

**DE AGTC Állattudományi, Biotechnológiai és Természetvédelmi Intézet**

**Növényi Biotechnológiai Tanszék**

# **VÖRÖS ELEMI NANOSZELÉN ÉS A CUKOR EGYÜTTES HATÁSA DOHÁNY SZÖVETTENYÉSZET FOTOSZINTÉZIS RENDSZERÉRE**

**Kató Marianna**

**DE ÁOK Molekuláris biológus**

**Konzulens: Dr. Szabolcsy Éva**

**Tudományos segédmunkatárs**

**Debrecen**

**2012**

## TARTALOMJEGYZÉK

|                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. BEVEZETÉS .....                                                                                          | 3  |
| 2. TÉMAFELVETÉS.....                                                                                        | 4  |
| 3. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS.....                                                                             | 5  |
| 3.1. Fotoszintézis folyamata.....                                                                           | 5  |
| 3.2. A fotoszintézis folyamatainak tanulmányozásra alkalmazott legáltalánosabb technikák6                   |    |
| 3.2.1. Fotoszintetikus pigmenttartalom mérése spektrofotometriás módszerrel .....                           | 6  |
| 3.2.2. Fotoszintézis rendszer hatékonyságának mérése indirekt fluoreszcencia méréssel ..                    | 7  |
| 3.2.3. Kloroplsztisz szerkezetében történő változások vizsgálata cirkuláris spektroszkópia módszerével..... | 8  |
| 3.3. Pigmenttermelés és fotoszintézis folyamatok változása abiotikus stressz körülmények között.....        | 9  |
| 3.4. Szervetlen szelén formák hatása a pigmenttermelésre és a fotoszintézis folyamatára. 11                 |    |
| 3.5 Vörös elemi szelén nanopartikulumok hatása magasabbrendű növényekben .....                              | 11 |
| 3.6. In vitro táptalajok cukor koncentrációjának hatása szövettenyészetek fotoszintetikus aktivitására..... | 12 |
| 4. ANYAG ÉS MÓDSZER .....                                                                                   | 13 |
| 4.1 Dohány kultúra in vitro .....                                                                           | 13 |
| 4.2 Fotoszintetikus apparátus működésének vizsgálata .....                                                  | 14 |
| 4.2.1 Klorofill tartalom meghatározás spektrofotometriás módszerrel .....                                   | 14 |
| 4.2.2 Indirekt klorofill- fluoreszcencia mérések .....                                                      | 15 |
| 4.2.3 Cirkuláris Dikroizmus (CD) spektroszkópia .....                                                       | 16 |
| 4.2.4 Statisztikai analízis.....                                                                            | 16 |
| 5. EREDMÉNYEK .....                                                                                         | 17 |
| 5.1 In vitro dohány növények klorofill tartalma.....                                                        | 17 |
| 5.2 In vitro nevelt dohány növények fotoszintézis rendszerének hatékonysága .....                           | 20 |
| 5.2.1. OJIP tranziens.....                                                                                  | 20 |
| 5.2.2. Fv/Fm arány.....                                                                                     | 21 |
| 5.2.3. Fotoszintetikus performance index (PIabs) .....                                                      | 22 |
| 5.2.4. Elektron transzportlánc hatékonysága (PSIo) .....                                                    | 23 |
| 5.3 CD spektroszkópia .....                                                                                 | 24 |
| 6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK .....                                                                      | 28 |
| 7. ÖSSZEFOGLALÁS.....                                                                                       | 30 |
| 8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....                                                                                | 32 |

## 1. BEVEZETÉS

A fotoszintézis a növények egyik legfontosabb élettani folyamata. A fotoszintetikus apparátus működése, a fotoszintetikus aktivitás mértéke, a fotoszintetikus pigmentek mennyisége és egymáshoz viszonyított aránya együttesen utal a növény általános „egészségi állapotára”, vitalitására.

A növényi szövettenyésztés a hagyományos szaporítási eljárások mellett, gazdaságilag is nagy jelentőséggel bíró speciális technika. A szaporítás mellett az *in vitro* kultúrák lehetőséget biztosítanak többek között a növények élettani, biokémiai folyamatainak nyomon követésére, steril, kontrollált körülmények között. Az *in vitro* tenyészetekben lehetőség nyílik bizonyos anyagok növényekre gyakorolt hatásának részletes vizsgálatára is reprodukálható módon. Az abiotikus és/vagy biotikus faktorok élettani hatásai hasonlóan az *in vivo* vizsgálatokhoz, elsősorban a fotoszintetikus folyamatokban bekövetkező változásokban manifesztálódnak.

Az *in vitro* tenyészetek fotoszintézis folyamatokat vizsgálva az egyik legnagyobb különbség abban látható a szabadföldi vagy üvegházi körülmények között fejlődő növényekhez képest, hogy a növénytenyészetek a szénhidrát jó részét készen veszik fel a táptalajból cukor formájában (kivéve a fotoautotróf tenyészetek). A magas cukor tartalom pedig gátlás alatt tarthatja a fotoszintetikus folyamatokat, bár a pigmenttermelés zavartalanul működik és a növény teljesen zöld.

A szelén az utóbbi években, évtizedekben nagy érdeklődésre tart számon, mivel bebizonyították esszenciális voltát emberekben és magasabb rendű állatokban. A szelén hatását magasabb rendű növényekben is intenzíven kutatták/ják. Az eddigi eredmények arra utalnak, hogy a növényekben a szelénnek nincs létfontosságú szerepe, bár egyes fajoknál előnyt jelenthet a magasabb szelénakkumuláló képesség. Intakt növényekben ismertté vált a szelenát, szelenit (a természetben leggyakrabban előforduló szervesetlen szelénformák) felvétele, szállítása, metabolizmusa, élettani és biokémiai folyamatokat befolyásoló hatása. *In vitro* körülmények között növényi tenyészetekben azonban kevésbé kutatott a különböző szervesetlen szelénformák élettani, biokémiai hatása.

## 2. TÉMAFELVETÉS

Növényi szövettényészetekben a különböző szervetlen szelén formák hatása csak kevésbé kutatott. Az ismert, hogy szelén akkumuláló *Astragalus* kallusztényészetek a szelenátot és a szelenitet is jobban tolerálják, mint a nem-szelénakkumuláló tenyészetek. A legfrissebb kutatások arról számolnak be, hogy a vörös elemi szelén sokkal inkább tolerálható szelénforma, mint a szelenát nem-szelénakkumuláló dohány szövettényészetben. Az eddigi vizsgálatok azonban csak a vörös elemi nanoszelén felvételére, felhalmozódására és szervképződésre gyakorolt hatására terjedtek ki, az élettani folyamatokra vonatkozólag nincsenek információink.

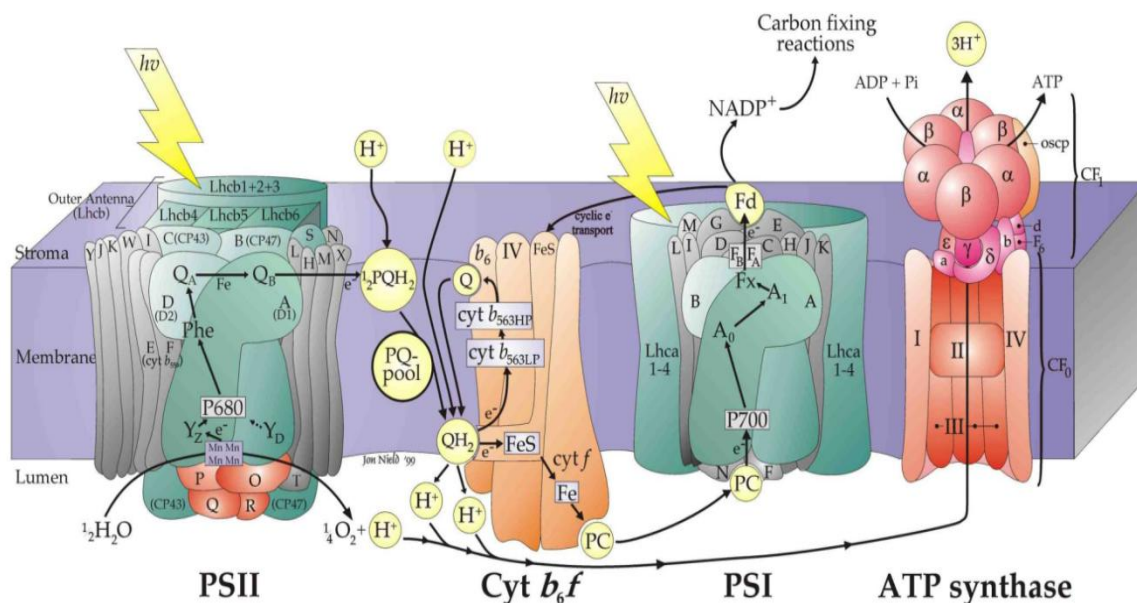
Ezen ismeretekre alapozva jelen munkában célul tűztük részletesebben tanulmányozni a vörös elemi nanoszelén hatásának vizsgálatát dohány (*Nicotiana tabacum*) fotoszintézis rendszerének működésére szelenáttal összehasonlítva *in vitro*. A szelénformák mellett a táptalaj szacharóz koncentrációját is változtattuk, mivel szakirodalmi hivatkozások szerint a 2% szacharóz, ami általánosan alkalmazott dohány tenyészet esetében, befolyásolhatja a fotoszintetikus aktivitást. Vizsgálatainkban arra voltunk kíváncsiak, hogy a két szelénforma befolyásolja-e a dohány modell pigment tartalmát, a fotoszintetikus aktivitást és a kloroplaszt ultrastruktúrájának rendeződését.

### 3. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

#### 3.1. Fotoszintézis folyamata

A fotoszintézis komplex folyamataiban a fény és sötétszakasz mind idő, mind térbeli kompartmentációval jellemezhető, ami a kloroplasztiszok szerkezetében is megnyilvánul. A kloroplasztiszok alapállományában történik a CO<sub>2</sub> megkötése, míg a tilakoidmembránban az elsődleges fizikai folyamatok - a fényenergia összegyűjtése és redukáló erővé történő átalakítása megy végbe. Ezeknek a folyamatoknak két egymástól eltérő fotoszisztéma a színtere. A második fotokémiai rendszer (PSII) és a fénybegyűjtő klorofill-fehérje komplex (LHCP) zömében a gránumokban, míg az első fotokémiai rendszer (PSI) a sztrómatilakoidokban található, a két rendszert speciális elektrontranszportlánc köti össze. A két fotorendszer közötti elektronáramlás mellett protonvándorlás is megvalósul a membrán két oldala között és az így létrejött pH-, töltés, és potenciálkülönbség ATP szintézisre használódhat fel. A fényenergia begyűjtését végző klorofill-protein komplexek (klorofill- karotinoid komplexek) több fajtáját sikerült kimutatni (CCI, CCII, LHCPI, LHCPII), amelyek maguk is több komplex összekapcsolódása révén jöhetnek létre **(1. ábra)**. Ezek egy része a reakciócentrumok felépítésében játszik szerepet, míg más részük a reakciócentrumok belső és külső antennarendszerét alkotja (Nelson et al., 2004). A fény abszorpciója során a fotoszintetikus pigmentek alapállapotból gerjesztett állapotba kerülnek, energia tartalmuk éppen annyival növekszik, mint amennyi az elnyelt foton energiatartalma. Ez a megemelt energiatartalmú, excitált állapotú molekula egyik elektronja magasabb energiaszintű pályán helyezkedik el, ahová az elnyelt fénykvantum "emelte". A fotoszintézis során a klorofill molekulák fotokémiai reakciójának a lényege, hogy a gerjesztett klorofill molekula egy lazítópályára juttatott elektront átad egy - a közvetlenül a környezetében lévő - elektronakceptoroknak. A klorofill oxidálódik és egy, a környezetében lévő donortól vesz fel egy elektront. Bár a fotoszintézis során csak két klorofill *a* forma vesz részt a töltésszeparációval járó folyamatban - a P680 és a P700 - speciális energiatranszferekkel más molekulaformák - antennapigmentek - által abszorbeált energia is hasznosul. Ez az energiatranszfer csaknem két nagyságrenddel növeli meg fotokémiai reakciók gyakoriságát a reakciócentrumokban (Krause és Weiss 1991). A gerjesztési energia azonban nem minden esetben hasznosul fotokémiai reakcióban. Ezt a gerjesztési energia és a reakciócentrumok redoxállapota határozza meg elsősorban. A gerjesztett molekulák dezaktivációjának módja némileg eltérő az antenna, ill. reakciócentrum pigmentek esetén. Az antennapigmentekben nincs lehetőség fotokémiai hasznosulásra, míg a reakciócentrumokból áttevődhet más pigmentekre. A gerjesztési energia egy része hő, fluoreszcencia, késleltetett fluoreszcencia, belső konverzió, ritkábban foszforeszcencia révén disszipálódhat (Krause -Weiss 1991; Damjanovich et al., 2006)

**1. ábra: Fotoszintetikus pigment rendszer felépítése sematikusan ábrázolva (Strasser et al., 2004 munkája alapján)**



**3.2. A fotoszintézis folyamatainak tanulmányozásra alkalmazott legáltalánosabb technikák**

A fotoszintézis folyamatainak vizsgálatára léteznek invazív és nem-invazív technikák, melyek lehetőséget biztosítanak külön-külön vagy együttesen tanulmányozni az egyes makrodomének szerkezetét, működését.

**3.2.1. Fotoszintetikus pigmenttartalom mérése spektrofotometriás módszerrel**

A magasabb rendű növényekben a klorofill fontos szerepet játszik a napenergia elnyelésében. A pigmentek koncentrációjának mérése lényeges tényező a fotoszintetikus jellemzők meghatározásában. Normális körülmények között a klorofill *a* és *b* mennyisége 3:1 viszonyított arányban fordul elő. Napjainkban használt leggyakoribb módszer szerves oldószeres kivonáson alapul, ami például acetonnal, metanollal és N,N-dimetilformamiddal történhet. Az extrakciót követően a klorofill tartalom spektrofotométerrel határozható meg (Porra et al., 1989). Az *in vitro* meghatározás egyszerű és pontos, hátránya azonban, hogy munka és időigényes (Manetas et al., 1998). Ismertek ma már *in vivo* vizsgálatok is a levél klorofill-tartalmának meghatározására. Ezek a

módszerek a levelek optikai tulajdonságait használják ki és a klorofill sugárzás-visszaverődésén és/vagy elnyelésén alapulnak (Maráczai et al., 2011).

### **3.2.2. Fotoszintézis rendszer hatékonyságának mérése indirekt fluoreszcencia méréssel**

A növények klorofill *a* és *b* koncentrációja utal a klorofill bioszintézis és degradáció mértékére, melyek érzékenyen reagálnak a növényt ért stressz hatásokra. Önmagában azonban a klorofill tartalom nem mutatja meg a növény fotoszintézis rendszerének hatékonyságát. A fotoszintetikus aktivitás mérésére az egyik leggyakrabban alkalmazott technika a klorofill *a* fluoreszcencia mérés. A fotoszintézis működése ugyanis jól jellemezhető a besugárzott fényből, a növény által kibocsátott fluoreszcencia ismeretében (Papageorgiou and Govindjee et al., 2004). A klorofill *a* fluoreszcencia elsődlegesen a II. fotokémiai rendszerből (PSII) származik. Az I. fotokémiai rendszer (PSI) alacsony fluoreszcens jelet bocsát ki. Azonban elmondható, hogy a PSII kinetikáját befolyásolja a teljes fotoszintetikus elektronszállító rendszer is. Sötét adaptált növényekben a hirtelen erős fénnnyel való megvilágítás hatására a PSII reakciócentrumok telítődnek, így bezáródnak. A feleslegben maradt energia részben fluoreszcencia formájában disszipálódik (Kautsky et al., 1960). Fluorométerrel rögzített jelekből OJIP tranziens görbe vehető fel, mely a gyors klorofill *a* fluoreszcencia emelkedést reprezentálja, ahol az „O” =  $F_0$  minimális fluoreszcenciát jelenti, ekkor az összes QA oxidálódik. A „P” =  $F_m$  a maximális fluoreszcencia értéket mutatja, ez esetben az összes QA redukált állapotba kerül. A köztes lépések J és I szakasz 2ms-30 ms alatt zajlik le (Bussotti et al., 2004).

Az OJIP görbéből származtatható az  $F_v/F_m$  arány, a leggyakrabban használt képlet a fotoszintetikus rendszer hatékonyságának számszerűsítésére: ahol

$F_0$ : sötétadaptált növény alap fluoreszcenciája

$F_m$ : sötétadaptált növény maximális fluoreszcenciája

$F_v$ : fluoreszcencia változás ( $F_m - F_0$ )

$$F_v/F_m = (F_m - F_0)/F_m$$

Az  $F_v/F_m$  arány konkrétan az elnyelt fényenergia kvantumhatásfok hasznosításának maximális értékét méri a PSII reakciócentrumokban. Normálisan működő fotoszintetikus rendszer normál értéke 0,8 körül van. Ha az  $F_0$  értéket növeljük és az  $F_m$  csökken akkor nem megfelelő a sötétadaptáció, ami növényfajonként változó pl: mutáns, fény-árnyék kedvelő fajok estében eltérő lehet az adaptáció mértéke.

Az OJIP görbéből származtatható paraméter a fotoszintetikus index (PSIo) is, amely az plasztokinon A-t (Q<sub>A</sub>) követő elektron transzportlánc hatékonyságára mutat rá. Ha a növényt érő stresszhatás nem közvetlenül a PSII-t érinti, akkor az Fv/Fm arány nem jelez csökkenést, viszont a PSIo szolgálhat informatív eredményekkel.

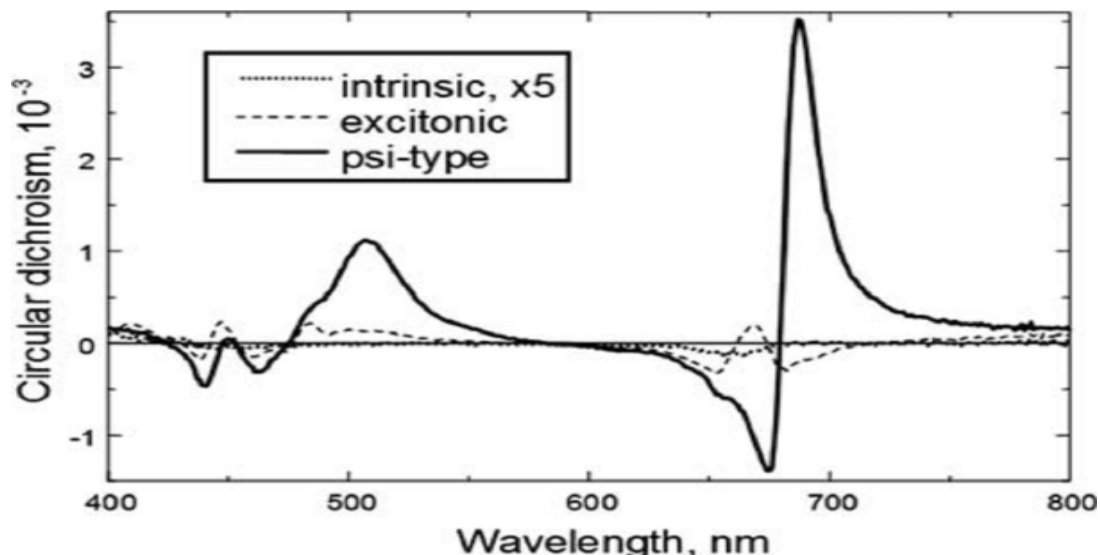
Szintén a klorofill fluoreszcencia mérésekből származtatott integratív paraméter a performance index (PIabs), mely három független paramétert integrál: az aktív reakciócentrumok sűrűségét, a Q<sub>A</sub> mögötti elektrontranszport hatékonyságát és a reakció centrumok által abszorbeált fotonok csapdába esésének valószínűségét (Lepedus et al., 2012). A PI abs alapján visszajelzést kaphatunk mind a PSI és a PSII fotokémiai rendszerekről, egyúttal számszerű információt nyújt a növény aktuális teljesítőképességéről is.

### ***3.2.3. Kloroplasztisz szerkezetében történő változások vizsgálata cirkuláris spektroszkópia módszerével***

A fotoszintézis során a fényenergia megkötésének hatékonysága nagyban függ a kloroplasztiszokat alkotó fotoszintetikus membránok molekuláris szerveződésétől. Ennek vizsgálatára napjainkban elterjedőben van a cirkuláris spektroszkópia (CD) módszere. Előnye, hogy nem invazív technika, ugyanakkor igen eredményes a királisan rendeződött komplex biológiai rendszerek szerkezeti sajátságainak tanulmányozásában, és a pigment kölcsönhatások kimutatásában (Van Amergon et al., 2000). Azokat a molekulákat, amelyeknél nem létezik az a sík, amire tükrözve önmagába menne át, királis molekuláknak nevezzük. Ez az optikai módszer lehetőséget biztosít arra, hogy a különböző szerveződési szinten lévő pigmentek, pigment-protein komplexek, makrodomének teljes membránok és membrán rendszerek molekuláris szerveződéséről mélyrehatóbb tudáshoz jussunk (Garab - Amerongen, 2009). Hierarchikusan szervezett rendszerekben a CD jelek különböző molekuláris szerkezetekből származnak. A molekulák kiralitásából és belső aszimmetriájából eredően a szabad klorofill molekulák esetén gyenge, úgynevezett intrinzikus CD jelek figyelhetők meg **(2. ábra)**. Két vagy több pigmentmolekula kölcsönhatása esetén (pl. izolált pigmentprotein komplexekben) exciton CD jelek figyelhetők meg, melyekre jellemző a 3 szabályos, konzervatív sávszerkezet.

A speciális CD jelek, nagyméretű, királisan rendezett makroaggregátumok esetében láthatóak, melyek igen nagy intenzitással és nem-konzervatív sávszerkezettel jellemezhetők, és ezekkel differenciális fényszórással is társulhat. Ezeket polimer és só-indukált (psi) típusú CD jeleknek nevezzük. Hierarchikusan szervezett rendszerekben a CD jelek különböző molekuláris szerkezetekből származnak **(2. ábra)**.

Kimutatták, hogy a makrodoménekben hő- és fénykezelés hatására nagymértékű szerkezeti átrendeződések történnek, melyet a psi-típusú CD sáv intenzitása jelez, míg a rövid távú kölcsönhatásokra jellemző exciton CD jelek sokkal stabilabbnak bizonyultak. Ismert továbbá, hogy a közeg ozmotikus nyomása és a kétértékű kationok jelenléte meghatározó jelentőségűek a makrodomének szerveződésében (Szabó et al., 2011).



**2. ábra: Tilakoid pigmentek különböző szerveződési szintjéről készült spektrumok cirkuláris dikroizmus technika segítségével (Garab és Amerongen 2009 munkája alapján)**

### **3.3. Pigmenttermelés és fotoszintézis folyamatok változása abiotikus stressz körülmények között**

A növények fejlődését, alkalmazkodó képességét, termőképességét különböző biotikus és abiotikus stressz tényezők befolyásolják. Az abiotikus stressztényezők közül a magas UV B sugárzás, vízhiány, hideg-meleg hőmérséklet mellett egyre fokozódó problémát jelent az antropogén hatások következménye, a toxikus nehézfémek felhalmozódása a talajban. (Harrach et al., 2009; Thapar et al., 2008; Endres et al., 2010). A növények pigment termelése és a fotoszintézis működése érzékenyen reagál ezekre az abiotikus stressz hatásokra. A fotoszintetikus apparátust vizsgálva, általánosan elmondható, hogy a különböző abiotikus stressz tényezők gátolják a klorofill bioszintézisét, illetve a fokozzák a klorofill degradációt (Hamid et al., 2010; Jaleel et al., 2009). Ugyanakkor a fotoszintézis sötét- és fényszakaszában végbemenő reakciókat is gátolhatják az abiotikus stressz faktorok, mivel kölcsönhatásba lépnek az elektron transzportlánc komponenseivel és befolyásolják a Calvin-ciklus enzimeinek szerkezetét, funkcióját, emellett károsítják a kloroplasztisz membrán struktúráját. A toxikus fém gátló hatása érvényesülhet közvetlenül, de

közvetett mechanizmus által is, mint az oxidatív stressz körülményei között létrejött változások (Hegedűs *et al.*, 2007).

Fémek/nehézfémek, mint a Fe hiány és Cd stressz nemcsak a fotoszintetikus pigment csökkenését, hanem levélnövekedést gátló, és klorózt kiváltó hatásokat is eredményeztek *in vitro* körülmények között nevelt *Populus glauca* esetén. Az eredményekből az is kiderült, hogy a klorofill *a* és *b* pigmentek csökkenését a fémstresszek nem egyforma arányban befolyásolták (Gaspar *et al.*, 2008). Hidroponikus körülmények között nevelt kukorica és napraforgó csíra növények esetében az 1 ppm Cd kezelés mintegy 20% csökkenést eredményezett a kontrollhoz képest a relatív klorofill tartalmat vizsgálva a hatodik napon. Ez a csökkenés 30-40%-os volt a magasabb kadmium koncentrációnál. Biotrágya és kadmium együttes alkalmazása során azonban mérséklődött a klorofill csökkenés (Gajdos *et al.*, 2009).

A kadmium kezelés hatására bekövetkező klorofill tartalom csökkenését támasztotta alá Stobart *et al.*, (1985) eredményei is. A kadmium a CO<sub>2</sub> fixációban résztvevő enzimek aktivitását is csökkentette árpában.

Ciegler *et al.*, (2010) titánnal kezelt spenót növények esetében is kimutatták a fotoszintézis rendszerre gyakorolt gátló hatást. Hidroponikus rendszerben nevelt Fe-hiányos spenót növények esetében a titán jelentősen csökkentette a fotoszintetikus aktivitási paramétereket, amit klorofill fluoreszcencia mérésekkel követtek nyomon. A táptalajhoz adott vas kiegészítés hatására nőtt a növények fotoszintetikus aktivitása s egyúttal csökkent a gyökér és hajtás titán koncentrációja egyaránt. Az eredményekből arra következtettek, hogy a titán befolyásolja a az I és II fotokémiai rendszert és a vas tartalmú elektron transzportlánc elemeit illetve azok szerkezetét.

UV-B sugárzásnak és szárazság stresszhatásnak együttesen kitett kocsánytalan tölgy csíranövény levelének érzékenységét is jól nyomon lehetett követni a fotoszintetikus aktivitás vizsgálatokkal. Az UV-B sugárzás hatására ugyanis csökkent a fotokémiai hatékonyság ( $F_v/F_m$ ) és a PSII aktuális fotokémiai hatékonysága ( $\Delta F/F_m'$ ) is. UV-B és szárazság stressz komplex megjelenésekor fokozottan csökkent a  $F_v/F_m$  és  $\Delta F/F_m'$  (Szöllősi *et al.*, 2008).

A magas sótartalom, mint abiotikus stressz faktor hatását a fotoszintézis működésére szintén bizonyították. *In vitro* körülmények között 28 napig nevelt vad illetve nemesített árpa növényeket, 14 napon keresztül nátrium-kloriddal kezelték kálium tartalmú tápközegben illetve annak hiányában, különböző kombinációban. Az eredmények azt mutatták, hogy a megnövekedett só tartalom negatívan befolyásolta a fotoszintetikus folyamatokat, ami a PSII kvantum határfok hozamának csökkenésben volt mérhető (Degl'Innocenti *et al.*, 2009).

### **3.4. Szervetlen szelén formák hatása a pigmenttermelésre és a fotoszintézis folyamatára**

A szelenát alacsony koncentrációban ( $2\ \mu\text{M}$ ) segítette az olajrepce csíranövények kloroplasztiszainak normális fejlődését és működését a benne zajló asszimilációs folyamatokkal együtt, valamint képes volt kompenzálni (legalábbis részben) a kadmium okozta stresszhatást intakt növényekben Filek et al., (2010). Hidropónikus kultúrában nevelt brokkoli növények esetében Pedrero et al., (2008) is azt tapasztalta, hogy a szelenát csökkentette a kadmium klorofill szintézist gátló hatását. Ezzel szemben Fargarsova – Molnarova (2009) *Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum* és *Sinapis alba* csíranövényeknél szelenát ( $7,1 - 35,5\ \text{mg L}^{-1}$ ) a klorofill szintézisre gyakorolt gátló hatását mutatták ki, különösen klorofill *b* tartalom mérésekor.

### **3.5 Vörös elemi szelén nanopartikulumok hatása magasabbrendű növényekben**

Az utóbbi időkben a vörös elemi nanoszelén (nanoSe) az érdeklődés homlokterébe került, mivel a végzett állatkísérletekben kedvezőbb hatásúnak bizonyult. Egerekben a nanoSe akut toxicitása alacsonyabb volt, mint a szelenité. Ugyanakkor a nanoSe hozzáférhetősége hasonló volt a szelenittel összehasonlítva *in vitro* kultúrában és Se-hiányos patkányokban (Zhang et al., 2001).

Növényekben azonban kevés információ áll rendelkezésünkre a nanoSe-t illetően. Dohány szövettenyészetben végzett kísérletek alapján úgy tűnik, hogy a vörös elemi nanoszelén partikulumok képesek bejutni a kalluszbá, és ott túlnyomó részben változatlan formában felhalmozódni (Domokos-Szabolcsy et al., 2012). Regenerálódó növényekben főként a gyökérrészben akkumulálódik. Ezzel szemben a regenerálódó növény hajtásrészben a szelenát fokozott felhalmozódása volt jellemző. A kalluszon át indirekt organogenezissel képződő mikrohajtások fejlődését a táptalajban lévő nagy mennyiségű nanoSe ( $50-100\ \text{mg/l}$ ) serkentette. A képződő mikrohajtások jellemzően szabályos formájúak voltak normál szöveti szerkezettel, vitrifikáció megjelenése nélkül. Ellenben kontroll táptalajon az újonnan fejlődő mikrohajtások jó része abnormális alakú volt, vizenyős áttetsző szöveti szerkezetük vitrifikációra utalt. A nanoSe-nel ellentétben  $50-100\ \text{mg/l}$  szelenát már meggátolta a kalluszképződést. Az átoltott hajtástenyészetekre is jellemző volt ez a tendencia:  $\geq 50\ \text{mg/l}$  szelenát teljesen megakadályozta a gyökérképződést, a hajtások egy ideig vegetáltak, majd elpusztultak. Ezzel szemben a magas nanoSe tartalom ( $50-$

100 mg/l) kifejezetten segítette a gyökérképződés megindulását és a biomasszaprodukciót is (Domokos-Szabolcsy, 2011).

### **3.6. *In vitro* táptalajok cukor koncentrációjának hatása szövettenyészetek fotoszintetikus aktivitására**

*In vitro* kultúrában nevelt növény tenyészetek esetében a fotoszintetikus aktivitás gyakran alacsony szinten működik, aminek hátterében a gyengén fejlett fotoszintetikus apparátus, a nem kielégítő gázcsere és a zárósejtek deformációja állhat (Capellades et al., 1991; Zenkteler – Borkowska, 2000). Emellett a táptalaj cukor tartalma is jelentősen befolyásolhatja a növények fotoszintézis folyamatait. Rybczynski et al. (2007) kísérleteiben 0,2-0,4 % között alkalmazott exogén cukor koncentráció előnyösnek bizonyult a szomatikus embrió eredetű *Gentiana* növények fotoszintetikus rendszerének fejlődésére. Ezzel szemben 3% cukor koncentráció mellett már csökkentette a fotoszintetikus aktivitást. A fotoszintetikus aktivitás csökkenését tapasztalták Fuentes et al., (2005) is *in vitro* kókuszdió tenyészettel végzett kísérleteikben 90 g/l cukor koncentráció mellett. Ugyanakkor az alacsonyabb koncentrációban alkalmazott cukor (22,5 g/l) kis mértékben szintén csökkentette a fotoszintézis folyamatainak hatékonyságát, viszont növelte az *ex vitro* átrakott növények túlélési arányát a kontrollhoz képest.

Ezeknek az eredményeknek némileg ellent mond Kadlecek et al., (2003) dohányval végzett kísérletei. *In vitro* körülmények között nevelt dohány (*Nicotiana tabacum*) növényekben hozzáadott cukor nélkül, azaz fotoautotróf körülmények között erős sugárzás mellett fotoinhibíciós mechanizmusok indultak be. Ami abban nyilvánult meg, hogy csökkent a Chl *a+b*, Chl *a/b* arány, A PSII hatékonysága, és emellett fokozódott a nem fotokémiai kioltás (NPQ). Ezzel szemben a táptalaj 3% cukorral történő kiegészítése stimulálta az aszkorbát glutation ciklus enzimeit, kivéve az aszkorbát peroxidázt. A szacharóz koncentráció további emelésével, 5% cukor esetében, a fotoszintetikus aktivitás csökkent, de nem volt jelentős változás az aszkorbát glutation enzimeinek szintjében. Ezek az eredmények arra engedtek következtetni, hogy a hozzáadott cukor fokozza az oxidatív károsodások elleni védelmet, a kulcs az exogén szacharóz koncentrációjában rejlik.

## 4. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 4.1 Dohány kultúra in vitro

Szilárd, MS (*Murashige-Skoog, 1962*) táptalajon neveltünk dohány (*Nicotiana tabacum*) donor növényeket. A táptalaj készítésekor alkalmazott cukor és szelénformák koncentrációinak kombinációit az **1. táblázat** foglalja. A kalluszon át képződő organogenezishez, illetve az abból származó növények gyökeresítéséhez szükséges táptalajok egyéb összetevőit a **2. táblázat** mutatja be.

#### 1. táblázat: Táptalajok sorrendje hozzáadott szacharóz és szelenát/vörös elemi nanoszelén alapján

| Táptalaj | Szacharóz | Szelenát/Vörös elemi nanoszelén |
|----------|-----------|---------------------------------|
| 1.       | 0,2 %     | 0 $\mu\text{M}$                 |
| 2.       | 0,2 %     | 53 $\mu\text{M}$ szelenát       |
| 3.       | 0,2 %     | 532 $\mu\text{M}$ nanoszelén    |
| 4.       | 2 %       | 0 $\mu\text{M}$                 |
| 5.       | 2 %       | 53 $\mu\text{M}$ szelenát       |
| 6.       | 2 %       | 532 $\mu\text{M}$ nanoszelén    |

Az indirekt organogenezist dohány levélszegmensekből indukáltuk (Domokos-Szabolcsy et al., 2012) munkája alapján. A kalluszok felszínén képződött új mikrohajtásokat levágtuk steril és szilárd hormonmentes MS regeneráló táptalajra tettük át 100 ml-es műanyag kupakos tenyésztőedényekbe. A növénynevelést 10/14 órás fotoperiódusú, állandó hőmérsékleten, 23 C<sup>o</sup>-on tenyésztőszobában végeztük 41  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  foton flux megvilágítás mellett.

## 2. táblázat: Szövettenyésztéshez használt táptalajok összetétele

| Táptalaj indirekt organogenezishez | Táptalaj növényregeneráláshoz    | Táptalaj növényregeneráláshoz     |
|------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| 4,4 g L <sup>-1</sup> MS komplex   | 4,4g/l MS komplex                | 4,4g/l MS komplex                 |
| 2 % Szacharóz                      | 0,2 % Szacharóz                  | 2% Szacharóz                      |
| 6,0 g L <sup>-1</sup> Plant agar   | 6,0 g L <sup>-1</sup> Plant agar | 6,0 mg L <sup>-1</sup> Plant agar |
| 2 mg L <sup>-1</sup> Zeatin        |                                  |                                   |
| 0,01 mg L <sup>-1</sup> NAA        |                                  |                                   |
| pH 5,75                            | pH 5,75                          | pH 5,75                           |

Az alkalmazott szelénformák és koncentrációk:

- 100 mg L<sup>-1</sup> nátrium-szelenát (Sigma-Aldrich) törzsoldatból 10 mg L<sup>-1</sup> koncentrációjú oldatot hígítottunk.
- 100 mg L<sup>-1</sup> vörös elemi nanoszelén (nanoSe). A nanoszelén szuszpenziót Dr. Prokisch József biztosította kísérleteinkhez, a Bio-és környezetenergetikai Intézetben (*Prokisch - Zommara, 2008; Prokisch et al., 2008*)

### 4.2 Fotoszintetikus apparátus működésének vizsgálata

#### 4.2.1 Klorofill tartalom meghatározás spektrofotometriás módszerrel

A klorofill tartalom meghatározását Porra et al., (1989) módszere szerint végeztük némi módosítással. A minta-előkészítés során 10 mm átmérőjű korongokat vágunk ki a dohánylevelekből. A levélkorongokat 1ml N’N dimethyl-formamid oldatba (Sigma-Aldrich) raktuk egy éjszakára. Az összegyűjtött felülúszót használtuk fel a spektrofotometriás mérésekhez. Klorofill *a* esetében 664, míg klorofill *b* esetében 645 nm-en mértük meg az abszorbanciát (Amersham Biosciences Ultrospec 2100 Pro UV/Visible). A megfelelő képletbe behelyettesítve kiszámoltuk a klorofill *a* és *b* értékeket, a klorofill *a + b* és a klorofill *a/b* arányt.

#### 4.2.2 Indirekt klorofill- fluoreszcencia mérések

Ezen mérések a fényenergia fotoszintetikus hasznosulásáról nyújtanak pontosabb információt, így a növényeket érő környezeti stresszhatások mértékének kimutatására alkalmas.

A vizsgálatokhoz a növényeket előzetesen 15 percig sötétben inkubáltuk. A méréseket a HandyPEA (Plant Efficiency Analyser Hansatech Instruments Ltd, Norfolk, UK) fotoszintetikus hatékonyságmérő készülék segítségével végeztük. A sötétadaptált leveleket folyamatos 650 nm hullámhosszúságú vörös fénnel világítottuk meg 1 másodpercig, amely  $3000 \mu\text{mol foton m}^2 \text{s}^{-1}$  intenzitású volt. A fényforrást három LED biztosította, melynek fénye egy 5 mm átmérőjű körben fókuszálódott.

A mért értékeket logaritmikus időskálán, úgynevezett OJIP görbén ábrázoltuk, ahol az O-J szakasz (0-3 ms) a fotokémiai fázist jelenti, ami igen erősen függ a fény intenzitástól, a J-I fázisban (3-30 ms) PQ redukciója megy végbe, az I-P szakasz pedig (30-300 ms) a PSI elektrontranszport folyamataitól függ.

Az OJIP görbe alapján az  $F_v/F_m$  arányt és a fotoszintetikus indexet  $PSI_o$ , mint származtatott értékeket határoztuk meg a fotoszintetikus rendszer hatékonyságának számszerűsítésére. A fotoszintetikus performance index  $PI(ABS)$  egy integratív paraméter, mely a növények életképességét lehet jellemezni vele, ahogy a 3.2 fejezetben le van írva. Kiszámítása az alábbi képlettel történik.

$$PI_{ABS} = \frac{1 - (F_0 / F_M)}{M_0 / V_J} \cdot \frac{F_M - F_0}{F_0} \cdot \frac{1 - V_J}{V_J}$$

- $F_0$ : alap fluoreszcencia intenzitás érték 50  $\mu\text{s}$ -nál
- $F_m$ : maximális fluoreszcencia intenzitás
- $F_J$ : fluoreszcencia intenzitás 2 ms-nél
- $V_J$ : változó relatív fluoreszcencia 2 ms-nél, ami az alábbi képlettel adható meg  
 $V_J = (F_J - F_0)/(F_M - F_0)$
- $M_0$ : kezdeti Fluoreszcencia kinetika:  $M_0 = 4 \cdot (F_{300 \mu\text{s}} - F_0)/(F_M - F_0)$

#### **4.2.3 Cirkuláris Dikroizmus (CD) spektroszkópia**

A CD spektrumokat Jasco J-815 dikrográffal mértük 400-750 nm-es hullámhossz tartományban, szobahőmérsékleten. A CD spektroszkópia egy nem invazív módszer, ahol 1 cm átmérőjű ép levél szegmenseket a mérőműszerbe helyezve, a kloroplasztiszok ultrastruktúrájában történő változásokat mutatja ki. A fényindukált változások méréséhez a készülékbe épített oldal-megvilágítást alkalmaztuk. A CD spektrumokat abszorpció egységekben kaptuk meg.

Az Indirekt klorofill- fluoreszcencia és CD spektroszkópiás méréseket a Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Növény Biológiai Intézetében a Fotoszintetikus Membráncsoport kutatólaboratóriumaiban végeztük, Prof. Garab Győző engedélyével és Dr. Zsíros Ottó közreműködésével.

#### **4.2.4. Statisztikai analízis**

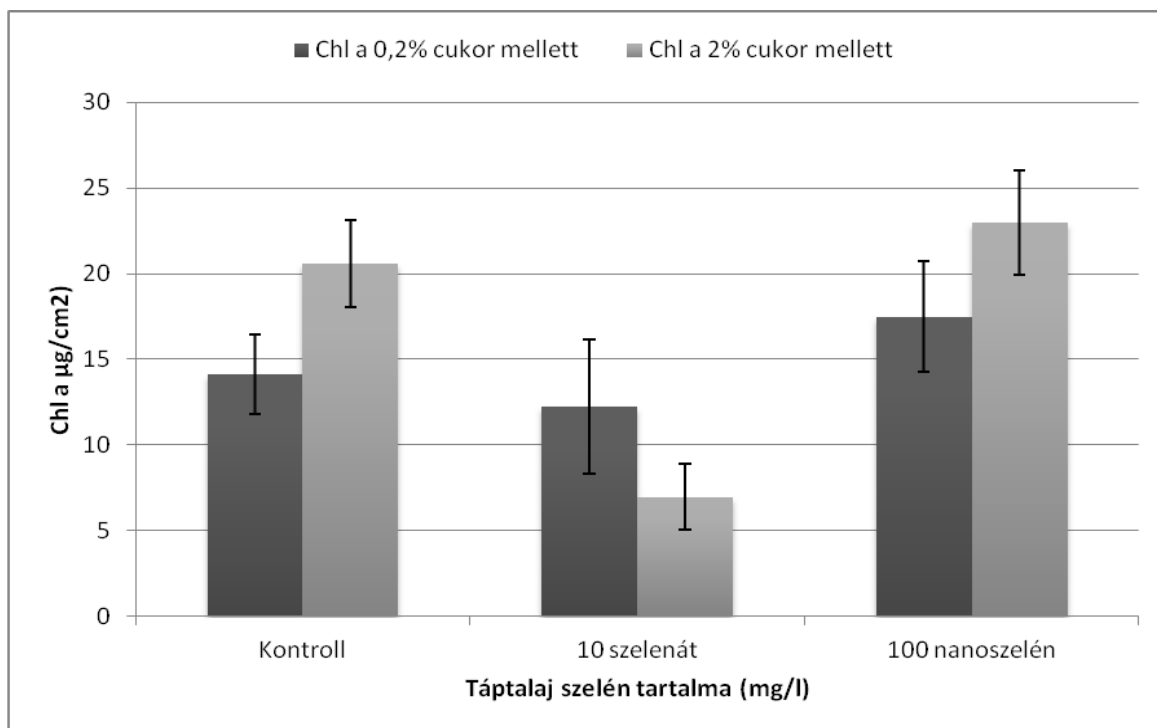
Vizsgálataim során az egyes méréseket legalább három-három ismétlésben végeztem el, ebből számoltam átlagot és a hozzá tartozó standard hibaszórást ( $\pm$  SE) Microsoft Excel 2007 programban végeztem.

## 5. EREDMÉNYEK

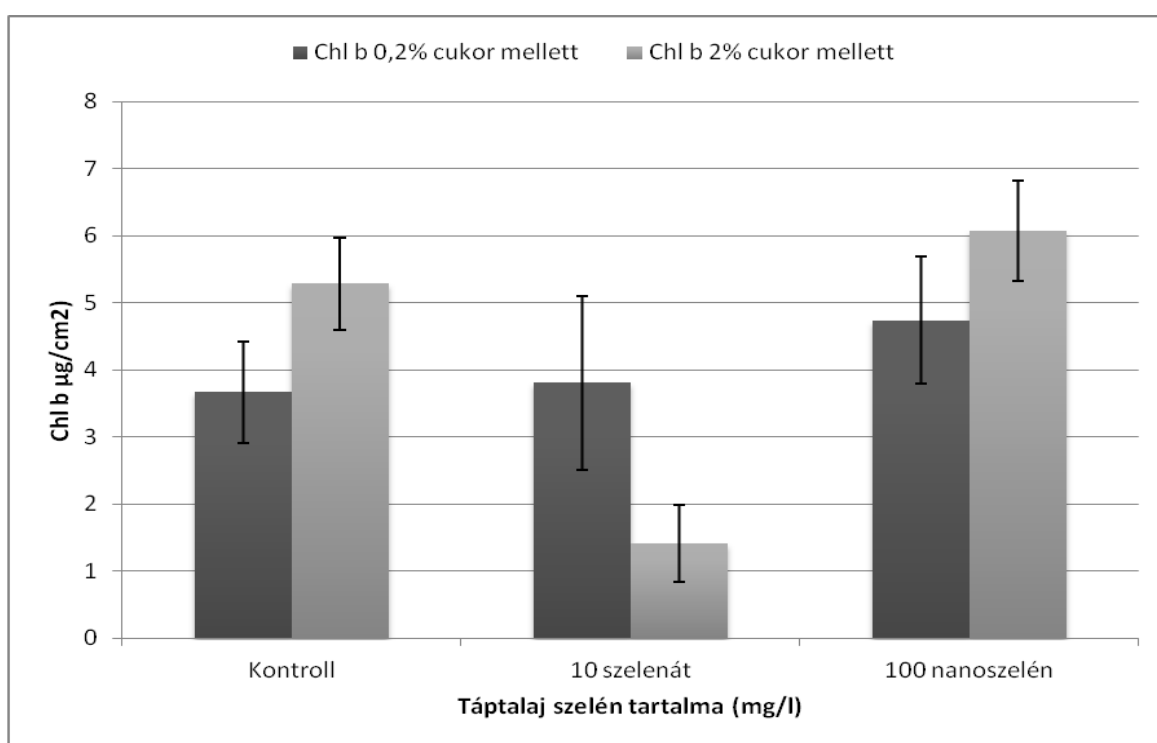
### 5.1 *In vitro* dohány növények klorofill tartalma

A fotoszintetikus apparátus pigmentjeinek szintéziséért és lebomlásáért számos környezeti tényező lehet felelős, amelyek kihatnak a növények energia begyűjtő és hasznosító rendszerére. A klorofill *a* és *b* pigmentek a növényi kloroplasztisz tilakoid membránjában helyezkednek el, ahol az őket érő fénysugarak energiáját nyelik el. Az összegyűjtött energiát elvezetik a fotokémiai reakcióközpontokhoz, ahol egy része átalakul hasznosítható energiává. Vizsgálataink során arra próbáltunk választ kapni, hogy a szelenát illetve a vörös elemi nanoszelen befolyásolja-e a dohánynövények klorofill tartalmát.

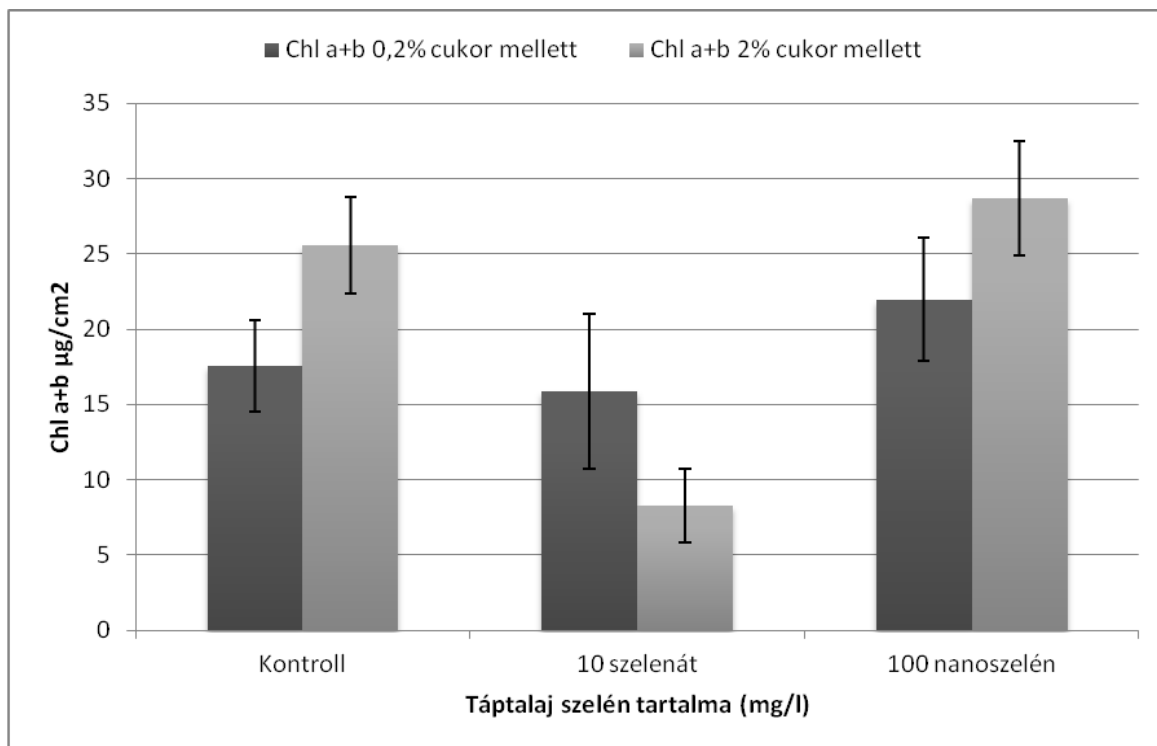
A 0,2% szacharóz tartalmú táptalajon fejlődő dohánynövények esetében a szelenát  $10 \text{ mg L}^{-1}$  koncentrációban nem okozott szignifikáns eltérést a kontrollhoz viszonyítva sem a klorofill *a*-t sem a klorofill *b*-t illetően (**3., 4., 5. ábra**). Ezzel szemben 2%-os szacharóz táptalajon  $10 \text{ mg L}^{-1}$  szelenát szignifikánsan csökkentette a klorofill *a* és *b* tartalmat egyaránt. A vörös elemi nanoszelen klorofill szintézisre gyakorolt gátló hatását nem tapasztaltuk, bár tízszer nagyobb koncentrációban ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) alkalmaztuk, mint a szelenátot. Sem a klorofill *a* sem a klorofill *b* tartalom mérése során nem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni a kontrollhoz képest, bár ahogy az ábrákon is látható kissé nagyobb értékeket mértünk a  $100 \text{ mg L}^{-1}$  vel kezelt növényeknél (**3., 4., 6. ábra**). Vizuális megfigyeléseink is alátámasztották a kapott eredményeket, ugyanis  $100 \text{ mg L}^{-1}$  nanoSe esetén a növények sötétzöldebbek voltak, mint a kontroll egyedek. A klorofill *a* és *b* adatokból meghatározható klorofill *a/b* arány normál körülmények között  $\sim 2,5\text{-}3,8$  tartományba esik. E tartományon kívül eső értékek arra utalnak, hogy valamilyen változás van a fotoszintetikus pigmentek sztöchiometriájában (Falqeto et al., 2009). A klorofill *a* és *b* értékek alapján várható volt, hogy a klorofill *a/b* arány meghatározása során is a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  szelenát okozza a legnagyobb eltérést a kontrollhoz viszonyítva. A várakozásnak megfelelően 2% szacharóz tartalmú táptalajon fejlődő növények klorofill *a/b* aránya 5,13 volt  $10 \text{ mg L}^{-1}$  szelenát alkalmazása mellett. A magas klorofil *a/b* arányt okozhatja a környezetben előforduló stressz hatások, úgymint nehézfém (Zengin-Munzuroglu, 2005).



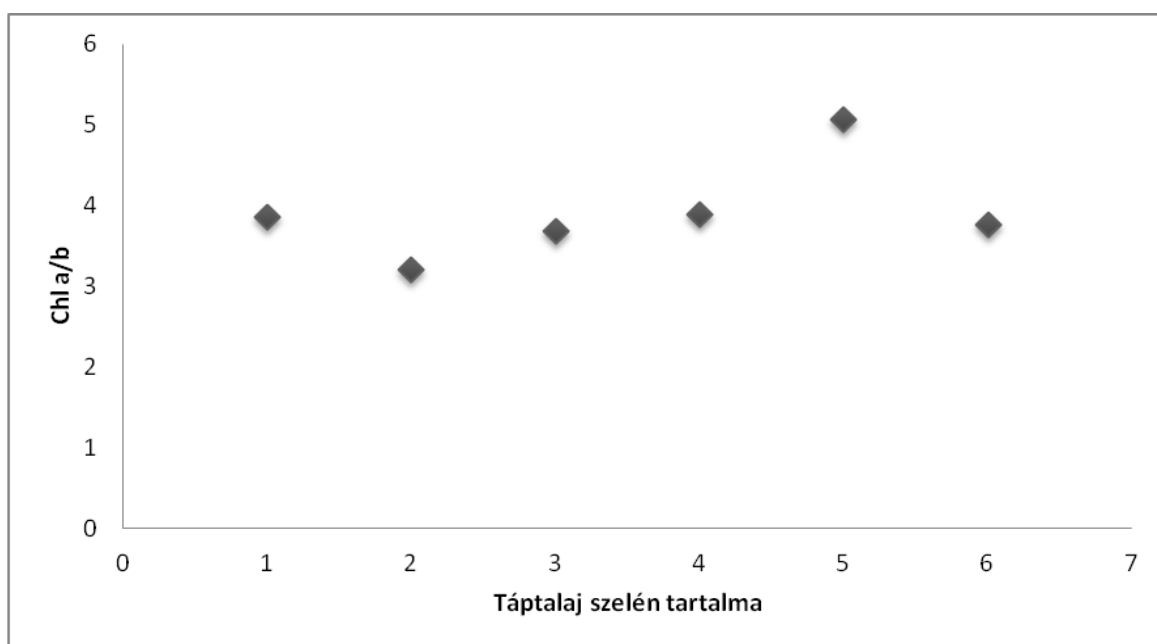
**3. ábra: *In vitro* dohánynövények klorofill *a* tartalma nátrium-szelenát ill. elemi nanoszelén tartalmú táptalajon változó cukor koncentráció mellett**



**4. ábra: *In vitro* dohánynövények klorofill *b* tartalma nátrium-szelenát ill. elemi nanoszelén tartalmú táptalajon változó cukor koncentráció mellett**



5. ábra: *In vitro* dohánynövények klorofill *a+b* tartalma nátrium-szelenát ill. elemi nanoszelén tartalmú táptalajon változó cukor koncentráció mellett

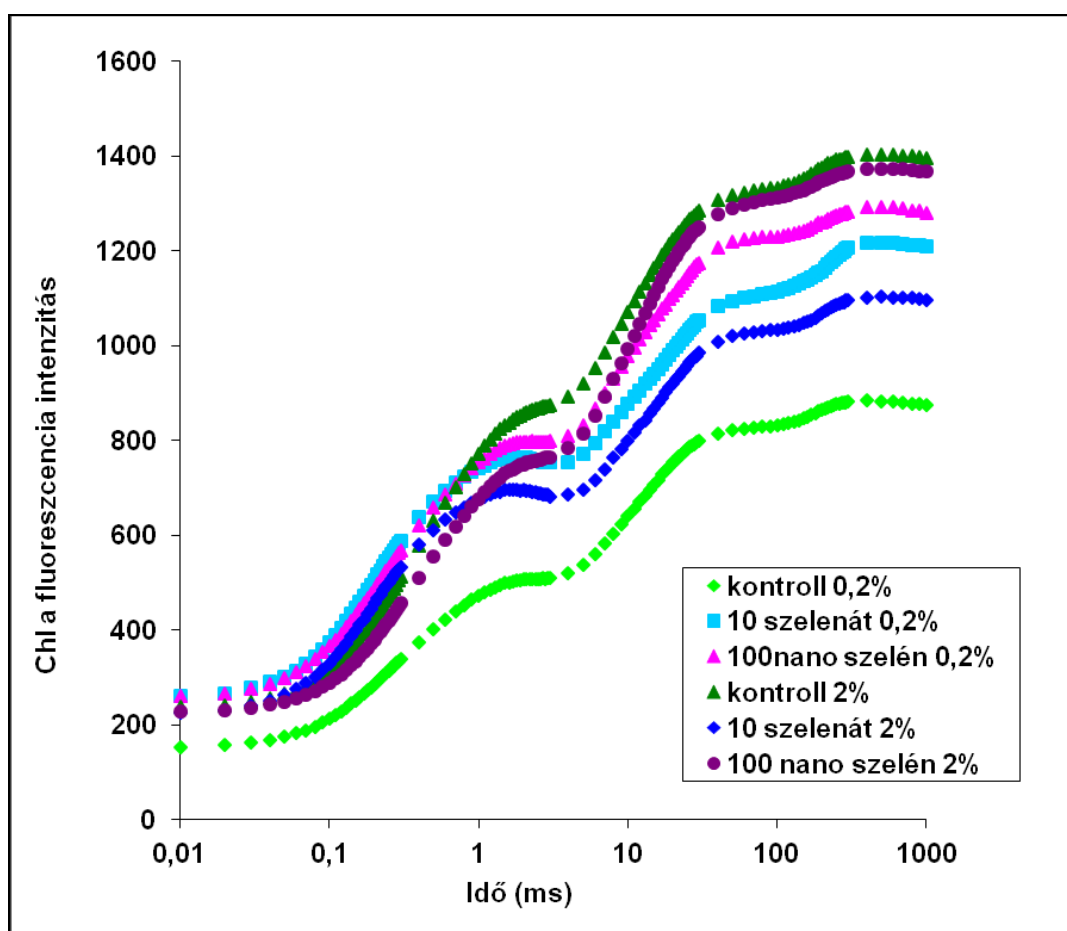


6. ábra: *In vitro* dohánynövények klorofill *a/b* aránya nátrium-szelenát ill. elemi nanoszelén tartalmú táptalajon változó cukor koncentráció mellett ( 1= kontroll 0,2% cukor; 2=10 szelenát 0,2% cukor; 3=100 nano szelén 0,2% cukor; 4=kontroll 2% cukor; 5= 10 szelenát 2 % cukor; 6= 100 nano szelén 2% cukor)

## 5.2 *In vitro* nevelt dohány növények fotoszintézis rendszerének hatékonysága

### 5.2.1. OJIP tranziens

A fotoszintézis működése jól jellemezhető a besugárzott fény a növény által kibocsátott fluoreszcencia ismeretében, így következtetni lehet a fotoszintetikus apparátus, annak működéséből az elektrontranszportlánc hatékonyságára, a zárt és nyitott reakciócentrumok arányára, és még számos egyéb értékekre (Bacsó et al., 2009). A fluorométerrel rögzített jelekből felvehető OJIP tranziens görbe a gyors klorofill *a* fluoreszcencia emelkedést reprezentálja (7. ábra), melyből származtatható az Fv/Fm arány.

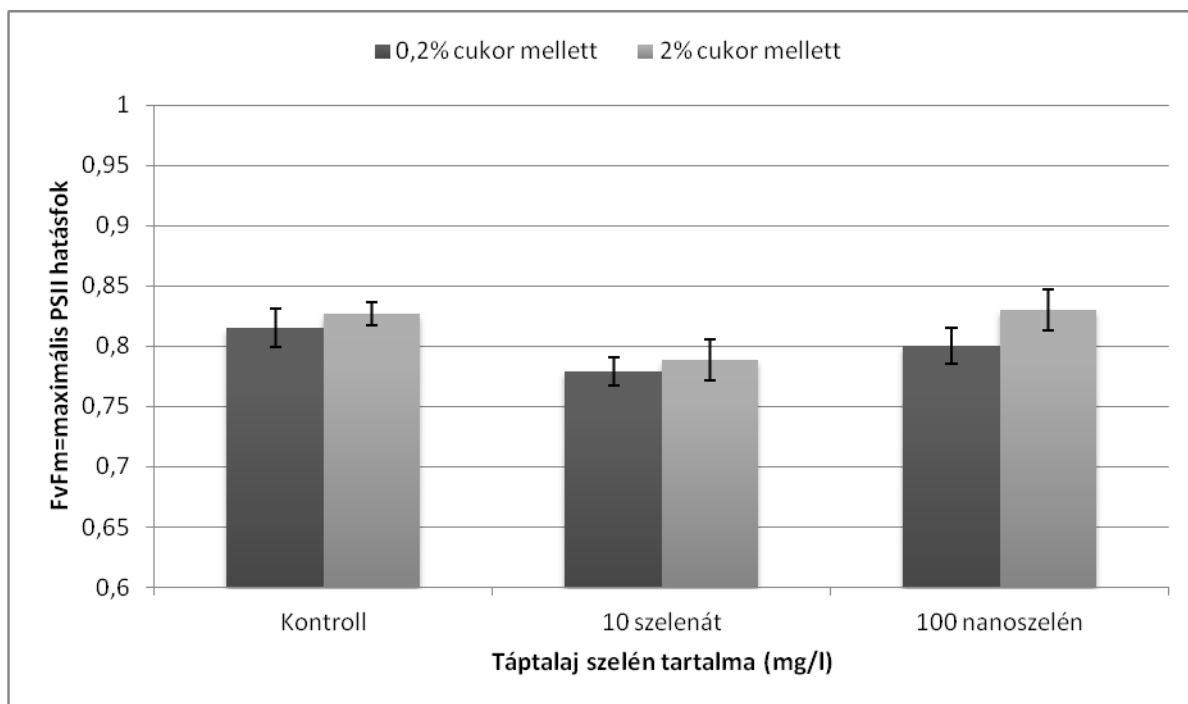


7. ábra: *In vitro* dohánynövények OJIP görbéje nátrium-szelenát ill. elemi nanoszelen tartalmú táptalajon változó cukor koncentráció mellett

### 5.2.2. *Fv/Fm* arány

A *Fv/Fm* arányszámot gyakran használják a fotoszintetikus rendszer hatékonyságának számszerűsítésére. Az *Fv/Fm* arány megmutatja az abszorbeált kvantumoknak azt a maximális hányadát, amely felhasználható a PSII reakciócentrumban a fotoszintézis során. Minél nagyobb az *Fv/Fm* arány a PSII reakció centrum annál több fénykvantumot tud fogadni és hasznosítani a fotoszintézisben. Kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy 2% szacharóz koncentráció nem csökkentette, sőt kis mértékben növelte a dohánynövények fotoszintetikus aktivitást 0,2% szacharóz tartalmú táptalajon nevelt növényekhez képest **(8. ábra)**. Kadlecek et al. (2003) kísérleteinél is azt tapasztalták, hogy fotomixotróf dohány tenyészetek (3% cukor tartalom alkalmazásával) nem csökkentette a fotoszintetikus aktivitást. Ezzel szemben *Pelargonium x hortorum*, *P. peltatum* és *Vitis vinifera* növényekkel végzett vizsgálatokban 5 és 0 g L<sup>-1</sup> szacharóz koncentráció mellett nagyobb fotoszintetikus aktivitást mértek, mint 20 g L<sup>-1</sup> alkalmazása esetén (Reuther et al., 1992).

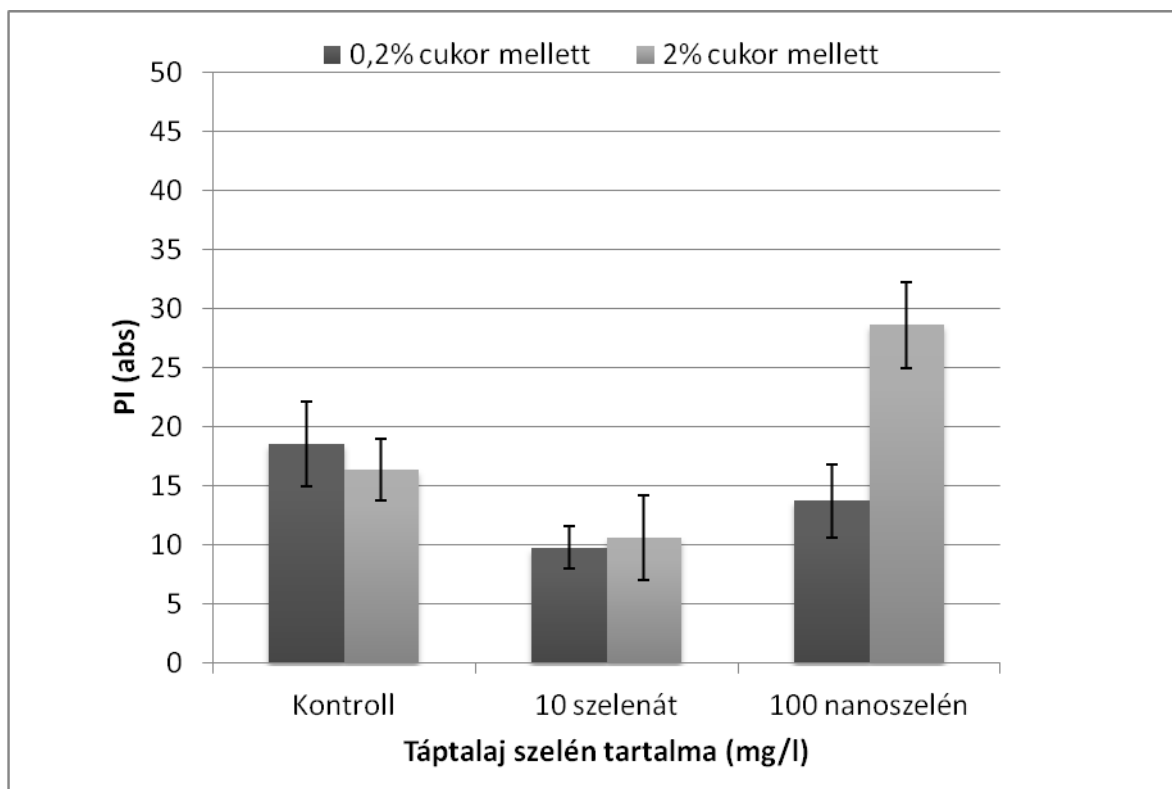
A szelénkezeléseket összehasonlítva a nanoSe (100 mg L<sup>-1</sup>) kezelés nem okozott jelentős eltérést a II. fotokémiai rendszer működésében az *Fv/Fm* arányt figyelembe véve sem 0,2% sem 2% szacharóz alkalmazása esetén **(8. ábra)**. A szelenát 10 mg L<sup>-1</sup> koncentráció esetén a 0,78 (0,2% szacharóz mellett) 0,79 (2% szacharóz mellett) körüli *Fv/Fm* arány alacsonyabb ugyan a kontrollhoz viszonyítva, de a normális ~0,8 értékhez közel. Levélpermetezéssel kijuttatott nátrium-szelenát 10 mg L<sup>-1</sup> koncentrációban sem okozott jelentős csökkenést, sőt pozitívan befolyásolta a PSII fotokémiai hatékonyságát az *Fv/Fm* arányt figyelembe véve *Glycine max* (L.) Merr, *Eruca sativa* illetve *Solanum tuberosum* növények esetében (Germ–Osvald, 2005; Germ et al., 2007; Mechora-Germ, 2010).



**8. ábra: *In vitro* dohánynövények PSII fotokémiai rendszer hatékonysága nátrium-szelenát ill. elemi nanoszelén tartalmú táptalajon változó cukor koncentráció mellett**

### 5.2.3. Fotoszintetikus performance index (PI<sub>abs</sub>)

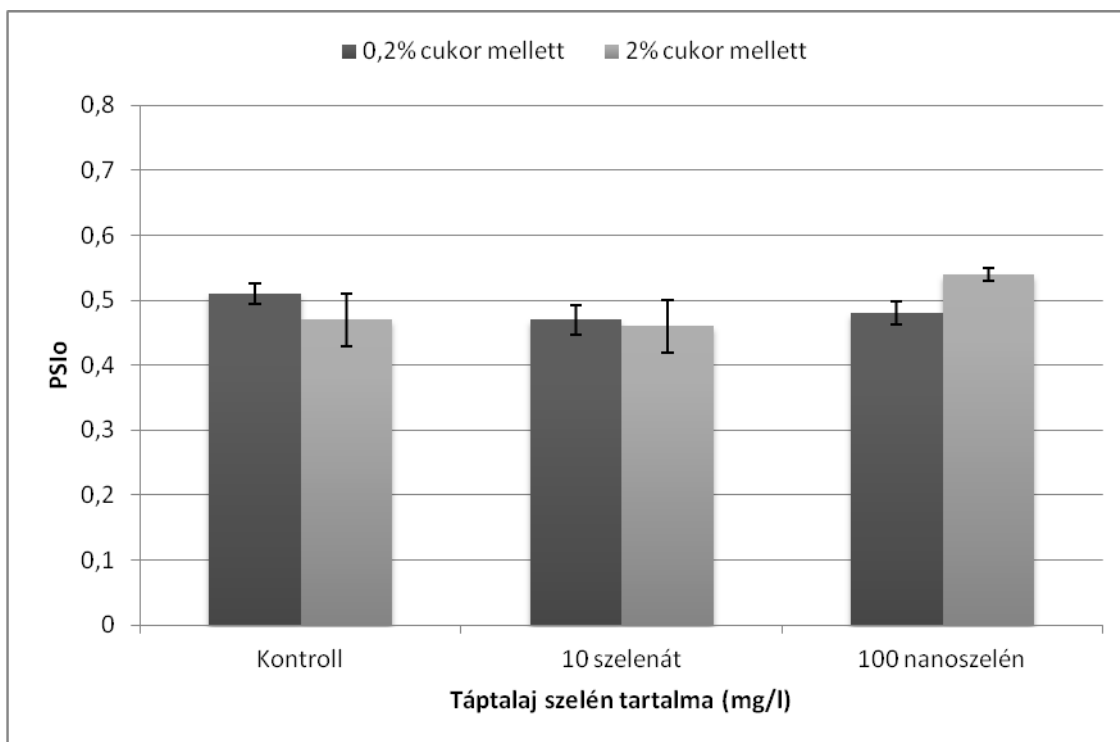
A fotoszintetikus performance index (PI<sub>abs</sub>) a stressz hatásoknak kitett növények PSI-PSII rendszer működéséről ezáltal a növények vitalitásáról szolgáltat kvantitatív információkat (Strasser et al., 2004). A **9. ábráról** jól kitűnik, hogy a vörös elemi nanoszelénnel kezelt, 2%-os cukor tartalmú táptalajon nevelt dohány növényeknek volt a legmagasabb PI(abs) értéke alacsonyabb cukor koncentráció mellett a kontrolhoz hasonló értéket kaptunk. Ezzel szemben a szelenát (10 mg L<sup>-1</sup>) kezelés hatására szignifikánsan alacsonyabb PI(abs) értéket kaptunk 0,2% szacharóz tartalmú táptalajon. A 2% szacharóz koncentráció mellett is alacsonyabb PI(abs) értékeket kaptunk, de ott a nagyobb szórás miatt szignifikáns különbséget nem találtunk.



**9. ábra:** *In vitro* dohánynövények performance indexe nátrium-szelenát ill. elemi nanoszelén tartalmú táptalajon változó cukor koncentráció mellett

#### 5.2.4. Elektron transzportlánc hatékonysága (PSIo)

A PSIo index szintén a az OJIP görbéből származtatott paraméter és az elektron transzportlánc hatékony működéséről nyújt információt. a plasztokinon A-t ( $Q_A$ ) követően, ahogy a 3.2. fejezetben már szó volt róla. Ha összevetjük a szelént nem tartalmazó 0,2% és a 2% szacharózzal kiegészített táptalajokon mért eredményeket, azok nem mutatnak különbséget a szórásokat figyelembe véve. A szelén kezeléseket figyelembe véve sem találtunk jelentős eltérést az elektron transzportlánc működésében a PSIo indexet értékelve a kontrollhoz viszonyítva **(10. ábra.)**



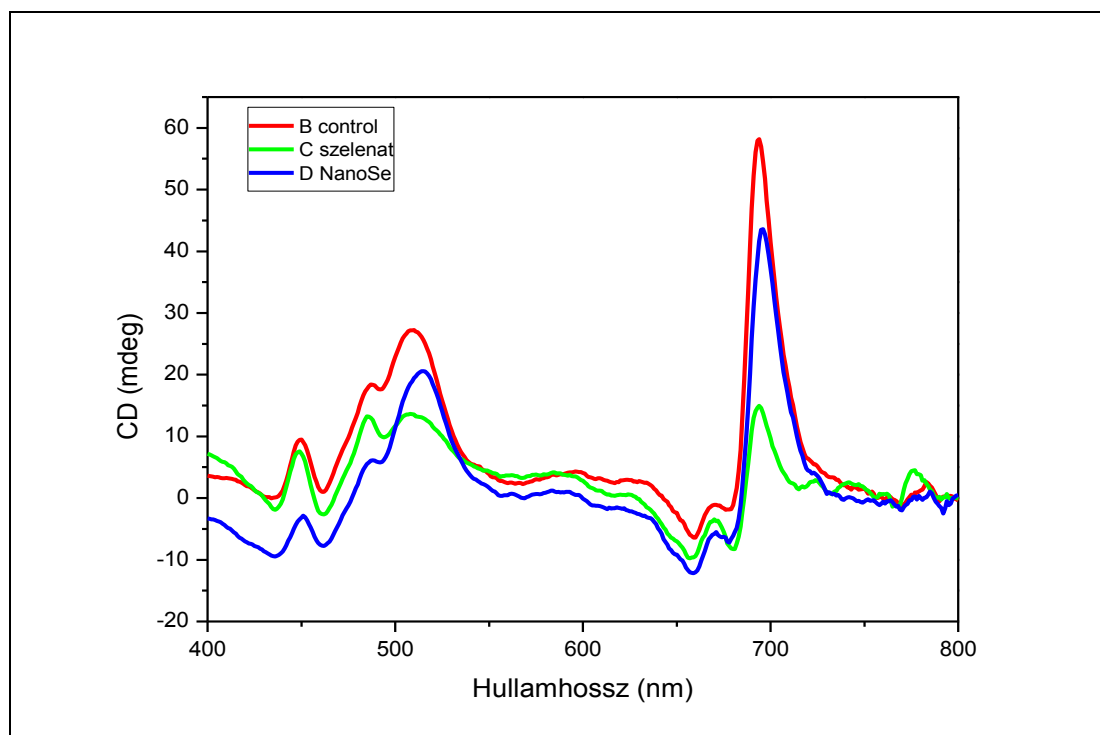
**10. ábra: *In vitro* dohánynövények PSIo értékei nátrium-szelenát ill. elemi nanoszelén tartalmú táptalajon változó cukor koncentráció mellett**

### 5.3 CD spektroszkópia

Az optikailag aktív molekulákat (királis molekula) poláros fénnel megvilágítva azt tapasztaljuk, hogy a lineárisan poláros fény polarizációs irányának síkját elforgatják. Ezt úgy kell érteni, hogy az asszimmetrikus szerkezetű molekulák a fénnel kölcsönhatásba lépve a balra ill. jobbra cirkulárisan poláros összetevők forgási-terjedési sebességét nem egyformán befolyásolják, azaz eltérő a két komponens törésmutatója (Damjanovich et al., 2006). A biológiai rendszerekben szinte minden molekula és molekula-komplex királis egységként van jelen (Cantor-Schimmel, 1980). A növények kloroplasztiszaiban is a pigment-protein szuperkomplexek királisan rendezett makrodoménekbe szerveződnek, melyekben történő szerkezeti változásokat cirkuláris dikroizmus spektroszkópia segítségével ki lehet mutatni, ahogy a 3.2.3. fejezetben részletezve volt.

CD mérés során a psi-típusú görbékét rögzítettük, melyek a pigment-protein makrodoménekben történő változásokra mutatnak rá. Vizsgálataink során a psi-típusú spektrum lefutásában és intenzitásában sem találtunk jelentős eltérést 100 mgL<sup>-1</sup> nanoszelénnel kezelt dohány növény (2% szacharóz) esetében a kontrollhoz viszonyítva sem a kék, sem a vörös hullámhossz tartományban (**11. ábra**). A két CD spektrum azért nem fed át, mert a műszer a nanoSe-nel kezelt minta esetében alacsonyabb értéknél kezdte rögzíteni a jelet. Ezzel szemben a 10 mgL<sup>-1</sup> szelenáttal kezelt növények

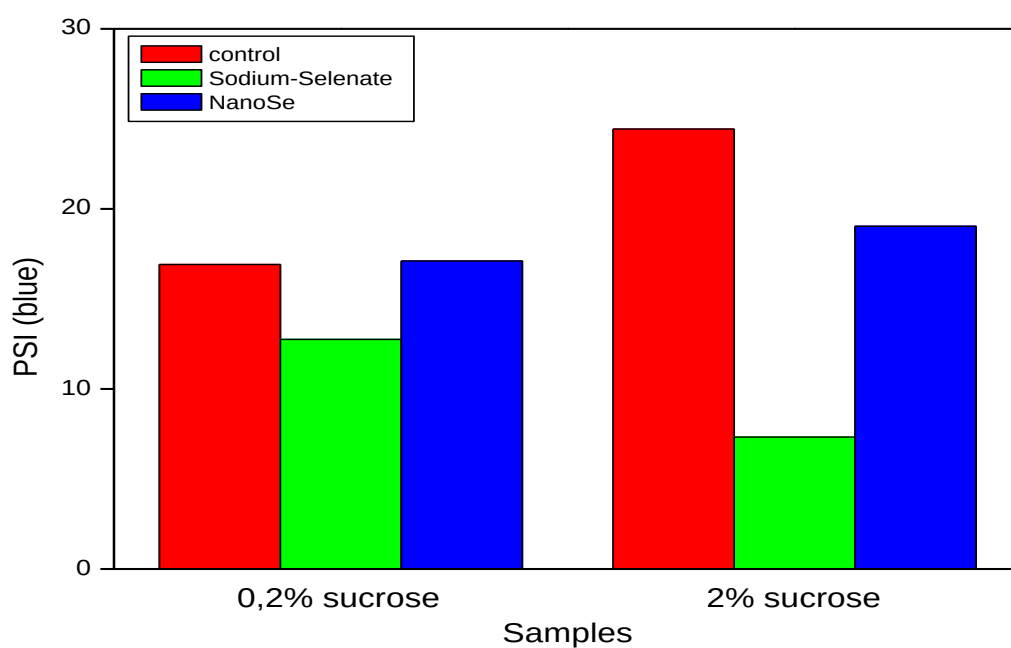
(2% cukor tartalom) psi-típusú görbéjének mind az alakja mind az intenzitása lényegesen eltért a kontrolltól vörös és kék fény tartományban egyaránt (**11. ábra**). Az 517 nm hullámhossznál jelzett psi-típusú csúcs lefutása és intenzitása is lényegesen eltér a kontrolltól, ami a karotinok távoli interakcióiban történő eltérésekre utal. A vörös tartományban 700 nm-nél rögzített csúcsnál tapasztaltunk még egy lényeges intenzitásbeli csökkenést, ami az átfedett klorofill *a* és *b* molekulák távoli érintkezéseiben bekövetkező változásokra utalnak (**11. ábra**).



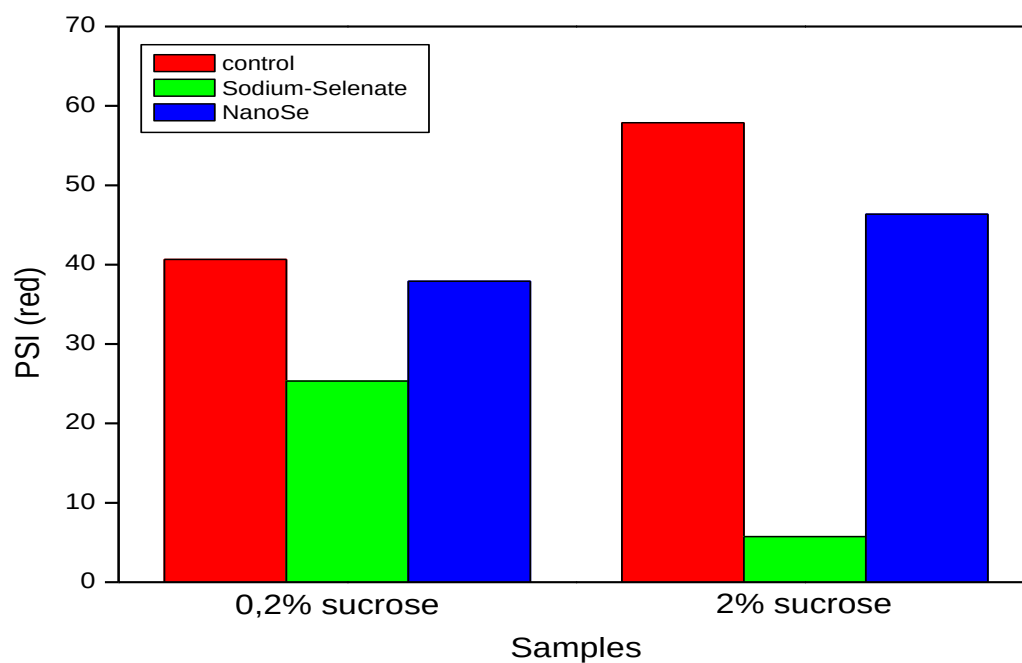
**11. ábra: *In vitro* dohánynövények CD spektruma nátrium-szelenát ill. elemi nanoszelen tartalmú táptalajon változó cukor koncentráció mellett**

A kalluszból regenerált dohánynövények kék és vörös fénytartományban rögzített alapvonalra korrigált psi-típusú CD jeleit mutatja be a **11. és 12. ábra**. A psi-típusú CD jelek érzékenyebbek a vörös megvilágításra, mint a kék megvilágításra, ezért a kloroplasztisz ultrastruktúrájában történő változások látványosabban kimutathatóak itt. Eredményeink alapján a legszembetűnőbb csökkenést szelenát kezelésnél tapasztaltuk a fotomixotróf tenyészetekben (2% szacharóz alkalmazása mellett) ami vörös tartományban még kifejezettebben megnyilvánult, bár kék tartományban is egyértelműen látható (**12. ábra, 13. ábra**). A szelenát kezelés kloroplasztisz makrodoménekre gyakorolt negatív hatása fotoautotróf tenyészetben (0,2% szacharóz használatakor) kevésbé volt kimutatható, hozzáteve, hogy e cukor koncentráció alkalmazása mellett a kontrol növények is alacsonyabb CD jeleket mutattak.

A nanoszelénes kezeléseknél kisebb mértékű csökkenést realizáltunk a 2% szacharózt tartalmazó táptalajokon fejlődő növényeknél. A 0,2% szacharóz koncentráció alkalmazásakor pedig a kontrollal majdnem megegyező értékeket kaptunk kék és vörös fénytartományban egyaránt.



**12. ábra: *In vitro* dohány növények psí-típusú CD jele alapvonalra korrigálva kék fénytartományban**



13. ábra: *In vitro* dohány növények psí-típusú CD jele alapvonalra korrigálva vörös fénytartományban

## 6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Vörös elemi nanoszelénnel és nátrium-szelenáttal végzett összehasonlító vizsgálatban fotoautotróf (0,2% szacharóz) körülmények között nem tapasztaltuk a szelén gátló vagy serkentő hatását a klorofill *a* és *b* tartalmat vizsgálva egyik szelénformát illetően sem *in vitro* dohány tenyészetben. Fotomixotróf (2% szacharóz) tenyészetben azonban a szelenát ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) koncentrációban csökkenést okozott a klorofill *a* és *b* tartalomban egyaránt. Ez a negatív hatás a kiugróan magas klorofill *a/b* arányban is nyomon követhető volt, ami a különösen alacsony klorofill *b* tartalomnak volt köszönhető. Ennek oka lehet a klorofill *b* szintézisben fellépő probléma, vagy a klorofill *b* klorofill *a*-ba történő konverziója vagy a klorofill *b* degradációja (Falqeto et al., 2009). Ugyanakkor az alacsony klorofill *b* tartalmat okozhatja LHC antennák hiánya is. A nanoszelén ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) szignifikáns csökkenést nem okozott egyik cukor koncentráció alkalmazása mellett sem, ami arra utal, hogy az elemi nanoszelén nagyobb koncentráció tartományban tolerálható szelénforma, mint a szelenát (Domokos-Szabolcsy et al., 2012).

A szelenát gátló hatása kevésbé volt szembevetendő PSII fotokémiai rendszer hatékonyságára utaló Fv/Fm arány mérésekor. Mindkét cukor tartalmú táptalajon nevelt növények Fv/Fm aránya normális érték körül mozgott. A nanoSe kezelések kontrolhoz hasonló Fv/Fm értékei is arra utaltak, hogy a PSII fotokémiai rendszer normálisan működik fotoautotróf illetve fotomixotróf körülmények között egyaránt.

A növények vitalitásának jellemzésére használt fotoszintetikus performance index (PIabs)  $100 \text{ mg L}^{-1}$  (2% cukor) nanoSe kezelés mellett a legnagyobb értéket mutattak, ami mind PSI, mind a PSII rendszer normális működésére reflektál. Vizuális tapasztalataink is alátámasztották ezt az eredményt, hiszen egészségesnek tűnő, sötétzöld, nagy levélfelülettel rendelkező hajtások és kiterjedt gyökérhálózat jellemezte a növényeket (nem közölt adatok). Az alacsonyabb cukor tartalmú táptalajra rakott, nanoSe-nel kezelt növények PIabs-e alacsonyabb volt. Ezek a növények lassabban is fejlődtek, keskenyebb levélfelülettel rendelkeztek, és a gyökérzetük sem volt olyan kiterjedt. A  $10 \text{ mg L}^{-1}$  szelenátot tartalmazó táptalajon fejlődő dohányok PIabs (kontrollhoz viszonyított) alacsonyabb értéke arra mutat, hogy növény PSI és PSII rendszere zavart szenvedett, ami látható is volt a növény vitalitásában. A növények kisebbek, világosabbak voltak, gyengén fejlett gyökérzettel rendelkeztek, összehasonlítva a kontroll vagy a nanoSe kezelttel (nem közölt adatok).

A kontrollhoz hasonló PSIo értékek azonban arra engedtek következtetni bennünket, hogy a szelenát negatív hatása az elektron transzportlánc  $Q_A$  utáni részére nem terjedt ki egyik cukor koncentrációnál sem. A nanoszelén sem okozott zavart fotoszintézis elektron transzportláncban mivel itt sem láttunk szignifikáns csökkenést.

CD spektroszkópos mérések során kapott psi-típusú görbék intenzitása és lefutása alapján látható vált, hogy a szelenát már ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) koncentrációban jelentős szerkezeti változásokat okozott a kloroplasztisz királis makroegységeiben. Mivel a psi-típusú görbe nagyjából arányosan változott a kék és vörös fénytartományban, ebből valószínűsíthető a membrán struktúrában bekövetkező változások. További terveink között szerepel elektronmikroszkópos felvétel készítése ami valószínűleg megerősítené a dezorganizált kloroplasztisz szerkezetet. NanoSe ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) kisebb mértékű eltérést tapasztaltunk a psi-típusú spektrumokban fotomixotróf dohány tenyészetben, a fotoautotróf tenyészeteknél pedig szinte teljesen megegyeztek a psi-típusú CD jelek. Ebből arra következtethetünk, hogy a nanoSe még nagyobb koncentrációban sem befolyásolja jelentősen a kloroplasztisz ultrastruktúráját.

Jelen kutatási eredményeink összevetve a korábbi, elemi nanoszelénnel végzett kutatások eredményeivel dohány szövettenyészetben (Domokos-Szabolcsy, 2011), hogy a szelenát már alacsony koncentrációban ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) is toxikus a fotoszintetikus apparátusra, ami megnyilvánul a fotoszintetikus pigmenttartalomban, a PSI és PSII fotokémiai rendszerek együttes működésében és a kloroplasztiszt felépítő makroegységek dezorganizált szerveződésében. Ugyanakkor a vörös elemi nanoszelén nagyobb koncentrációban ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) cukor koncentrációtól függetlenül sem volt gátló hatású a fotoszintetikus folyamatokra, sőt kis mértékben serkentőleg hatott a fotokémiai rendszerek működésére fotomixotróf tenyészetekben.

Eredményeink, a korábbi biomassa és szelénakkumulációs eredményekkel együttesen (Domokos-Szabolcsy, 2011) arra engednek következtetni, hogy a vörös elemi nanoszelén szövettenyészetben felvehető, és nagyobb koncentráció tartományban tolerálható szelénforma, mint a szelenát. Emiatt alkalmas lehet célzott szelén fortifikációra haszonnövényekben. Ahhoz azonban, hogy a gyakorlatban vörös elemi nanoszelént teljes biztonsággal lehessen alkalmazni szükséges még más növény fajokkal is összehasonlító vizsgálatot elvégezni nemcsak szövettenyészetekben, hanem intakt növényekkel is. Emellett lényeges még megvizsgálni a növénybe bejutott nanoSe további sorsát, eloszlását és átalakulását más szelénformákba. További vizsgálataink ezeknek a kérdéseknek a megválaszolására irányul.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

A szelén, szemben az emberrel és magasabb rendű állatokkal, a növények számára nem létfontosságú mikroelem. Ismert ugyan néhány faj, mint például az *Astragalus bisulcatus* amely képes nagy mennyiségben (1-5 g/kg DW) akkumulálni a szelént toxikus tünetek megjelenése nélkül, a legtöbb faj azonban a nem-szelénakkumulálók közé tartozik. Ezek a növények csak alacsony koncentrációtartományban tolerálják a szelént. A növények szelén felvételét és toleranciáját befolyásolja a megjelenési formája. A természetben leggyakoribb, növények számára könnyen hozzáférhető szelénforma a szelenát. Éppen ezért fortifikációs kísérletekben, ahol a cél valamilyen növény szelénrel történő gazdagítása, a szelenátot alkalmazzák elsősorban. A szelénrel dúsított élelmisznövények jó forrásként szolgálhatnak az emberi szervezet számára szükséges szelén mennyiség fedezésére.

Az utóbbi időben az érdeklődés homlokterébe került egy érdekes szelénforma, a vörös elemi nanoszelén, ami állatkísérletekben ígéretesnek tűnő eredményeket mutatott. Növényi vonatkozásban azonban csak a felvételtől és az organogenezisre gyakorolt hatásáról tudunk egy keveset *in vitro* kísérletekből. Ugyanakkor a fotoszintézis az egyik legfontosabb metabolikus folyamat magasabb rendű növényekben. A fotoszintetikus folyamatok vizsgálata, illetve a kloroplasztisz szerkezeti felépítésére vonatkozó mérések információt biztosítanak a növény általános „egészségi állapotáról”.

Emiatt jelen kísérletes munkában a vörös elemi nanoszelén fotoszintetikus apparátusra gyakorolt összehasonlító vizsgálatát végeztük el a szelenáttal összevetve *in vitro* dohány tenyészetben fotoautotróf (0,2% szacharóz) illetve fotomixotróf (2% szacharóz) körülmények között.

Eredményeink alapján elmondható, hogy a szelenát klorofill szintézisre irányuló gátló hatása fotomixotróf körülmények között tapasztalható, 0,2% szacharóz koncentráció mellett azonban a kontrolhoz hasonló értékeket kaptunk. A vörös elemi nanoszelén nem befolyásolta jelentősen a klorofill tartalmat egyik szacharóz koncentráció mellett sem.

A fotoszintetikus rendszer hatékonyságát sötétadaptált növényeken a klorofill *a* fluoreszcencia tranziens vizsgálatával követtük nyomon. A mérés során kapott OJIP görbéből kiszámolt Fv/Fm arány azt mutatta meg, hogy az alkalmazott szelénformák és koncentrációk nem befolyásolták jelentősen a PSII működését. Ugyanakkor az is láthatóvá vált, hogy dohány esetében a táptalaj 2% szacharóz tartalma még nem gátolja a fotoszintetikus folyamatok működését. A szintén OJIP görbéből származtatott integratív Plabs paraméter a 100 mg L<sup>-1</sup> nanoSe kezelésnél szignifikánsan nagyobb volt. Ez arra mutat, hogy PSI és PSII fotokémiai rendszerek hatékonyan működnek, ezzel együtt a növények vitalitása fokozott. Ellenben a szelenát (10 mg L<sup>-1</sup>) csökkent Plabs értéke a PSI és PSII rendszerekben fellépő zavarra utaltak, ami a szerkezetükben fellépő problémákból adódhat. A cirkuláris dikroizmus vizsgálattal megerősítettük, hogy a szelenát kezelés hatására a

kloroplasztiszokban lévő makrodomének, pigment-protein komplexek dezorganizálódtak (különösen fotomixotróf körülmények között), ami funkcióvesztéshez vezethet. A szelenát gátló hatása azonban a fotoszintetikus elektron transzportlánc  $Q_A$  mögötti részére nem terjedt ki, amire az OJIP görbe alapján származtatott kontrolhoz hasonló PSIo érték mutatott rá.

A nanoszelén az alkalmazott koncentrációban nem befolyásolta jelentősen a kloroplasztisz ultrastruktúráját. A fotoautotróf tenyészetekben a kontrollal szinte teljesen azonosak voltak a  $ps_i$ -típusú jelek. A nanoSe kezelés mellett kapott PSIo értékek is hasonlóak voltak a kontrolhoz, ami az elektron transzport zavartalan működésére utalt.

Az eredményeket összefoglalva elmondható, hogy a szelenát alacsonyabb koncentrációban ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) gátlólag hat a fotoszintézis működésére. Ez megnyilvánul a klorofill tartalomban, a PSI és PSII fotokémiai rendszerek hatékonyságában és a kloroplasztisz makrodoménjeinek szerkezetében történő változásokban. Ezzel szemben a vörös elem nanoszelénnek még nagyobb koncentrációban ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) sincs negatív hatása fotoszintézis működésére sem fotoautotróf, sem fotomixotróf körülmények között. Sőt fokozza a növény vitalitását a PSI és PSII rendszerek hatékonyabb működése által.

## **8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Ezúton szeretnék hálás köszönetet mondani, Prof. Dr. Fári Miklós intézetvezetőnek, aki biztosította és engedélyezte a labormunkák lefolytatását és Dr. Szabolcsy Éva témavezetőmnek, aki a dolgozatom megírása során, illetve a labor munkám alatt hasznos tanácsokkal, információkkal látott el, segített és támogatott.

Emellett szeretném megköszönni, a Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Növény Biológiai Intézetében a Fotoszintetikus Membráncsoport kutatólaboratóriumaiban dolgozó Dr. Zsíros Ottónak és vezetőjének Prof. Dr. Garab Győzőnek, hogy biztosították azokat a nélkülözhetetlen feltételeket, ami nélkül az Indirekt klorofill- fluoreszcencia méréseket nem tudtuk volna elvégezni.

## SZAKIRODALOMJEGYZÉK

1. ABDUL JALEEL, C., MANIVANNAN, P.†, WAHID, A.‡, FAROOQ, M., JASIM AL-JUBURI, H., SOMASUNDARAM, R.,† AND PANNEERSELVAM, R. (2009): Drought Stress in Plants: A Review on Morphological Characteristics and Pigments Composition. *International Journal of Agriculture & Biology*, 1560–8530. p.
2. BACSÓ R. (2009): A szárazságtűrés élettani hátterének vizsgálata *Arabidopsis* modellnövényen és transzgenikus szárazságtűrő növények előállítása (Budapest, 2009) PhD értekezés, 33-34., 36-37. p.
3. BARZDA V., GARAB GY., MUSTÁRDY L. (1994): Size Dependency of Circular Dichroism in Macroaggregates of Photosynthetic Pigment-Protein Complexes. *Biochemistry*. 10837-10841. p.
4. BREZNIK, B., GABERSCIK, A., GERM, M., KREFT I. (2005): The combined effects of enhanced UV B radiation and selenium on common buckwheat( *Fagopyrum esculentum* Moench) habitus. *Fagopyrum*, 22: 83-87. p.
5. BUSOTTI, F. (2004) : Assessment of stress conditions in *Quercus ilex* L. leaves by O-J-I-P chlorophyll a fluorescence analysis Plant Biosystems. *An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology. Official Journal of the Societa Botanica Italiana* Volume 138
6. CANTOR, C. R. and SCHIMMEL, P. R. (1980): *Biophysical Chemistry*, W. H. Freeman Company, Sanfranscisco
7. CAPELLADAES, M., LEMEURE, R. and DEBERGH, P. (1991): Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *Rosa* cultured in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 25:, 21-26. p.
8. ESAR TORRES ELGUERA, J., YANEZ BARRIENTOS, E., WROBEL, K. (2012): Effect of cadmium (Cd(II)), selenium (Se(IV)) and their mixtures on phenolic compounds and antioxidant capacity in *Lepidium sativum*. *Acta Physiologiae Plantarum* , (Online version)

9. LER, O., OLEJNICKOVA, J., HRUBY, M., CSEFALVAY, L. (2010): Interactions between iron and titanium metabolism in spinach: A chlorophyll fluorescence study in hydropony. *J. Plant Physiol.* 1592-1597. p.
10. DAMJANOVICH. (2006): Orvosi Biofizika. Bp. Medicina Könyvkiadó 632. p.
11. DEGL'INNOCENTI, E., HAFSI, C., GUIDI, L., NAVARI- IZZO, F. (2009): The effect of salinity on photosynthtetic activity in potassium-deficient barley species. *J. Plant Physiol.* 1968-1981. p.
12. DOMOKOS -SZABOLCSY E., MARTON L., SZTRIK A., BABKA B., PROKISCH J., FARI M. (2012) Accumulation of red elemental selenium nanoparticles and their biological effects in *Nicotinia tabacum*. *Plant Growth Regul.* 68: 525-531. p.
13. DOMOKOS-SZABOLCSY É. (2011): Szervetlen szelénmódosulatok biológiai hatásának és a fortifikáció lehetőségeinek tanulmányozása növényi rendszerekben (Debrecen, 2011) PhD értekezés, 64-66., 95-97. p.
14. ENDRES, L., VIEIRA SILVA, J., MARQUES FERRERIA, V., VERRÍSSIMO DE SOUZZA A., BARBOSA G. (2010): Photosynthesis and Water Relations in Brazilian Sugarcane. *The Open Agriculture Journal.* 31-37. p.
15. FILEK, M., GZYL-MALCHER, B., ZEMBALA, M., BEDNARSKA, E., LAGGNER, P., KRIECHBAUM, M. (2010): Effect of selenium on characteristics of rape chloroplasts modified by cadmium. *J. Plant Physiol.* 167: 28-33. p.
16. FUENTES, G., TALAVERA, C., OROPEZA, C., DESJARDINSAND, Y., SANTAMARIA, J. M. (2005): Exogenous sucrose can decrease in vitro photosynthesis but improve field survival and growth of coconut ( *Cocos nucifera* L.) in vitro plantlets. In vitro cellular and developmental biology-plant. Volume 41, Number 1 (2005), 69-76. p. DOI: 10.1079/IVP2004597
17. GAJDOS É., BÁKONYI N., LÉVAI L., VERES S., TÓTH B., MAROZSÁN M. (2009): A kadmium fiziológiai hatásai kukorica és napraforgó csíra növényekre. *Georgikon napok* LI. 328-336. p.
18. GARAB GY. -VAN AMERONGEN H.: 2009 Linear dichroism and circular dichroism in photosynthesis research. *Photosynthesis Research* 101, 135-146. p.

19. GÁSPÁR L. (2008): A Cd-stressz, a vashiány és a vízháztartási zavarok összefüggéseinek vizsgálata. Protektív mechanizmusok. (Budapest, 2008) PhD értekezés, 6-7. p.
20. GERM, M., KREFT I., OSVALD, J. (2005): Influence of UV-B exclusion and selenium treatment on photochemical efficiency of photosystem II, yield and respiratory potential in pumpkins (*Cucurbita pepo* L.). *Plant physiol. Biochem*, 43: 445-448. p.
21. GERM, M., KREFT, I., STIBILIJ, S., URBANC-BERCIC, O. (2007): Combined effects of selenium and drought on photosynthesis and mitochondrial respiration in potato. *Plant Physiol. Biochem*, 45: 162-167. p.
22. GIRLING, C. A. (1984): Selenium in agriculture and the environment *Argic. Ecosys Envirom.* 11, 37-65 p.
- HAMID N., BUKHARI N. AND JAWAID F. (2012): Physiological responses of *phaseolus vulgaris* to different lead .*Pak. J. Bot.*, 42(1): 239-246 p.
23. HARRACH B. (2010): Abiotikus és biotikus stresszorok hatása árpa és dohány növényekre hatására búzában (Szeged, 2010) PhD értekezés, 18- 19 p.
24. HEGEDŰS A., ERDEI S., HORVÁTH G. (1997): Is colchicine a stress-factor. *Horticultural Science*, 29: 53–57. p.
25. HEGEDŰS A., ERDEI S., HORVÁTH G. (2001): Comparative studies of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. *Plant Science* 160, 1085–1093. p.
26. KADLECEK, P., RANK, B., TICHÁ, I.(2003): Photosynthesis and photoprotection in *Nicotiana tabacum* L. in vitro-grown plantlets. *J. Plant Physiol.* 1017-1023. p.
27. KAUTSKY, H., APPEL, W., AMANN, H. (1960): Chlorophyll fluorescence and carbon assimilation, The fluorescence and the photochemistry of plants. *Biochemische Zeitschrift*, 332: 277-292. p.
28. KIRBAG ZENGİN, F., MUNZUROĞLU, O. (2005) : Effects of some heavy metals on content of chlorophyll, proline and some antioxidant chemicals in bean (*PHASEOLUS VULGARIS* L.) seedlings *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 47/2: 157–164. p.

29. KRAUSE, G. H., WEIS, E. (1991): Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: *The Basics*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 313-349. p.
30. LEPEDUS H., BRKI I., CESAR V., JURKOVI V., ANTUNOVI J., JAMBROVI A., BRKI J., SIMIC D.( 2012): Chlorophyll fluorescence analysis of photosynthetic performance in seven maize inbred lines under water-limited conditions. *Periodicum Biologorum* vol. 114, 73–76. p.
31. MANETAS, Y., -GRAMMATIKOPOULOS, G., - KYPARISSIS, A. (1998) : The use of the portable, non-destructive, SPAD-502 (Minolta) chlorophyll meter with leaves of varying trichome density and anthocyanin content. *J. Plant Physiol.* 153. 513-516. p.
32. MARÁČZI K. H., BARACSI É. (2011): Roncsolásmentes ökofiziológiai vizsgálatok díszcserjéken Georgikon napok LIII., 471-477. p. Keszthely 2011. szeptember 29 – 30
33. MECHORA, Š., GERM, M. (2010): Selenium induced lower respiratory potential in Glycine max (L.) Merr. *Acta agriculturae, Slovenica*, vol. 95 29 - 34. p.
34. MOLNÁROVÁ, M., FARGASOVÁ, A. (2009): Se(IV) phytotoxicity for monocotyledonae cereals (*Hordeum vulgare* L., *Triticum aestivum* L.) and dicotyledonae crops (*Sinapsis alba* L., *Brassica napus* L.) *J. Hazard. Mat.* 172: 854-861. p.
35. MURASHIGE, T., SKOOG, F. (1962) : A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Plant Physiol.* 15: 126-146. p.
36. NELSON, N., BEN-SHEM, A. (2004): Complex Architecture of Oxygenic Photosynthesis. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 1-12. p.
37. PAPAGEORGIOU GC., GOVINDJEE.: 2004 Chlorophyll a fluorescence a signature of photosynthesis. *Advances in Photosynthesis and Respiration*, Vol. 19. New York: Springer
38. PEDRERO, Z., MADRID, Y., HARTIKAINEN, H., CÁMARA, C.(2008) : Protective effect of selenium in Broccoli (*Brassica oleracea*) plants subjected to cadmium exposure. *J Agric Food Chem.*, 266-71. p.
39. PORRA, RJ., THOMPSON, WA., KRIEDEMANN, P. (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with

four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica Et Biophysica Acta-bioenergetics*, 384-394. p.

40. PROKISCH J., (50%) ZOMMARA M. (2008): Process for producing elemental selenium nanospheres. PCT/IB2008/052838 Date of Receipt: 15 July Receiving Office: International Bureau of the World Intellectual Property Organization Your Reference: P104315

41. PROKISCH J., SZÉLES É., KOVÁCS B., DARÓCZY L., ZOMMARA M. (2008) : Formation of metal selenium nanospheres in bacteria: Is it a possible detoxification mechanism? *Cer. Res. Comm.* 36: 947-951. p.

42. RALPH FALQETO, A., CASSOL D., MARTINS DE MAGALHAES JUNIOR, A., COSTA DE OLIVEIRA MARCOS ANTONIO BACARIN, A. (2009) : Physiological analysis of leaf senescence of two rice cultivars with different yield potential *Pesq. Agropec. bras.*, Brasília, v.44, n.7, 695-700. p.

43. REUTHER, G. (1992): Stimulation of the photoautotrophy of in vitro plants. *Acta Hort. (ISHS)* 300:59-76. p.

44. RYBCZYNSKI, J. J., BORKOWSKA, B., FIUK, A., GAWRONSKA, H., SLIWINSKA, E., MIKULA, A. (2007): Effect of sucrose concentration on photosynthetic activity of in vitro cultures *Gentiana kurroo* (Royle) germlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, 445-453. p.

45. SKINNER, C. P. (1999): Environmental Chemistry of Selenium. *Soil Science Society of America Journal*, 164 70-72. p.

46. STOART, K., GRIFFITS, W., BUKHARY, IA., SHERWOOD, R. (1985): The effect of  $Cd^{2+}$  on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. *Physiol. Plant.* 63. 293–298. p.

47. STRASSER, J., SRIVASTAVA, A., TSIMILLI-MICHAEL, M. (2004): Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. In: Papageorgiou, G., Govinjee, Xu C.H. (Eds.), *Advances in Photosynthesis and Respiration, Chlorophyll Fluorescence a Signature of Photosynthesis*, vol. 19. Kluwer Academic Publishers, 321–362. p.

48. SZABÓ M. (2011): Kovamoszatok fotoszintetikus pigmentrendszerének makroszerveződése és szerkezeti flexibilitása (Szeged, 2011) 1-11. p.

49. SZALAI G. (2009): A szalicilsav szerepe gazdasági növények stressztűrő képességében (Martonvásár, 2009) PhD értekezés, 1-3. p.
50. SZÉCSÉNYI M. (2010): Fajtafüggő élettani és transzkriptszintű változások szárazságstressz (Szeged, 2010) 7-10. p.
51. SZŐLLŐSI E., VERES SZ., KANALAS P., OLÁH V., Solti Á., SÁRVÁRI É, MÉSZÁROS I. (2008): Effects of UV-B radiation and water stress on chlorophyll fluorescence parameters and activity of xanthophyll cycle in leaves of sessile oak (*Quercus petraea*) seedlings. *Acta Biologica Szegediensis*, 241-242. p.
52. THAPAR, R., SRIVASRTAVA, A. K., BHARGAVA, P., MISHRA, Y., CHAND, L.(2008): Impact of different abiotic stresses on growth, photosynthetic electron transport chain, nutrient uptake and enzyme activities of Cu-acclimated *Anabaena doliolum*. *J. Plant Physiology*. 165, 306—316. p.
53. VAN AMERONGEN, H, VALKUNAS, L, VAN GRONDELLE, R.(2000): Photosynthetic excitons. World Scientific, Singapore, ISBN 981-02-3280-2
54. ZENKTELER, E., BORKOWSKA, B. (2000): The photosynthetic status of in vitro strawberry shoots. *Acta Hort*. 567: 309-312. p.
55. ZHANG, HH, ZHANG, XL. (2011): Effects of exogenous CaCl<sub>2</sub> on the functions of flue-cured tobacco seedlings leaf photosystem II under drought stress. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao*, 1195-2000. p.
56. ZHANG, J.S., GAO, X.Y., ZHANG, L.D., BAOI, Y.P. (2001):. Biological effects of a nano red elemental selenium. *Biofactors* 15: 27-38. p.

## **NYILATKOZAT**

**KATÓ MARIANNA büntetőjogi és fegyelmi felelősségem tudatában kijelentem és aláírásommal igazolom, hogy a diplomadolgozat saját munkám eredménye. A felhasznált irodalmat korrekt módon kezeltem, a diplomamunkára vonatkozó jogszabályokat betartottam.**

.....

**Aláírás**

**Születési idő:.....**

*A dolgozat a TÁMOP-4.2.2/b-10/1-2010-0024 azonosító számú „A Debreceni Egyetem tudományos képzési műhelyeinek támogatása” című pályázat keretein belül készült.*