selenium Nanoparticles-Lysozyme Nanohybrid System with Synergistic Antibacterial Properties. *Scientific Reports* 10: 510.
187. Van Breusegem, F., Dat, J.F. (2006.): Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiology* 141: 384–390.
188. Verbruggen, N., Hermans, C. (2008.): Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* 35, 753–759.
189. Verma, S., Dubey, R.S. (2003.): Leads toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science* 164: 645-655.
190. Vernie, L.N. (1984.): Selenium in carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on Cancer* 738: 203–217.
191. Vukadinović, V., Bertić, B. (1989.): Praktikum iz agrokemije. Poljoprivredni fakultet u Osijeku.
192. Wang, S.Y., Lewers, K.S., Bowman, L., Ding, M. (2007.): Antioxidant Activities and Anticancer Cell Proliferation Properties of Wild Strawberries. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 132(5): 647-658.
193. Wang, K., Wang, Y., Li, K., Wan, Y., Wang, Q., Zhuang, Z., Guo, Y., Li, H. (2020.): Uptake, translocation and biotransformation of selenium nanoparticles in rice seedlings (*Oryza sativa* L.). *Journal of Nanobiotechnology* 18: 103.
194. Wang, T., Zhao, H., Bi, Y., Fan, X. (2021) Preparation and antioxidant activity of selenium nanoparticles decorated by polysaccharides from *Sargassum fusiforme*. *Food Science* 86: 977-986.
195. Wang, X., Zhang, W., Chen, H., Liao, N., Wang, Z., Zhang, X., Hai, C. (2014): High selenium impairs hepatic insulin sensitivity through opposite regulation of ROS. *Toxicology Letters* 224: 16–23.
196. Wang, Y.D., Wang, X., Wong, Y.S., (2013.): Generation of selenium-enriched rice with enhanced grain yield, selenium content and bioavailability through fertilization with selenite. *Food Chemistry* 141: 2385–2393.
197. Wendel, A. (1980.): Glutathione peroxidase. Enzymatic basis of detoxication Academic Press, New York, USA. 11: 333-353.

198. Weng, X., Li, H., Ren, C., Zhou, Y., Zhu, W., Zhang, S., Liu, L. (2022.): Calcium Regulates Growth and Nutrient Absorption in Poplar Seedlings. *Frontiers in Plant Science* 13: 887098.
199. White, P. J., Broadley, M. R. (2005.): Biofortifying crops with essential mineral elements. *Trends in Plant Science* 10: 586-593.
200. WHO (2009.): *Global Health Risks: Mortality and Burden of Disease Attributable to Selected Major Risks*.
201. Wituszyńska, W., Karpiński, S. (2013.): Programmed cell death as a response to high light, UV and drought stress in plants. *Abiotic Stress: Plant Responses and Applications in Agriculture*, 207 – 246.
202. Wojdyło, A., Oszmianowski, J., Czemerys, R. (2007.): Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry* 105: 940–949.
203. Xu, X., Du, X., Wang, F., Sha, J., Chen, Q., Tian, G., Zhu, Z., Ge, S., Jiang, Y. (2020.): Effects of Potassium Levels on Plant Growth, Accumulation and Distribution of Carbon, and Nitrate Metabolism in Apple Dwarf Rootstock Seedlings. *Frontiers in Plant Science* 11: 904.
204. Xue, T., Hartikainen, H., Piironen, V. (2001.): Antioxidative and growth-promoting effect of selenium on senescing lettuce. *Plant and Soil* 237: 55–61.
205. Yang, X., Lu, Y., Zhong, F., Qian, Y., Zhao, Z., Liu, X. (2017.): The Positive Effect of Sulfur on Selenium Detoxification Under Selenite Condition in Wheat. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 48(13): 1564-1573.
206. Yasin, M., El Mehdawi, A.F., Jahn, C.E., Anwar, A., Turner, M.F.S., Faisal, M., Pilon-Smits, E.A.H. (2014.): Seleniferous soils as a source for production of selenium-enriched foods and potential of bacteria to enhance plant selenium uptake. *Plant and Soil* 386: 385–394.
207. Ye, X., Chen, L., Liu, L., Bai, Y. (2017.): Electrochemical synthesis of selenium nanoparticles and formation of sea urchin-like selenium nanoparticles by electrostatic assembly. *Materials Letters* 196: 381–384.
208. Yin, X.B. and Yuan, L.X. (2012.): *Phytoremediation and biofortification. Two Sides of One Coin*. Berlin, Germany. p.1–31.
209. Yruela, I. (2005.): Copper in plants, *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17: 1.



210. Yu, S.Y., Zhu, J.Y., Li, W.G. (1997.): Protective role of selenium against hepatitis B virus and primary liver cancer in Qidong. *Biological Trace Element Research* 56: 117-124.
211. Zafeiriou I., Gasparatos, D., Ioannou, D., Massas, I. (2022.): Selenium uptake by rocket plants (*Eruca sativa*) grown in a calcareous soil as affected by Se species, Se rate and a seaweed extract-based biostimulant application. *Crop and Pasture Science* 73: 850-861.
212. Zahedi, S.M., Hosseini, M.S., Meybodi, N.D.H., Teixeira da Silva, J.A. (2019.): Foliar application of selenium and nano-selenium affects pomegranate (*Punica granatum* cv. Malase Saveh) fruit yield and quality. *South African Journal of Botany*, 124: 350-358.
213. Zayed, A., Lytle, C.M., Terry, N. (1998.): Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants. *Planta* 206: 284-292.
214. Zhang, D., Dong, T., Ye, J., and Hou, Z. (2017.): Selenium accumulation in wheat (*Triticum aestivum* L) as affected by co-application of either selenite or selenate with phosphorus. *Soil Science and Plant Nutrition* 63: 37–44.
215. Zhang, J., Wang, H., Yan, X., Zhang, L. (2005.): Comparison of short-term toxicity between Nano-Se and selenite in mice. *Life Sciences* 76: 1099-1109.
216. Zhang, J., Wang, X., Xu, T. (2008.): Elemental selenium at nano size (nano-Se) as a potential chemopreventive agent with reduced risk of selenium toxicity: Comparison with Se-methylselenocysteine in mice. *Toxicological Sciences* 101: 22–31.
217. Zhang, Y., Pan, G., Chen, J., Hu, Q. (2003.): Uptake and transport of selenite and selenate by soybean seedlings of two genotypes. *Plant Soil* 253: 437–443.
218. Zhao, X.Q., Mitani, N., Yamaji, N., Shen, R.F., Ma, J.F. (2010.): Involvement of silicon influx transporter OsNIP2;1 in selenite uptake in rice. *Plant Physiology* 153: 1871-1877.
219. Zhou, X., Yang, J., Kronzucker, H., Shi, W. (2020.): Selenium Biofortification and Interaction with Other Elements in Plants: A Review. *Frontiers in Plant Sciences* 11: 586421.
220. Zhu, Y.G., Pilon-Smits, E.A.H., Zhao, F.J., Williams, P.N., Meharg, A.A. (2009.): Selenium in higher plants: understanding mechanisms for biofortification and phytoremediation. *Trends in Plant Science* 19: 436–442.

## 7. SAŽETAK

Selen je esencijalni mikroelement vrlo važan kod ishrane ljudi i životinja te se često koristi kao dodatak prehrani, a osobito zbog svoje zaštitne uloge u imunološkom odgovoru organizma i borbi protiv nastanka različitih malignih oboljenja. Osim za ljude i životinje, dokazano je da selen sudjeluje u mnogim biljnim fiziološkim procesima te pospješuje njihov rast i razvoj. S obzirom da je nedostatak selena u prehrani prisutan u velikom dijelu Svijeta jer ga nema dovoljno u tlu te posljedično u hrani za ljude i životinje, poljoprivredni proizvodi se obogaćuju selenom agronomskom ili genetskom biofortifikacijom. Agronomska biofortifikacija hrane podrazumijeva bilo koju vrstu gnojidbe ili primjene selena u tlo, hranjivu otopinu, folijarno te medij rasta u kojem biljke rastu s ciljem povećanja ukupnog sadržaja selena u krajnjem proizvodu. Najčešće korišteni kemijski oblici selena pri biofortifikaciji su selenat ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) i selenit ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ). Razvojem nanotehnologije, selen postaje dostupan u obliku selenovih nanočestica (SeNPs). Općenito, smatra se da SeNPs imaju odlična fizikalno-kemijska svojstva te su manje toksične u usporedbi s drugim kemijskim oblicima selena. Međutim, zbog nedovoljno istraženih učinaka nano materijala, utjecaj i posljedice primjene SeNPs kod ljudi i biljaka tek treba utvrditi. Stoga, u ovom istraživanju je bio cilj utvrditi učinak biofortifikacije selenom u obliku selenata i SeNPs na rast i razvoj, mineralni sastav, promjene u koncentraciji enzimskih i neenzimskih pokazatelja antioksidativnog statusa te uspješnost biofortifikacije tj. ukupan sadržaj Se u jestivim dijelovima špinata (*Spinacia oleracea* L.) i rukole (*Eruca sativa* Mill.). uz navedeno, cilj je bio i odabrati optimalni model biofortifikacije sukladno primijenjenim tretmanima.

Istraživanje je provedeno u grijanom plasteniku s automatskom kontrolom temperature i prozračivanja u sustavu plutajućeg hidropona tijekom 2019. i 2020. godine. Prvi i drugi biofortifikacijski pokus su bili postavljeni prema slučajnom blok rasporedu u 4 ponavljanja (20 biljaka po ponavljanju). Prvi kao dvofaktorijalni u 4 koncentracije i 2 kemijska oblika selena uz kontrolnu varijantu, a drugi kao dvofaktorijalni uz dodatak još dvije vrste SeNPs. Selenove nanočestice su bile sintetizirane te stabilizirane polivinilpirolidonom (SeNPs-PVP), huminskom kiselinom (SeNPs-HA) te polisorbitom (SeNPs-PS). Tijekom prve godine su primijenjene samo SeNPs-PVP. Po završetku istraživanja, kada su biljke bile na kraju proizvodnog procesa koje odgovara komercijalnom vremenu berbe za mlado lisnato povrće, obavljeno je uzorkovanje biljnog materijala. Analizirani su morfološki pokazatelji rasta i razvoja, sadržaj makro i mikroelemenata,

sadržaj selen te enzimski i neenzimski pokazatelji antioksidativnog statusa. Statističkom obradom podataka utvrđeno je da biofortifikacija s različitim oblicima selen značajno utječe na broj listova kod obje ispitivane vrste. Također, pojedini tretmani biofortifikacije su utjecali i na povećanje dužine korijena kod obje ispitivane vrste u drugoj vegetacijskoj godini. Tretmani biofortifikacije su utjecali i na značajno povećanje ukupne biomase kod ispitivanih vrsta. Nadalje, biofortifikacija različitim oblicima selen je utjecala i na promjene sadržaja makro i mikroelemenata kod ispitivanih vrsta. Biofortifikacija SeNPs je značajno povećala sadržaj N u biljnim dijelovima obje vrste. Nadalje, biofortifikacija s različitim oblicima selen je različito utjecala na sadržaj makroelemenata u korijenu i listovima špinata i rukole. Također, tretmani biofortifikacije su imali različit utjecaj na promjenu sadržaja mikroelemenata kod korijena i listova ispitivanih vrsta. Općenito, tretmani biofortifikacije su značajno utjecali na povećanje sadržaja Fe, Mn i Cu kod korijena špinata u obje vegetacijske godine. Također, utjecali su i na povećanje sadržaja Fe, Mn i Cu u listovima špinata, ali nije utvrđena značajna razlika. Očekivano, sadržaj Se u biljnim dijelovima je bio pod značajnim utjecajem biofortifikacijskih tretmana. U prvom pokusu, sadržaj selen se kod oba kemijska oblika u korijenu i listovima ispitivanih vrsta povećavao rastom primijenjene koncentracije Se u hranjivoj otopini za uzgoj biljaka te je utvrđen gotovo linearan trend povećavanja sadržaja Se u korijenu i listovima špinata i rukole kod svih tretmana biofortifikacije. U korijenu špinata i rukole kod SeNPs tretmana utvrđen je značajno veći sadržaj Se u usporedbi s kontrolom i tretmanima selenatom. Suprotno tome, značajno veći sadržaj Se u listovima špinata i rukole je utvrđen kod tretmana selenatom u usporedbi s SeNPs tretmanima i kontrolom. Također, isti trend je utvrđen kod rukole u drugom pokusu, dok je kod špinata utvrđena značajna promjena u sadržaju Se kod listova pod utjecajem primijenjenih oblika gdje se primjena SeNPs ističe kao bolji model biofortifikacije. Tretmani biofortifikacije su utjecali i na povećanje koncentracije klorofila i karotenoida (Chl a, Chl b, Car) kod obje ispitivane vrste. Također, biofortifikacija s različitim oblicima selen je značajno utjecala i na enzimске i neenzimске pokazatelje oksidativnog stresa u ovisnosti o biljnoj vrsti te obliku i koncentraciji selen. Biofortifikacija različitim oblicima selen je utjecala na povećanje koncentracije PHE, GSH i AA kod ispitivanih vrsta što se odrazilo i na povećanje UAA. Općenito, SeNPs tretmani su utjecali na smanjenje intenziteta LPO kod obje ispitivane vrste, dok je primjena selenata imala suprotan učinak kod rukole. Utvrđen je i utjecaj na povećanje aktivnosti enzima APX, CAT, SOD, GR i GST u ovisnosti o biofortifikacijskom tretmanu. Ukupno prema svim

analiziranim pokazateljima, biofortifikacija selenovim nanočesticama stabiliziranih polisorbatom (SeNPs-PS) se ističe kao najbolji model biofortifikacije s obzirom na ukupan sadržaj Se u jestivim dijelovima biljke te pozitivnog utjecaja na njihov rast i razvoj. Na kraju, ovo istraživanje je rezultiralo novim spoznajama učinka i mogućnosti primjene SeNPs u cilju biofortifikacije lisnatog povrća. Međutim, ovo istraživanje nije u potpunosti razjasnilo usvajanje, translokaciju i sudbinu SeNPs u biljnim organima. Stoga, daljnja istraživanja treba fokusirati na razjašnjavanju sudbine SeNPs u biljkama te njihovoj biotransformaciji i utjecaju konzumacije biljaka biofortificiranih ovim metodama na ljudsko zdravlje. Na kraju, potrebno je uložiti dodatne napore u cilju razvoja novih SeNPs uz upotrebu prirodnih redukcijskih agenasa kako bi se dobile SeNPs poželjnih fizikalnih i kemijskih svojstava još prikladnijih za proizvodnju funkcionalnih namirnica.

## 8. SUMMARY

Selenium is an essential microelement very important for human and animal health and is often used as a dietary supplement, especially because of its protective role in the body's immune response and the fight against various malignant diseases. In addition to humans and animals, it has been proven that selenium participates in many plant physiological processes and promotes their growth and development. Given that the lack of selenium in the diet is present in a large part of the world because of its low concentration in the soil and consequently in food for humans and animals, agricultural products are enriched with selenium through agronomic or genetic biofortification. Agronomic biofortification of food implies any type of fertilization or application of selenium to the soil, nutrient solution, growth medium or by foliar application with the aim of increasing the total content of selenium in the final product - food. The most commonly used chemical forms of selenium in biofortification models are selenate ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) and selenite ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ). With the development of nanotechnology, selenium became available in the form of selenium nanoparticles (SeNPs). In general, SeNPs are considered to have excellent physicochemical properties and are less toxic compared to other chemical forms of selenium. However, due to the insufficiently investigated effects of nanomaterials, the impact and consequences of the application of SeNPs on humans and plants are yet to be determined. Therefore, the aim of this research was to determine the effect of biofortification with selenium in the form of selenate and SeNPs on growth and development, mineral composition, changes in the concentration of enzymatic and non-enzymatic indicators of antioxidant status, and the success of biofortification, i.e. the total content of Se in the edible parts of spinach (*Spinacia oleracea* L.) and rocket (*Eruca sativa* Mill.). In addition to the above, the goal was to choose the optimal biofortification model according to the effects of applied treatments.

The research was conducted in a heated greenhouse with automatic temperature and ventilation control in a floating hydroponic system during 2019 and 2020. The first and second biofortification experiments were set according to a random block design in 4 replications (20 plants per replication). The first trial was set as bifactorial in 4 concentrations and 2 chemical forms of selenium with the control variant, and the second as bifactorial with two additional SeNPs types. Selenium nanoparticles were synthesized and stabilized with polyvinylpyrrolidone (SeNPs-PVP), humic acid (SeNPs-HA) and polysorbate (SeNPs-PS). During the first trial, only SeNPs-PVP were applied. At the end of

the trial, which corresponds to the commercial harvest time for babyleaf vegetables, plant material was sampled. Morphological indicators of growth and development, content of macro and microelements, content of selenium as well as status of enzymatic and non-enzymatic indicators of antioxidant status were analysed. Statistical data processing revealed that biofortification with different forms of selenium significantly affects the number of leaves in both tested species. Also, some biofortification treatments had an effect on the increase in root length in both investigated species during the second trial. Biofortification treatments also significantly increased total biomass of the tested species. Furthermore, biofortification with different forms of selenium influenced on the content of macro and microelements in the examined species. SeNPs biofortification significantly increased the N content in plant parts of both species. Furthermore, biofortification with different forms of selenium had different effects on the content of macronutrients in the roots and leaves of spinach and arugula. Also, biofortification treatments had a different impact on the change in the content of micronutrients in the roots and leaves of both species. In general, biofortification treatments significantly increased the content of Fe, Mn and Cu in spinach roots in both trials. Also, they increased the content of Fe, Mn and Cu content in spinach leaves. As expected, the content of Se in plant parts was significantly influenced by biofortification treatments. In the first trial, along with increasing the concentration of Se in nutrient solution, both chemical forms of Se significantly increased the content of selenium in the roots and leaves of the tested species and almost linear trend of Se increment was observed. In the roots of spinach and rocket biofortified with SeNPs, a significantly higher content of Se was found compared to the control and selenate treatments. Conversely, a significantly higher content of Se in spinach and rocket leaves was found when biofortified with selenate. Also, the same trend was observed in rucola during the second experiment, while in spinach a significant change in Se content was found in the leaves under the influence of the applied forms, where the application of SeNPs stands out as a better model of biofortification. Biofortification treatments increased the concentration of chlorophyll and carotenoids (Chl a, Chl b, Car) in leaves of spinach and rucola. Also, biofortification with different forms of selenium significantly influenced both enzymatic and non-enzymatic indicators of oxidative stress, depending on the plant species, the form and concentration of selenium. Biofortification with different Se forms increased the concentration of PHE, GSH and AA in the tested species, which reflected in the increase of UAA. In general, SeNPs treatments reduced the intensity of LPO in both tested species, while the application of

selenate had the opposite effect in rucola. The impact on the increase in the activity of the enzymes APX, CAT, SOD, GR and GST was also determined, depending on the biofortification treatment. Overall, according to all analysed indicators, biofortification with polysorbate-stabilized selenium nanoparticles (SeNPs-PS) stands out as the best model of biofortification with regard to the total content of Se in the edible parts of the plant and the positive impact on their growth and development. At the end, this research resulted in new insights about the effect and possibility of using SeNPs for biofortification of leafy vegetables. However, this research did not fully clarify the uptake, translocation and fate of SeNPs in plant organs. Therefore, further research should focus on the fate of SeNPs in plants and their biotransformation as well as the impact of consumption of plants biofortified with SeNPs on human health. Finally, additional efforts are needed to develop new SeNPs with the use of natural reducing agents in order to obtain SeNPs with desirable physical and chemical properties even more suitable for the production of functional foods.

## ŽIVOTOPIS

Boris Ravnjak rođen je 14. prosinca 1991. godine u Doboju, Bosna i Hercegovina. Godine 2010. završava Isusovačku klasičnu gimnaziju. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, sveučilišni preddiplomski studij Poljoprivrede, smjer Hortikultura, upisao je 2010. godine, a završio u rujnu 2013. godine. Iste godine na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku upisuje sveučilišni diplomski studij „Voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo“. U rujnu 2015. godine je obranio diplomski rad pod naslovom "Primjena mikoriznih gljiva u poljoprivrednoj proizvodnji“ s izvrsnom ocjenom. Nakon završene prve godine navedenog diplomskog studija, Fakultetsko vijeće Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku odobrava mu, kao uspješnom studentu, paralelan upis na još jedan diplomski studij, smjer Biljna proizvodnja. Po završetku oba diplomatska studija, u veljači 2016. godine zapošljava se u tvrtki Novi Agrar d.o.o. kao tehnolog u biljnoj proizvodnji. Od ožujka 2018. godine zaposlen je u suradničkom zvanju asistenta na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek na Katedri za povrćarstvo, cvjećarstvo i ljekovito bilje pri Zavodu za biljnu proizvodnju i biotehnologiju. Kao suradnik sudjeluje u izvođenju nastave na sljedećim modulima: Povrćarstvo, Povrćarstvo i cvjećarstvo, Uzgoj bilja u zaštićenim prostorima, Modeli proizvodnje povrća i cvijeća, Modeli proizvodnje povrća, Berba i skladištenje povrća i cvijeća, Ekološko povrćarstvo, Ljekovito i začinsko bilje, Biopolinacija u hortikulturi, Uzgoj bilja u zaštićenom prostoru, Horticultural production systems, Greenhouse production technology. U prosincu 2018. godine upisuje Poslijediplomski doktorski studij Poljoprivredne znanosti, smjer Agrokemija na Fakultetu agrobiotehničkih znanosti Osijek. Bio je suradnik na znanstveno-stručnom projektu financiranom od strane Ministarstva poljoprivrede RH (VIP projekt) pod nazivom „Definiranje tehnologije proizvodnje autohtone začinske paprike“. Trenutno je suradnik na znanstvenom projektu Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ) pod nazivom „Primjena nanobiotehnologije za suplementaciju hrane sa selenom“ voditelja izv.prof.dr.sc. Tomislava Vinkovića. U sklopu ERASMUS+ programa mobilnosti 2019. godine proveo je dva tjedna na Sveučilištu u Lisabonu u Portugalu (The Faculty of Sciences and Technology), 2021. godine, boravio je 10 dana na Sveučilištu u Rzeszowu u Poljskoj (College of Natural Sciences) te je 2022. boravio dva tjedna na Sveučilištu u Temišvaru u Rumunjskoj (Banat University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine „King Michael I of Romania“). Sudjelovao je na više međunarodnih znanstvenih skupova te na šest s usmenom prezentacijom rada.



Kao autor i koautor objavio je 6 radova u kategoriji a1 radova, 2 rada u kategoriji a2 radova, 1 rad u kategoriji a3 radova te 19 sažetka. Koautor je priručnika „Proizvodnja autohtone baranjske začinske paprike“ te sveučilišnog priručnika „Okolišno prihvatljiva proizvodnja povrća“.

## **POPIS KORIŠTENIH KRATICA**

SeNPs – selenove nanočestice

PVP – polivinilpirolidon

PS – polisorbit

HA – huminska kiselina

Chl a – klorofil a

Chl b – klorofil b

Car – karotenoidi

UAA – ukupna antioksidativna aktivnost

PHE – ukupni fenoli

LPO – lipidna peroksidacija

GSH – glutation

APX – askorbat-peroksidaza

CAT – katalaza

AA – askorbinska kiselina

GR – glutation-reduktaza

GST – glutation-s-transferaza

GPX – glutation-peroksidaza

SOD – superoksid-dismutaza