

IDENTIFIKASI GEN SELENOMETIL TRANSFERASE (*smt*)
PADAISOLAT *Geobacillus* sp. 20K YANG RESISTEN TERHADAP SELENIUM¹
[Identification of Seleno methyltransferase (*smt*) Gene from
Geobacillus sp. 20k Resistant to Selenium]

Evi Triana^{1,3*}, Novik Nurhidayat, Titin Yulinery, Ernawati Kasim dan Ratih M Dewi
Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI
Jin Raya Bogor, Km 46, Cibinong
* e-mail: evitriana03@yahoo.com

ABSTRACT

The trace element Selenium is toxic at high concentration. Most of organisms living in selenium rich environment are selenium resistant. One of the resistance mechanisms is methylation, in which selenium is methylated and transformed to non-toxic selenium compound. The methylation is catalyzed by seleno methyltransferase (SMT) coded by *smt* gene. The gene are expressed by selenium tolerant plants. However, there was no available report yet on such specific gene in the bacterial genome. This study was carried out to determine *smt* homologous gene on selected selenium accumulator bacteria, *Geobacillus* sp. 20k. The *smt* gene of was determined by amplifying target DNA and analyses its sequences through homology search (BLAST). The result showed that the DNA and its protein part of thermophilic enzyme involved selenium metabolisms.

Kata kunci/ keywords: Selenium, seleno methyltransferase (SMT), gen *smt* *smt* gene, *Geobacillus* sp. 20k

PENDAHULUAN

Di alam, selenium merupakan elemen tris yang terdapat dalam sejumlah bentuk anorganik seperti selenida (Se^{2-}), selenat (SeO_4^{2-}) dan selenit (SeO_3^{2-}) serta dalam bentuk organik seperti selenometionin dan selenosistein (Johansson *et al*, 2005). Sebagaimana metaloid lain, dalam kadar tinggi, selenium bersifat toksik. Polusi yang disebabkan elemen ini dapat diakibatkan proses geologis (alami) maupun aktivitas manusia, misalnya dalam bidang industri, antara lain pemrosesan, penggunaan bahan bakar dan pertambangan (Ellis *et al*, 2004). Oleh karena itu, polusi selenium cukup sering dijumpai. Selenium dalam bentuk oksianion merupakan bentuk yang sangat reaktif dan paling berbahaya Ranjard *et al*, 2003). Beberapa organisme memetilasi selenium sebagai mekanisme detoksifikasi/ pertahanan terhadap toksisitas selenium, selain mengubah senyawa selenium menjadi selenium yang mudah menguap dan memecah senyawa selenium menjadi selenium elemental (Zhang *et al*, 2006).

Pada organisme pengakumulasi selenium, selenium dimetilasi dan ditransformasi ke dalam bentuk seleno asam amino non-toksik, antara lain *methyl selenic acid* (MSA) dan *methyl selenocysteine* (MSC) (Dong *et al*, 2002). Senyawa-senyawa tersebut merupakan bentuk dominan senyawa selenium yang

disimpan dan hanya dihasilkan oleh organisme pengakumulasi selenium. Oleh karena itu, akumulasi senyawa tersebut dianggap merupakan dasar toleransi/resistensi terhadap toksisitas selenium (Whanger, 2002; Lyi *et al.*, 2005). Sementara pada organisme yang bukan pengakumulasi selenium, selenium diserap dan diinkorporasi secara nonspesifik ke dalam senyawa organiknya yang mengandung sulfur (Rayman, 2000). Hal ini berkontribusi terhadap toksisitas selenium pada organisme tersebut (Whanger, 2004). Oleh karena itu, organisme pengakumulasi selenium yang mampu mengubah selenium toksik menjadi selenium non-toksik dapat dimanfaatkan untuk bioremediasi lingkungan yang tercemar selenium.

Penemuan tentang jenis-jenis tumbuhan serta mikroba pengakumulasi selenium mendorong penelitian lebih lanjut mengenai mekanisme organisme tersebut dalam mentoleransi toksisitas selenium. Mekanisme tersebut terungkap dari hasil penelitian terhadap tumbuhan pengakumulasi selenium, *Astragalus bisulcatus*. Tumbuhan ini mampu bertahan terhadap toksisitas selenium karena memiliki kemampuan mengubah bentuk toksik selenium menjadi tidak toksik. Selenosistein secara spesifik dimetilasi untuk menghindari penggabungan yang bersifat non-spesifik dengan protein. Metilasi selenosistein dikatalis oleh

³Diterima: 12 September 2010 - Disetujui: 14 Oktober 2010

enzim seleno metiltransferase (SMT) membentuk selenometil selenosistein (Se-MS), dimana metilmethionin berperan sebagai donor metil (Neuhierl *et al.*, 1999; Pickering *et al.*, 2003).

Penelitian yang dilakukan oleh Ellis *et al.* (2004), mengungkapkan bahwa enzim SMT disandi oleh gen *smt*. Gen ini sebagian besar diekspresikan oleh tumbuhan pengakumulasi dan toleran terhadap selenium, misalnya *Astragalus bisulcatus*, *Camelia chinensis*, *Brassica oleraceae*, *Zea mays* dan *Oryza sativa* (Clark *et al.*, 1996; Johansson *et al.*, 2005). Selain itu, *Arabinopsis* dan *indian mustard* (*Brassica juncea*) yang mengekspresikan SMT dalam jumlah tinggi, menunjukkan toleransi yang tinggi terhadap selenium. Oleh karena itu diduga gen *smt* merupakan gen yang bertanggungjawab dalam resistensi terhadap selenium pada organisme pengakumulasi selenium (Whanger, 2004).

Walaupun bakteri merupakan organisme dominan yang memetilasi selenium (Ranjard *et al.*, 2003), namun hingga saat ini, gen spesifik seperti *smt* pada *A. bisulcatus* belum dilaporkan terdapat pada genom bakteri. Untuk mengungkapkan kemungkinan adanya gen *smt* atau yang serupa (homolog) dengan gen tersebut pada mikroba, dilakukan pendekatan dengan mengisolasi mikroba pengakumulasi selenium. Mikroba pengakumulasi selenium banyak dijumpai pada sumber air panas dan tanah gunung berapi. Sumber air panas dan tanah gunung berapi memiliki kandungan selenium yang sangat tinggi, sehingga bersifat toksik. Oleh karena itu bakteri yang mampu hidup dan tumbuh pada ekosistem tersebut harus memiliki mekanisme detoksifikasi selenium.

Geobacillus sp. 20k yang diisolasi dari sumber air panas di Gunung Kerinci (Sumatera Barat), mampu bertahan terhadap toksisitas selenium dan mengakumulasi selenium. Kemampuan tersebut telah dikonfirmasi secara *in vitro* (Nurhidayat, 2008), sehingga menimbulkan asumsi bahwa bakteri tersebut memiliki gen-gen yang serupa dengan gen *smt A. bisulcatus*. Selain itu, karena merupakan bakteri termofilik, enzim-enzim dan gen-gen pada *Geobacillus* sp. 20k, termasuk gen *smt*, stabil pada suhu tinggi, sehingga lebih mudah diaplikasikan dalam bidang bioteknologi dan ekologi untuk kepentingan bioremediasi dan reproduksi lingkungan yang tercemar selenium.

METODE PENELITIAN

Kultur dan pemanenan *Geobacillus* sp. 20k

Bakteri ditumbuhkan pada media heterotrof dengan komposisi 15 g pepton, 3 g tripton, 5 g NaCl, 2,5 g K₂HPO₄, 2,5 g glukosa, 10 g agar dalam 1000 mL akuades, ditambah 100 ppm SeO₂, kemudiandiinkubasi pada suhu 60°C selama 3 hari. Selanjutnya bakteri ditumbuhkan kembali pada media heterotrof cair pada suhu 60°C selama 3 hari. Sel dipanen dengan cara sentrifugasi 3000 rpm selama 5-10 menit.

Isolasi DNA

DNA diekstraksi dan dipurifikasi menggunakan illustra™ bacteria genomic Prep Mini Spin Kit dari GE Healthcare menurut prosedur dari produsen.

Desain primer

Primer spesifik untuk gen *smt* didesain menggunakan program primer3 (Rozen and Skaletsky, 2000; NCBI, 2008a) berdasarkan *query* nukleotida gen *smt A. bisulcatus* yang diperoleh dari *Gene Bank* NCBI secara online (*Accession no.* AJ131433) (NCBI, 2008b). Forward primer 5'-CAAGCCACCATTCAAGGTTT-3' dan reverse primer 5'-CCCTACTGATCCCGCAATTA-3'.. Sintesis primer dilakukan oleh EUROGENTEC AIT, Singapore.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

DNA diamplifikasi menggunakan FastStart PCR Master, forward dan reverse primer. Total volume reaksi adalah 25 µl, yang terdiri dari 3,75 µl untuk masing-masing primer (5 µM), 1 µl templat, 12,5 µl PCR Master Mix dan 4 µl ddH₂O. Siklus termal berlangsung sebanyak 40 siklus yang terdiri dari: denaturasi DNA pada suhu 96°C selama 30 detik, penempelan primer pada suhu 60°C selama 30 detik dan pemanjangan pada suhu 72°C selama 2 menit.

Purifikasi produk PCR

DNA dimurnikan menggunakan illustra™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit menurut prosedur yang dikeluarkan oleh produsen.

Elektroforesis

Sebanyak 10 µl sampel yang telah dicampur dengan 2 µl loading dye, bersama dengan 2 µl DNA ladder (100 bp) diaplikasikan pada 0,8% gel agarose yang mengandung EtBr dengan konsentrasi akhir 0,5 ppm. Pada gel yang direndam dalam buffer TAE 1x,

diberikan arus listrik 100 V selama \pm 60 menit, kemudian gel divisualisasi dengan pendedahan sinar UV.

Sekuensing DN A (*Cycle sequencing*)

Urutan nukleotida ditentukan menggunakan Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit oleh Applied Biosystem 3130 *Genetic Analyzer*. Total volume reaksi adalah 20 μ l, yang terdiri dari 3,75 μ l primer (5 μ M), 1 μ l templat, 8 μ l BigDye Ready Reaction Mix dan 7,25 μ l ddH₂O. Siklus termal berlangsung sebanyak 40 siklus pada kondisi denaturasi DNA pada suhu 96°C selama 30 detik, penempelan primer pada suhu 60°C selama 30 detik dan pemanjangan pada suhu 72°C selama 2 menit.

Analisis sekuen

Sekuen gen SMT dirakit (*assamble*) menggunakan perangkat lunak *ATGC Sequencing Analysis* versi 4.0 (ABI Prism) kemudian nukleotida-nukleotida penyusunnya dikoreksi secara langsung.

Pencarian homologi

Urutan nukleotida gen *smt Geobacillus* sp. 20k dirujuk ke *Gene Bank* untuk mengetahui kesamaannya dengan gen dan protein lain terutama yang berkaitan dengan sintesis selenoprotein, menggunakan analisis Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

HASIL

Kegiatan identifikasi gen *smt* pada *Geobacillus* sp. 20k dimulai dengan penelusuran pada *Gene Bank*

untuk mendapatkan informasi gen *smt*. Gen *smt Astragalus bisulcatus* (Accession No. AJ131433) yang telah dikarakterisasi digunakan sebagai referensi. Pencarian homologi terhadap gen tersebut dapat dilihat pada Tabel 1.

Dengan menggunakan primer-primer spesifik tersebut, fragmen DNA target yang berukuran sekitar 190 bp telah berhasil diamplifikasi (Gambar 1), dengan urutan nukleotida sebagai berikut:

```
CGTACATGCGTTCATCCGAGGGGTAAGACATATG
AGCGTGCTCCCATGCATTCTAATTGCGGGATCAGT
AGATAAACCTTGAATGGTGGCTTGACAGTGCGTA
TTAATCATATGATCGTGGCGCGCCTGCACGACAA
ATGTAGGCGAATAGATCATGTCCACATCKJrCTCTGA
CATCGGCAATCAAATCCTGCAGTGCTTTCAACGT
GTTTCATCGGCGTTTTTTTTGAATTCTTCCATCTCAG
CGTCAATCTGCTCCGCTGTCTTGCCTTCAAATTC
TTATAATTGCGGGATCAGTAGGGAAACCT.
```

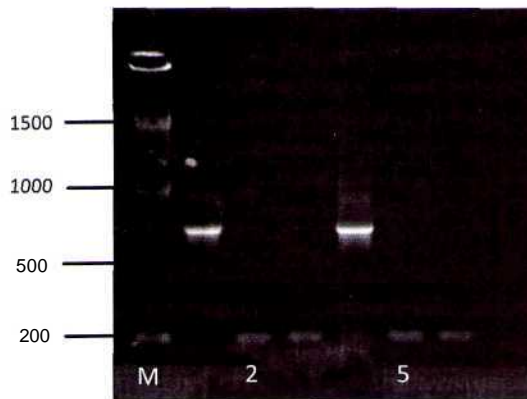
Hasil pencarian homologi terhadap urutan nukleotida fragmen DNA tersebut dapat dilihat pada Tabel 2.

PEMBAHASAN

Pada bakteri, gen seleno metiltransferase (*smt*) memiliki domain mirip metiltransferase hingga \pm 60%, misalnya dengan homosistein metiltransferase (*hmi*) pada *Bacillus pumilus*, *Clostridium acetobutylicum* dan *Streptococcus mutans* (Tabel 1). Bagian yang

Tabel 1. Hasil pencarian homologi gen *smt A. Bisulcatus*.

Organisme	Gen	Homologi
<i>Astragalus bisulcatus</i>	Selenosistein metiltransferase (<i>smt</i>)	100
Teh (<i>Camelia sinensis</i>)	Selenosistein metiltransferase (<i>smt</i>)	85
<i>Arabinopsis thaliana</i>	Homosistein S-metiltransferase (<i>hmt2</i>)	86
Jagung (<i>Zea mays</i>)	Homosistein S-metiltransferase (<i>hmt3</i>)	84
Padi (<i>Oryza sativa</i>)	cDNAclone:J013044M21	83
Anggur (<i>Vitisvinifera</i>)	hypothetical protein LOCI00264835	84
Sawi (<i>Brassica oleracea</i>)	Homosistein S-metiltransferase (<i>hmt2</i>)	84
<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032	Homosistein S-metiltransferase	64
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	Possible Homosistein S-metiltransferase	68
<i>Streptococcus mutans</i> UA 159	Putative metiltransferase	63



Gambar 1. Hasil amplifikasi fragmen DN A yang berukuran sekitar 190 bp. M = DNA ladder, Lane 2 dan 5 = produk PCR dengan primer SMT.

Tabel 2. Hasil pencarian homologi terhadap urutan nukleotida fragmen gen *smt* *Geobacillus* sp. 20k.

Protein	Organisms	Homology (%)
Esterase/lipase/thioesterase	<i>Bacillus lichineformis</i>	100
Carboxylesterase	<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061	95
Carboxylesterase	<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032	93
Thermostable Est3G	<i>Bacillus coakuilensis</i> m4-4	90
Thermostable Est30	<i>Geobacillus</i> sp. GI IMC 16	88
Thermostable carboxylesterase Est30	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	88
Carboxylesterase	<i>Geobacillus stearothermophiius</i>	90
Seleno methyltransferase	<i>Astragalus bisulcatus</i>	83

serupa diduga merupakan bagian yang bertanggung jawab untuk transfer metil, sementara bagian yang berbeda merupakan bagian yang variabel dan kemungkinan spesifik untuk proses pengikatan selenium. Homologi tersebut mencerminkan sifat kimia substrat yang hampir serupa. Substrat yang lebih disukai SMT sebagai akseptor metil adalah selenium, sementara untuk HMT adalah sulfur. Oleh karena itu ada kemungkinan toleransi terhadap selenium juga diatur oleh gen-gen yang terlibat dalam metabolisme sulfur (Lyi *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006).

Untuk mendeteksi keberadaan gen *smt* pada genom *Geobacillus* sp. 20k, DNA target diamplifikasi melalui reaksi PCR, menggunakan primer spesifik untuk gen *smt*. Berdasarkan parameter-parameter pentingnya, primer yang dirancang memenuhi persyaratan sebagai primer spesifik untuk amplifikasi gen *smt* (Wikipedia, 2009). Selain itu, primer bersifat spesifik karena tidak ada sekuen gen pada basis data yang kesamaannya signifikan dengan primer gen *smt* (data tidak

ditampilkan) (NCBI, 2008b). Karakter ini disyaratkan untuk primer spesifik, dimana primer untuk amplifikasi gen *smt* harus secara spesifik berikatan hanya dengan gen *smt*.

Dengan menggunakan program dan reaksi PCR sebagaimana dijelaskan pada prosedur penelitian, sere primer spesifik untuk gen *smt*, fragmen DNA target yang berukuran sekitar 190 bp telah berhasil diamplifikasi (Gambar 1), dan diperoleh urutan nukleotida penyusunnya, sebagaimana dicantumkan dalam Hasil Penelitian.

Hasil pencarian homologi pada basis data menunjukkan bahwa sekuen parsial gen *sm*: *Geobacillus* sp. 20k mempunyai kemiripan dengan bagian dari gen *smt* *A. bisulcatus* (83%). Selain itu, fragmen tersebut juga serupa dengan bagian dari enzim esterase atau karboksilesterase yang termostabil pada bakteri-bakteri termofilik, antara lain: *Geobacillus* sp., *Geobacillus thermodenitrificans*, dan *Geobacillus stearothermophiius* (Tabel 2).

Prediksi *Geobacillus* sp. 20k memiliki gen yang mirip dengan bagian dari gen *smt*, dikonfirmasi oleh hasil kultur isolat tersebut pada media yang disuplementasi selenium. Bakteri tumbuh sebagai koloni berwarna merah (Foto), yang menunjukkan kemampuan bakteri mereduksi senyawa selenium menjadi selenium elemental, sebagaimana ditunjukkan oleh tumbuhan pengakumulasi selenium bertahan terhadap toksisitas selenium (Zhang *et al.*, 2006). Mekanisme ini merupakan indikasi bahwa *Geobacillus* sp. 20k mampu mengakumulasi dan resisten terhadap selenium (Whanger, 2004). Indikasi tersebut sesuai hasil penelitian terdahulu yang mengungkapkan bahwa *Geobacillus* sp. 20k mengakumulasi selenium dari lingkungan sebesar 1,0031 ppm (Handayani, 2006).

Kemampuan *Geobacillus* sp. 20k mengakumulasi selenium mengindikasikan isolat bakteri tersebut memiliki mekanisme yang berperan dalam toleransi/resistensi terhadap toksisitas selenium. Mekanisme ini dihubungkan dengan kemungkinan terdapatnya enzim yang bertanggung jawab terhadap detoksifikasi selenium, sebagaimana pada organisme pengakumulasi selenium lainnya. Melalui mekanisme detoksifikasi, selenium toksik (SeO_2) diubah menjadi tidak toksik bagi isolat bakteri tersebut (Pickering *et al.*, 2003). Selain itu, juga terjadi proses metilasi untuk mencegah penggabungan selenosistein hasil reduksi SeO_2 secara non-spesifik dengan protein (Lyi *et al.*, 2005), yang berkontribusi terhadap toksisitas selenium. Melalui proses metilasi tersebut, terbentuk metil

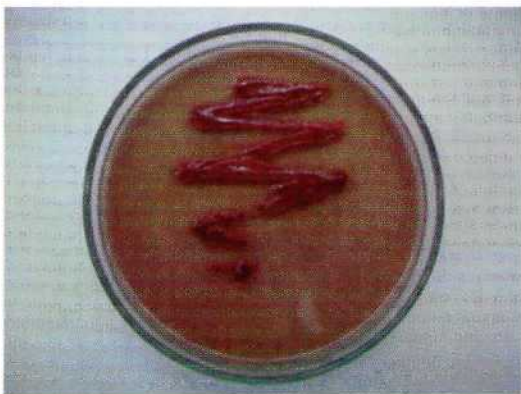


Foto Koloni *Geobacillus* sp. 20k pada media yang disuplementasi Se.

selenosistein (MSC) (Neuhierl *et al.*, 1999; Rayman, 2000). Senyawa ini hanya dihasilkan oleh organisme pengakumulasi selenium, dengan perantara enzim SMT yang disandi oleh gen *smt* (Pickering *et al.*, 2003; Ellis *et al.*, 2004). Oleh karena itu, diprediksi bahwa *Geobacillus* sp. 20k memiliki gen yang homolog dengan *smt A. bisulcatus*.

Berdasarkan hasil analisis sekuen parsial gen *smt* *Geobacillus* sp. 20k, bersama dengan kemampuan *Geobacillus* sp. 20k mengakumulasi selenium (Handayani, 2006), yang dikonfirmasi oleh tumbuhnya koloni bakteri berwarna merah pada medium yang disuplementasi selenium (Foto), diprediksi *Geobacillus* sp. 20k memiliki fragmen DNA yang serupa dengan bagian dari gen *smt A. bisulcatus*. Dengan terungkapnya kemungkinan keberadaan materi genetik tersebut pada organisme ini, terbuka peluang memanfaatkan *Geobacillus* sp. 20k untuk remediasi ekosistem yang tercemar selenium. Melalui rekayasa genetika, dapat dikembangkan mikroorganisme lain (misalnya yang lazim digunakan sebagai biofertilizer) dengan kemampuan mendetoksifikasi selenium, sehingga lebih resisten terhadap selenium. Karakter ini sangat penting untuk remediasi dan reproduksi lahan yang tercemar selenium.

KESIMPULAN

Isolat bakteri termofilik *Geobacillus* sp. 20k memiliki gen yang homolog dengan gen *smt Astragalus bisulcatus*, yang ditunjukkan oleh adanya fragmen DNA yang berhasil diamplifikasi menggunakan primer yang diturunkan dari gen *smt A. bisulcatus*.

Sekuen parsial *gensmt* *Geobacillus* sp. 20k memiliki homologi dengan bagian gen *smt A. bisulcatus* (83%).

Geobacillus sp. 20k berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai agensia remediasi dan reproduksi lahan yang tercemar selenium.

DAFTAR PUSTAKA

- Clark LC, GF Combs Jr, BW Turnbull, EH Slate, DK Chalker, J Chow, *et al.* 1996. Effects of Selenium Supplementation for Cancer Prevention in Patients with Carcinoma of The Skin: A Randomized Controlled Trial. *Journal of American Medical Association* 276, 1957-1963.
- Dong Y, HE Ganther, C Stewart, and C Ip. 2002. Identification of Molecular Target Associated with

- Selenium-induced Growth Inhibition in Human Breast Cells Using cDNA Microarrays. *Cancer Research* **62**, 708-714.
- Ellis DR, TG Sors, DG Brunk, C Albrecht, C Orser, B Lahner. 2004.** Production of Se-methylselenocystein in Transgenic Plants Expressing Selenocysteine Methyltransferase. *BMC Plant Biology* **4(1)**, 1-11.
- Handayani. 2006.** Penurunan Ekspresi Gen *pho85* Sel Apoptosis *Saccharomyces cerevisiae* oleh Ekstrak Air Daun Ciplukan 33NHR dan *Geobacillus* sp. 22a. *Skripsi. Institut Pertanian Bogor*.
- Johansson L, G Gafvelin and ESJ Arner. 2005.** Selenocysteine in Protein Properties and Biotechnological Use. *Biochimica et Biophysica Acta* **XX**, 1-13.
- Lyi SM, Li Heller, M Rutzke, RM Welch, LV Kochian, and L Li. 2005.** Molecular and Biochemical Characterization of The Selenocysteine Se-Methyltransferase Gene and Se-Methylselenocysteine Synthesis in Broccoli. *Plant Physiology* **138(1)**, 409-420.
- NCBI. 2008a.** National Center for Biotechnology Information HomePage. <http://biotools.umassmed.edu/cgi-bin/primer3plus/>. [8 Agustus 2008]
- NCBI. 2008b.** National Center for Biotechnology Information HomePage. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. [8 Agustus 2008]
- Neihierl B, M Thanbichler, F Lottspeich, A Montana, and Boock. 1999.** A Family of S-methylmethionine Dependent Thiol/Selenol Methyltransferases: Role in Selenium Tolerance and Evolutionary Relation. *Journal of Biology and Chemistry* **274(9)**, 5407-5414.
- Nurhidayat N. 2008.** Penyembuh dari Rinjani. <http://www.tempointeraktif.com/hg/iptek/2006/09/22brk.20060922-84S60.id.html>. [5 Juni 2008]
- Pickering LJ, C Wright, B Bubner, D Ellis, MV Persans, EY Yu. 2003.** Chemical Form and Distribution of Selenium and Sulfur in The Selenium Hyperaccumulator *Astragalus bisulcatus*. *Plant Physiology* **131**, 1457-1460.
- Ranjard L, S Nazareth and B Cournoyer. 2003.** Freshwater Bacteria Can Methylate Selenium Through The Thiopurine Methyltransferase Pathway. *Applied Environment Microbiology* **69(7)**, 3784-3790.
- Rayman MP. 2000.** The Importance of Selenium to Human Health. *The Lancet* **356**, 233-241.
- Rozen S and HJ Skaletsky. 2000.** Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers. Pp. 365-386. In: S Krawetz and S Misener (Eds). *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press. Totowa.
- Whanger PD. 2002.** Selenocompounds in Plant and Animals and Their Biological Significance. *Journal of American Col Nutrition* **21**, 223-232.
- Whanger PD. 2004.** Selenium and Its Relationship to Cancer. *British Journal of Nutrition* **91**, 11-28.
- Wikipedia. 2009.** Polymerase Chain Reaction, http://en.wikipedia.org/wiki/Polymrase_Chain_Reaction. [15 Juli 2009]
- Zhang LH, SE Abdel-Ghany, JL Freeman, AR Ackley, M Schiavon, and EAH Pilon-Smits. 2006.** Investigation of Selenium Tolerance Mechanisms in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **128**, 212-223.