

**Szelén-indukált stresszválaszok vizsgálata *Arabidopsis thaliana* L. és
Pisum sativum L. növényekben, a biofortifikáció lehetősége**

Ph.D. értekezés

LEHOTAI NÓRA

Témavezetők:

Ördögné Dr. Kolbert Zsuzsanna

Egyetemi adjunktus

Prof. Dr. Erdei László

Egyetemi tanár



SZTE TTIK

Biológia Doktori Iskola

Növénybiológiai Tanszék

Szeged

2014

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
I. Bevezetés	9
II. Irodalmi áttekintés	11
II.1. A nitrogén-monoxid (NO).....	11
II.1.1. A NO tulajdonságai	11
II.1.2. A NO szintézise az állati szervezetben.....	12
II.1.3. A NO szintézise a növényi szervezetben.....	13
II.1.4. A NO eltávolítási lehetőségei növényekben.....	16
II.1.5. A NO jelátvittele a növényi szervezetben	17
II.1.6. A NO, mint a növényi stresszválaszok és fejlődési folyamatok szabályozója	19
II.2. A nitrogén-monoxid interakciója hormonokkal a gyökér fejlődése során	20
II.3. A jelátviteli molekulák és hormonok kapcsolata a szelén stressz indukált morfogenetikai válaszban	28
II.3.1. A szelén, mint környezeti stresszfaktor	31
II.3.2. A szelén, mint limitáló faktor a táplálkozásban	34
II.3.3. A biofortifikáció lehetősége	35
III. Célkitűzés	37
IV. Anyagok és módszerek	38
IV.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> L. növényen végzett kísérletek	38
IV.1.1. Növényi anyag és nevelési körülmények.....	38
IV.1.2. Alkalmazott kezelések	39
IV.1.3. Elemtartalom meghatározása induktív csatolású plazma tömegspektrométerrel.....	40
IV.1.4. Morfológiai mérések.....	40
IV.1.5. GUS hisztokémiai festés.....	41
IV.1.6. Fluoreszcens mikroszkópiás módszerek	42
IV.1.6.1. A NO <i>in situ</i> és <i>in vivo</i> detektálása	42
IV.1.6.2. A H ₂ O ₂ <i>in situ</i> és <i>in vivo</i> detektálása.....	43
IV.1.6.3. Az életképesség meghatározása.....	43
IV.1.7. Konfokális lézer scanning mikroszkópia	43
IV.2. <i>Pisum sativum</i> L. növényen végzett kísérletek	45

IV.2.1. Növényi anyag és növénynevelés	45
IV.2.2. Morfológiai mérések.....	46
IV.2.3. Elemtartalom meghatározás induktív csatolású plazma tömegspektrometriával (ICP-MS)...	46
IV.3. Az adatok statisztikai analízise	47
V. Kutatási eredmények	48
V.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> L. növényen végzett kísérletek.....	48
V.1.1. A szelén felvétele és transzlokációja <i>Arabidopsis</i> -ban	48
V.1.2. A szelén hatása vad típusú <i>Arabidopsis</i> hajtásának és gyökerének fejlődésére és életképességére	49
V.1.3. Szelén hatása a főgyökér szöveti szerveződésére, a B1 ciklin szerepe	54
V.1.4. A szelén hatására a gyökérben bekövetkező hormonális változások átfogó vizsgálata	55
V.1.5. Hormon mutáns növények Se kezelésre adott növekedési válasza és életképessége.....	57
V.1.6. Szelén hatása vad típusú <i>Arabidopsis</i> endogén nitrogén-monoxid tartalmára.....	59
V.1.7. Szelén hatása hormon mutáns lúdfüvek endogén nitrogén-monoxid tartalmára.....	59
V.1.8. A nitrát reduktáz szerepe a Se által indukált NO képződésben.....	60
V.1.9. Szelén hatására bekövetkező hidrogén-peroxid szint változása.....	61
V.1.10. Módosított NO és H ₂ O ₂ tartalommal rendelkező lúdfü növények növekedési válasza és életképessége Se stressz alatt	63
V.2. A citokinin és nitrogén-monoxid kapcsolatának és szelén stressz tőrésben betöltött szerepének részletesebb tanulmányozása	64
V.2.1. A citokinin szint alakulása Se stressz alatt és a citokinin oxidázok szerepe	64
V.2.2. A CK és NO között fennálló kapcsolat tanulmányozása szelén stressz alatt	65
V.2.3. A CK és NO szerepe a Se toleranciában	68
V.3. <i>Pisum sativum</i> L. növényen végzett kísérletek.....	71
V.3.1. A szelén hosszú távú hatása a borsó növények morfológiájára, a virágzásra és a termésképzésre.....	71
V.3.2. A szelén felvétele, transzlokációja és hatása a makro- és mikroelem homeosztázisra	74
V.3.3. A biofortifikáció lehetőségének vizsgálata	77
VI. Eredmények értékelése	79
VI.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> L. növényen végzett kísérletek értékelése.....	79
VI.1.1. A lúdfü a gyökér- és hajtásrendszerbe transzlokálja a felvett szelént, mely fokozott kén felvételéhez is vezet	79

VI.1.2. A szelenit koncentrációfüggő módon befolyásolja a vad típusú <i>Arabidopsis</i> morfológiáját és életképességét	79
VI.1.3. A szelenit megváltoztatja a belső hormonális homeosztázist	81
VI.1.4. A hormon mutáns növények növekedési válaszai és szelén toleranciája	82
VI.1.5. A NO szerepe Se stressz alatt vad típusú és hormon mutáns növényekben	83
VI.1.6. A hidrogén-peroxid szintek alakulása <i>Col-0</i> és hormon mutáns növényekben	84
VI.1.7. A jelátviteli molekulák szintjében mutáns növények növekedési válasza Se stressz hatására	85
VI.2. A citokinin és nitrogén-monoxid szelén stressz tőrésben betöltött szerepének részletesebb tanulmányozása.....	88
VI.2.1. A Se ellentétesen hat a citokinin és nitrogén-monoxid szöveti eloszlására és szintjére az <i>Arabidopsis</i> szerveiben	88
VI.2.2. A CK-NO közötti cross talk viszonyának tisztázása	89
VI.2.3. A Se toleranciában résztvevő CK és NO	90
VI.3. <i>Pisum sativum</i> L. növényen végzett kísérletek értékelése	91
VI.3.1. A szelén negatívan befolyásolja a borsó növények fejlődését és termésképzését	91
VI.3.2. A szelén biofortifikációja borsó növényekben	91
VII. Összefoglalás	94
VIII. Summary	96
IX. Irodalomjegyzék	98
X. Publikációs lista	111
XI. Köszönetnyilvánítás	116

Rövidítések jegyzéke

'O ₂ '	szuperoxid gyök anion
ABS	abszcizinsav
ACC	1-aminociklopropán karboxil sav
ACO	1-aminociklopropán karboxilsav oxidáz
ACS	1-aminociklopropán karboxil sav szintáz
ADP	adenozin-5'-difoszfát
AHK	<i>Arabidopsis</i> hisztidin kináz
AHP	<i>Arabidopsis</i> hisztidin foszfotranszfer protein
Amplex Red	10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazin
APSe	adenozin-foszfo-szelenát
APX	aszorbát peroxidáz
ARR	<i>Arabidopsis</i> response regulator
Asa	aszorbinsav
AtNOA1	<i>Arabidopsis thaliana</i> nitric oxide associated 1
AtNOS1	<i>Arabidopsis thaliana</i> nitric oxide synthase 1
ATP	adenozin-5' -trifoszfát
BA	6-benzilaminopurin
BH ₄	tetrahidrobiopterin
BR	brasszinoszteroid
Ca/Ca ²⁺	kalcium
Cd	kadmium
CK	citokinin
CKX	citokinin oxidáz/dehidrogenáz
cNR	citoszolikus nitrát reduktáz
Co	kobalt
cPTIO	2-(4-karboxifenil)-4,4,5,5,-tetrametilimidazolin-1-oxil-3-oxid
Cr	króm
CTR1	CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1
Cu	réz
CYC	ciklin
cys SNO	cisz-nitrozilált nitrogén-monoxid
cys-SH	cisz-tiol
cZ	cisz-zeatin
DAF-FM DA	4-amino-5-metilamino-2'-7'-difluorfluoreszcein

DAG	days after germination; csírázás utáni napok száma
DMAPP	dimetilallil-difoszfát
DMDSe	dimetildiszelenid
DMSe	dimetilszelenid
DMSO	dimetil-szulfoxid
DNS	dezoxiribonukleinsav
DZ	dehidrozeatin
e-	elektron
EDZ	elongációs/differenciációs zóna
eNOS	endoteliális nitrogén-monoxid szintáz
ENT	equilibratív nukleozid
ETR1	ethylen response gene 1
EZ	elongációs zóna
F	fluor
FAD	flavin-adenin-dinukleotid
FDA	fluorescein diacetát
Fe	vas
FGY	főgyökér
FMN	flavin-adenin-mononukleotid
FT	friss tömeg
GA	gibberellin
GC	guanilát cikláz
GFP	green fluorescent protein; zöld fluoreszcens protein
GPX	glutation peroxidáz
GS-FDH	formaldehid dehidrogenáz
GSH	glutation
GSNO	nitrozoglutation
GSNOR	nitrozoglutation reduktáz
GSSG	oxidált glutation
GST	glutation S-transzferáz
GTP	guanozin trifoszfát
GUS	β -glükuronidáz
H ₂ O ₂	hidrogén-peroxid
HA	hidroxilamin
Hb	hemoglobin
HR	hiperszenzitív reakció
I	jód

IAA	indol-3-ecetsav
ICP-MS	induktív csatolású plazma-tömegspektrometria
iNOS	indukálható nitrogén-monoxid szintáz
iP	N6-adenin
IPT	izopentenil transzferáz
JGY	járulékos gyökér
K/K ⁺	kálium
KAT	kataláz
LOG	lonely guy
MAP	mitogén-aktiválta protein
MAPK	mitogén-aktiválta protein kináz
MAT	metionin adenzil transzferáz
MES/KCl	2-(N-morfolino)etánszulfonsav/kálium-klorid
MeSeCys	metilszelenocisztein
MET	metionin szintáz
Mg	magnézium
Mn	mangán
Mo	molibdén
MZ	merisztematikus zóna
N	nitrogén
N ₂ O	dinitrogén-oxid
N ₂ O ₃	dinitrogén-trioxid
Na	nátrium
Na ₂ HPO ₄	nátrium-foszfát
NADP	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NH ₃ ⁺ /NH ₃	ammónia
Ni:NOR	nitrit:nitrogén-monoxid reduktáz
nNOS	neuronális nitrogén-monoxid szintáz
NO	nitrogén-monoxid
NO ⁻	nitroxil anion
NO [·]	nitrogén-monoxid gyök
NO ⁺	nitrozónium kation
NO ₂ ⁻	nitrit
NO ₂	nitrogén-dioxid
NO ₂ [·]	dinitrogén-dioxid
NO ₃ ⁻	nitrát

NOS	nitrogén-monoxid szintáz
NPR1	nonexpressor of pathogenesis related proteins 1
NR	nitrát redukáz
nsHb	nem-szimbionta hemoglobin
O ₂	oxigén; molekuláris oxigén
OAS	O-acetilszerin
OGY	oldalgyökér
ONOO ⁻	peroxinitrit
OPH	O-foszfohomoszerin
P	foszfor
PA	poliamin
PAT	poláris auxin transzport
PGP	foszfoglikoproteinek
PI	propídium-jodid
PM	proximális merisztéma
PR1	pathogen related 1
PUP	purin permeáz
QC	quiescent centre, nyugalmi centrum
RNF	reaktív nitrogénformák
ROF	reaktív oxigénformák
RSNO	S-nitrozotiol
S	kén
SAM	S-adenozil metionin
SCN	stem cell niche
SE	standard error, standard hiba
Se	szelén
Se ²⁻	szelenid
SeCys	szelenocisztein
SeMet	szelenometionin
SeO ₃ ²⁻	szelenit
SeO ₄ ²⁻	szelenát
sGC	citoszolikus vagy szolubilis guanilát cikláz
SIMV	stressz-indukált morfogenetikai válasz
SMT	szelenocisztein metiltranszferáz
SNAP	S-nitroso-N-acetil-DL-penicillinamin
SNP	nátrium-nitroprusszid
SOD	szuperoxid dizmutáz

SZT	száraz tömeg
TCS	two-component signalling pathway; kétkomponensű jelátviteli út
TIR1	transport inhibitor response 1
TRIS/HCl	trizma base/hidrogén-klorid
tZ	transz-zeatin
TZ	tranzíciós/átmeneti zóna
X-Gluc	5-bromo-4-kloro-3-indolil glükuronid
XOR/XHD	xantin-oxidoreduktáz/dehidrogenáz
Zn	cink

I. Bevezetés

Az elmúlt évtizedekben a talajok szelén tartalma jelentősen megváltozott. Míg a világ egyes részein túl alacsony, addig más területeken már toxikusan nagy mennyiségben fordul elő. Ennek oka legtöbbször a nem megfelelően alkalmazott mezőgazdasági technikák, az öntözés és műtrágyázás, a rosszul előállított takarmány, de akár környezetszennyezés következtében is jelentősen feldúsulhat. Lúdfű modell növényen (*Arabidopsis thaliana*) végzett kísérletek kapcsán a kutatók rájöttek, hogy a növényi szervezetben a szelén - a kénnel szemben mutatott nagymértékű hasonlósága miatt, a kén utakat használva metabolizálódik (Ellis és Salt, 2003). A kémiai hasonlóság miatt a túlzott szelénfelvétel azonban növényekben kénhiányt is okozhat, mely klorózisban, illetve gátolt növekedésben nyilvánulhat meg. Ezzel szemben az optimálisnál alacsonyabb vagy magasabb szelén tartalom a növényevő haszonállatok körében jelentős pusztulást idézhet elő. Ennek mind gazdasági, mind pedig egészségügyi vonatkozásai jelentősek lehetnek. A téma aktualitását támasztja alá, hogy a szelénnel kapcsolatos kutatások csak az elmúlt pár évtizedben kerültek előtérbe. A kutatók rávilágítottak arra, hogy bár a növények számára nem létfontosságú, az állati és emberi szervezetben azonban esszenciális mikroelem, így nélkülözhetetlen az optimális működéshez, emiatt egyre több kutatás irányul a szelén szerepének a tanulmányozására.

A szelén terhelés, más környezeti stresszfaktorokhoz hasonlóan morfológiai változásokat (stressz-indukált morfogenetikai válaszok, SIMV) idéz elő a növényi szervezetben, hiszen a növények szerveik növekedését, fejlődését a környezet aktuális állapotához (pl.: víz- és tápanyag ellátottság, szerves és szervetlen szennyezők jelenléte) igazodva szabályozzák. A stressz-indukált morfogenetikai válaszok a gyökér- és hajtásrendszert egyaránt érintik (Potters és mtsai, 2007, 2009). A környezeti tényezők mellett a gyökér endogén hormonális rendszere (pl. auxin, citokinin és etilén) is szabályozza a morfológiai válaszokat, vagyis a szelén stressz által indukált SIMV kialakulásában a növényi hormonok metabolizmusának és transzportjának megváltozása is szerepet játszik. A külső, környezeti és belső, hormonális szabályozó elemek közötti gazdag jelátviteli hálózatban szignálmolekulák teremtenek kapcsolatot, biztosítva a fejlődési és növekedési jelek összehangolását.

A jelátviteli molekulák újabban felfedezett csoportját képezik a nitrogén-monoxid (NO) és reakciótermékei, az ún. reaktív nitrogénformák (RNF). A NO mint jelátvivő, jelentős szerepet tölt be a fejlődési folyamatokban, és újabb kutatások igazolják, hogy a NO és reakciótermékei nem specifikus, sokkal inkább általános és multifunkcionális jelemolekuláknak tekinthetők. Stresszválasz során azonban nem csak a RNF töltnek be jelátvivő funkciót, hanem a reaktív oxigénformák (ROF) is hozzájárulnak a morfogenetikai változásokhoz. A NO és ROF között aktív jelátvitel működik és a kutatók legújabb álláspontja szerint nitro-oxidatív stresszről beszélhetünk, mely során a ROF és RNF képződése biotikus vagy abiotikus stresszre indukálódik, és ezek együttesen alakítják ki a makromolekulákat érintő válaszokat (Corpas és Barroso, 2013).

Elsődleges kutatási objektumként a lúdfű, vagyis *Arabidopsis thaliana* L. növény szolgált. Kutatásaim során szelén stressz alkalmazásával, biokémiai és genetikai vizsgálatok segítségével, *in situ* és *in vivo* fény-, fluoreszcens- és konfokális mikroszkópiás módszerekkel tanulmányoztam a ROF és RNF kapcsolatát és kölcsönhatását, valamint szerepüket a sikeres adaptáció és tolerancia folyamatában. További vizsgálatokkal felderítettem szerepüket a stressz-indukálta morfogenetikai válaszok kialakulásában és szabályozásában. A lúdfű, mint modell rendszer mellett biofortifikációs kísérleteket is végeztem egy konyhakerti növény, a borsó (*Pisum sativum* L.) segítségével. A kísérletsorozat kapcsán a szelén kezelés hosszú távú hatását figyelhettem meg a fejlődési paraméterekre és az elemanalízis segítségével tanulmányoztam az új borsószemekben a szelén dúsításának lehetőségét az általam alkalmazott kísérleti rendszerrel. A kétféle kísérleti rendszer alkalmazása nem összehasonlító vizsgálatokra irányult, hanem arra, hogy átfogó képet kaphassak a szelén hatásáról és gyakorlati alkalmazhatóságáról. A rövid távú kísérleti eredmények mellett a hosszú távú alkalmazás eredményeit is bemutatom, végigkísérve a szelén teljes életciklusra kifejtett hatását a borsó növény esetében.

II. Irodalmi áttekintés

II.1. A nitrogén-monoxid (NO)

II.1.1. A NO tulajdonságai

A nitrogén-monoxid (NO) tulajdonságainak és az élő szervezetben betöltött sokrétű biológiai szerepének köszönhetően az élettani kutatások egyik kulcsmolekulája. A nitrogén-monoxid molekulát 1992-ben a *Science* c. tudományos folyóirat az 'Év Molekulájá'-nak nevezte és F. Furchgott, Louis J. Ignarro és Ferid Murad Nobel-díjat is köszönhetnek e molekulával kapcsolatos élettani kutatásaiknak.

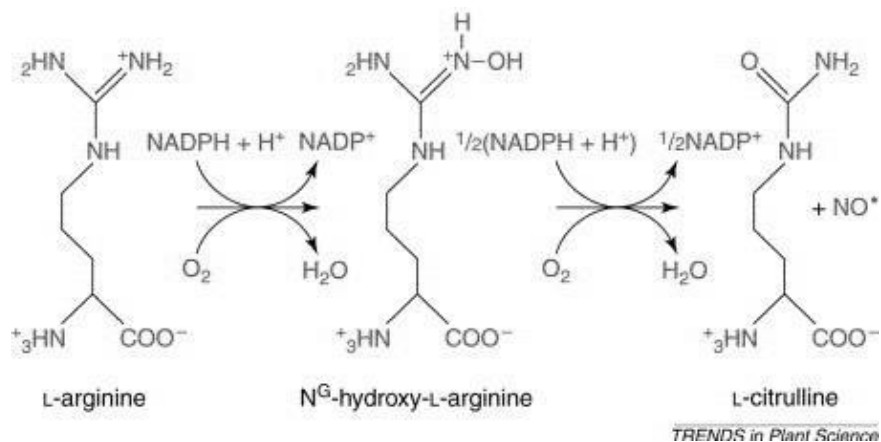
A NO szobahőmérsékleten, atmoszférikus nyomáson egy színtelen, vízben rosszul oldódó gáznemű molekula. Egyik legjellemzőbb kémiai tulajdonsága, hogy nyílt elektron (e^-) szerkezettel rendelkezik, a π pályáján egy párosítatlan elektront tartalmaz. Egy e^- felvételével illetve leadásával energetikailag kedvezőbb szerkezetet tud kialakítani, ezáltal három formája létezik a biológiai rendszerekben: a nitrogén-monoxid gyök (NO^\cdot), a nitrozónium kation (NO^+) és a nitroxil anion (NO^-). Párosítatlan elektronja miatt könnyen reagál molekuláris oxigénnel (O_2), aminek az eredménye a nitrogén-dioxid (NO_2), mely vizes közegben gyorsan nitráttá (NO_3^-) és nitritté (NO_2^-) alakul. Aerob körülmények között szuperoxid gyök anionnal ($\cdot\text{O}_2^-$) vagy hidrogén-peroxiddal (H_2O_2) történő reakciója peroxinitrit (ONOO^-) keletkezéséhez vezet (Stöhr és Ullrich, 2002). A NO szabadgyök tulajdonságokkal is rendelkezik, ám a többi reaktív gyökhöz képest viszonylag hosszú a féléletideje, mely függ saját, illetve célmolekuláinak koncentrációjától. Nagyobb koncentrációban ($< 1 \mu\text{mol/l}$) a NO féléletideje csupán néhány másodperc, ha azonban ez az érték kisebb mint $1 \mu\text{mol/l}$, akkor a féléletideje perces, akár óras nagyságrendű is lehet (Stöhr és Ullrich, 2002). Ezen idő alatt hidrofób tulajdonsága révén könnyen átdiffundál a biológiai membránokon és hosszabb távolságokba is eljuthat sejten belül (Henry és mtsai, 1997), diffúziós sebessége $50 \mu\text{m s}^{-1}$ (Corpas és mtsai, 2007). A molekula S-nitrozilációs folyamatok során kölcsönhat a célfehérjék cisztein aminosavának tiol csoportjával és a reverzibilis reakció során S-nitrozotiol (RSNO) csoport keletkezik. Emellett a NO az S-nitroziláció során képes alacsony molekulású tiolokkal, mint például glutationnal is reakcióba

lépni, létrehozva az S-nitrozoglutationt (GSNO). A GSNO a totál RSNO pool legnagyobb részét képezi és intermedierként fontos szerepet tölt be a NO transzportjában és raktározásában (Kovacs és Lindermayr, 2013), illetve NO donorként is alkalmazható.

II.1.2. A NO szintézise az állati szervezetben

Először Salvador Moncada és mtsai (1987) egy endotélium-kapcsolt relaxációs faktorként (endothelium-derived relaxing factor) határozták meg a NO-ot. Később a kutatók rájöttek, hogy funkciója nem csak az endoteliális sejtekhez kapcsolható, hanem a NO intra- és intercelluláris közvetítő szerepet tölt be a sejtciklus során, továbbá membránok és fehérjék redox központjaiban. A NO a vérben mint a fehérjék S-nitroso formája van jelen, leginkább szérum albumin, hemoglobin vagy alacsony molekulásúlyú S-nitrozotiolként; mint pl. a GSNO (Jia és mtsai, 1996). Az állati szervezetben mégis legfontosabb funkciói a simaizmok relaxációjának jelátvitelében, neurotranszmisszió, sejtburjánzás, apoptózis és fertőzésre adott válaszreakciók során vannak.

Az állati szervezetben a legfontosabb NO képződési mechanizmusért a nitrogén-monoxid szintáz (NOS) enzim (EC 1.14.13.39) felelős, mely a deaminált L-argininből NO és L-citrullin termékeket képez oxigén és NADPH jelenlétében (Nappi és mtsai, 2000) (1. ábra). A NOS enzimek homodimerek, mindkét alegységük egy N-terminális oxigenáz és egy C-terminális reduktáz doménből áll. Az N-terminális oxigenáz domén egy P450 típusú hem centrumot és egy tetrahidrobiopterin (BH₄)-kötő elemet, míg a C-terminális felőli domén flavin-adenin-dinukleotid (FAD)-, és flavin-adenin-mononukleotid (FMN)-kötő, valamint NADPH-kötő helyeket tartalmaz. A két domént egy kalmodulin-kötőhely köti össze. Az enzim szabályozó faktora a kalcium-kalmodulin komplex. Aktivitása kofaktoraitól függ (NADPH, flavin mononukleotid, FAD és BH₄), és jellemzően három izoformáját különböztetik meg: a neuronálist (nNOS), az endoteliálist (eNOS) és az indukálhatót (iNOS) (Durner és Klessig, 1999).



1. ábra: Az emlős NOS által katalizált 2 lépéses reakció (Wendehenne és mtsai, 2001).

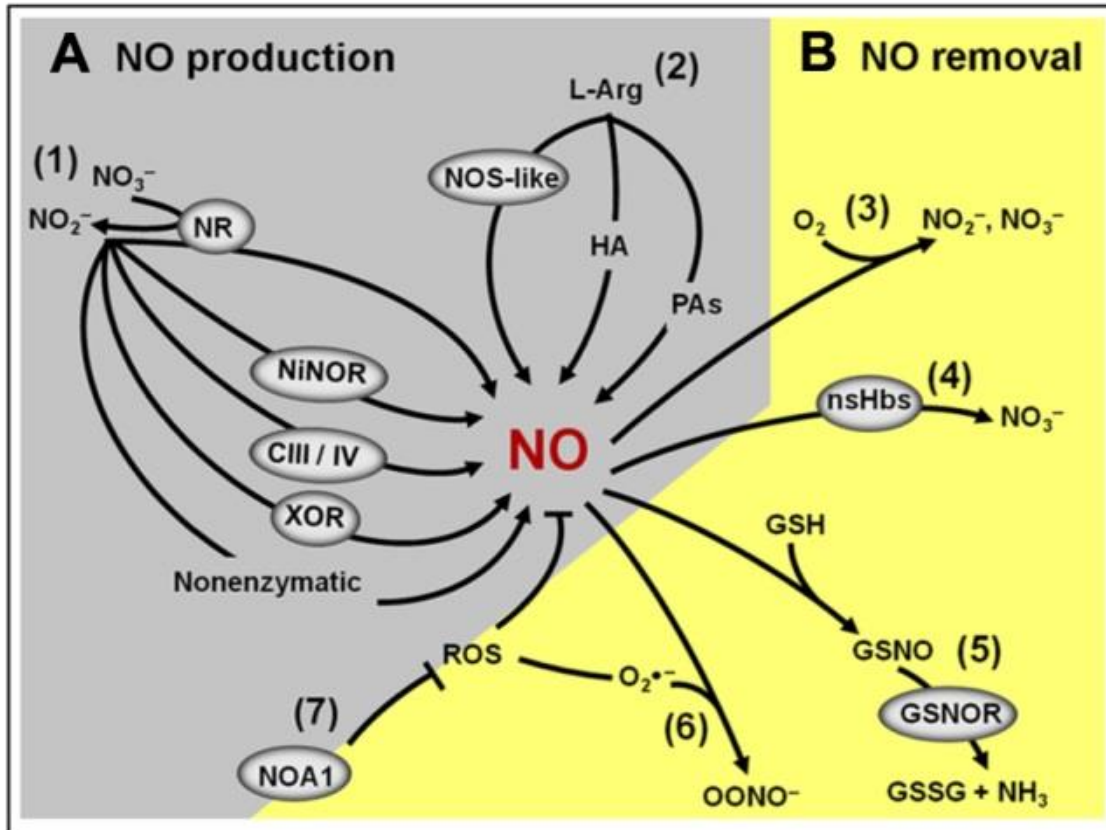
II.1.3. A NO szintézise a növényi szervezetben

A növényekben a NO bioszintézise lényegesen komplexebb folyamat az állatokban leírtaknál, hiszen több enzim részvételével, valamint számos nem enzimaktivitáshoz kötött folyamat során is történhet (Stöhr és Ullrich, 2002) (2. ábra A). Az állatihoz hasonló NOS enzimek létezése máig kérdéses a magasabbrendű növényekben. Guo és mtsai (2003) *Arabidopsis*-ban leírtak egy szekvenciát, ami hasonlóságot mutatott a *Helix pomatia* NOS génjével, ezért AtNOS1-nek nevezték el (*Arabidopsis thaliana* nitric oxide synthase 1) és *Atnos1* T-DNS inszerciós mutánst is létrehoztak, mely csökkent NO produkciót mutatott abszcizinsav (ABS) kezelés hatására. Később ezt a szekvenciát átnevezték AtNOA1-re (*Arabidopsis thaliana* nitric oxide associated 1) (Crawford és mtsai, 2006), amikor bizonyossá vált, hogy nincs NOS aktivitása, ám az is kiderült, hogy ez valójában egy guanozin trifoszfátáz (GTPáz). 2010-ben aztán egy állati NOS génnel 44-45%-os homológiát mutató szekvenciát találtak az *Ostreococcus tauri* nevű primitív algában, és kiderült, hogy a géntermék képes az arginin kötésére és oxidálására (Foresi és mtsai, 2010).

A legfőbb NO-ot szintetizáló enzim aerob körülmények között a gyökérsejtek citoszoljában lokalizált nitrát reduktáz (cNR) enzim. A NR NO képzésben betöltött funkcióját megfigyelték már patogén támadás elleni védekezés során, de szárazság-, hideg stressz, sztóma záródás szabályozása és megannyi fejlődési folyamat során is (Mur és mtsai, 2013). Az NR

enzim (EC 1.6.6.1) elsődleges funkciója, hogy a talajból felvett NO_3^- -ot NO_2^- -té redukálja, azonban NAD(P)H-t elektrondonorként felhasználva képes NO_2^- -ből NO-ot és peroxinitritet is generálni (Wendehenne és mtsai, 2001). A NR homodimer, esetleg tetramer szerkezettel rendelkezik magasabbrendű növényekben. A nitrát reduktáz, mint fehérje viszont változékonynak tekinthető, mivel foszforilálódhat és ezáltal inaktívvá válik, valamint proteolízisen is keresztülmehet. A foszforilációt Ca^{2+} -függő és kétvegyértékű kationok is befolyásolják (Mur és mtsai, 2013). A cNR a levelek plazmamembránjában is megtalálható, de ennek csupán közvetett szerepe van a NO szintézisben. *Arabidopsis thaliana* növényben két gén kódolja a NR enzimet; a NIA1 és NIA2, melyek közül a NIA1 szerepe meghatározó a NO szintézisben. A *nial* mutáns növény ugyan csökkent mennyiségben, de tartalmaz NO-ot, ha a NIA2 gén működőképes. Ezzel szemben a mindkét génben deficiens *nialnia2* duplamutáns *Arabidopsis* NR aktivitása a vad típusénak csupán 1%-a (Wilkinson és Crawford, 1993).

A NO szintézisében résztvevő másik két enzim a nitrit:nitrogén-monoxid reduktáz (Ni:NOR) és a xantin oxidáz/dehidrogenáz (XOR vagy XHD). A Ni:NOR enzim a gyökérsejtek plazmamembránjában található és savas pH-n a plazmamembránhoz kötött NR által felszabadított NO_2^- -et képes *in vivo* módon NO-dá alakítani. A Ni:NOR aktivitása oxigén jelenlétében gátlódik, és ez az enzim *citokróm c*-t használ e^- -donorként (Stöhr és Stremlau, 2006). A peroxiszómában lokalizált XOR NADPH vagy xantin jelenlétében képes a NO_2^- redukciója által NO-ot képezni (Kovacs és Lindermayr, 2013). Továbbá a mitokondriális elektron transzportláncban a végoxidázok (*citokróm c* oxidáz és az alternatív oxidáz) hozzájárulhatnak a NO képződéséhez a nitrit redukálása által (Gupta és mtsai, 2011). A növényi NO képződés további lehetőségei a hidroxilaminok (HA-ok) (Rümer és mtsai, 2009) és a poliaminok (PA-ok) (Tun és mtsai, 2006) oxidációja, bár ezen folyamatok részleteikben még nem ismertek jelenleg.



2. ábra: A NO szintézisének (A) és eltávolításának (B) lehetséges mechanizmusai növényekben (Freschi, 2013). NR: nitrát reduktáz, NOS-like: nitrogén-monoxid szintáz-szerű, HA: hidroxilamin, PAs: poliaminok, NiNOR: nitrit:nitrogén-monoxid reduktáz, XOR: xantin oxidáz/dehidrogenáz, NOA1: nitric oxide associated 1, ROS: reaktív oxigénformák, nsHbs: nem-szimbionta hemoglobink, GSNOR: S-nitrozoglutation reduktáz, NO_2^- : nitrit, NO_3^- : nitrát, GSH: glutation, GSNO: S-nitrozoglutation, GSSG: oxidált glutation, NH_3 : ammónia.

Növényi rendszerekben a NO nem-enzimatis utakon is keletkezhet. Nitrifikációs és denitrifikációs folyamatok melléktermékeként NO képződhet (Wojtaszek, 2000), emellett a NO_2^- karotinoidok által katalizált, nem-enzimatis redukciója fényben szintén NO képződéséhez vezethet. Savas pH-n a NO_2^- spontán NO-dá redukálódik (Stöhr és Ullrich, 2002). Bizonyos pH körülmények között a kloroplasztisban és az apoplasztikus térben, a NO_2^- aszkorbinsav általi redukciója szintén NO, valamint dehidroaszkorbinsav képződését eredményezheti (Henry és mtsai, 1997).

II.1.4. A NO eltávolítási lehetőségei növényekben

A növényi szervezetben optimális körülmények között a NO szintje egyensúlyban van, ám bizonyos körülmények hatására szintje toxikus koncentrációt érhet el, így szükséges lehet a NO többlet eltávolítása. Emellett jelátviteli funkciójának betöltéséhez is alacsony koncentrációra van szükség, ezért a növények különböző eltávolítási mechanizmusokat dolgoztak ki a NO szintjének csökkentésére (2. ábra B). Ezen mechanizmusok közé tartozik az oxigénnel végbemenő reakciója, mely során nitrit és nitrát jön létre; vagy a reaktív oxigénformákkal (ROF) történő reakciója. A kölcsönhatás egy jó példája a NO szuperoxid gyök anionnal (O_2^-) való reakcióba lépése, mely során peroxinitrit (ONOO^-) keletkezik.

A glutationnal (GSH) történő oxidáció során képzett GSNO szintén a NO endogén szintjét kontrollálja. A GSNO-t a GSNO reduktáz (GSNOR) enzim oxidált glutationná (GSSG) és ammóniává (NH_3^+) alakítja tovább (Wilson és mtsai, 2008), így csökkentve az endogén NO, illetve RNF szintjét. A glutation-függő formaldehid dehidrogenáz enzim (GS-FDH, EC 1.2.1.1.) vagy más néven 3-as osztályú alkohol dehidrogenáz reverzibilisen katalizálja a NAD^+ -függő S-formilglutacion képződését S-hidroximetilglutacionból, mely reakció spontán végbemegy a formaldehid és a glutacion között (Sakamoto és mtsai, 2002). *Arabidopsis*-ban az alkohol-dehidrogenáz-3 génről kiderült, hogy GSNO reduktáz aktivitással rendelkezik (AtGSNOR1; At5g43940) (Feechan és mtsai, 2005). A gén mutációja (*gsnor1-3 Arabidopsis*) magasabb nitrozotiol és NO szintet, illetve több S-nitrozilált fehérjét eredményez, tehát az enzim közvetve S-nitrozilációval szabályozza a NO szintjét (Mur és mtsai, 2013, Feechan és mtsai, 2005).

A NO szint csökkenése mögött a nem-szimbióta hemoglobinok (nsHb) direkt oxidáción keresztül megvalósuló regulátor hatása is állhat. A növényi hemoglobinok fontos szabályozó szerepet töltenek be a NO homeosztázis fenntartásában és a NO hatásainak kontrollálásában: stressz esetén hozzájárulhatnak nagy mennyiségű NO felszabadulásához (Dordas és mtsai, 2003), illetve helyi és hosszú távú NO szállítóként is funkcionálhatnak (Arredondo-Peter és mtsai, 1998), ugyanakkor képesek a káros mennyiségben felhalmozódott NO-ot nitráttá alakítva eliminálni a rendszerből (Perazzoli és mtsai, 2006).

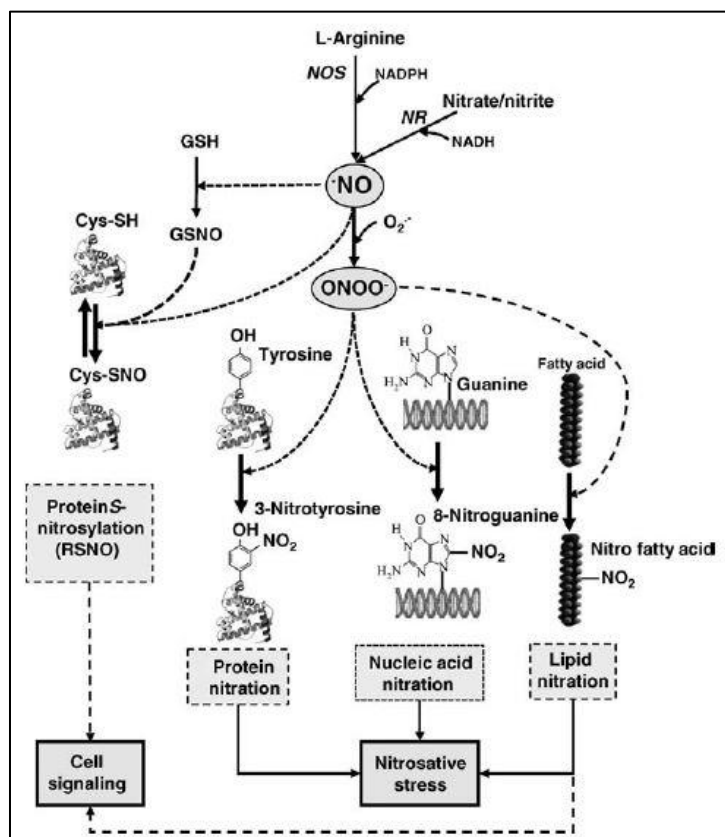
II.1.5. A NO jelátvittele a növényi szervezetben

A nitrogén-monoxid a növényi szervezetben két ellentétes hatásmechanizmussal rendelkezik, hiszen, ha túl magas a sejten belüli koncentrációja az sejtkárosodást tud előidézni, alacsony koncentráció esetén azonban jelátviteli molekulaként viselkedik és számos fiziológiai folyamatban részt vesz. A NO és származékai, mint a peroxinitrit (ONOO^-), dinitrogén-trioxid (N_2O_3), S-nitrozoglutation (GSNO) vagy a nitrozónium kation (NO^+), reaktív nitrogénformák (RNF) név alatt csoportosíthatók. A RNF felszaporodása DNS, lipid és fehérje károsodáshoz vezethet, mely végső soron sejthalált válthat ki (Corpas és mtsai, 2007), ám például a NO és ONOO^- saját jelátviteli úttal rendelkezik. Egy jelátviteli molekulának gyorsan és hatékonyan kell képződnie és eliminálnia a rendszerből, valamint mozognia a sejtek között és a sejten belül. A NO ezen kritériumoknak megfelel és a viszonylag hosszú féléletideje (3-6 s) is alkalmassá teszi jel továbbítására, továbbá képes más jelmolekulákkal reagálni és így jelátviteli utakat befolyásolni.

Állati rendszerekben a NO jelátvittele vagy cGMP-től (ciklikus guanozin monofoszfát) függően, vagy attól független úton történik, hiszen a NO egyik fő célpontja a citoszolikus vagy szolubilis guanilát cikláz (sGC). A NO az enzim hem vasával lép reakcióba, ami konformációs és aktivitásbeli változást okoz (Martí és mtsai, 2005). A GC aktivitás fokozódása révén cGMP képződik, mely további downstream elemeket (pl. cGMP-függő protein kinázokat, ciklikus nukleotid kapuzó ioncsatornákat) aktivál. A növények több életfolyamatában felismerték a cGMP jelátvivő szerepét. Többek között a pollentömlő növekedése, a járulékos gyökérfejlődés, valamint az ABS-indukált sztómazáródás bizonyult NO és cGMP által szabályozott folyamatnak (Prado és mtsai, 2004; Pagnussat és mtsai, 2003; Neill és mtsai, 2008).

A cGMP-független szignalizáció során az NO jel érzékelése NO-függő posztranzlációs módosulások révén valósul meg, melyeknek 3 típusa ismeretes a növényi szervezetben (Astier és Lindermayr, 2012) (3. ábra). Az **S-nitroziláció** a NO reverzibilis reakciója fehérjék cisztein aminosavának tiol (SH) csoportjával, melynek eredményeképpen S-nitrozotiol (-SNO) csoport képződik. A fehérje sejten belüli lokalizációja és a NO aktuális koncentrációja határozza meg, hogy mely fehérje szenved nitrozilációt. Egy fehérjén belül nem az összes cisztein nitrozilálódik, ezért ezt a reakciót specifikusnak tekinthetjük. Növényekben eddig kb. 100 db S-nitrozilációra

hajlamos fehérjét azonosítottak (Lindermayr és mtsai, 2005). Egy másik, NO jel érzékelésére alkalmas poszttranszlációs módosulás a **fehérje tirozin nitráció**. A reakció során a célfehérje tirozin aminosavának *orto* helyzetű szénatomjára egy nitro csoport (-NO₂) kapcsolódik, így a fehérje szerkezete és aktivitása módosul (Schopfer és mtsai, 2003). A legtöbb esetben a fehérje aktivitása gátlódik, de előfordulhat aktivitás fokozódás is, vagy olyan eset is, amikor a protein működése nem módosul a nitráció következtében (Corpas és mtsai, 2013). A **fehérjék nitrációját** kimutatták egészséges, kontroll borsó növényekben és különböző biotikus (pl. penészgomba fertőzés) és abiotikus stressznek (pl. só, vízhiány, hideg) kitett növényekben egyaránt (Corpas és mtsai, 2008; Tanou és mtsai, 2012; Valderrama és mtsai, 2007; Signorelli és mtsai, 2013).



3. ábra: A NO és más RNF által előidézett biomolekula módosítási folyamatok, melyek jelátviteli utak, illetve a nitrozatív stressz komponensei (Hayat és mtsai, 2010). GSH: glutation, GSNO: S-nitrozoglutation, cisz-tiol, cisz-S-nitrozilált NO, fehérje S-nitroziláció, jelátvitel. L-arginin, NOS: nitrogén-monoxid szintáz, NADPH, NR: nitrát redukáz, nitrogén-monoxid gyök, O₂⁻: szuperoxid gyök anion, ONOO⁻: peroxinitrit, nitrotirozin, fehérje nitráció, nitrozatív stressz. ONOO⁻: peroxinitrit, guanin, 8-nitroguanin, NO₂: nitrogén-dioxid, nukleinsav nitráció, nitrozatív stressz. ONOO⁻: peroxinitrit, zsírsav, nitro zsírsav, NO₂: nitrogén-dioxid, lipid nitráció, nitrozatív stressz, jelátvitel.

II.1.6. A NO, mint a növényi stresszválaszok és fejlődési folyamatok szabályozója

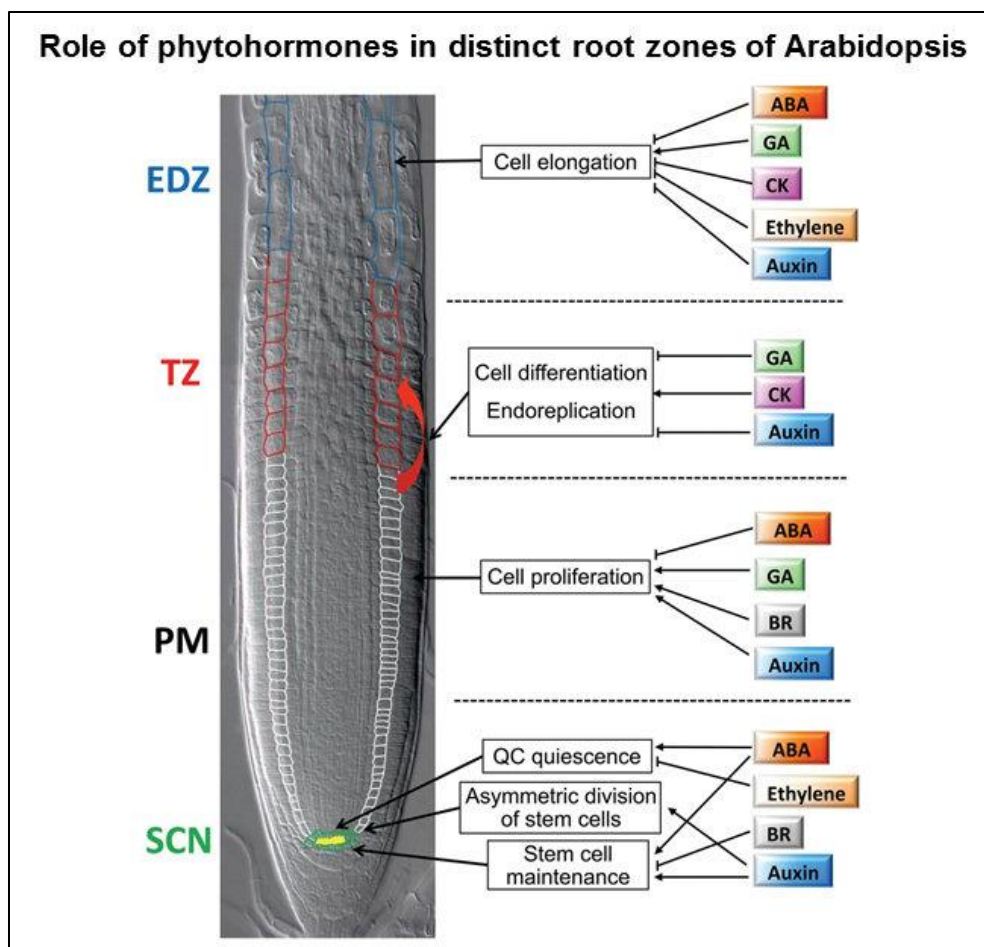
A NO kiemelkedő helyet foglal el a növénybiológiában tulajdonságainak és a növények növekedésében és fejlődésében betöltött sokrétű szerepének köszönhetően. Az elmúlt 4 évtizedben a NO szerepét számos **abiotikus és biotikus stressz** során felismerték. Nagy koncentrációban a DNS, lipidek és fehérjék károsodását idézik elő, és ún. nitrozatív stressz kialakulásához vezetnek (Valderrama és mtsai, 2007). Alacsonyabb koncentrációban a NO a legtöbb stressz ellen védő szerepet tölt be, és a sokrétű funkciójára **kiváló példa a nehézfém terhelés**. A NO védő funkciója egyrészt abban nyilvánul meg, hogy hozzájárul az antioxidánsok aktivitásának (pl. SOD, APX, KAT, stb.) illetve mennyiségének (pl. GSH) növekedéséhez, és közvetlenül is reakcióba lép ROF-kal, így az oxidatív stressz mértékét csökkenti. Ezek mellett redukálja a fémfelvételt, a sejtfal összetételének megváltoztatása révén, illetve a transzspiráció csökkentése nyomán. Továbbá tolerancia-kapcsolt gének (pl. prolin, glutation bioszintézis gének) kifejeződését is regulálja a fém kezelt növényekben (Xiong és mtsai, 2010). A NO **biotikus stresszhatások** során betöltött szerepe igen aktívan tanulmányozott terület. A kompatibilis gazda-patogén kapcsolatok során a RNF/NO túlsúlya nitrozatív stresszhez, és végső soron a gazdanövény halálához vezet (Delledonne és mtsai, 1998). Inkompatibilis kapcsolat esetén a NO ROF-kal együttműködve részt vesz a hiperszenzitív reakcióban (HR), illetve a szalicilsavval kölcsönösen pozitív kooperációban a szisztémikus szerzett rezisztencia kialakításában (Alvarez, 2000).

A növények által termelt NO egyedül, vagy más hormonokkal, illetve jelátvivőkkel közösen részt vesz a sejt differenciáció, lignifikáció, gyökér és hajtás **fejlődés**, virágzás, szenescencia és apoptózis szabályozásában (Planchet és Kaiser, 2006). Számos korai tanulmányban kimutatták, hogy a **csírázás** során a magban képződő NO megszakítja a nyugalmi állapotot és elősegíti a csírázási folyamatot (Giba és mtsai, 1998; Beligni és Lamattina, 2000). A NO **hipokotil- és internódusz megnyúlásra** gyakorolt hatásának vizsgálata során azt tapasztalták, hogy a NO donorok gátolták a növekedést, elősegítették a de-etiolációt és megnövelték a klorofill tartalmat burgonya, saláta és lúdfű növényekben (Beligni és Lamattina, 2000). A NO **klorofill tartalomra** gyakorolt pozitív hatásából arra következtethetünk, hogy ennek a molekulának szerepe van a vas homeosztázis szabályozásában. A ferritin

expressziójának fokozódását figyelték meg egyes NO donorok hatására, valamint megállapították, hogy a NO egy esszenciális faktora a vas többlet által kiváltott ferritin indukciónak (Grün és mtsai, 2006). A NO koncentrációjától függő módon hat a **hajtás fejlődésére**, hiszen alacsony koncentrációban elősegíti, nagyobb mennyiségben viszont gátolja azt paradicsom, lúdfű, borsó és saláta növényekben (Beligni és Lamattina, 2000; He és mtsai, 2004). A NO a **gyökér fejlődési folyamataiban** is egy alapvető szabályozó faktornak bizonyult, hiszen részt vesz a főgyökér megnyúlásának, az oldalgyökerek és a gyökérszőrök fejlődésének szabályozásában (Pagnussat és mtsai, 2002; Correa-Aragunde és mtsai, 2004; Lombardo és mtsai, 2006). Ezeken kívül a járulékos gyökerek képződésének és a gravitropikus növekedési válasznak is szabályozója a NO (Pagnussat és mtsai, 2003; Hu és mtsai, 2005). A fejlődés végső stádiuma a **szeneszcencia**, melynek késleltetésében szerepet játszik a NO. A gyümölcsérés egy etilén által szabályozott öregedési folyamat, mely késleltethető NO kezeléssel, így a gyümölcsök/zöldségek szüretelést követő eltarthatósága fokozható (Leshem és Pinchasov, 2000).

II.2. A nitrogén-monoxid interakciója hormonokkal a gyökér fejlődése során

Helyhez kötött élőlényként, a növényeknek szükségük van egy kifinomult jelátviteli mechanizmusra annak érdekében, hogy alkalmazkodni tudjanak a környezet változásaihoz. Ezen folyamatban kulcsszerepük van a fitohormonoknak, melyek egymással, illetve más endogén kémiai anyagokkal, pl. jelátviteli molekulákkal lépnek interakcióba (Santner és mtsai, 2009). A gyökér fejlődése kapcsán a NO fitohormonokkal való kölcsönhatása jól szemléltethető, hiszen ez az élettani folyamat a hormon- és a jelátviteli rendszer szoros együttműködését igényli, és a szabályozásban résztvevő hormonok mindegyikével képes a NO reakcióba lépni (4. ábra).



4. ábra: A fitohormonok szerepe az *Arabidopsis* különböző gyökér zónáiban (Takatsuka és Umeda, 2014). SCN: stem cell niche, PM: proximális merisztéma, TZ: tranzíciós zóna, EDZ: elongációs/differenciációs zóna, ABS: abszcizinsav, GA: gibberellin, CK: citokinin, BR: brassinoszteroid.

A gyökér fejlődését reguláló hormonok közül az **auxin, etilén és citokinin** vizsgálatára és ezek NO-dal való kölcsönhatásainak tanulmányozására helyeztem a hangsúlyt a munkám során. Az **auxin** a növényi növekedés fő szabályozójaként különös jelentőséggel bír a gyökér fejlődési folyamatai során, mint pl. az oldalgökér (OGY) iniciáció, a főgyökér (FGY) megnyúlás, a gyökérszőr képződés vagy a gravitropikus görbülés (Vanneste és Friml, 2009). A poláris auxin transzport (PAT) egy szigorúan szabályozott és irányított, növény-specifikus folyamat, mely a gyökérnövekedést lehetővé tevő ún. auxin grádiens hozza létre (Mravec és mtsai, 2008). Ez az irányított, intercelluláris auxin szállítás precízen lokalizált és szabályozott influx és efflux transzporter molekulák révén valósul meg. Az AUX1/LAX az indol-3-ecetsav (IES) sejtbe történő felvételéért felelős influx fehérje. A sejtből kifelé irányuló auxin

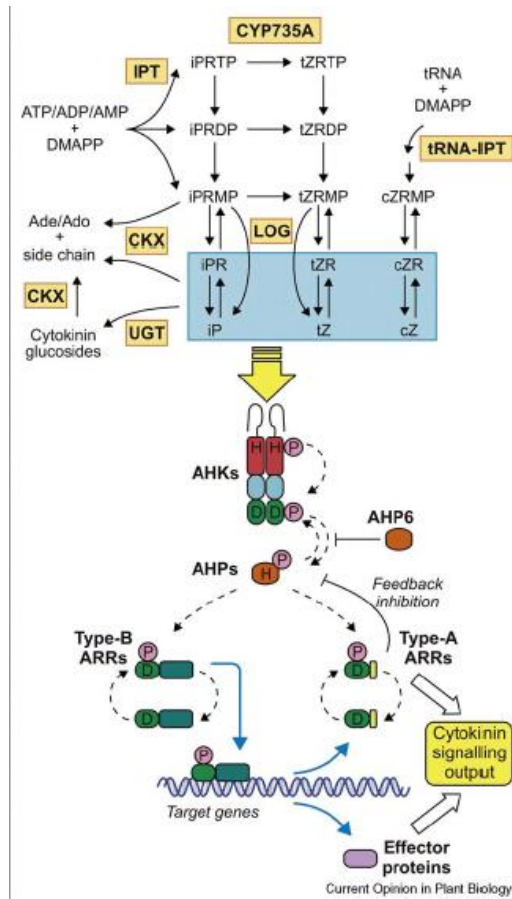
transzportban a szállítómolekulák két csoportja vesz részt: PIN-FORMED (PIN) fehérjék és különböző ABC transzporter-szerű foszfolipoproteinek (PGP) (Geisler és Murphy, 2006).

Néhány korai közleményben kimutatták a nitrogén-monoxid jelmolekula részvételét az előzőekben említett, auxin által szabályozott gyökérfejlődési folyamatokban (Pagnussat és mtsai, 2002; 2003; Lanteri és mtsai, 2006; Hu és mtsai, 2005; Pii és mtsai, 2007). Például kukorica gyökér szegmenseknél megfigyelték, hogy mind az auxin, mind pedig a NO a gyökércsúcs megnyúlását idézte elő, vagyis ez esetben a NO donor helyettesítette az auxin funkcióját (Gouvêa és mtsai, 1997). Az is bizonyítást nyert, hogy a NO jelenléte szükséges a gyökér primordiumok iniciációjához (Kolbert és mtsai, 2008). A NO szint tranziens növekedését figyelték meg JGY és OGY képződés során uborka, paradicsom és lúdfű növényekben, melyet az auxin indukált. Később arra is fény derült, hogy nemcsak az auxin váltja ki a NO képződését, hanem a NO megemelkedett szintje is befolyásolja a gyökércsúcs auxin szintjét (Fernández-Marcos és mtsai, 2011; Pagnussat és mtsai, 2004; Correa-Aragunde és mtsai, 2006). A NO gyökérfogó, a 2-(4-karboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolin-1-oxid-3-oxid kálium só (cPTIO) alkalmazásával kivédhető volt az auxin-indukálta járulékos- és oldalgyökér képződés, a gyökérszőr képződés és a gravitropikus válasz, mely a NO jelenlétének szükségességét jelzi ezekben a folyamatokban (Terrile és mtsai, 2012). A magas auxin koncentráció átmeneti NO szint növekedést okoz, ami az auxin TIR1 receptorát S-nitrozilálhatja. Ez a poszttranszlációs módosítás az auxin-függő génextpresszió megváltozásához vezet (Terrile és mtsai, 2012). A legújabb bizonyítékok pedig arra utalnak, hogy jelmolekulák, mint pl. a NO, képesek szabályozni a PAT-ban résztvevő szállítómolekulák aktivitását, lokalizációját és mennyiségét. Azonban mindössze egy jelentős publikáció foglalkozik a NO és a PAT közötti kapcsolat vizsgálatával. Ebben a munkában a NO-túltermelő *nox1/cue1 Arabidopsis* mutánsban jelentősen gátolt akropetális auxin transzportot mutattak ki (Fernández-Marcos és mtsai, 2011). A NO hiánya esetén (*atnoal* mutáns) a gyökércsúcs felé irányuló auxin szállítás fokozódott, ami a NO poláris auxin transzportra gyakorolt negatív hatását támasztja alá. Továbbá csökkent fluoreszcenciát detektáltak a PIN1:PIN1:GFP konstrukciót hordozó *nox1/cue1* gyökerekben, valamint NO-kezelt vad típusú növényekben. Érdekes módon azonban a PIN2:PIN2:GFP fúzió fluoreszcenciáját a megnövelt NO tartalom nem befolyásolta. Fernández-Marcos és munkatársai (2011) eredményei bizonyítják a NO akropetális auxin transzportra gyakorolt specifikus hatását, mely a PIN1 fehérje szintjének változásán keresztül érvényesül.

A gyökérzet fejlődését befolyásoló másik hormon az **etilén**, egy gáznemű messenger. A fokozott etilén jelátvitel olyan változásokat idéz elő, mint a gyümölcsérés, levelek és virágok szeneszenciája vagy a csíranövény hármás válasza (Lin és mtsai, 2009). *Arabidopsis* gyökerének nyugalmi centrumában (QC) az etilén elősegíti a sejtosztódást, amit az etilén-túltermelő *eto1* mutáns QC sejtjeinek számfeletti sejtosztódásai bizonyítanak. A *CTR1* (*CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1*) mutáns - melyben az etilén jelátvitel folyamatosan zajlik- szintén mutatja az *eto1* fenotípusát. Ezek alapján elmondható, hogy az etilén olyan jelátviteli hálózatok tagja, melyek a QC mitotikus aktivitásának kialakításáért felelősek a posztembrionális gyökérfejlődés során (Takatsuka és Umeda, 2014). Az etilén a levél, virág és termés szeneszenciájáért felelős hormonnaként ismert, míg a NO az aktív növekedésben és a szeneszencia késleltetésében vesz részt. A fiatal növények magas NO szintet mutatnak, mely az öregedés során fokozatosan csökken, míg az etilén koncentrációja egyre nő, tehát kettejük között egy antagonista kapcsolat áll fenn (Leshem és mtsai, 1998). Ennek egyik bizonyítéka, hogy a NO képes az etilén emisszióját csökkenteni szintézisének befolyásolásával, méghozzá az 1-aminociklopropán karboxilsav oxidáz (ACO) downregulációja révén, mely az etilén szintézis utolsó lépését katalizálja (Simontacchi és mtsai, 2013). Emellett a NO csökkenti az ACC szintáz (1-aminociklopropán karboxil sav) aktivitását is, és az enzimet S-nitroziláció révén is módosíthatja. Az etilén bioszintézis prekursorára, az S-adenozil metioninra (SAM) is negatív hatással lehet a NO, csak úgy mint a metilmetionin ciklus enzimeire (pl. metionin szintáz-MET, metionin adenozil transzferáz-MAT), melyek aktivitása felelős a homociszteináz, a metionin és a SAM képződéséért. Ezen elemek is S-nitrozilálódhatnak. Az etilén szintézise tehát bizonyítottan erőteljesen NO-szabályozott (Freschi, 2013).

A citokininek (CK) szintén létfontosságú szerepet töltenek be a gyökér struktúra kialakításában és növekedésében, bár az auxinnal ellentétben, negatívan befolyásolják azt (Kuderová és mtsai, 2008). A *de novo* szintézis, katabolizmus, influx és efflux, továbbá a konjugátumok képződése és lebomlása a CK biológiai aktivitásának fontos regulátor folyamatai. A citokinineknek négy típusát különböztetik meg növényekben: ezek a transz-zeatin (tZ), N⁶-adenin (iP), cisz-zeatin (cZ) és a dehidrozeatin (DZ) (Mok és Mok, 2001). *Arabidopsis*-ban a citokinin jelátviteli mechanizmusa különböző stressz- és tápanyag válaszokat mediál pl. ozmotikus stressz, nitrát érzékelés és asszimiláció, szulfát és foszfát asszimiláció vagy vas felvétel kapcsán (Werner és Schmölling, 2009).

A CK bioszintézis (5. ábra) kezdő lépéseit az adenzin foszfát-izopentiltranszferáz (IPT) katalizálja, dimetilallil-difoszfátot (DMAPP) és adenzin-5'-difoszfátot (ADP) vagy adenzin-5'-trifoszfátot (ATP) felhasználva. A reakció során iP-ribozidok keletkeznek, melyek tZ-ribozidokká való átalakítását a citokróm P450 mono-oxigenáz (CYP735A1, CYP735A2) végzi (Takei és mtsai, 2004b). Az iP-, tZ-, és cZ-ribozid 5'-monofoszfát aktív formává történő átalakítása két útvonalon mehet végbe. Az egyik útvonalon a LOG gén (lonely guy) aktiválásával citokinin ribozid 5'-monofoszfátot a citokinin nukleozid 5'-monofoszfát foszforibohidroláz konvertálja át citokininné (Kurakawa és mtsai, 2007). Egy másik útvonalon a ribotidok riboziddá defoszforilálódnak, majd CK-né alakulnak (Chen és Kristopeit, 1981a, 1981b), azonban a folyamatban résztvevő géneket még nem azonosították. A CK-ek inaktivációja konjugáció vagy a citokinin oxidáz/dehidrogenáz (CKX) által katalizált degradáció révén valósulhat meg (Galuszka és mtsai, 2001; Schmölling és mtsai, 2003). Ezen degradációs útvonalaknak fontos szerepük van a CK aktivitásának szabályozásában (Werner és mtsai, 2001; 2003; Ashikari és mtsai, 2005). A CKX enzimek a CK-t oxidatív oldallánc hasítással degradálják. *Arabidopsis*-ban eddig 7 CKX gént azonosítottak, melyek megváltozott expressziója növekedésbeli változást okoz. Mindez arra utal, hogy a CK-eknek fontos szabályozó szerepe van a sejtciklusban, befolyásolva a sejtkepzés sebességét és a sejt differenciációt a merisztémákban és a képződő szervekben (Werner és mtsai, 2001).



5. ábra: A citokinin metabolizmusának és szignalizációjának sematikus modellje (Werner és Schmülling, 2009): citokrom P450 mono-oxigenáz (CYP735A1, CYP735A2), IPT: izopentenil-transzferáz, tRNS-IPT, CKX: citokinin oxidáz/dehidrogenáz, LOG: lonely guy, UGT: glikozil-transzferáz, AHK: *Arabidopsis* hisztidin kináz, AHP: *Arabidopsis* hisztidin foszfotranszfer protein, ARR: *Arabidopsis* válasz regulátor (A- és B-típusú), effektor proteinek, citokinin jelátvitel.

Arabidopsis-ban a CK jel érzékelését és jelátvitelét (5. ábra) egy kétkomponensű szabályozó rendszer végzi (two-component signalling pathway; TCS). A CK jelátvitelével kapcsolatos ismeretek megszerzését az *Arabidopsis* CK receptorok (*Arabidopsis* hisztidin kinázok; AHKs: CRE1/AHK4, AHK2 és AHK3), a downstream transzmitterek (*Arabidopsis* hisztidin foszfotranszfer proteinek; AHPs) és az *Arabidopsis* válasz regulátorok (A- vagy B-típusú ARR-ok; *Arabidopsis* response regulators) felfedezése tette lehetővé (5. ábra). Az AHK2 és AHK3 CK receptor gének jelen vannak a főbb szervekben, bár a CRE1/AHK4 jobbára csak a gyökérben fejeződik ki, de valamennyi receptor génre igaz, hogy a fejlődés különböző szakaszaiban eltér az expressziójuk. (Heyl és Schmülling, 2003).

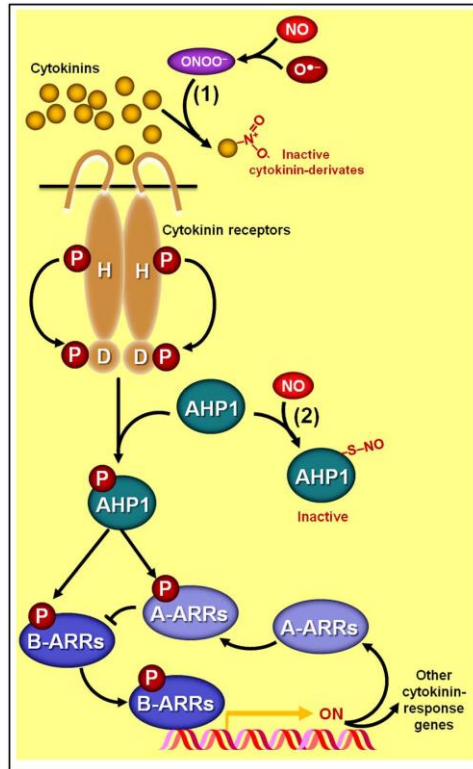
A régi hipotézissel ellentétben, mely szerint a CK-ek csak a gyökérben szintetizálódnak és xilém transzporttal kerülnek fel a hajtásba, az új kutatási eredmények azt mutatják, hogy a CK-ek nemcsak a gyökérben, hanem a növény különböző szerveiben is képződhetnek. Habár *Arabidopsis*-ban az IPT gének számos szervben expresszálódnak – pl. levelekben, szárban, virágokban, gyökerekben (Miyawaki és mtsai, 2004; Takei és mtsai, 2004a), addig a CYP735A gének főként a gyökerekben fejeződnek ki (Takei és mtsai, 2004b).

A CK-ek mobilis hormonok, ezért valószínűleg létezik egy olyan export-import rendszer, ami a plazmamembránon keresztüli szállítását végzi (Cedzich és mtsai, 2008). Jelenleg két transzporter családról feltételezik, hogy részt vesz a hormon szállításában: a purin permeáz (PUP), és az equilibratív nukleozid (ENT) transzporter család. A citokininek hosszú távú transzlokációja xilém és floém elemeken keresztül valósulhat meg. A xilémnedvben főként a citokinin tZR formája, még a floém elemekben a legfőbb iP-típusú citokininek, az iPR-ek és iP-ribotidok fordulnak elő. A citokininek xilém elemeken keresztüli transzportját környezeti és endogén szignálok egyaránt befolyásolják. Árpában (Samuelson és mtsai, 1992) és kukoricában (Takei és mtsai, 2001) is megfigyelték, hogy a nitrát ellátottság jelentősen megnövelte a xilém nedv tZ tartalmát, mely arra utal, hogy a tZ messengerként részt vesz a nitrát érzékelése során.

A CK-ek a hajtásban és a kalluszban elősegítik a sejtosztódást, amiért három D3-típusú ciklin felelős: a CYCD3;1, a CYCD3;2 és a CYCD3;3. A legfőbb célpontja a CK-eknek ezek közül a CYCD3;1, mely indukálódik CK hatására és kallusz képződését idézi elő *Arabidopsis* levélen külső citokinin kezelés nélkül. Gyökérben a citokininek elsődlegesen a TZ sejtjeinek differenciálódását segítik elő, viszont drasztikusan csökkentik a sejtosztódási rátát a merisztematikus zónában (Ioio és mtsai, 2007). Valószínűleg az AHK-ok és B-típusú ARR-ok szabályozzák a CK jelátvitelét a proximális merisztémában (Takatsuka és Umeda, 2014).

Az utóbbi években egyre több tanulmány igazolja a CK és a NO közötti komplex és több szinten működő kapcsolatot. Növényfajtól és élettani válaszoktól függően mind szinergista, mind antagonist interakciók is megfigyelhetők (Freschi, 2013). Az első megfigyelés, mely szerint a NO-nak szerepe van a CK szignalizációjában *Amaranthus caudatus* növények betalain termelését vizsgáló kísérletből származik. Nem csak a citokinin, hanem a NO donorok is kiváltották a pigment akkumulációját, és a citokinin által indukált folyamatban a NO szükséges regulátornak bizonyult (Scherer és Holk, 2000). Pozitív kapcsolat áll fenn a CK és a NO között a

levél szenescencia szabályozásában, a fotoszintézisben, a programozott sejthalálban, a differenciációban és a sejtosztódásban (Mishina és mtsai, 2007; Carimi és mtsai, 2005; Shen és mtsai, 2012). Ez utóbbi folyamatban a NO hiánya a CYCD3;1 transzkripció gátlásához vezetett, amiből arra lehet következtetni, hogy a NO a CK jelátvitel downstream elemeként a CYCD3;1 aktivációján keresztül hat a sejtciklusra (Shen és mtsai, 2012). Ezekkel ellentétben a két molekula közötti antagonistika kapcsolatát figyeltek meg módosított CK szintet tartalmazó dohány növényekben (Wilhelmová és mtsai, 2006). A közelmúltban bizonyítást nyert, hogy néhány CK típus, mint például a zeatin, reakcióba tud lépni NO-dal vagy annak származékával, pl. a ONOO⁻-tel, és az interakció során inaktív citokinin származékok keletkeznek. A CK adenin csoportjának nitrációja által a NO endogén szintje csökken, tehát a CK-eknek védő szerepe lehet a nitrozatív stresszel szemben (Liu és mtsai, 2013) (6. ábra). Ezenfelül a NO negatív hatással lehet a citokinin jelátvitelre is az AHP1 S-nitrozilációjával, amely kulcseleme a citokinin szignáltranszdukció többlépcsős foszforilációs mechanizmusának (Feng és mtsai, 2013). Habár számos tanulmány igazolta, hogy az exogén CK kezelés koncentrációfüggő módon NO termelést eredményez sejtkultúrákban és csíranövényekben (Tun és mtsai, 2001, 2008; Carimi és mtsai, 2005; Shen és mtsai, 2012), ellentétes eredmények is megjelentek mutáns vagy transzgenikus növényekről, melyek módosított CK tartalommal rendelkeztek vagy külső CK kezelést kaptak (Xiao-Ping és Xi-Gui, 2006; Romanov és mtsai, 2008; Liu és mtsai, 2013).



6. ábra: NO-CK közötti interakciók sematikus ábrája (Freschi, 2013). Citokininek, ONOO⁻: peroxinitrit, NO: nitrogén-monoxid, O₂⁻: szuperoxid gyök anion, inaktív citokinin származékok, citokinin receptorok, AHP1: *Arabidopsis* hisztidin foszfortranszfer protein 1, BARRs: B-típusú *Arabidopsis* válasz regulátorok, A-ARRs: A-típusú *Arabidopsis* válasz regulátorok, egyéb citokinin válaszgének.

II.3. A jelátviteli molekulák és hormonok kapcsolata a szelén stressz indukált morfogenetikai válaszban

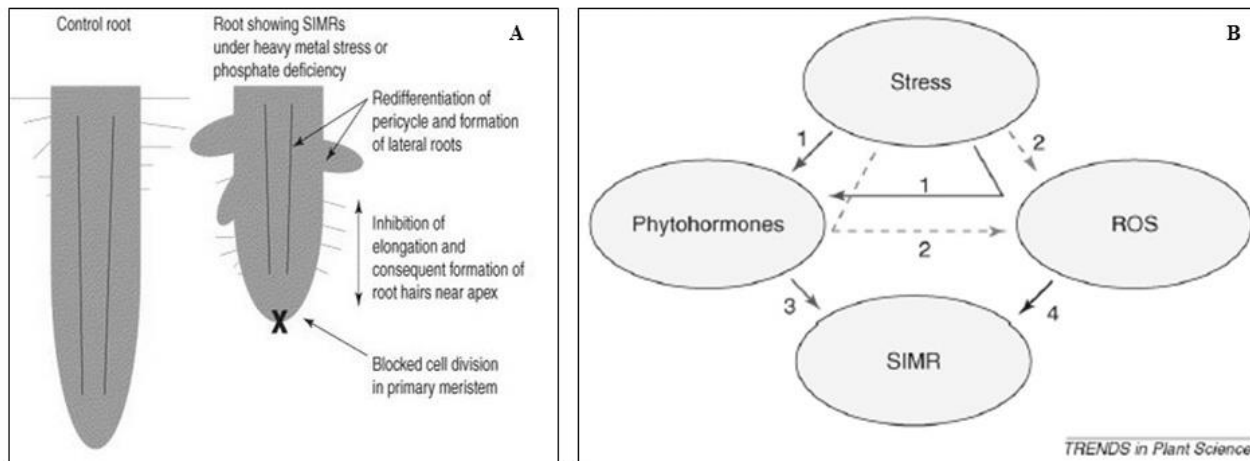
Stresszhelyzetben a jelátvivő molekulák (pl. NO) és fitohormonok (pl. citokininek) kölcsönhatásai számos növekedést gátló vagy aktiváló reakciót idéznek elő, és képesek stressz indukált morfogenetikai válaszok (SIMV) kialakítására a növény jobb túlélése érdekében. Ez a stratégia megfelel az állatoknál leírt 'fight-or-flight' jelenségnek, de mivel a növények helyhez kötöttek növekedésük újraprogramozása jelenti a 'flight' választ (Potters és mtsai, 2007; 2009).

A SIMV abiotikus stressz során tipikus gyökér fenotípust alakít ki: a gyökér elongációja gátlódik, ezáltal a gyökér rövidül, a gyökérszőrök közelebb jelennek meg a csúcshoz és több oldalgyökér képződik (7. ábra A) (Potters és mtsai, 2007). Pető és mtsai (2011) pl. réz

kezelésnek kitett *Arabidopsis* növényekben figyelték meg ezeket a morfológiai változásokat. A réz hatásán kívül az ólom, a cink, és a kadmium kolibrifa fajokban, a króm többlete pedig búzában okozta a morfogenetikai válasz megjelentését (Hasnain és Sabri, 1997; Yang és mtsai, 2004).

A SIMV kialakulásának legfőbb háttér mechanizmusaként elsőként a fitohormonok, legfőképp az auxin szintjében és eloszlásában bekövetkező változásokat azonosították (Potters és mtsai, 2007) (7. ábra B). A stresszhatások az auxin homeosztázisának több folyamatát is érinthetik. Hatással lehetnek az auxin eloszlására a transzportjának (pl. a PIN gének expressziójának vagy az apoplastikus pH-nak) a megváltoztatása révén, vagy a stabilitására az auxint bontó peroxidázok aktivitásának szabályozása révén (Reinhardt és mtsai, 2003; Casimiro és mtsai, 2003). Az auxin mellett az etilén SIMV-ban való részvételének lehetősége is felmerült, hiszen e hormon képződése megfigyelhető számos stressz során (pl. hő, ózon, szárazság) (Larkindale és Knight, 2002; Rao és mtsai, 2002). Az etilén a legtöbb fejlődési folyamatot gátolja, és feltételezhető, hogy nem közvetlenül, hanem a szervek auxin érzékenységének befolyásolása révén szerepel a SIMV kialakításában (Potters és mtsai, 2009).

A legtöbb stresszfaktor hatására a reaktív oxigénformák szintje megemelkedik, ami maga után vonja a ROF kioltó antioxidáns rendszer és a ROF jelátvitel aktiválódását is, melyeknek nagy szerepe van a stressz toleranciában (7. ábra B). Hidrogén-peroxiddal és parakvállal történő kezelés hatására is kimutatható volt a SIMV fenotípus *Arabidopsis* gyökerében, így feltételezték a ROF-k szerepét a stressz-indukált növekedési válaszok jelátvitelében (Pasternak és mtsai, 2005). A vad típusnál alacsonyabb aszkorbát tartalmú *vtc2* mutáns több oldalgyökérrel rendelkezik, ami szintén alátámasztja a ROF-ok szerepét a morfológiai válaszokban (Olmos és mtsai, 2006).



7. ábra: Stressz-indukált morfogenetikai válasz (SIMV) sematikus ábrája: a gyökér megnyúlás gátlása, blokkolt sejtosztódás a főgyökér csúcsában és fokozott oldalgyökér képződés (A), és a főbb szabályozó interakciók a SIMV kontrollálásában (B) (Potters és mtsai, 2007).

A ROF-k legfőbb képviselője a H_2O_2 , ami a NO-hoz hasonlóan multifunkcionális jelmolekulának tekinthető, hiszen önmagában és más szignalizációs, illetve hormonális szabályozókkal kölcsönösen fejti ki hatását. Féléletideje 1 ms, eliminálása a rendszerből nagyon gyorsan végbemegy (Bhattacharjee, 2012). A hidrogén-peroxid által kiváltott válaszok függenek a H_2O_2 szintézisének és a jel érzékelésének helyétől. A H_2O_2 a NO-dal egyidőben képződik stressz esetén, előbbi az oxidatív, utóbbi a nitrozatív jelátviteli utat képviselve.

A H_2O_2 által katalizált jelátvitel Ca^{2+} -függőnek bizonyult. Oxidatív stressz során a citoszolikus Ca^{2+} koncentráció megnő, ami H_2O_2 -indukálta Ca^{2+} influxon keresztüli sztóma záródást hajt végre. A NADPH oxidáz, mint a H_2O_2 enzimatisz forrása, szintén tartalmaz egy Ca^{2+} -kötő domént. A kalmodulin szintén mutatja a Ca^{2+} -függő H_2O_2 jelátviteli válaszokat. Az események láncolatának első lépése a citoszolikus Ca^{2+} koncentráció emelkedése, ami Ca^{2+} -függő protein kinázok és foszfatázok eredményeként jön létre. Ezután a MAPK kaszkád aktiválódása következik be treonin és tirozin származékok foszforilációja révén, végül transzkripciós faktorok aktivitásán és génexpressziós változásokon keresztül befejeződik a jelátviteli folyamat. A MAPK kaszkád overexpressziója fokozott toleranciával párosult különböző stresszek során (pl. hő sokk, fagyás vagy só stressz). Valószínűnek tartják, hogy a H_2O_2 cisztein származékokat érintő oxidációja és a NO S-nitrozilációs reakciója direkt módon

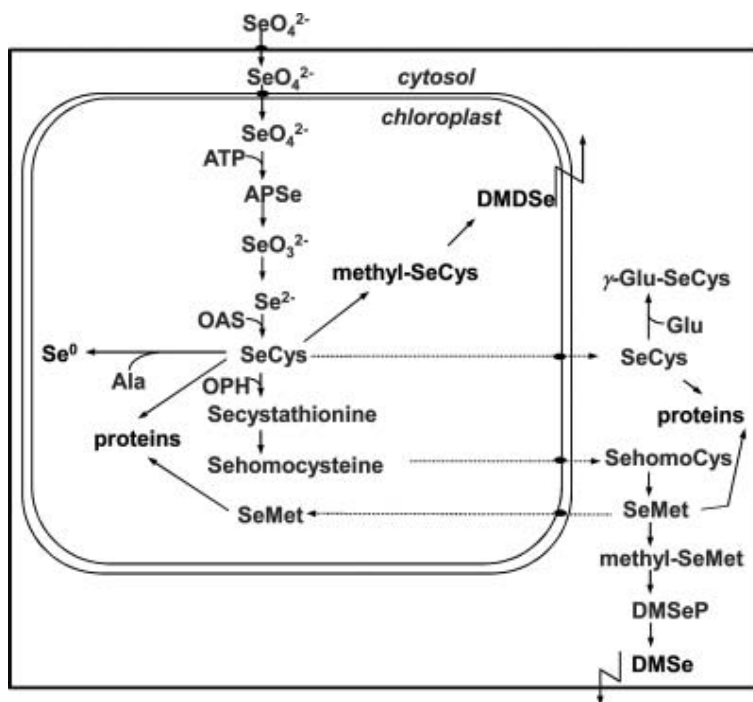
hat a transzkripciós faktorokra, de mindkét molekula tud MAPK aktivációt is kiváltani, így génexpressziós változásokat előidézve (Neill és mtsai, 2003).

A hidrogén-peroxid által katalizált jelátvitel egyik példjaként említhetjük a PCD kiváltásában betöltött szerepét a hiperszenzitív reakció során. Továbbá a védekezési válaszban glutation S-transzferázok (GST-ok) és glutation peroxidázok (GPX-ok) génexpresszióját upregulálja. Befolyásolja a saját szintéziséért és lebontásáért felelős gének expresszióját is, pl. az aszkorbát peroxidázon keresztül, kihatva így az aszkorbát-glutacion ciklusra. A sztóma záródásakor az ABS jelátviteléhez kapcsolódik, hiszen az ABS indukálja a H_2O_2 képződését, mely indukálja a sztóma zárását. H_2O_2 gátlószerrel meg lehet akadályozni az ABS-indukálta sztóma záródást (Neill és mtsai, 2003).

II.3.1. A szelén, mint környezeti stresszfaktor

A szelén (Se) egy metalloid, azaz nemfémes elem. A természetben szerves formában fordul elő, kémiai tulajdonságai a kénhez hasonlóak. Habár természetes (pl. vulkáni tevékenység, volatilizáció) és mesterséges források (pl. fosszilis tüzelőanyagok, mezőgazdasági tevékenység, szennyvíz) is befolyásolják a környezet szelén tartalmát, hosszabb távon a talaj típusa a meghatározó (Broadley és mtsai, 2006; Johnson és mtsai, 2010). Az agyagos talajok általában nagy koncentrációban tartalmazzák, amely az öntözés hatására könnyen kimosódik a talajból és a felszíni vizekbe kerül. Ezen területeken a szelén mennyisége idővel az élő szervezetek számára toxikus szintet érhet el (Ohlendorf, 1986). Esszenciális mikroelem az állati szervezet számára, így a környezeti hatásait, valamint a táplálékláncba való bekerülését és az ott betöltött szerepét egyre többen kutatják (Zhu, 2009). Koncentrációja a talajban általában $0,1-2,0 \text{ mg kg}^{-1}$ között változik, de amíg a szelénben gazdag területeken ez az érték nem ritkán az 1000 mg kg^{-1} -ot is meghaladja, addig a szelénben szegény talajok esetében ez kevesebb, mint $0,04 \text{ mg kg}^{-1}$ is lehet (Fordyce, 2005). Redox szenzitív elemként a szelén a környezet pH-jától és elektronaktivitástól függően 4 oxidációs állapotban lehet jelen a talajban. Jól oxidált, lúgos pH-jú talajokban szelenát (SeO_4^{2-}), míg savas, semleges pH-jú környezetben főként szelenit (SeO_3^{2-}) fordul elő nagyobb mennyiségben. Erősen redukált talajokban pedig már a szelenid (Se^{2-}) válik domináns formává (Zhu, 2009).

A növények szelén felvételét nagymértékben befolyásolja az, hogy milyen oxidációs állapotú a mikroelem, illetve az milyen kémiai tulajdonságokkal rendelkezik. Ezen kívül a felvehetőséget meghatározza még a szelén talajoldatban lévő koncentrációja, a talaj redox állapota, a rizoszféra pH-ja, valamint kompetitor anionok, pl. szulfát vagy foszfát jelenléte is (Dhillon és Dhillon, 2003; Dhillon és mtsai, 2008). A növények a szelenátot nagy affinitású szulfát transzportereken keresztül veszik fel. Az AtSULTR1;2 gén kódolja az egyik ilyen nagy affinitású szulfát transzportert, mely a gyökér kortexben, csúcsban és az oldalgyökerekben fejeződik ki. A szelenit viszont valószínűleg foszfát transzporterek segítségével kerül a gyökérbe, mert szulfát jelenlétében sem paradicsom, sem pedig rizs növényekben nem tapasztaltak felvételt, illetve a kén (S) megvonásnak sem volt hatása a szelenit felvételére (Li és mtsai, 2008). A szelenát kémiaiilag nagyon hasonlít a szulfáthoz, gyengén kötött és viszonylag mobilis elem a talajban (Alemi és mtsai, 1988). Ezen tulajdonsága miatt kompetícióban áll a szulfáttal, mivel felvétel során mindkét anion ugyanazt a transzportrendszert használja. Mivel a szulfát és a foszfát is a gyökérsejtek plazmamembránján át transzportálódik az elektrokémiai gradiensükkel szemben, feltehetőleg a szelenátra és szelenitre is igaz ez (Li és mtsai, 2008). Kísérleti eredmények szerint, melyek Se-t nem-akkumuláló és –akkumuláló *Astragalus* fajokon történtek, a szelenit felvétele lassabb folyamat, mint a szelenaté (Zayed és mtsai, 1998). A növények által felvett szelenát és szelenit a S-asszimilációs útvonalon keresztül különböző szelén vegyületekké alakul. Az oxidált formák először szeleniddé alakulnak. A szelenid O-acetilszerinnel (OAS) egyesülve szelenociszteinné (SeCys) módosul, mely később tovább alakulhat szelenometioninná (SeMet) (8. ábra). A gyökérsejtekbe transzportált szelenát és szelenit a xilém elemeken keresztül a hajtásba szállítódik. Amíg a növények viszonylag nagy mennyiségű szelenátot halmoznak fel a levelekben, addig a szelenitből jóval kevesebb szállítódik a felsőbb szervekbe. Ennek az a legfőbb oka, hogy a szelenit miután bekerült a növénybe, azonnal átalakul a szelén szerves formájává, szelenometioninná, ami általában a gyökérben marad (Çakır és mtsai, 2012). HPLC-ICP-MS módszerrel azonosították a Se szerves formáit és SeMet-t, SeOMet-t és MeSeCys-t találtak, valamint a gyökérben és xilémekben egy eddig még azonosítatlan formát (Li és mtsai, 2008). Az, hogy a szelenit asszimilációja nagyon gyorsan, míg a szelenaté nagyon lassan történik, azt jelenti, hogy a szelenát szelenitté történő redukciója egy korlátozó lépés a szelenát metabolizmusában (Sors és mtsai, 2005).



8. ábra: A szelén metabolizmusa növényekben: APSe (adenozin-foszfo-szelenát), OAS (O-acetilszerin), OPH (O-foszfohomoszerin), SeCys (szelenocisztein), SeMet (szelenometionin), DMSe (dimetilszelenid), DMDSe (dimetildiszelenid) (Çakır és mtsai, 2012).

A szelénnek emberi és állati szervezetben, baktériumokban, valamint néhány zöld algában betöltött szerepe ma már jól ismert, de ez idáig nincs meggyőző bizonyíték a szelenoproteinek magasabb rendű növényekben való létét illetően (Van Hoewyk, 2013). Mindamellert számos növény fajban - köztük hiperakkumuláló és szelént nem akkumuláló között is - kimutatták a szelén jótékony hatását a növekedésre. Ez valószínűleg annak köszönhető, hogy a szelén megnöveli a növény antioxidáns kapacitását, vagy a szelenotermékek antioxidáns kapacitásán vagy a növényi antioxidánsok indukcióján keresztül (Hartikainen, 2005). Bizonyos koncentráció felett a szelén nemcsak az állati, de a növényi szervezetre is képes kifejteni toxikus hatását, mely főként a szelén kénhez való kémiai hasonlóságán alapszik (Minorsky, 2003). A S-asszimiláció során képződött SeCys és SeMet, a proteinek felépítő cisztein illetve metionin helyére képesek beépülni. A SeCys ebből a szempontból veszélyesebb, mivel a cisztein tiol oldallánca különösen fontos szerepet játszik a fehérje megfelelő működésében, így beépülésével funkciójukat gyengén ellátó proteinek keletkeznek (Barillas és mtsai, 2011).

A növények között az alapján, hogy mennyire képesek tolerálni a szelén jelenlétét, megkülönböztetünk elsődleges szelén akkumulálókat (hiperakkumulálókat) ($>1,000/\text{kg SZT}$), másodlagos akkumulálókat ($100\text{--}1000 \text{ mg/kg SZT}$), valamint szelént nem akkumulálókat ($<100 \text{ mg/kg SZT}$) (Zhang és mtsai, 2007). A hiperakkumuláló növények toleranciája azon alapszik, hogy képesek intracellulárisan elkülöníteni a SeCys-t és SeMet-t a fehérjeszintézistől és nem-proteinépítő aminosavak szintézisében felhasználni. Ezen folyamat egyik kulcsenzime a szelenocisztein metiltranszferáz (SMT), amely a SeCys metil-szelenociszteinné (MeSeCys) való átalakulását katalizálja (Çakır és mtsai, 2012). Mivel a MeSeCys nem képes beépülni fehérjékbe, a szelén ilyen formában való tárolása fontos eleme a növények toleranciájának (Barillas és mtsai, 2011). A hiperakkumuláló és nem akkumuláló növények egyaránt képesek a felvett Se gázneművé történő átalakítására, volatilizációjára. Amíg a hiperakkumuláló növények a MeSeCys-t képesek volatilizálható dimetildiszeleniddé (DMDS₂) alakítani, addig a nem akkumulálókat a SeMet-t dimetilszeleniddé (DMS₂) transzformálva képesek a Se volatilizálására (Terry és mtsai, 2000).

II.3.2. A szelén, mint limitáló faktor a táplálkozásban

A Se az élő környezetben mindenhol jelenlévő elem, azonban földrajzi régióként való eloszlása nem egységes. Amíg a Föld bizonyos területein pl. Kínában alacsony, addig más országokban pl. USA-ban, Kanadában magasabb a talaj szelén koncentrációja (Minorsky, 2003).

Bár az élő szervezetben kis mennyiségben fordul elő, mégis sokrétű biológiai hatást közvetít. Legfontosabb szerepe antioxidáns tulajdonságából adódik, mivel csak szelén jelenlétében aktívak az olyan redox reakciókban résztvevő enzimek, mint a glutation peroxidáz vagy a formát dehidrogenáz. Emellett a Se terápiás mennyiségben adagolva csökkenti a rákos betegségek kialakulásának kockázatát. Emlős szervezetekben végzett vizsgálatok kimutatták, hogy a Se egyik szerves formája, a metilszelenocisztein (MeSeCys) képes megelőzőleg hatni a mellrák kialakulásában (Ip és Ganther, 1992; Lu és mtsai, 1996; Ip és mtsai, 2000; Finley és Davis, 2001; Medina és mtsai, 2001; McKenzie és mtsai, 2009). Habár a mikroelem rákellenes aktivitása mögött meghúzódó pontos mechanizmus még nem ismert, a kutatók úgy vélik a Se képes befolyásolni a sejtciklust, ezáltal képes indukálni az apoptózist a rákos sejtekben (Wang és

mtsai, 2002). A Se rákellenes hatása mellett pozitívan hat a termékenységre, vírusos fertőzések ellen, erősíti az immunitást, védi a szívet és a diabétesz kialakulásának megelőzésében is jótékony (Rayman, 2000). A Se hiánya és túladagolása mind olyan problémák, amelyek a világ szinte minden táján megfigyelhetők. Megfelelően táplált egyéneknél ritkán jelentkezik szelénhiány, azonban a Föld olyan területein melyek szelénben szegények bizonyos betegségek pl. a szívfunkciók zavarát okozó Keshan kór, igen nagy számban fordulnak elő. Ha viszont rövid idő alatt nagy mennyiségű Se bevitele történik, akkor az hányással és hasmenéssel járó szelenózis kialakulásához vezethet (Goldhaber, 2003).

II.3.3. A biofortifikáció lehetősége

Az állati és emberi szervezet számára nélkülözhetetlen a makro- és mikroelemek, valamint nyomelemek és vitaminok megfelelő szintű ellátottsága. A makroelemek közé tartozik a foszfor (P), klór (Cl), kalcium (Ca), kálium (K), magnézium (Mg) és nátrium (Na). A mikroelemek közé tartozik a cink (Zn), fluor (F), jód (I), kobalt (Co), króm (Cr), mangán (Mn), molibdén (Mo), réz (Cu), szelén (Se) és vas (Fe). Habár ezek a vegyületek csak nyomelemnyi mennyiségben szükségesek, az emberi szervezetnek több mint 49 tápelemre van szüksége az optimális működéshez, melyek hiánya úgynevezett minőségi éhezéshez vezet (Welch és Graham, 2004). A minőségi éhezés tünetei között szerepelnek többek között a termékenység csökkenése, születési rendellenességek, abnormális növekedés, az immunrendszer alulműködése, vakság, az agyi aktivitás csökkenése, mely tünetek a haszonállatok körében is éppúgy megjelenhetnek, így gazdaságilag is jelentős károkat okoznak (Rayman, 2000).

A modern mezőgazdaság egyik fő feladata ezen tápanyagok bejuttatása a táplálékláncba a növények segítségével, illetve ezzel párhuzamosan a mérgező vegyületek pl. nehézfémek, vagy egyéb antinutriens anyagok kizárása a táplálékláncból, melyek toxikus hatást fejthetnek ki a fogyasztói szervezetre. Leggyakrabban Fe, Zn, Ca, Mg, Cu, I vagy Se hiány alakul ki mind az állati, mind pedig az emberi szervezetben. A 2000-es évek elején hozzávetőlegesen a Föld népességének 60%-a vashiányos, több mint 30%-a cinkhiányos, és 15%-a szelén hiányos volt (White és Broadley, 2005). Mivel a Föld népessége rohamosan növekszik és a helytelen,

mennyiségre kiélezett táplálkozás válik hétköznapivá, a minőségileg alultápláltak száma egyre inkább növekszik.

Ha a tápelemek a talajban nem találhatóak meg elegendő mennyiségben vagy nem a növények számára felvehető formában, akkor ezek a magasabbrendű fogyasztókhöz nem jutnak el. Szelént például nagyobb mennyiségben egyedül a brazil dió és a vese tartalmaz, melyeket nem fogyasztunk minden nap (Rayman, 2000), így szükséges lenne egyéb táplálékláncba való bejutási pontot szolgáltatni. Ennek a problémának a megoldására szolgálnak a biofortifikációs eljárások. A genetikai biofortifikáció azt jelenti, hogy genetikai tervezés kapcsán a növényfajok toleranciája javítható, így azok ellenállóbbakká válnak, illetve elérhető, hogy egy bizonyos elemet megnövekedett mennyiségben akumuláljanak (Broadley és mtsai, 2006). Erre szelén esetében - a kénnel szembeni nagyfokú hasonlósága miatt- a S/Se metabolizmus enzimeinek overexpressziójában látják a megoldást a kutatók (Zhang és mtsai, 2007). Az ún. mezőgazdasági biofortifikáció során trágyázással emelik az esszenciális elem mennyiségét a növény fogyasztható részeiben úgy, hogy az biológiailag elérhető legyen a növény és a fogyasztó számára is. A mezőgazdasági biofortifikációra a legkorábbi jól ismert példa Finnország, ahol már az 1980-as évek közepétől alkalmazzák ezt a fajta eljárást (Li és mtsai, 2008).

III. Célkitűzés

Munkánk során célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a szelén kezelés milyen hormonális és jelátviteli folyamatok indukálása által eredményezi a bekövetkező morfogenetikai válaszokat (SIMV) lúdfűben, illetve az e mögött húzódó háttérmechanizmusok feltérképezését. További célunk volt, hogy a lúdfű (*Arabidopsis thaliana* L.) mint modellnövény mellett, a szelénnel történő biofortifikáció lehetőségét is megvizsgáljuk egy egyszerű konyhakerti növény, a borsó (*Pisum sativum* L. Petit provencal) segítségével, hiszen a minőségi éhezés komoly egészségügyi és gazdasági károkat okoz a szelén hiányos területeken.

Kutatásaink során a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Hogyan hatnak az alkalmazott szelén koncentrációk a lúdfű modellnövények növekedésére, és kialakul-e morfogenetikai válasz szelén stressz során?
2. Milyen változásokat idéz elő a szelén kezelés a hormonális rendszerben?
3. Milyen változásokat idéz elő a szelén terhelés a fejlődést szabályozó jelmolekulák (a nitrogén-monoxid és a hidrogén-peroxid) szintjében az *Arabidopsis* növények gyökérzetében?
4. Milyen interakciók állnak fenn a fejlődést szabályozó hormonális és jelátviteli rendszer között szelén kitettség során?
5. Milyen hosszú távú hatása van a szelén kezelésnek a borsó növények fejlődésére és a terméshozásra?
6. Az általunk alkalmazott módszer alkalmas lenne-e biofortifikációs eljárásként a szelén dúsítására borsó növényekben?

IV. Anyagok és módszerek

IV.1. *Arabidopsis thaliana* L. növényen végzett kísérletek

IV.1.1. Növényi anyag és nevelési körülmények

Kísérleteinket 2, 4, 7 és 14 napos (DAG2/DAG4/DAG7/DAG14; days after germination; napok száma csírázás után) lúdfű (*Arabidopsis thaliana* L.) növényekkel végeztük. A növekedési periódust egy 4 napos csírázási időszak előzte meg. A vad típus (*Col-0*) mellett felhasználtuk a *niaInia2* dupla mutánst, ami csupán 1% nitrát reduktáz aktivitással rendelkezik a vad típushoz képest (Wilkinson és Crawford, 1993), az S-nitrozoglutation reduktáz (GSNOR)-deficiens *gsnor1-3* mutánst (Feechan és mtsai, 2005), valamint a β -glükuronidáz (GUS) transzgenikus vonalakat a hormon státusz vizsgálatához (az auxin-indukálható *DR5::GUS*, Ulmasov és mtsai, 1997, a citokinin-indukálható *ARR5::GUS* (D'Agostino és mtsai, 2000) és az etilén szintet jelző *ACS8::GUS/GFP* (Tsuchisaka és Theologis, 2004). Kísérleteket végeztünk továbbá három különböző *AtCKX::GUS* (*AtCKX4*, *AtCKX5*, *AtCKX6*) növényvonallal is, melyekben a citokinin oxidáz gének promóterét a GUS riportergénnel fuzionáltatták (Werner és mtsai, 2003, 2010). Tanulmányoztuk az izopentenil transzferáz enzim génjét túlexpresszázó *ipt-161* mutáns vonalat is (AT1G25410.1, N117), mely a vad típushoz képest megnövelt zeatin és zeatin ribozid tartalommal bír (van der Graaff és mtsai, 2001). A citokinin oxidázt overexpresszázó *35S:CKX2* lúdfű a vad típushoz képest kb. 40%-kal csökkent zeatin tartalommal rendelkezik (Werner és mtsai, 2003). Ezek mellett kísérleteink során felhasználásra került az auxin-rezisztens és hiányos *aux1-7* (AT2G38120, N16704; Maher és Martindale, 1980), az etilén-hiányos *hookless* (*hls1-1*, AT4G37580, N3073; Guzmán és Ecker, 1990) és az *etr1-1* *Arabidopsis*, mely az etilén jelátvitelében hibás (AT1G66340, N237; Chang és mtsai, 1993). A módosított aszkorbinsav (Asa) tartalommal rendelkező vonalak közül a *vtc2-1* (25-30%-os Asa tartalom, Conklin és mtsai, 2000) és a *miox4* (2-3-szoros Asa tartalom a vad típushoz képest; Lorence és mtsai, 2004) került felhasználásra munkánk során. A sejtosztódás vizsgálatához a *CYCBI;1::GFP* (Doerner és Potuschak, 2001) *Arabidopsis* vonalat alkalmaztuk (9. ábra A).

A magok felületi sterilizálásához 1 perces 50%-os etanollal történő öblítést, majd 5% (v/v) nátrium hipoklorit oldattal történő mosást alkalmaztunk 10 percig. Ezután 3-szor átmostuk

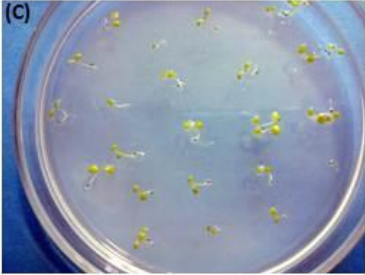
a magokat desztillált vízzel és Petri-csészékben elkészített, feles erősségű Murashige-Skoog (MS) (1% szacharóz, 0,8% agar w/v, Murashige és Skoog, 1962) táptalajra helyeztük őket (9. ábra C). A Petri-csészéket a növénynevelőben tartottuk, ahol a fény intenzitása $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 12/12 sötét és fényes periódus, 55-60% páratartalom és $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ hőmérséklet volt.

IV.1.2. Alkalmazott kezelések

Fő kezelésként nátrium-szelenitet (Na_2SeO_3) (Reanal, Budapest, Magyarország) alkalmaztunk 10, 20 és 40 μM koncentrációban, melyet közvetlenül a táptalajba adtunk még a sterilizációs folyamat előtt, a növények így már a Se-t tartalmazó táptalajon csíráztak és nevelkedtek. Kontrollként szelenit kezelést nem kapott növényeket használtunk. A táptalajba adott Se mellé a következő kezeléseket alkalmaztuk: S-nitrozo-N-acetil-DL-penicillinamin (SNAP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) mint NO donor 10 μM koncentrációban és 6-benzilaminopurin (BA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), mint exogén CK 0,1 μM koncentrációban (9. ábra B).

<i>Arabidopsis thaliana</i>		(A)		
	Leírás			
<i>Col-0</i>	vad típus			
NO homeosztázis mutánsok				
<i>nia1nia2</i>	NO-hiányos			
<i>gnor1-3</i>	NO-tútermelő			
ROS homeosztázis mutánsok				
<i>vtc2-1</i>	alacsony Asa tartalmú			
<i>miox4</i>	magas Asa tartalmú			
Hormon homeosztázis mutánsok				
<i>ipt-161</i>	CK-tútermelő			
<i>35S::CKX2</i>	csökkent CK tartalom			
<i>aux1-7</i>	auxin-rezisztens/hiányos			
<i>hookless; hls1-1</i>	ET-hiányos			
<i>etr1-1</i>	ET jelátvitelben hibás			
GFP és GUS transzgenikus riporter vonalak				
<i>cyclinB1;1::GFP</i>	ciklinB1;1-indukálható			
<i>DR5::GUS</i>	DR5-indukálható			
<i>ARR5::GUS</i>	ARR5-indukálható			
<i>ACS8::GUS/GFP</i>	ACS8-indukálható			
<i>AtCKX4::GUS</i>	CKX4-indukálható			
<i>AtCKX5::GUS</i>	CKX5-indukálható			
<i>AtCKX6::GUS</i>	CKX6-indukálható			

(B)		
Kezelés (μM Se)	Kezelés időtartama (DAG)	Kiegészítő kezelés (μM)
0	2	
10	4	SNAP - 10
20	7	BA - 0,1
40	14	



(C)

9. ábra: Az alkalmazott növényvonalak (A) és kezelések (B), valamint a növénynevelés bemutatása (C).

IV.1.3. Elemtartalom meghatározása induktív csatolású plazma tömegspektrométerrel

A szelén és kén tartalmakat 14 napos (DAG 14) vad típusú *Arabidopsisok* gyökér- és hajtásrendszerében határoztuk meg. A méréshez mintánként 200-250 növényt használtunk fel, a megfelelő mintatérfogat eléréséhez. A kontroll, valamint a 10, 20 és 40 μM Se-nel kezelt növények gyökerét és hajtását szétválasztás után desztillált vízzel mostuk. Majd 72 órán keresztül, 70 °C-on történő szárítás után salétromsavas (HNO_3 , 65%, w/v, Reanal, Budapest, Magyarország) és hidrogén-peroxidos (H_2O_2 , 30%, w/v, Reanal, Budapest, Magyarország) roncsolással történt a minták emésztése (MarsXpress CEM, Matthews, USA) 200 °C-on, 1600 W teljesítmény mellett 15 percig. A lehűtött mintákat ezután megfelelő mértékben hígítottuk, majd az induktívan csatolt plazma tömegspektrométer (ICP-MS) készülékkel (Thermo Scientific XSeries II, Asheville, USA) meghatároztuk az elemtartalmakat. Az adatokat $\mu\text{g/g}$ SZT (száraz tömeg) mértékegységben fejeztük ki, továbbá hajtás:gyökér arányt is számoltunk.

IV.1.4. Morfológiai mérések

A mintavételi napokon (2, 4, 7 és 14 DAG) a következő morfológiai paramétereket határoztuk meg: sziklevel terület (mm^2), hipokotil hossz (mm), főgyökér (FGY) hossz (mm). A mérések digitális fotókon történtek a Fiji (<http://fiji.sc/Fiji>, Schindelin és mtsai, 2012), illetve a Zeiss Axiovision Rel. 4.8 szoftverek segítségével. A digitális felvételek elkészítéséhez Zeiss Axioskope 200-C sztereomikroszkópot (Carl Zeiss, Jena, Németország) és Zeiss Axiovert 200M inverz mikroszkópot (Carl Zeiss, Jena, Németország) használtunk. A szelén tolerancia indexet Van Hoewyk és mtsai (2008) alapján, a következő formula segítségével számoltuk:

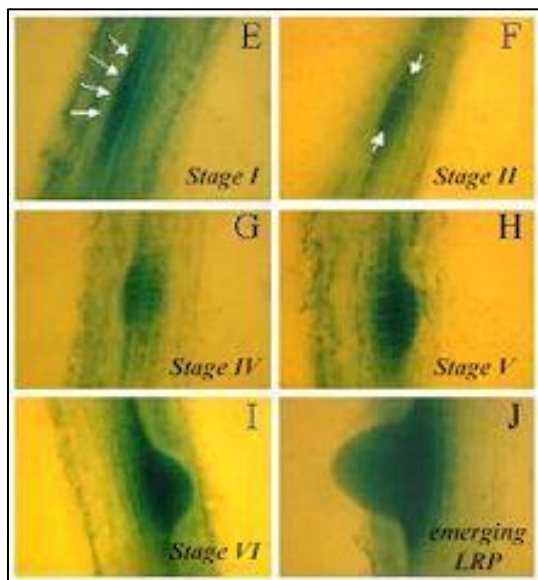
$$\text{Se tolerancia index (\%)} = (\text{FGY hossz Se jelenlétében} / \text{átlag kontroll FGY hossz}) \times 100.$$

A morfológiai kísérleteket legalább két biológiai ismétlésben végeztük, és kezelésenként min. 20 mintával dolgoztunk.

IV.1.5. GUS hisztokémiai festés

Azokban a transzgenikus *Arabidopsis* vonalakban, melyek rendelkeztek β -glükuronidáz (GUS) aktivitással, 5-bromo-4-kloro-3-indolil glükuronid (X-Gluc) festést végeztünk Jefferson és mtsai (1987) módszere alapján. A csíranövényeket 15 órán keresztül inkubáltuk 37°C-on a festék oldatban, mely a következőket tartalmazta: 0,1 M NaPO₄ (pH 7,0), 10 mM EDTA, 0,1% Triton-X, 1 mM K₃Fe(CN)₆ és 1 mM X-Gluc (DMSO-ban oldva). Az inkubáció után a mintákat 70%-os (w/v) etanollal mostuk 30 percig 50°C-on, majd a kék színű festődést Zeiss Axiovert 200M inverz mikroszkóppal (Carl Zeiss, Jena, Németország) detektáltuk, $\times 10$ és $\times 20$ objektíveket használva.

A *DR5::GUS* növények X-Gluc festése lehetővé tette számunkra, hogy lokalizáljuk és megszámloljuk az oldalgyökereket, valamint a fejlettségi állapotukat is meg tudtuk határozni. Malamy és Benfey módszere alapján (1997) elkülönítettük a VII. stádiumnál „fiatalabb” (ezeket primordiumokként említjük), valamint az annál „idősebb” oldalgyökereket (10. ábra).



10. ábra: Reprezentatív fotó GUS festéssel jelölt oldalgyökér fejlődési stádiumokról *Arabidopsis thaliana*-ban (Hummel és mtsai, 2004).

IV.1.6. Fluoreszcens mikroszkópiás módszerek

A fluoreszcensen jelölt mintáink vizsgálatához a technikai háttérrel a Zeiss Axiovert 200M típusú inverz mikroszkóp (Carl Zeiss, Jena, Németország) biztosította számunkra. A készülékhez egy nagy felbontású kamera (AxioCam HR, HQ CCD) csatlakozik, és különböző szűrőkombinációkkal rendelkezik a megfelelő excitációs és emissziós hullámhosszok beállításához. A kísérleteinkben a 10-es (exc.: 450-490 nm, em.: 515-565 nm) és a 20HE filtereket (exc.: 535-585 nm, em.: 600-655 nm) alkalmaztuk. A FLUAR 5x/0.12 NA és FLUAR 10x/0.25 NA objektív lencsét használtuk a minták vizsgálatához. A méréseket gyökérben és sziklevélben is elvégeztük. Az így készült digitális fotókon a fluoreszcencia intenzitása, mint pixel intenzitás került meghatározásra a Zeiss Axiovision Rel. 4.8 szoftver segítségével. A pixel intenzitás mérése gyökér esetében a merisztematikus- (MZ) és elongációs zónában (EZ) 60 µm sugarú körök területén, míg sziklevél esetében egy 500 µm sugarú körben történt. A kísérleteket legalább két biológiai ismétlésben végeztük, és kezelésként min. 10 mintával dolgoztunk.

IV.1.6.1. A NO *in situ* és *in vivo* detektálása

A NO szint a növények gyökérében és sziklevelében került meghatározásra 4-amino-5-metilamino-2'-7'-difluorofluorescein diacetát (DAF-FM DA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) festék használatával Pető és mtsai (2011) módszere alapján, kisebb módosításokkal. A DAF-FM DA festék pH stabil és sejtp permeábilis. A sejtbe történő bejutás után lehasadnak az acetyl csoportok a citoszolikus észterázok hatására és víz oldható DAF-FM képződik, mely a NO egyik oxidációs termékével (N_2O_3) reagál, egy fluoreszcens triazol molekulát ($\lambda_{exc}= 495$ nm, $\lambda_{em}= 515$ nm) eredményezve (Kojima és mtsai, 1999). A festék törzsoldatát (5 mM, DMSO-ban oldva) -20°C-on, fénytől védve tároltuk, és a kísérletek megkezdése előtt 10 µM koncentrációra hígítottuk 10 mM Tris/HCl pufferrel (pH 7,4). A csíranövényeket 30 percig inkubáltuk a festék oldatban sötétben, szobahőmérsékleten és 2-szer mostuk 30 percen belül Tris/HCl pufferrel. A fluoreszcencia intenzitás detektálásához a mikroszkóp 10-es filterét használtuk (exc.: 450-490 nm, em.: 515-565 nm), és a pixel intenzitásokat a gyökérben és sziklevélben egyaránt meghatároztuk.

IV.1.6.2. A H₂O₂ *in situ* és *in vivo* detektálása

A hidrogén-peroxid szint meghatározásához a növényekben az AmplifluTM (vagy 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazin vagy Amplex Red, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) festéket alkalmaztuk. Ez a stabil és megbízhatóan érzékeny festék torma-peroxidáz jelenlétében 1:1 arányban képez rezorufint, mely fluoreszcens tulajdonságú molekula (λ_{exc} = 563 nm, λ_{em} = 587 nm). A festék törzsoldatát (10 mM, DMSO-ban oldva) -20 fokon, fénytől védve tároltuk, és a kísérletek megkezdése előtt 50 μ M koncentrációra hígítottuk 50 mM nátrium-foszfát (Na₂HPO₄) pufferrel (pH 7,5). A növényeket 30 percig inkubáltuk a festék oldatban sötétben, szobahőmérsékleten, majd egyszer átmostuk a puffer oldattal (Gomes és mtsai, 2005). A mikroszkóp 20HE filter szettjét használtuk a fluoreszcencia detektálásához (exc.: 546/12 nm, em.: 607/80 nm), és a pixel intenzitásokat a gyökérben és sziklelevélben egyaránt meghatároztuk.

IV.1.6.3. Az életképesség meghatározása

A gyökércsúcsok és a sziklelevél életképességének meghatározására fluorescein diacetát (FDA) festéket (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) használtunk Harvey és mtsai (2008) módszere alapján. A festék törzsoldatát (5 mM, DMSO-ban oldva) -20 fokon, fénytől védve tároltuk, és a kísérletek megkezdése előtt 10 μ M koncentrációra hígítottuk 10 mM MES/KCl pufferrel (pH 6,15). A növényeket 10 μ M koncentrációjú FDA festék oldatban inkubáltuk 30 percen át, sötétben, szobahőmérsékleten. Ezután 4-szer mostuk 20 percen belül a mintákat MES/KCl pufferrel, majd tárgylemezre helyeztük őket. A mikroszkóp 10-es filterjét használtuk a méréshez (exc.: 450-490 nm, em.: 515-565 nm), és a pixel intenzitásokat a gyökérben és sziklelevélben egyaránt meghatároztuk.

IV.1.7. Konfokális lézer scanning mikroszkópia

A *CYCB1;1:GFP* növények GFP expresszióját Zeiss LSM 700 Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss, Jena, Németország) és Olympus LSM 700 (Olympus, Tokyo, Japán) lézer scanning konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. A 4 napos (DAG4) növényeket propídium jodid (PI)

festéssel jelöltük, hogy láthatóvá váljanak a sejtfalak. A festéket $10 \mu\text{M mL}^{-1}$ koncentrációban használtuk és a növényeket 1 percig inkubáltuk a festék oldatban. A propidium jodidot 488 nm-es dióda lézerrel gerjesztettük, az emissziót pedig 620 és 700 nm között detektáltuk. A GFP fluoreszcenciát 488 nm-es dióda lézerrel gerjesztettük és 555 nm-en detektáltuk az emissziót. A GFP jel intenzitását és lokalizációját digitális képeken elemeztük Zeiss Zen2010 és Olympus Fluoview FV100, valamint Fiji szoftverek segítségével (Schindelin és mtsai, 2012). Meghatározásra került a távolság a nyugalmi centrumtól (quiescent centre; QC) az átmeneti zóna (transition zone; TZ) kezdetéig, ahol a sejtek megnyúlása már erőteljes. A gyökér merisztéma méretét digitális felvételeken, Fiji szoftver (<http://fiji.sc/Fiji>, Schindelin és mtsai., 2012) segítségével mértük meg (Tsukagoshi és mtsai, 2010). A kísérleteket legalább két biológiai ismétlésben végeztük, és kezelésenként min. 15 mintával dolgoztunk.

IV.2. *Pisum sativum* L. növényen végzett kísérletek

IV.2.1. Növényi anyag és növénynevelés

Kísérleteink során *Pisum sativum* L. Rajnai törpe borsó növényeket használtunk. A magokat 5%-os (v/v) nátrium-hipoklorit oldattal sterilizáltuk 10 percig, majd átmostuk, és 2 órán keresztül áztattuk folyó víz alatt. A csíráztatás 3 napon keresztül, nedves szűrőpapírok között, sötétben, 26°C hőmérsékletű termosztátban (Mammert, Schwabach, Németország) történt. Ezt követően a csíranövényeket perlittel megtöltött 5 literes cserépekbe ültettük (4 növény/cserép és 6 cserép/kezelési koncentráció, 11. ábra) és üvegházi körülmények között neveltük: 12 órás nappali és 12 órás éjszakai periódus, 23/18°C nappali/éjszakai hőmérséklet és 65%-os relatív páratartalom. A növények locsolása Hoagland tápoldattal történt (1. táblázat).

1. táblázat: A Hoagland tápoldat összetétele.

Makroelemek	Koncentráció	Mikroelemek	Koncentráció
Ca(NO ₃) ₂	5 mM	H ₃ BO ₃	10 µM
KNO ₃	5 mM	MnSO ₄	1 µM
MgSO ₄	2 mM	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	5 µM
KH ₂ PO ₄	1 mM	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,5 µM
Fe-EDTA	10 µM	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0,1 µM
		CoCl ₂	10 µM

A borsó növények 35 napos korukig kontroll körülmények között nevelkedtek, majd 10, 50 és 100 µM Na₂SeO₃ kezelést kaptak a tápoldattal 50 (50 és 100 µM Se), illetve 56 napig (10 µM Se). Öt liter tápoldattal locsoltuk őket, az újraöntözés pedig akkor történt, amikor az előző adag tápoldatot már teljesen felszívták. A kísérleti periódus alatt háromszor történt mintavétel a termésből, 2 hetes időközönként.



11. ábra: A kísérletekhez használt nevelési rendszer.

IV.2.2. Morfológiai mérések

A következő morfológiai paramétereket határoztuk meg manuálisan: hajtás hossz (cm), hajtás friss tömeg (FT, g), levél hossz (cm), főgyökér hossz (cm) és gyökér friss tömeg (FT, g). A termés morfológiai paramétereit tekintve borsóhüvely szám/növény (db), a magokat tartalmazó hüvely friss és száraz tömege (FT és SZT, g), a magok friss tömege (FT, g), a magok száma/hüvely (db) kerültek meghatározásra. A kísérleteket legalább két biológiai ismétlésben végeztük, és kezelésenként min. 20 mintával dolgoztunk.

IV.2.3. Elemtartalom meghatározás induktív csatolású plazma tömegspektrometriával (ICP-MS)

A szelén mellett egyéb mikro- (Zn, Mn, Fe, Co, Cu, Mo) és makroelemek (K, Mg, Ca) koncentrációit is meghatároztuk a növények gyökerében, hajtásában és a termésben. A mintavétel után a növényi anyagot desztillált vízzel lemostuk, majd 72 h, 70°C-on történő szárítás után, salétromsavas (HNO_3 , 65%, w/v, Reanal, Budapest, Magyarország) és hidrogénperoxidos (H_2O_2 , 30%, w/v, Reanal, Budapest, Magyarország) roncsolással történt a minták emésztése (MarsXpress CEM, Matthews, USA) 200 °C-on, 1600 W teljesítményen 15 percig. A lehűtött minták ezután hígításon estek át, majd az ICP-MS készülékkel (Thermo Scientific

XSeries II, Asheville, USA) az elemtartalmak meghatározásra kerültek. Az adatokat $\mu\text{g/g}$ SZT (száraz tömeg) mértékegységben adtuk meg.

IV.3. Az adatok statisztikai analízise

Kísérleteinket legalább két biológiai ismétlésben végeztük el, és kezelésként minimum 10-15, illetve 20 minta átlag és szórás értékeit (SE, standard error, standard hiba) tüntettük fel. A vad típustól statisztikailag szignifikánsan különböző eredmények Microsoft Excel 2010 szoftver segítségével kerültek kiértékelésre a Student-féle T-teszttel, ahol a kapott eredmények (*) $P \leq 0,05$, (**) $P \leq 0,01$ és (***) $P \leq 0,001$ valószínűségi szinteken különböznek egymástól szignifikánsan (n.s.=nem szignifikáns). Az adatok többszörös összehasonlításához a varianciaanalízist (ANOVA, $P \leq 0,05$) SigmaPlot és SigmaStat12 szoftverrel végeztük (Systat Software Inc., Erkrath, Németország), Duncan-féle teszt felhasználásával. A különböző betűvel jelölt átlagok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinten különböznek egymástól szignifikánsan.

V. Kutatási eredmények

V.1. *Arabidopsis thaliana* L. növényen végzett kísérletek

V.1.1. A szelén felvétele és transzlokációja *Arabidopsis*-ban

A 0, 10, 20 és 40 μM nátrium-szelenitet tartalmazó táptalajon nevelt 2 hetes (DAG14) vad típusú (*Col-0*) növények Se tartalmát ICP-MS technikával határoztuk meg annak érdekében, hogy nyomon tudjuk követni a Se felvételét és eloszlását a lúdfű hajtás- és gyökérrendszerében. A 2. táblázatban látható, hogy a szelén koncentrációja szignifikánsan megemelkedett mind a gyökér-, mind a hajtásrendszerben, még hozzá az alkalmazott növekvő, külső Se koncentrációkkal egyenes arányban. Kontroll körülmények között a szelén tartalomra vonatkozó hajtás:gyökér arány 0,6 volt, tehát a gyökérben találunk nagyobb mennyiségű Se-t. A kezelés hatására azonban ez az arány megnőtt (>1), mely jelzi, hogy erőteljes transzlokáció történt a hajtás irányába (2. táblázat). A Se kezelés hatására a kén tartalom szignifikáns növekedését tapasztaltuk a gyökérben, bár ez a változás nem bizonyult koncentrációfüggőnek. A hajtásban csupán a legmagasabb, 40 μM -os Se koncentráció emelte meg a S tartalmat (3. táblázat).

2. táblázat: Szelén koncentráció ($\mu\text{g/g}$ SZT) 14 napos vad típusú (*Col-0*) *Arabidopsis thaliana* hajtásában és gyökerében), valamint hajtás:gyökér transzlokációs arány. A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

Szelenit konc. (μM)	Se koncentráció ($\mu\text{g/g}$ SZT)				Hajtás:gyökér arány
	Hajtás		Gyökér		
0	0,69	\pm 0,08 ^d	1,14	\pm 0,24 ^d	0,60
10	312,90	\pm 3,01 ^c	349,20	\pm 2,50 ^c	0,89
20	689,90	\pm 35,16 ^b	605	\pm 8,49 ^b	1,14
40	1180	\pm 18,91 ^a	1044	\pm 5,25 ^a	1,13

3. táblázat: Kén koncentráció ($\mu\text{g/g}$ SZT) 14 napos vad típusú (*Col-0*) *Arabidopsis thaliana* hajtásában és gyökerében, valamint hajtás:gyökér transzlokációs arány. A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

Szelenit konc. (μM)	S koncentráció ($\mu\text{g/g}$ SZT)				Hajtás:gyökér arány
	Hajtás		Gyökér		
0	6125	\pm 119,50 ^b	12930	\pm 133,80 ^c	0,47
10	5440	\pm 110,80 ^c	24680	\pm 377,30 ^a	0,22
20	5996	\pm 57,06 ^b	24350	\pm 427,20 ^a	0,25
40	8093	\pm 18,49 ^a	22640	\pm 241,00 ^b	0,36

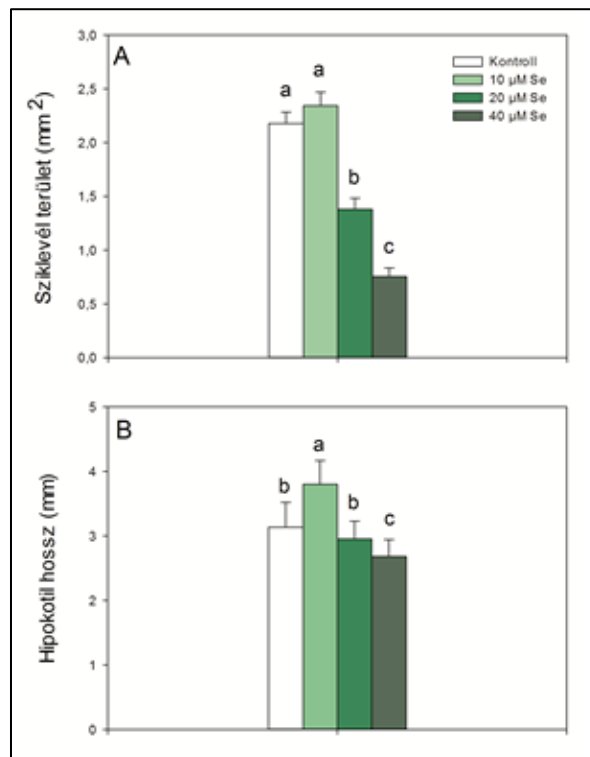
V.1.2. A szelén hatása vad típusú *Arabidopsis* hajtásának és gyökerének fejlődésére és életképességére

Miután megbizonyosodtunk arról, hogy a táptalajba adagolt szelént a kísérleti növényeink képesek felvenni, kíváncsiak voltunk arra, hogyan befolyásolja ez a hajtás és gyökér fejlődését és növekedését, valamint életképességét. A 4. táblázatban a kontroll és a szelén terhelt növények sziklevelének hosszanti és oldalirányú növekedését tüntettem fel. A 10 μM Se megnövelte az expansziót a kontrollhoz képest, míg a magasabb koncentrációk negatívan hatottak erre a paraméterre. A megnyúlásos növekedést érdekes módon az összes alkalmazott koncentráció jelentősen gátolta.

4. táblázat: Se kezelés hatása vad típusú *Arabidopsis* sziklevelének expansziójára és elongációjára DAG2, 4 és 7 időpontokban vizsgálva.

	Sziklevél expanszió (mm) 2-4.nap között	Sziklevél elongáció (mm) 4-7.nap között
Kontroll	0,99	0,10
10 μM Se	1,39	0,05
20 μM Se	0,96	0,07
40 μM Se	0,94	0,00

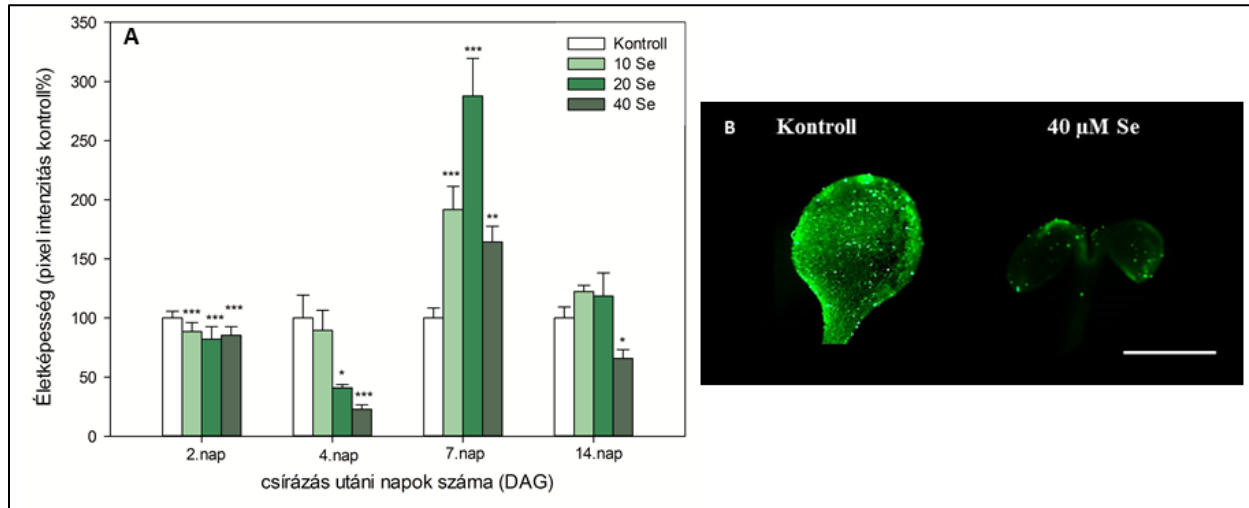
A 4 napos (DAG4) növények hajtását részletesebben vizsgálva elmondható, hogy a növények sziklevelének területe a legkisebb (10 μM) kezelési koncentráció hatására nem szignifikáns módon növekedett (12. ábra A). Ezzel szemben a 20 és 40 μM -os Se kezelések hatására szignifikáns redukción tapasztaltunk. Hasonló tendencia volt megfigyelhető a hipokotil hosszának változásában is, hiszen a 20 és 40 μM Se jelentős megnyúlás gátlást eredményezett, míg a 10 μM Se elősegítette a sziklevel alatti szárrész növekedését (12. ábra B). Azt is megfigyeltük, hogy a 20 és 40 μM Se expozíció a növekedésgátlás mellett a sziklevelek sárgulásához, klorózishoz vezetett.



12. ábra: 4 napos *Col-0 Arabidopsis* sziklevel területének (A) és hipokotil hosszának (B) változása Se kezelések hatására. A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

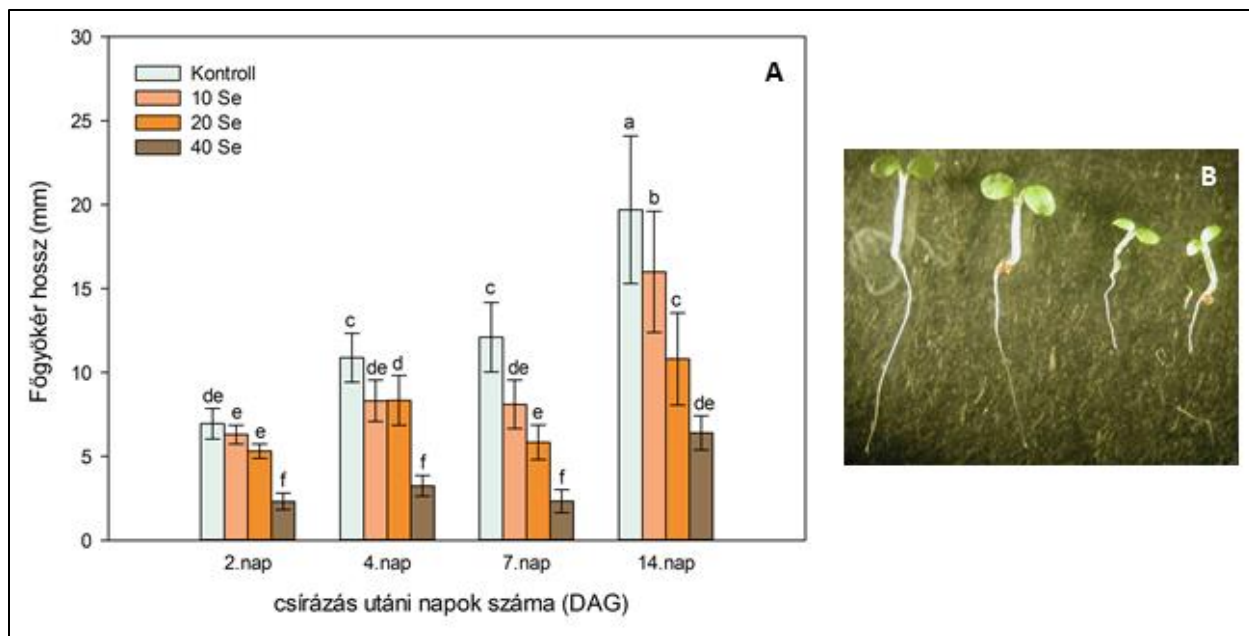
A vad típusú csíranövények szikleveleinek életképességét a korai fejlődési szakaszban (DAG2) vizsgálva megállapítható, hogy a Se nem hatott szignifikánsan az életképességre, hiszen egyik alkalmazott koncentráció sem okozott fluoreszcencia intenzitásbeli csökkenést. Négy nappal a csírázás után azonban a 20 és 40 μM Se is szignifikáns életképesség romlást idézett elő a sziklevekben. A csírázás utáni 7. napon a sziklevek Se toleranciája már egészen más képet

mutatott, hiszen az életképesség 1,5-2-szerese a kontrollnak, még a legerősebb 40 μM koncentrációjú kezelés esetében is. A 14. napon csupán a 40 μM Se okozta az életképesség szignifikáns csökkenését (13. ábra).



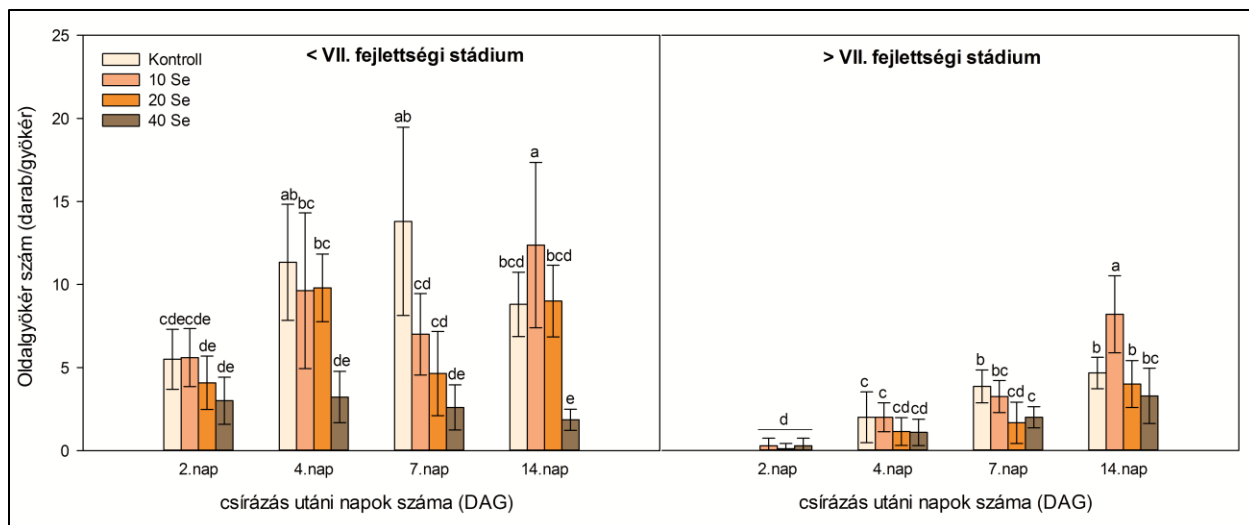
13. ábra: A sziklevek életképességének változása Se hatására 2, 4, 7 és 14 nappal a csírázás után (A). A *-gal jelölt minták a kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), $0,01$ (**) vagy $0,001$ (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek a Student-féle T-teszt alapján. Reprezentatív fotók fluorescein diacetáttal jelölt, 4 napos kontroll és 40 μM Se kezelt vad típusú *Arabidopsis* szikleveléről (B). Mércse=1 mm.

A gyökérrendszer morfológiai vizsgálata céljából a következő paramétereket határoztuk meg: főgyökér hossz (mm) és OGY szám (db/gyökér) a csírázást követő 2, 4, 7 és 14 napokon. A legkorábbi vizsgált időpontban (DAG2) a FGY növekedését az alacsonyabb Se koncentrációk (10 és 20 μM) nem befolyásolták szignifikánsan, ám a legmagasabb, 40 μM Se negatívan hatott a növekedésre (14. ábra). A csírázás utáni 4., 7. és 14. napon a Se az összes általunk alkalmazott koncentrációban gátolta a főgyökér növekedését, mely hatás koncentrációfüggőnek bizonyult. A 14. napon a kontrollhoz viszonyítva a 40 μM Se-kezelt gyökerek hossza több mint 50%-kal rövidült (14. ábra).



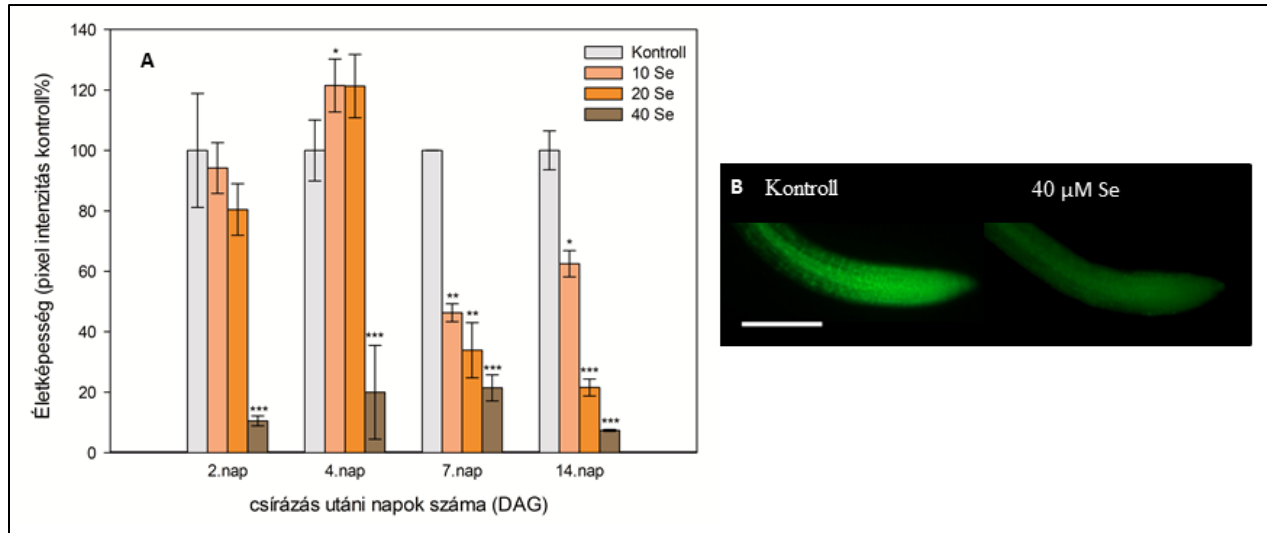
14. ábra: Vad típusú (*Col-0*) *Arabidopsis* növények főgyökér hossz változása Se kezelés hatására DAG2, 4, 7 és 14 időpontokban mérve (A). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján. Vad típusú (*Col-0*) *Arabidopsis* növények DAG4 időpontban (B). Balról jobbra haladva a kontroll, 10, 20 és 40 μM Se kezelt növények. Mércé=1 mm.

A gyökér architektúra kialakításában kulcsszerepű oldalgyökerek számát is meghatároztuk a szelén kezelt lúdfüveinkben. Malamy és Benfey (1997) alapján elkülönítettük a $\leq \text{VII.}$ és $\geq \text{VII.}$ stádiumú OGY-eket, és gyökerekenkénti darabszámot határoztunk meg. A kontroll növényeken kapott eredményekhez képest a Se a legfiatalabb csíranövényekben (DAG2) nem befolyásolta az OGY primordiumok képződését, míg a 4 napos csíranövényeknél a 40 μM -os Se koncentráció csökkenést okozott. A legerőteljesebb OGY szám redukciót a csírázást követő 7. napon figyeltük meg, ahol az összes alkalmazott Se koncentráció csökkentette az OGY primordiumok számát. Hosszabb távon (DAG14) a 10 μM Se szignifikáns növekedést okozott mindkét fejlődési állapotú OGY-ek számában, és csupán a 40 μM -os koncentráció gátolta az OGY iniciációt (15. ábra).



15. ábra: Az oldalgökér szám (kisebb és nagyobb, mint VII. fejlettségi stádium) változása Se kezelés hatására vad típusú (*Col-0*) *Arabidopsis*-ban. A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

A gyökér megfelelő növekedéséhez nélkülözhetetlen, hogy sejtjei funkcióképesek, életképesek legyenek. A FGY merisztéma sejtjeinek életképességét fluoreszcein diacetát festés segítségével határoztuk meg, mely során az emittált fluoreszcenciát, mint pixel intenzitást számszerűsítettük és kontroll%-ban adtuk meg. A *Col-0* növények FGY merisztémáinak életképessége DAG2 időpontban csak a legmagasabb, és 40 μM koncentrációjú Se kezelés hatására csökkent szignifikánsan. A 2 nappal későbbi időpontban a 10 és 20 μM Se növelte a gyökércsúcsi sejtek életképességét, mely 10 μM Se esetében szignifikánsnak is bizonyult. A 7. és 14. napon azonban a növények gyökere már az összes alkalmazott kezelési koncentráció hatására életképesség csökkenést szenvedett el, melynek mértéke a kezelés erősségével arányosnak bizonyult (16. ábra).

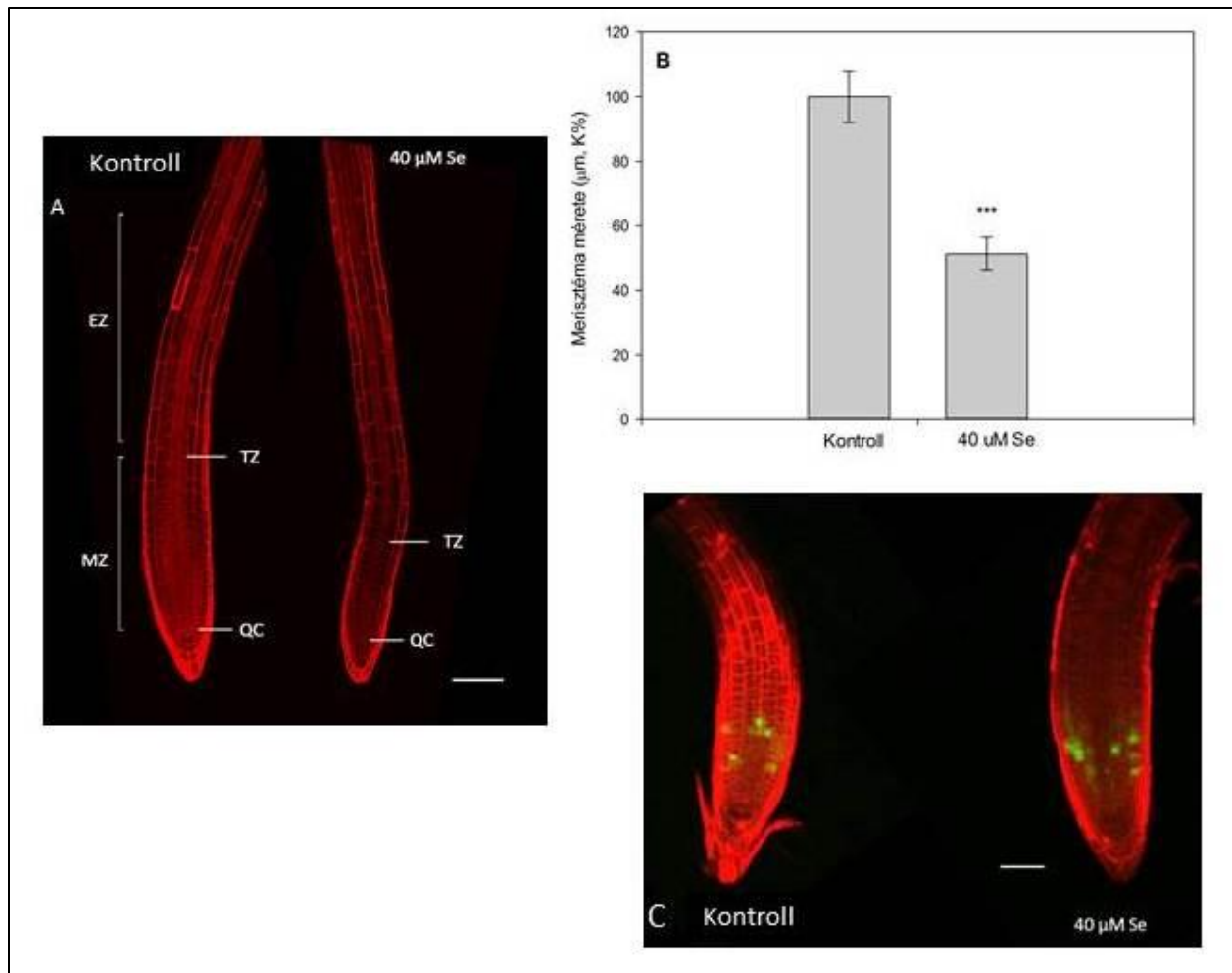


16. ábra: Életképesség változása Se kezelés hatására a főgyökér merisztémában (A). A *-gal jelölt oszlopok a kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek a Student-féle T-teszt alapján. Hét napos kontroll és 40 μM Se kezelt növények FDA-val jelölt gyökércsúcsairól készített fluoreszcens mikroszkópos felvételek (B). Mércse=0,5 mm.

V.1.3. Szelén hatása a főgyökér szöveti szerveződésére, a B1 ciklin szerepe

Az *Arabidopsis*-ban jelentős számban megtalálható ciklinek a sejtciklus, ezáltal a sejtosztódás nélkülözhetetlen szabályozói. A B1 ciklin (*Arabidopsis*; *CYCB1;1*) a mitotikus fázisban aktív, így a *CYCB1;1::GFP* növények vizsgálatával következtethettünk ezen gén promóter aktivitásának mértékére. A GFP jelölésnek köszönhetően azokban a sejtekben látható zöld fluoreszcencia, melyek éppen az osztódási fázisban vannak.

A 17. ábrán látható, hogy a kontrollhoz viszonyítva a 40 μM Se kezelés hatására az átmeneti/tranzíciós zóna (TZ) a gyökér csúcsához közelebb jelent meg (17. ábra A), a merisztéma mérete pedig közel felére redukálódott (17. ábra B). A *CYCB1;1::GFP in vivo* GFP expresszióját tekintve viszont nem mutatkozott számottevő eltérés a kontroll és szelénrel kezelt minták között (17. ábra C).



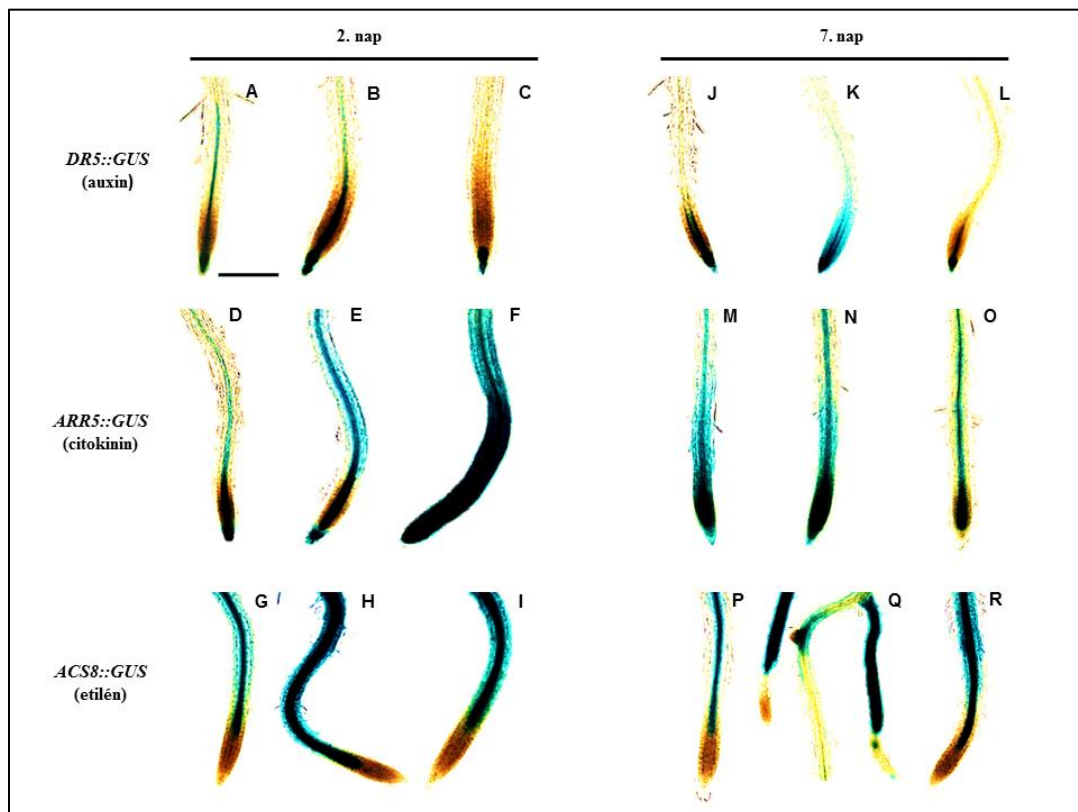
17. ábra: A kontroll és 40 μM Se-kezelt *CYCB1;1::GFP* növények gyökércsúcsi morfológiája. QC: quiescent centre-nyugalmi centrum, TZ: tranzíciós/átmeneti zóna, MZ: merisztematikus zóna, EZ: elongációs zóna. MÉRCE=500 μm (A). Merisztéma mérete a kontroll és 40 μM Se kezelt növények gyökércsúcsában (B). A *-gal jelölt oszlop a kontrolltól $P \leq 0,001$ (***) valószínűségi szinten szignifikánsan különbözik a Student-féle T-teszt alapján. Reprezentatív konfokális mikroszkópos fotó a GFP expresszióról kontroll és 40 μM Se-kezelt *CYCB1;1::GFP* növények gyökércsúcsaiban (C). MÉRCE= 500 μm .

V.1.4. A szelén hatására a gyökérben bekövetkező hormonális változások átfogó vizsgálata

A Se által indukált növekedési válaszok kialakulásában a növényi hormonok metabolizmusának és transzportjának megváltozása is szerepet játszik, így ezen mechanizmusok felderítése is célunk volt. Kutatásunkhoz auxin- és citokinin-indukálható, valamint az etilén bioszintézisét jelző GUS konstrukcióval rendelkező növényvonalakat használtunk, melyekben a

csírázást követő 2. és 7. napokon X-Gluc festéssel detektáltuk az adott hormonfüggő GUS aktivitás változásait, és ezekből hormonválaszra következtettünk.

Az auxin-indukálható *DR5::GUS* növények gyökerében a csírázás utáni 2. napon a legalacsonyabb koncentrációjú Se (10 μ M) kezelés hatására a GUS festődés jellemzően indigókék színe enyhén erősödött (18. ábra B és ábra C), mely a DR5-függő hormonválasz fokozódására utal. Ezt a fokozódást azonban a 40 μ M-os Se kezelés a 7. napra legátolta (18. ábra K és ábra L). A CK-indukálható ARR5 gén-függő GUS *in situ* aktivitása jelentősen fokozódott a korai fejlődési szakaszban mind az enyhe, mind pedig a magas Se koncentráció hatására (18. ábra D-F). Ez a változás tehát a citokininválasz emelkedését jelzi a főgyökérben. Az etilén bioszintézis prekursorát képező enzim az ACC szintáz, mely gén (itt ACS8) promóteréhez kapcsolt GUS aktivitás fokozódást mutatott Se stressz alatt, amiből magának az etilén szintézisének az indukciójára következtethetünk (18. ábra G-I és ábra P-R).

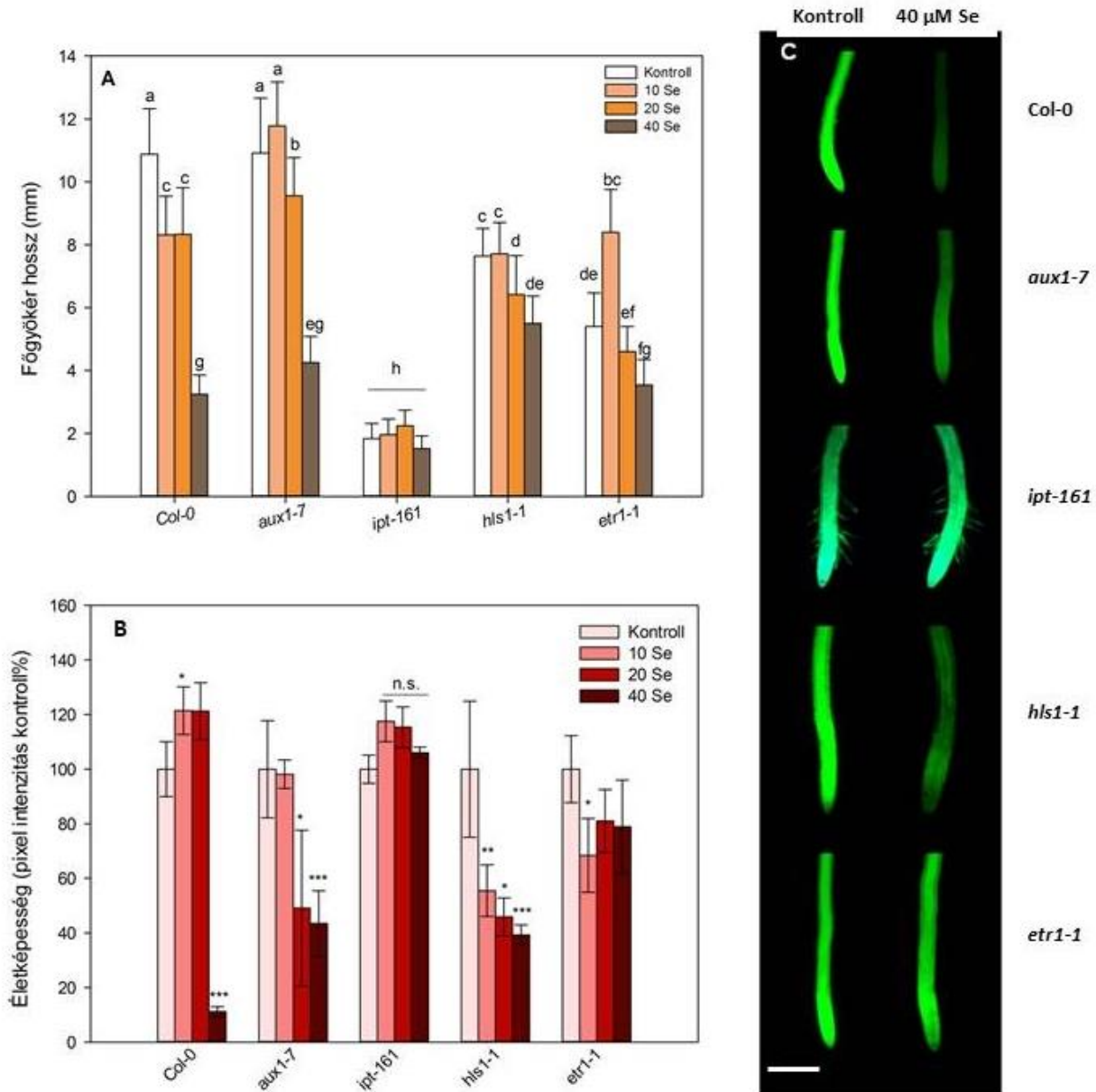


18. ábra: Hormon-indukálható gének promóteréhez kapcsolt GUS aktivitás *in situ* kifejeződése a csírázást követő 2. és 7. napon (DAG2 és DAG7). *DR5::GUS*=auxinválasz (A-C és J-L), *ARR5::GUS*=citokininválasz (D-F és M-O), *ACS8::GUS/GFP*=etilén szintézis (G-I és P-R). Kontroll (A, D, G, J, M, P); 10 μ M Se (B, N, H, K, N, Q) és 40 μ M Se (C, F, I, L, O, R). Mérce=0,5 mm.

V.1.5. Hormon mutáns növények Se kezelésre adott növekedési válasza és életképessége

Ebben a kutatási fázisban genetikai szintű vizsgálatokat végeztünk módosított hormontartalmú *Arabidopsis* növények felhasználásával. Az auxin influx carrier fehérje (AUX1) mutáns *aux1-7* növények FGY hossza a magasabb Se koncentrációk (20 és 40 μM) hatására szignifikáns csökkenést szenvedett el csakúgy, mint a két etilén mutáns, a *hls1-1* és *etr1-1* gyökere. A CK-túltermelő *ipt-161* vonal esetében nem történt szignifikáns változás egyik alkalmazott koncentráció esetében sem, bár elmondható, hogy a többi vonalhoz képest lényegesen rövidebb főgyökérrel rendelkezett stresszmentes körülmények között is (19. ábra A).

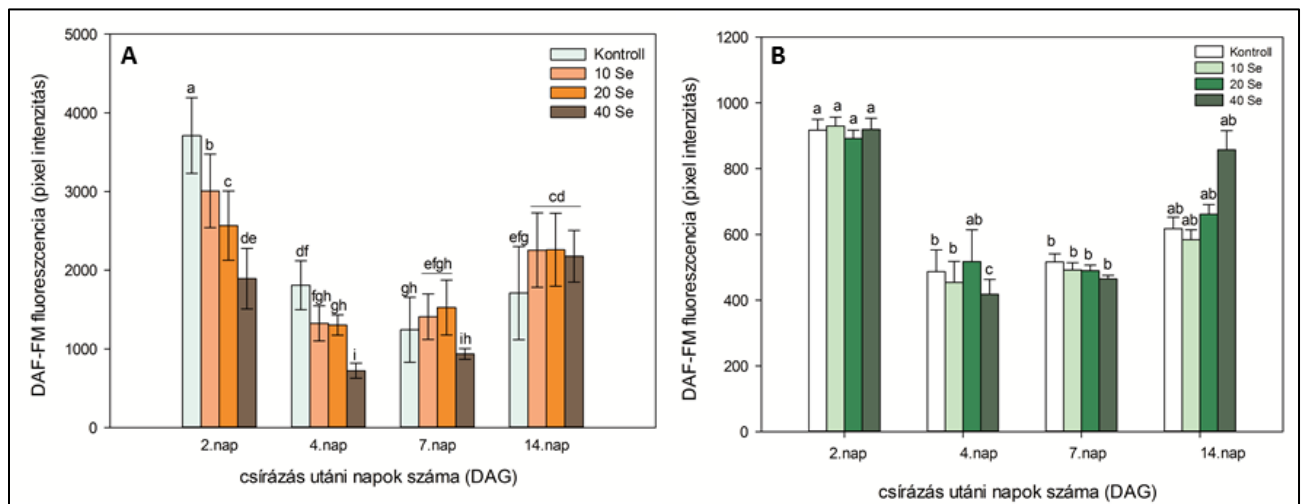
A *Col-0* gyökércsúcsának életképességét csupán a 40 μM Se csökkentette le, míg az *aux1-7*, *etr1-1* és *hls1-1* mutánsokban a többi Se koncentráció is életképesség veszteséget okozott. A CK-túltermelő *ipt-161* növényekben a FGY merisztematikus sejtjeinek életképességét egyik alkalmazott Se koncentráció sem csökkentette le (19. ábra B és ábra C).



19. ábra: FGY hossz (A) és életképesség (FDA fluoreszcencia pixel intenzitása kontroll%-ban) (B) kontroll és Se-kezelt 4 napos vad típusú (*Col-0*), auxin-rezisztens *aux1-7*, CK-túltermelő *ipt-161*, etilén-hiányos *hls1-1* és etilén-rezisztens *etr1-1* *Arabidopsis*-okban. A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján. A *-gal jelölt minták a kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**), vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek a Student-féle T-teszt alapján (n.s.=nem szignifikáns). Reprezentatív fluoreszcens mikroszkópos fotók a kontroll és 40 μM Se-kezelt *Col-0* és hormon mutáns növények gyökereiről FDA festést követően (C). Mércse=0,5 mm.

V.1.6. Szelén hatása vad típusú *Arabidopsis* endogén nitrogén-monoxid tartalmára

A nitrogén-monoxid molekula multifunkcionalitása és jelátvivő szerepe révén hozzájárul a stressz toleranciához. Ezen szignálmolekula szintjét a növények gyökerében és hajtásában a specifikus DAF-FM DA fluorofórral mutattuk ki. A csíranövény fejlődése kezdetén detektáltuk a legmagasabb NO szinteket a szervekben, mely a későbbiekben alacsonyabb tartományban maradt. A csírázást követő 2. és 4. napon Se-indukált koncentrációfüggő nitrogén-monoxid szint csökkenést tapasztaltunk a gyökérben, míg később (DAG7 és 14) a kezelések következtében a jelmolekula szintje emelkedett (20. ábra A). A hajtásban a Se nem okozott számottevő változásokat a NO tartalomban (20. ábra B).

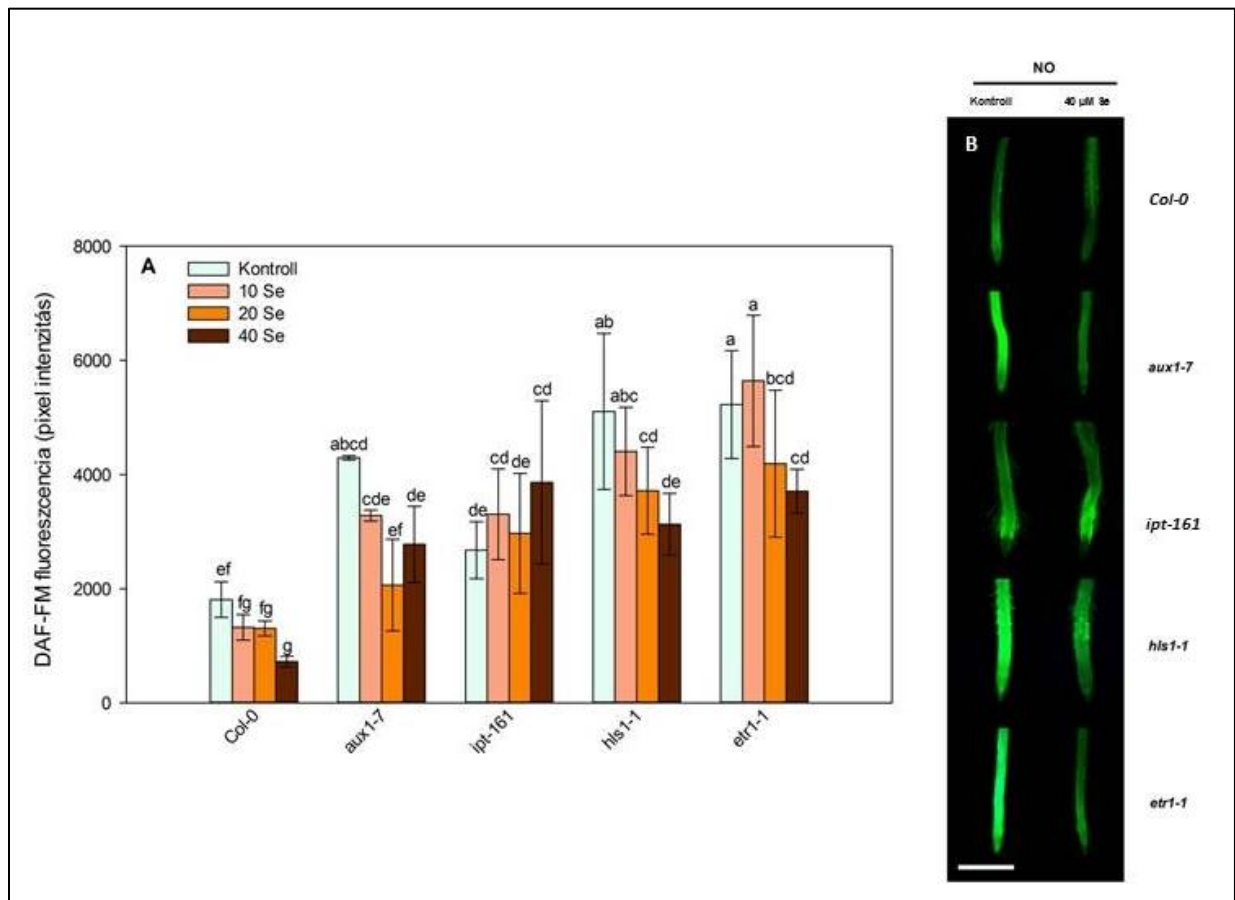


20. ábra: NO-függő DAF-FM fluoreszcencia (pixel intenzitás) kontroll és Se-kezelt vad típusú (*Col-0*) *Arabidopsis* FGY merisztémájában (A) és szik- illetve valódi levelében (14 nap esetén) (B). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.

V.1.7. Szelén hatása hormon mutáns lúdfüvek endogén nitrogén-monoxid tartalmára

A NO és a hormonok szelén stressz alatti kapcsolatának genetikai szintű vizsgálata céljából 4 napos hormon mutáns növényekben detektáltuk a NO jelmolekula szintjének változásait. Általánosságban elmondható, hogy a megváltozott hormon tartalommal rendelkező növények gyökerében magasabb NO szinteket mértünk, mint a vad típusban. Se stressz hatására az auxin-rezisztens *aux1-7* növények NO szintje a merisztémában a vad típushoz hasonlóan

lecsökkent. Az etilén hiányos és rezisztens növények (*hls1-1* és *etr1-1*) a vad típusnál lényegesen magasabb NO szinteket mutattak, bár a szelén okozta csökkenés a vad típushoz hasonlóan megjelent a gyökérükben. Ezekkel szemben a citokinin túltermelő *ipt-161* FGY merisztémájában a szelén-indukált NO szint redukció nem volt kimutatható, sőt egy enyhe növekedést tapasztaltunk (21. ábra).

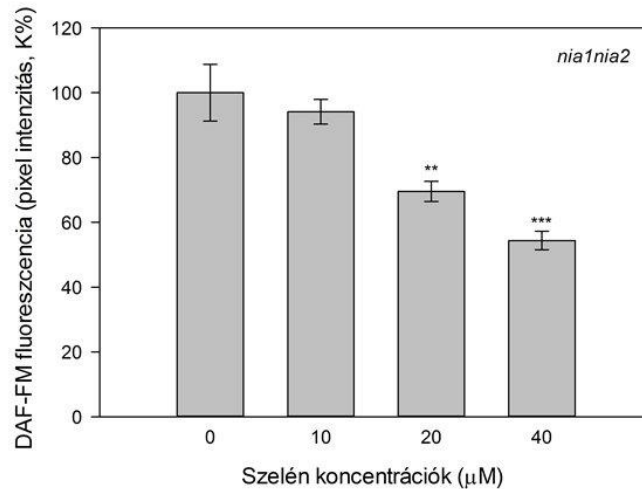


21. ábra: NO-függő DAF-FM fluoreszcencia kontroll és Se-kezelt vad típusú (*Col-0*), *aux1-7*, *ipt-161*, *hls1-1* és *etr1-1* *Arabidopsis*-ok FGY merisztémájában a csírázás utáni 4. napon (A). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján. Reprezentatív mikroszkópos fotók a kontroll és 40 μM Se kezelt növények gyökércsúcsáról DAF-FM DA festést követően (B). Mércé=0,5 mm.

V.1.8. A nitrát reduktáz szerepe a Se által indukált NO képződésben

A következő lépésben arra a kérdésre kerestük a választ, vajon a nitrát reduktáz aktivitása szerepet játszik-e a Se stressz hatására bekövetkező NO szintbeli változásokban. A vad típusú

lúdfű gyökerében tapasztalt Se koncentrációfüggő NO szint redukció (lásd előző grafikon, 21. ábra) a NR-deficiens *nia1nia2* növények FGY merisztémájában is tapasztalható volt, és ez a csökkenés a 20 és 40 μM Se hatására szignifikánsnak bizonyult (22. ábra).



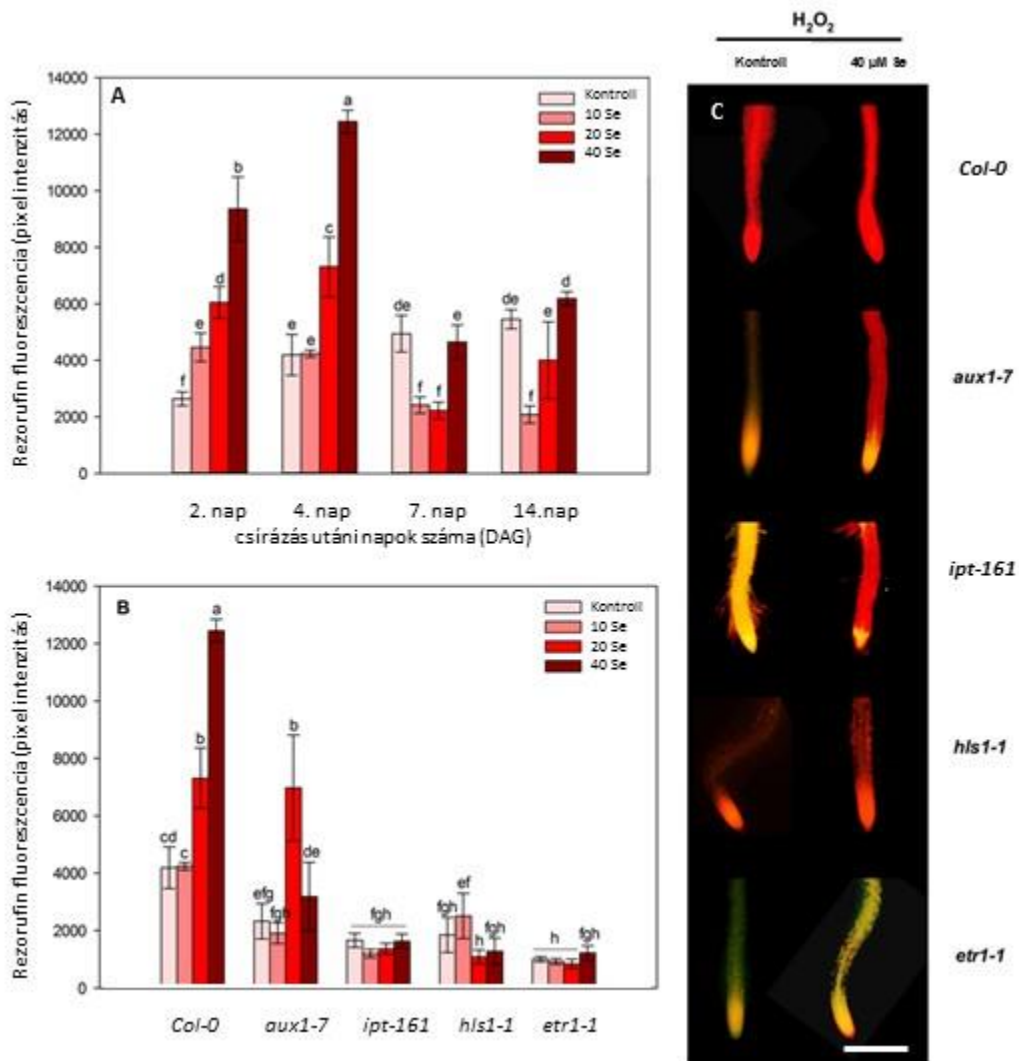
22. ábra: NO szintek (DAF-FM fluoreszcencia pixel intenzitás) a kontroll és Se-kezelt *nia1nia2* lúdfű FGY merisztémájában. A *-gal jelölt minták a kontrolltól $P \leq 0,01$ (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek a Student-féle T-teszt alapján.

V.1.9. Szelén hatására bekövetkező hidrogén-peroxid szint változása

A NO mellett a H_2O_2 is betölthet fejlődést szabályozó jelátviteli funkciót, ezért a csíranövény gyökérnövekedése során fluoreszcens jelöléssel monitoroztuk a változását. A kontroll csíranövények fejlődésének kezdetén (DAG2 és 4) alacsonyabb H_2O_2 szinteket detektáltunk, melyek koncentrációfüggő módon és jelentősen megemelkedtek a szelén kezelésnek kitett növények gyökereiben. A második növekedési szakaszban (DAG7 és 14) a kezelést nem kapott növények gyökereiben mért H_2O_2 tartalmak nagyobbak bizonyultak, és a 2. illetve 4. napon tapasztalható hasonló H_2O_2 akkumuláció nem volt kimutatható (23. ábra A).

A megváltozott hormon tartalmú növények közül az auxin-rezisztens és -hiányos *aux1-7* mutatott jelentős H_2O_2 felhalmozódást a magasabb Se koncentrációk hatására, míg a citokinin túltermelő (*ipt-161*) és etilén hiányos (*hls1-1*), valamint rezisztens (*etr1-1*) növények gyökerében

a *Col-0*-nál alacsonyabb hidrogén-peroxid szinteket detektáltunk kontroll körülmények között, és a Se által indukált szignifikáns akkumuláció sem történt meg (23. ábra B és C).

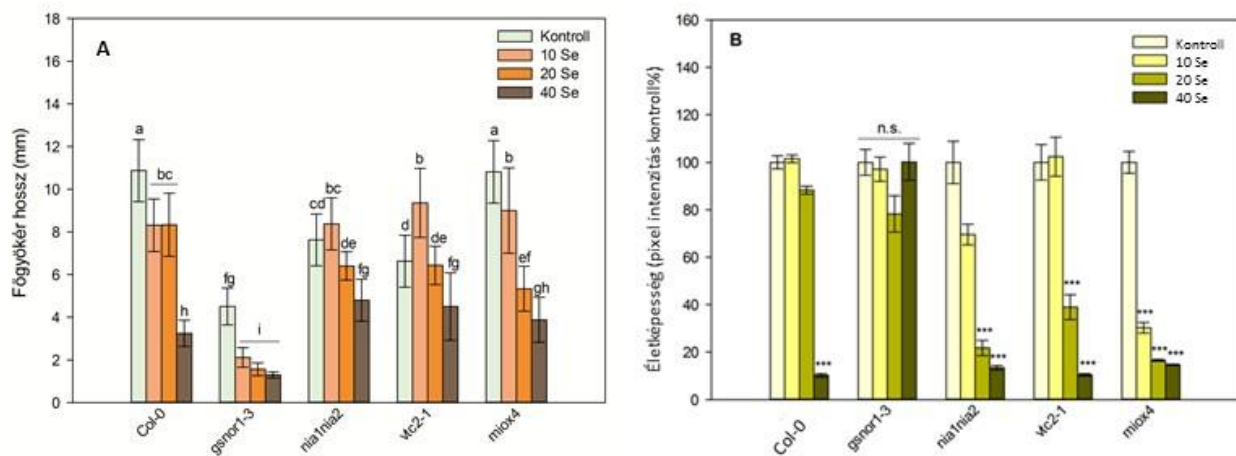


23. ábra: Hidrogén-peroxid-függő fluoreszcencia (rezorufin) intenzitása kontroll és Se-kezelt, vad típusú (*Col-0*) *Arabidopsis* növények FGY merisztémájában a csírázást követő 2., 4., 7. és 14. napon (A). Hidrogén-peroxid-függő fluoreszcencia (rezorufin) vad típusú és hormon mutáns (*aux1-7*, *ipt-161*, *hls1-1* és *etr1-1*) *Arabidopsis* növények FGY merisztémájában 0, 10, 20 és 40 μM Se kezelés mellett a csírázás utáni 4. napon vizsgálva (B). A különböző betűvel jelzett oszlopok P≤0,05 valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján. Reprezentatív mikroszkópos fotók AmplifluTM-val jelölt, kontroll és 40 μM Se-kezelt növények gyökércsúcsáról (C). Mércse=0,5 mm.

V.1.10. Módosított NO és H₂O₂ tartalommal rendelkező lúdfű növények növekedési válasza és életképessége Se stressz alatt

A továbbiakban módosított NO, illetve H₂O₂ tartalommal rendelkező növényvonalakat vetettünk alá Se kezelésnek, és meghatároztuk a gyökérhosszak alakulását a növekedésgátlás mértékének megállapítása céljából, valamint kimutattuk a gyökércsúcsok életképességét, hogy információt kapjunk a Se-nel szemben tanúsított toleranciájukról.

A vad típusnál nagyobb NO tartalmú *gsnor1-3* növények FGY hossza szignifikáns mértékű növekedésgátlást szenvedett el a kezelés hatására, ám érdekes módon a gyökér merisztéma életképessége nem változott. Ezzel szemben, az alacsony NO szinttel rendelkező *nia1nia2* dupla mutáns gyökere csak a legnagyobb Se koncentráció esetén rövidült meg szignifikáns módon, bár a merisztéma sejtek életképessége jelentős mértékben csökkent a 20 µM Se terhelés hatására is. A vad típusnál magasabb H₂O₂ szintet mutató *vtc2-1* és alacsonyabb H₂O₂ szinttel rendelkező *miox4* lúdfűvek főgyökere szintén rövidülést mutatott a súlyos Se terhelés hatására, és mindkét esetben drasztikus romlás következett be a merisztematikus sejtek életképességében, bár ez erőteljesebbnek bizonyult a *miox4* mutánsban (24. ábra).



24. ábra: FGY hossz (A) és életképesség (B) Se kezelés hatására vad típusú (*Col-0*), *gsnor1-3*, *nia1nia2*, *vtc2-1* és *miox4* *Arabidopsis* növények FGY merisztémájában a csírázás utáni 4. napon. A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján. A *-gal jelölt minták a kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**), vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek a Student-féle T-teszt alapján (n.s.=nem szignifikáns).

V.2. A citokinin és nitrogén-monoxid kapcsolatának és szelén stressz tűrésben betöltött szerepének részletesebb tanulmányozása

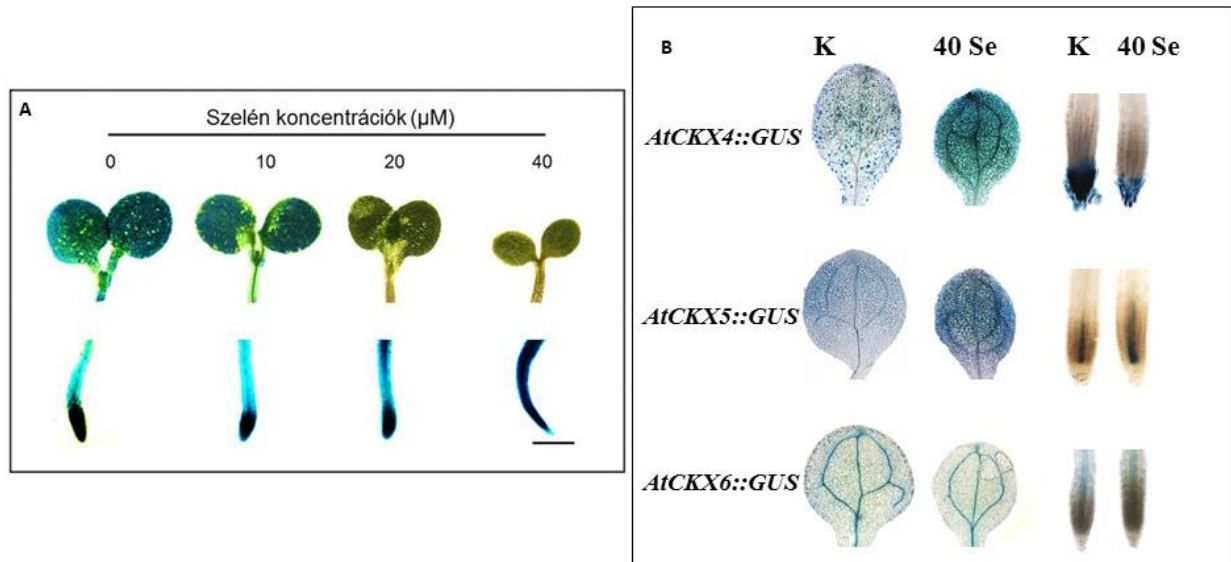
V.2.1. A citokinin szint alakulása Se stressz alatt és a citokinin oxidázok szerepe

A korábbiakban felderített Se-indukált hormonális változások közül kiemelt hangsúlyt fektettünk a citokininekre, hiszen e növényi hormonok a hajtás- és gyökérrendszerben ellenkezőleg hatnak, és egyre több bizonyíték támasztja alá a NO-CK közötti komplex kapcsolatot. Az *in situ* CK-függő ARR5::*GUS* expresszió meghatározásához –melyből az endogén citokininválaszra következtettünk- kiválasztottuk a csírázás utáni 4. napot, és a további kísérleteinket ebben az időpontban végeztük.

A 25. A ábrán látható, hogy a kezeletlen csíranövények hipokotiljában, szikleveleiben és a FGY merisztematikus zónájában lokalizálódik az ARR5::*GUS* expresszió. A 20 és 40 μM Se a gyökérben a CK-függő hormonválasz fokozódását idézte elő, melyet az X-Gluc festés indigókék színének intenzitása jelez. A festődés lokalizációját tekintve nem csak a MZ-ban emelkedik meg a CK-függő GUS aktivitás, hanem az egész gyökérre vonatkozóan. Ezzel szemben a sziklevelekből és a hipokotilból az ARR5::*GUS* aktivitása eliminálódik a növekvő mértékű exogén Se terhelés hatására.

A hajtásban és a gyökérben tapasztalt ellentétes irányú citokininválasz változásért felelős mechanizmus felderítése érdekében a citokinin oxidáz/dehidrogenáz-függő (CKX) GUS aktivitást mutattuk ki *CKX::*GUS** riportergén konstrukciót kifejező vonalak felhasználásával. A hét eddig azonosított *Arabidopsis* CKX gén közül az AtCKX4, AtCKX5 és AtCKX6 gén promóteréhez kapcsolt GUS aktivitással rendelkező növényeket alkalmaztuk az *in situ* elemzéshez. Kontroll körülmények között az AtCKX4::*GUS*-aktivitás főleg a zárósejtekben és a gyökérsüvegben lokalizálódott. Az AtCKX5::*GUS* növényekben a fejlődő levél és a gyökér központi hengere voltak a CK oxidáz/dehidrogenáz kifejeződésének a helyei, csakúgy, mint az AtCKX6 vonal esetében, bár itt a MZ-ban nem volt detektálható GUS aktivitás. Se kezelés hatására az AtCKX4- és AtCKX5-függő GUS expresszió fokozódott a szikleveleiben, míg a gyökérben egyedül csak az AtCKX4::*GUS*-aktivitásának csökkenése következett be. Az

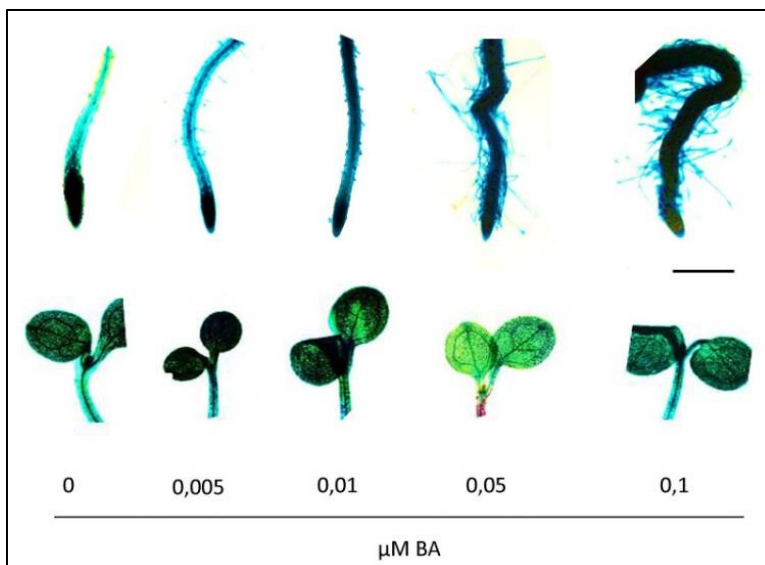
AtCKX6::GUS kifejeződése a rendszerünkben nem mutatott változást Se stressz alatt egyik szerv tekintetében sem (25. ábra B).



25. ábra: Reprezentatív mikroszkópos fotók 0 (kontroll), 10, 20 és 40 μM Se-kezelt, 4 napos *ARR5::GUS* növények hajtásáról és FGY csúcsáról (A). Kontroll (K) és 40 μM Se-nel kezelt *AtCKX4::GUS*, *AtCKX5::GUS* és *AtCKX6::GUS* növények sziklevele és gyökércsúcsa X-Gluc festéssel (B). Mércse=1 mm.

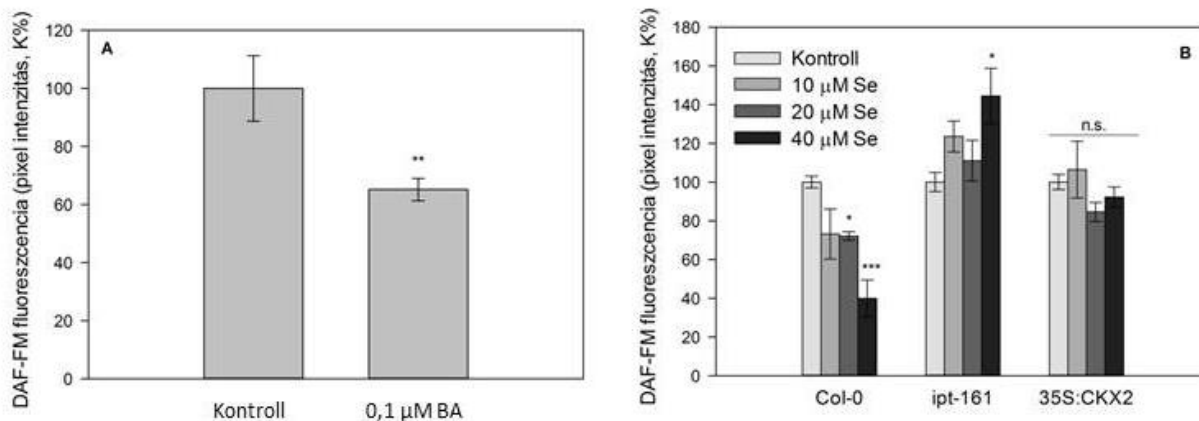
V.2.2. A CK és NO között fennálló kapcsolat tanulmányozása szelén stressz alatt

A CK-NO interakció jellege az eddigi kutatási eredmények alapján lehet szinergista és antagonista is. Célunk volt a szelén által előidézett stresszhelyzetben e két komponens kapcsolati viszonyának tanulmányozása. Mindezt genetikai szinten vizsgáltuk a CK-túltermelő *ipt-161* növények segítségével, illetve az endogén CK szint biokémiai módosításával, amit benziladenin (BA) kezeléssel valósítottunk meg. A külső CK forrásként alkalmazott BA-t több, különböző koncentrációban (0,005; 0,01; 0,05 és 0,1 μM) adtuk a táptalajba, melyen *ARR5::GUS* növényeket neveltünk.



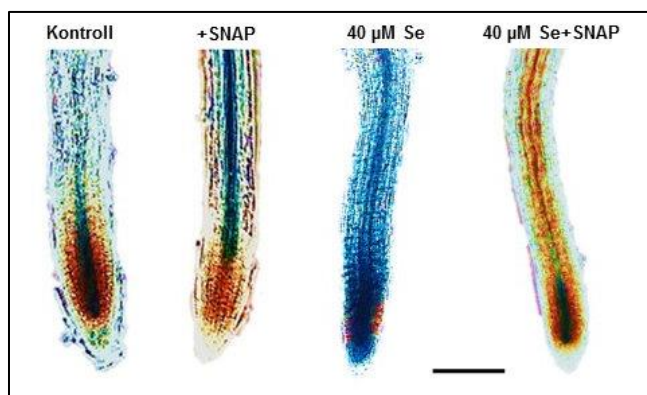
26. ábra: Reprezentatív fotók X-Gluc festett *ARR5::GUS* növények gyökércsúcsáról és szikleveléről BA koncentrációsor alkalmazása mellett. Mércse=1 mm.

A 26. ábrán látható eredmények alapján kiválasztottuk a 0,1 μM koncentrációjú BA kezelést, hiszen ez mind a sziklevelben, mind pedig a FGY merisztémájában stabilan magas CK-függő GUS aktivitás emelkedést idézett elő, és kísérleteinkhez a továbbiakban ezt alkalmaztuk. Az is látható az ábrán, hogy az exogén BA kezelés citokininválasz fokozódását indukálta, tehát az *ARR5::GUS* konstrukció ténylegesen citokinin-érzékeny. Kontroll körülmények között (Se kezelés nélkül) a BA szignifikáns módon csökkentette a NO szintet a gyökérben (27. ábra A). Szelén expozíció esetén az *ipt-161* növények gyökerében a NO szint csökkenése elmaradt, sőt a vad típussal ellentétben a 40 μM Se hatására szignifikáns akkumuláció történt. A *35S::CKX2* transzgenikus növények esetében, melyek a vad típushoz képest alacsonyabb citokinin tartalommal rendelkeznek, a Se kezelés nem indukált szignifikáns változást a NO szintjében (27. ábra B).



27. ábra: NO szintek (DAF-FM fluoreszcencia pixel intenzitás) kontroll és BA-kezelt *Col-0* növények FGY merisztémájában (A). NO szintek (DAF-FM fluoreszcencia pixel intenzitás) vad típusú (*Col-0*), *ipt-161* és *35S:CKX2* növények FGY merisztémájában kontroll körülmények és Se kezelés alatt (B). A *-gal jelölt minták a kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), illetve 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek a Student-féle T-teszt alapján (n.s.=nem szignifikáns).

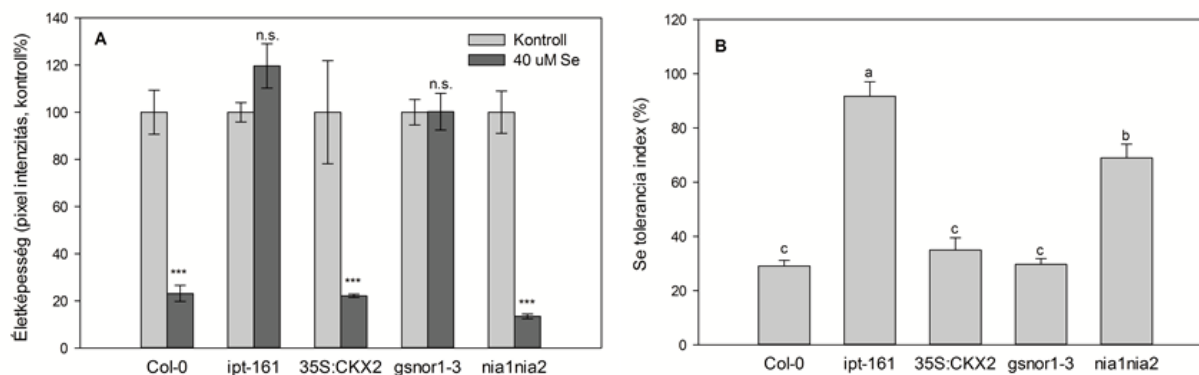
A továbbiakban a nitrogén-monoxid CK szintekre gyakorolt hatását tanulmányoztuk Se kezelésnek kitett *Arabidopsis*-ban. Ehhez az S-nitrozo-N-acetil-DL-penicillinamin (SNAP) nitrogén-monoxid donort használtuk 10 μM koncentrációban, és meghatároztuk a citokininválasz esetleges változásait az *ARR5::GUS* csíranövényekben. Eredményeink alapján a NO donor teljesen gátolta az *ARR5::GUS* konstrukció kifejeződését a Se kezelést nem kapott növények FGY merisztémájában, és fokozta azt a merisztéma feletti gyökér régió központi hengerében. A Se és SNAP kezelés együttes alkalmazásának hatására pedig elmaradt a csak szelénnel kezelt gyökerekben tapasztalt *ARR5*-függő GUS aktivitás fokozódása (28. ábra).



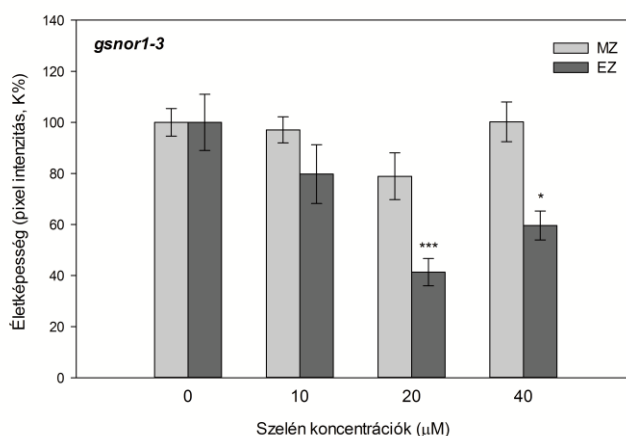
28. ábra: Reprezentatív mikroszkópos fotók kontroll, 40 μM Se és/vagy 10 μM SNAP kezelt *ARR5::GUS* gyökerekről X-Gluc festést követően. Mércse=1 mm.

V.2.3. A CK és NO szerepe a Se toleranciában

A Se toleranciát a FGY merisztéma sejtek életképességének fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatával és a gyökérmegnyúlás alapján számolt tolerancia indexszel határoztuk meg a vad típusú (*Col-0*), CK-túltermelő *ipt-161*, alacsony CK tartalommal rendelkező *35S:CKX2*, NO-túltermelő *gsnor1-3* és NR-deficiens (NO-hiányos) *nia1nia2* mutáns növényekben. A vad típusú lúdfűben bekövetkező életképességbeli romláshoz képest a CK-túltermelő (*ipt-161*) növény FGY merisztémájának életképessége nem mutatott szignifikáns Se-indukált csökkenést (29. ábra A). Ehhez hasonlóan a 40 μ M Se-terhelt NO-túltermelő *gsnor1-3* gyökerek életképessége is kontroll szinten maradt. Ezzel ellentétesen alakult a helyzet a csökkent citokinin, valamint a csökkent NO tartalommal bíró lúdfűvek esetében, hiszen itt a 40 μ M Se a gyökér merisztéma életképességének szignifikáns romlását idézte elő. A tolerancia indexeket tekintve (29. ábra B) megállapítható, hogy az *ipt-161* bizonyult a legtoleránsabbnak, melyet az életképességbeli adatok is alátámasztanak. A CK-hiányos *35S:CKX2* és a NO-ot többletben tartalmazó *gsnor1-3* tolerancia szintje a vad típuséhoz hasonló volt, míg a *nia1nia2* dupla mutáns- bár a gyökér életképességét jelentősen rontotta a kezelés-, mégis közepesen szelén toleránsnak bizonyult, hiszen a FGY megnyúlása kevésbé gátlódott. Az eredmények alapján felmerül a kérdés, hogy pontosan mi a szerepe a NO-nak a gyökérnövekedés szabályozásában? A nagy NO tartalommal rendelkező *gsnor1-3* mutánsban a szelén a merisztematikus zónában nem, az elongációs zónában viszont csökkentette az életképességet (30. ábra).

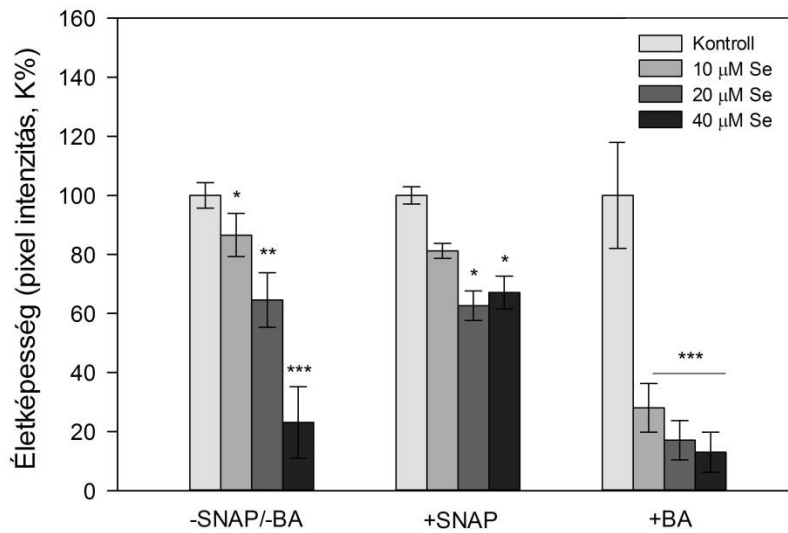


29. ábra: Életképesség (FDA fluoreszcencia pixel intenzitás kontroll%-ban megadva) a kontroll és 40 μM Se-kezelt *Col-0*, *ipt-161*, *35S:CKX2*, *gsnor1-3* és *nia1nia2* lúdfűvek FGY merisztémájában (A). A *-gal jelölt oszlopok a $P \leq 0,001$ (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek a Student-féle T-teszt alapján (n.s.=nem szignifikáns). Szelén tolerancia index (%) a 40 μM Se-kezelt *Col-0*, *ipt-161*, *35S:CKX2*, *gsnor1-3* és *nia1nia2* *Arabidopsis*-okban (B). A különböző betűvel jelzett oszlopok $P \leq 0,05$ valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek egymástól a Duncan teszt alapján.



30. ábra: Életképesség (FDA fluoreszcencia pixel intenzitásban, kontroll%-ban megadva) 0, 10, 20 és 40 μM Se kezelt *gsnor1-3* növények merisztémikus (MZ) és elongációs (EZ) zónájában. A *-gal jelölt oszlopok a $P \leq 0,001$ (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek a Student-féle T-teszt alapján.

A növények életképességének alakulását Se stressz alatt exogén NO és CK kezelés alkalmazása mellett is tanulmányoztuk, hogy össze tudjuk hasonlítani a genetikailag és a biokémiaailag módosított NO és CK tartalom hatását a növények stressz toleranciájára. A NO donor kezelés hatására a merisztéma sejtek életképessége jelentősen javult, míg az exogén BA kezelés súlyosította a Se-indukált életképesség veszteséget (31. ábra).



31. ábra: Életképesség (FDA fluoreszcencia pixel intenzitásban, kontroll%-ban megadva) a vad típusú lúdfü FGY merisztémájában Se kezelés valamint 10 μM SNAP vagy 0,1 μM BA kiegészítő kezeléssel. A *-gal jelölt minták $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) illetve 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek a Student-féle T-teszt alapján.

V.3. *Pisum sativum* L. növényen végzett kísérletek

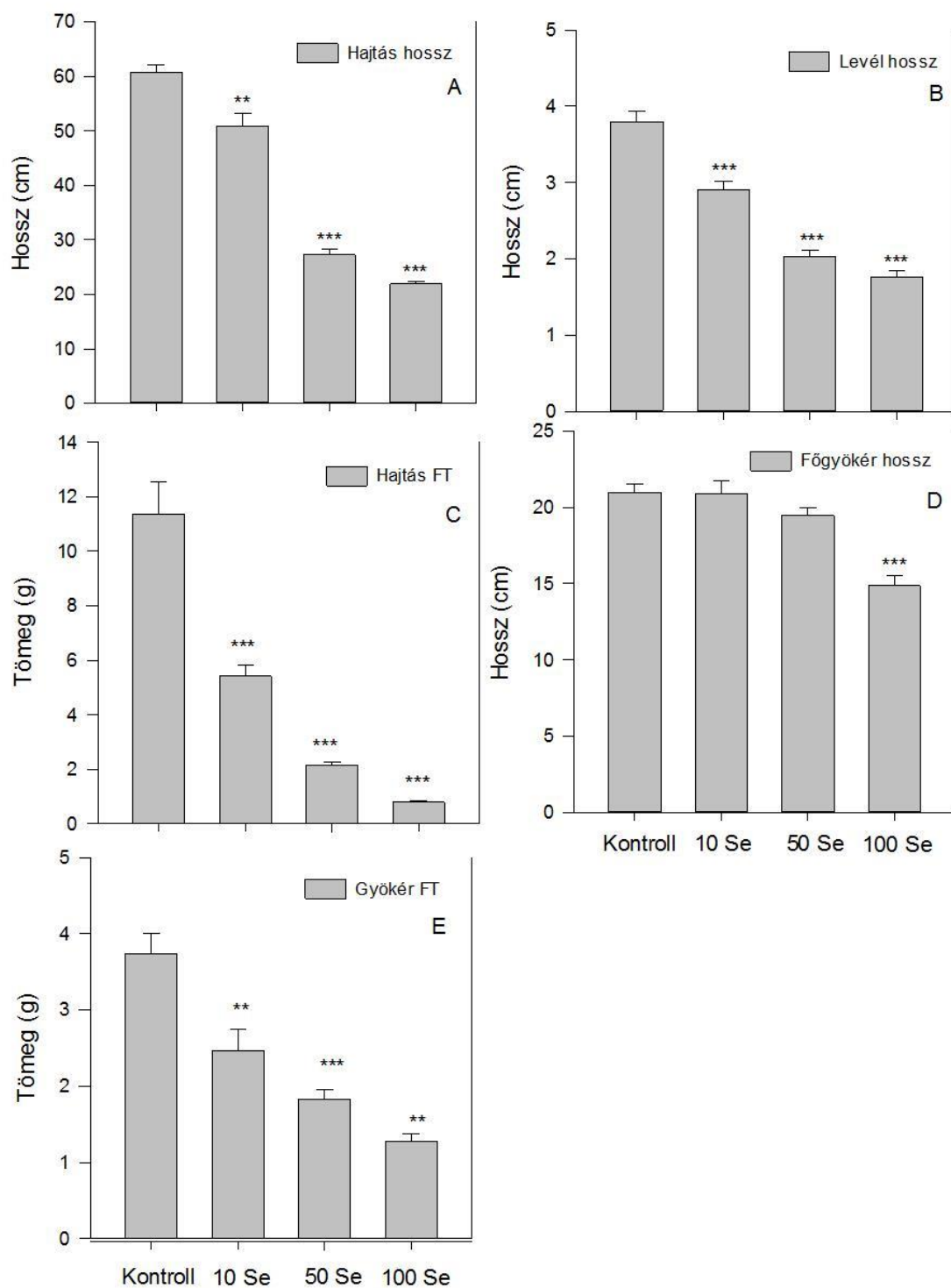
V.3.1. A szelén hosszú távú hatása a borsó növények morfológiájára, a virágzásra és a termésképzésre

A biofortifikációs kísérlet során célunk volt a hosszú távú szelén stressz borsó növényekre kifejtett fiziológiai hatásait vizsgálni, így a növekedésre, fejlődésre, virágzásra, a terméshozásra és érlelésre gyakorolt hatását tanulmányoztuk. Ezen monitorozott paraméterek, mint érzékenységi markerek, jól tükrözik a stresszhatást és az előidézett fejlődési válaszokat.

A borsó növények hajtását tekintve, a hossz eredményekből látszik, hogy a Se kezelés hosszú távon szignifikánsan negatívan befolyásolta a hajtás növekedését: a legenyhébb, 10 μM koncentrációjú Se kezelés kis mértékben, míg a 20 és 40 μM Se erősen gátolta azt (32. ábra A és 33. ábra B). Kevésbé érzékeny morfológiai paraméternek bizonyult a levéllemez hossznövekedése, melynek értékei ugyan szintén csökkenő tendenciát mutattak, de szignifikáns gátlás csak a 40 μM -os Se koncentráció hatására jelentkezett (32. ábra B).

A hajtás friss tömegét tekintve, itt már a 10 μM Se is ~50%-os redukción eredményezett, mely a növekvő Se koncentrációk hatására végül drasztikusan lecsökkent. A 100 μM Se kezelt növények hajtása erőteljesen elszáradt, ebből adódik a csupán 1 g körüli FT érték (32. ábra C).

A FGY hossza csak kismértékben tért el a kontrolltól a 10 és 20 μM Se kezelés hatására, ám a legmagasabb kezelési koncentráció (40 μM) itt is szignifikáns rövidülést okozott (32. ábra D és 33. ábra A). A Se terhelt növények gyökerének friss tömege a hajtásukéhoz hasonlóan változott, ám a redukció kisebb mértékű volt (32. ábra E).



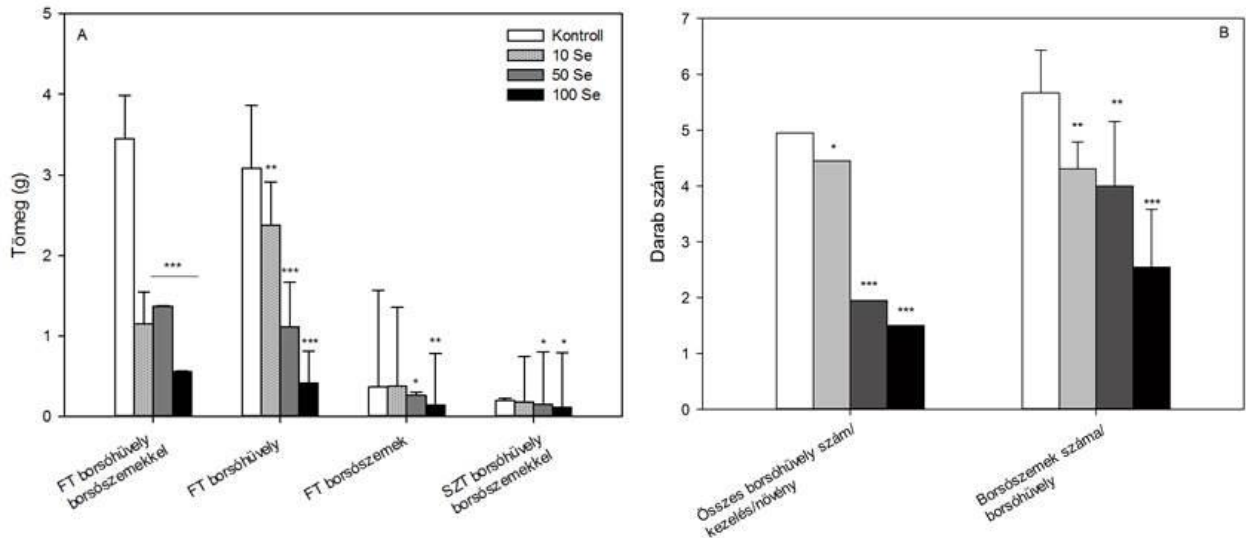
32. ábra: Az aratás napján mért morfológiai paraméterek: hajtás hossz (A), levél hossz (B), hajtás friss tömeg (C), FGY hossz (D), gyökér friss tömeg (E). A *-gal jelölt minták a kontrolltól $P \leq 0,01$ (**) vagy $0,001$ (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek a Student-féle T-teszt alapján.

A borsó növények 42 napos korukban kezdtek el virágozni, mely a kezelési periódus 8. napját jelentette. Legelőször az 50 μM Se-nel kezelt növényeken jelentek meg a virágkezdemények, majd pár napon belül a kontroll és 10 μM szelén kezelésnek kitett növényeken is (33. ábra C). A 100 μM Se ehhez képest egy héttel késleltette a virágzást. A szelén-kezelt növényeken kevesebb virágot számoltunk a kontrollhoz képest, ám ezek gyorsabban fejlődtek és nyíltak ki (adat nincs bemutatva). Ezzel összefüggésben, az 50 és 100 μM Se-kezelt növényekről 6 nappal hamarabb kellett learatnunk a termést (84. nap - 50. napja a kezelésnek) (33. ábra D és E), mert a növények életképessége erősen lecsökkent. A 10 μM Se kezelésnek kitett növényeket a 90. napon arattuk le (56. napja a kezelésnek).



33. ábra: A borsó növényekről az aratás napján készített reprezentatív felvételek: kontroll, 50 μM és 100 μM Se-kezelt növény hajtása és gyökere (A), kontroll, 50 μM és 100 μM Se-kezelt növény hajtása (B), termés érlelési fázis (C), 10 μM Se-kezelt növények borsóhüvelyei (egy növényről származnak) (D), és kontroll és 10 μM Se-kezelt növények borsóhüvelyei terméssel (E).

A termés morfológiai elemzésekor vizsgáltunk tömegre, darab számra és hossza vonatkozó paramétereket is, hogy egy átfogó képet kaphassunk a Se terméshozásra kifejtett hatásáról. Az összes általunk kiválasztott szempont alapján kapott értékek azt tükrözik, hogy a Se koncentrációfüggő módon csökkentette a termés friss és száraz tömegét (34. ábra A), a képződött borsóhüvelyek és borsószemek számát (34. ábra B). Az 50 és 100 μM Se minden esetben szignifikáns csökkenést idézett elő.

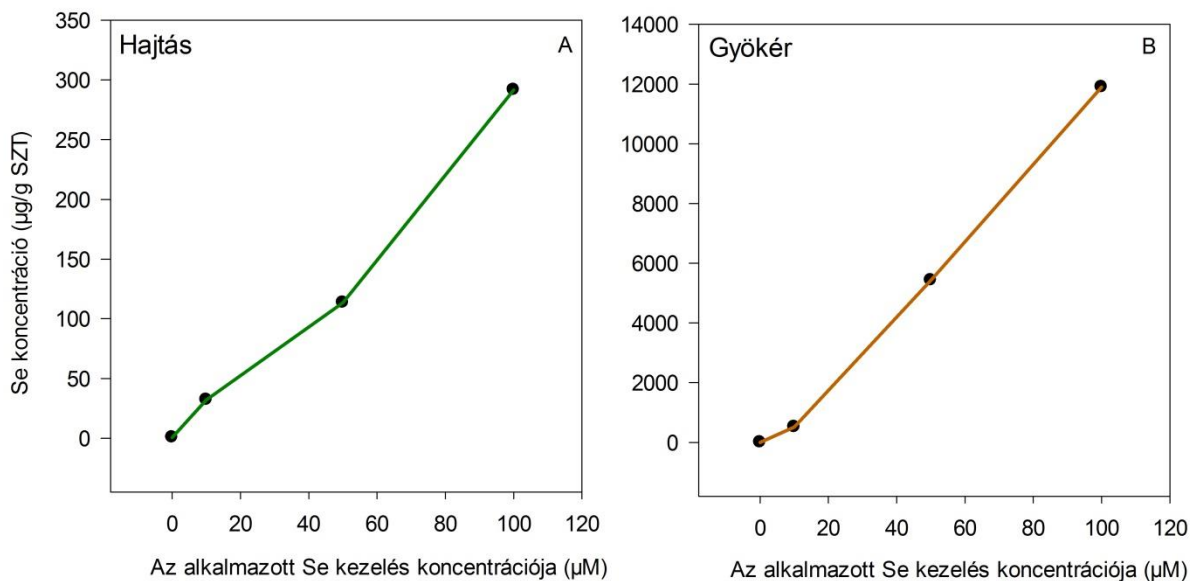


34. ábra: A borsóhüvely és -szemek friss és száraz tömegei (A) és a borsóhüvelyek száma növényenként, valamint a borsószemek száma hüvelyenként (B). A *-gal jelölt minták a kontrolltól $P \leq 0,05$ (*) vagy $0,01$ (**) vagy $0,001$ (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek a Student-féle T-teszt alapján.

V.3.2. A szelén felvétele, transzlokációja és hatása a makro- és mikroelem homeosztázisra

Az általunk felállított kísérleti rendszerben a borsó növények a Hoagland tápoldattal együtt kapták a szelént nátrium-szelenit formájában 10, 50 és 100 μM koncentrációban. Az így alkalmazott hosszú távú kezelés Se felvételre, transzlokációra és a makro-, valamint mikroelem homeosztázisra gyakorolt hatását ICP-MS készülékkel határoztuk meg. A hajtás és gyökér adatok egyértelműen mutatják, hogy a szelént különböző koncentrációban tartalmazó tápoldattal történő öntözés hatására az elemfeldúsulás mind a hajtásban, mind pedig a gyökérben megtörtént (35. ábra). Kontroll körülmények között a növényekben 0-2 μg szelén volt 1 g száraz tömegre

vonatkoztatva, mely a kísérleti periódus végére a hajtásban 291,6 $\mu\text{g/g}$ SZT, míg a gyökérben 11900 $\mu\text{g/g}$ SZT volt.



35. ábra: A borsó növények hajtásában (A) és gyökerében (B) akkumulálódott Se koncentráció ($\mu\text{g/g}$ SZT) 0, 10, 50 és 100 μM nátrium-szelenit kezelés hatására.

Az akkumulációs ráta a polinomiális korrelációt mutatja az akkumulált Se tartalom és az alkalmazott Se kezelési koncentrációk között. Ezeket a gyökérre, hajtásra és termésre vonatkozóan is kiszámoltuk (5. táblázat). Az R^2 értékek a gyökér, hajtás és borsószem esetében is 1-hez közeliak voltak (5. táblázat).

5. táblázat: Az akkumulációs ráta a hajtás:gyökér transzlokációs arányával szemlélítve, valamint a gyökér, hajtás és borsószem R^2 értékei.

Se kezelés	Se hajtás:gyökér arány		R^2
Kontroll	0,303	Gyökér	0,9956
10 μM Se	0,063	Hajtás	0,9978
50 μM Se	0,021	Borsószem	0,9857
100 μM Se	0,025		

A hosszú távú Se kezelés hatását tekintve a növények makro- és mikroelem homeosztázisára láthatjuk, hogy hajtásban a makroelemek közé tartozó kálium és magnézium szintje koncentrációfüggő módon lecsökkent a kezelés hatására, míg a kalcium tartalom 10 μM Se hatására megemelkedett és csak az erőteljesebb Se stressz hatására csökkent le. Gyökérben a kálium és kalcium koncentrációja a hajtásban megfigyelt módon változott, ám a magnézium tartalom emelkedést mutatott a kezelés hatására (6. táblázat).

6. táblázat: A hosszú távú Se kezelés hatása a növények makroelem tartalmára ($\mu\text{g/g}$ SZT).

		Makroelemek ($\mu\text{g/g}$ SZT)		
		K	Mg	Ca
Hajtás	Kontroll	69011,41	11102,66	9273,76
	10 μM	64347,00	11172,55	10329,84
	50 μM	38514,17	8367,55	9038,12
	100 μM	31017,61	7749,51	7549,90
Gyökér	Kontroll	10146,34	2540,49	12870,24
	10 μM	5408,06	2639,13	17687,32
	50 μM	7073,64	2779,07	7468,99
	100 μM	2843,14	2725,49	6333,33

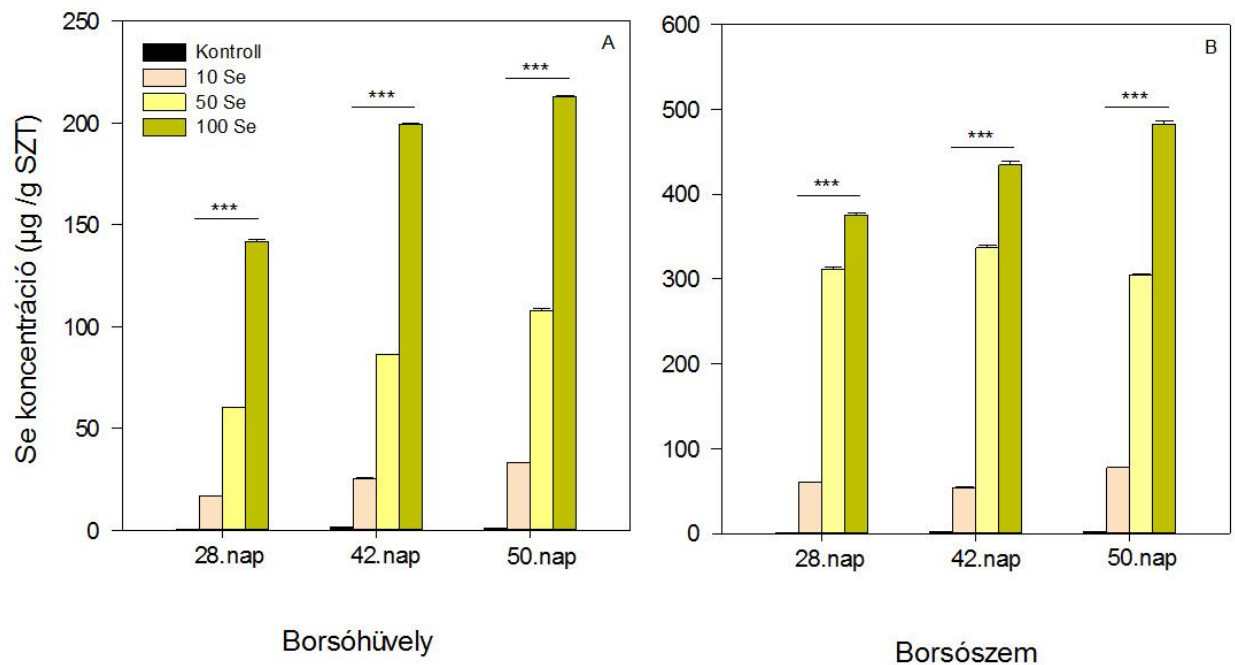
A mikroelemek közül a cink tartalomról elmondhatjuk, hogy hajtásban a 10 és 50 μM Se kezelés esetében csökkent, majd a legmagasabb 100 μM koncentrációjú Se kezelés hatására kontroll szintre tért vissza. Gyökérben a 10 és 100 μM Se is megemelte a Zn tartalmat. A kobalt és a molibdén tartalom koncentrációfüggő módon lecsökkent a hajtásban, míg a réz szintje megemelkedett. A mangán és a vas szintje 10 és 50 μM Se hatására szintén megemelkedett, majd visszacsökkent. Gyökérben a mangán, vas, kobalt, réz és molibdén tartalmak különböző mértékben emelkedtek (7. táblázat).

7. táblázat: A hosszú távú Se kezelés hatása a növények mikroelem tartalmára ($\mu\text{g/g}$ SZT).

		Mikroelemek ($\mu\text{g/g}$ SZT)					
		Zn	Mn	Fe	Co	Cu	Mo
Hajtás	Kontroll	112,30	9,89	38,16	0,69	4,21	11,81
	10 μM	78,96	14,62	41,50	0,62	4,17	10,30
	50 μM	62,99	16,07	37,05	0,64	3,96	9,23
	100 μM	117,50	7,01	32,44	0,61	4,83	8,21
Gyökér	Kontroll	333,90	9,46	239,70	5,59	41,39	4,12
	10 μM	467,20	8,90	239,90	2,90	22,52	1,91
	50 μM	369,00	13,33	412,60	6,42	49,00	2,33
	100 μM	469,30	11,87	387,20	6,93	60,79	3,59

V.3.3. A biofortifikáció lehetőségének vizsgálata

A biofortifikáció folyamatának lényege, hogy a választott technikával a hiánytűnetet mutató elemet - esetünkben a szelént - bevigyük a növénybe és feldúsítsuk azt a növény ehető részeiben olyan formában, hogy az hozzáférhető legyen a fogyasztó szervezet számára. Az elemfeldúsulás természetesen belüli vizsgálatához ICP-MS technikát alkalmaztunk, mellyel a három alkalommal történt termés aratás során szerzett minták együttes szelén tartalmát elemeztük külön a borsóhévelyben és a borsószemekben. Így nyomon tudtuk követni a 28., 42. és 50/56. napon kapott eredmények segítségével, hogy a dúsulás fokozatosan történt-e, vagy esetlegesen van egy akkumulációs határa a borsó növényeknek. Látható, hogy a kontrollhoz képest az összes Se kezelés szignifikáns elemtartalom emelkedést váltott ki mind a hévelyben, mind pedig a szemekben. Továbbá elmondható, hogy a borsóhévely és a szemek Se tartalma a kezelések időtartamával párhuzamosan és koncentrációfüggő módon növekedett (36. ábra).



36. ábra: A Se koncentrációk (µg/g SZT) a borsóhüvelyben (A) és a borsószemekben (B) a kezeléseket követő 28., 42. és 50. napon. A *-gal jelölt minták a kontrolltól $P \leq 0,01$ (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különböznek a Student-féle T-teszt alapján.

VI. Eredmények értékelése

VI.1. *Arabidopsis thaliana* L. növényen végzett kísérletek értékelése

VI.1.1. A lúdfű a gyökér- és hajtásrendszerbe transzlokálja a felvett szelént, mely fokozott kén felvételéhez is vezet

Az *Arabidopsis* a Se-re nézve nem akkumuláló növény (Pilon-Smits és Quinn, 2010), eredményeink alapján azonban az látszik, hogy fel tudta venni a kezelésként alkalmazott szelenitet, és mintegy 500-szorosára növelte így a Se tartalmát (2. táblázat). A hajtás:gyökér arányszámok azt is megmutatták, hogy míg kontroll körülmények között a gyökérben található nagyobb mennyiségben a Se, addig a kezelés hatására nagymértékű transzlokáció történt a hajtás felé. Ezek alapján úgy tűnik, hogy az *Arabidopsis* nem tudta kizárni a Se-t a hajtás szöveteiből.

A szelén és a kén között nagyfokú kémiai hasonlóság van, ezért versengenek egymással a felvételi és asszimilációs folyamatok során (Ellis és Salt, 2003, Hopper és Parker, 1999). A kémiai hasonlóság miatti túlzott szelénfelvétel akár kénhiányt is okozhat a növényi szervezetben, klorózis és gátolt növekedés tünetét előidézve. A mi kísérleti rendszerünkben azonban szignifikáns szelén-indukált kén felhalmozódást tapasztaltunk, legfőképp a lúdfű gyökerében (3. táblázat). Ennek magyarázata az lehet, hogy a szelén kitettség kénhiányt idézett elő, melyre válaszul a SULTR1;1 és SULTR2;1 szulfát transzporterek expressziója megemelkedett, ez pedig végső soron S akkumulációhoz vezetett (Van Hoewyk és mtsai, 2008).

VI.1.2. A szelenit koncentrációfüggő módon befolyásolja a vad típusú *Arabidopsis* morfológiáját és életképességét

A meghatározott elemtartalmakból tudtuk, hogy a táptalajba adott szelenitet a növényeink felveszik, méghozzá mindkét szervrendszerükben fel is halmozzák. A következő kérdésünk az volt, hogy a felvett szelenit hogyan hat a növények gyökér- és hajtásfejlődésére, valamint az életképességére. A vad típusú (*Col-0*) növények sziklevel expanzióját a Se kezelés kevésbé

befolyásolta (4. táblázat), ekkor a sejtek életképességére sem fejtett ki hatást, a 4. és 7. nap közötti hosszanti növekedésére azonban jelentős, gátló hatással volt, ami összefüggést mutat a 4. napon tapasztalt életképesség veszteséssel (12. ábra A, 13. ábra). A sziklevél növekedésével ellentétben a hipokotil megnyúlás kevésbé bizonyult Se-re érzékeny folyamatnak (12. ábra B).

A hajtás növekedési válaszához képest a gyökérrendszer fejlődése érzékenyebbnek bizonyult a magas szelén koncentrációkra, az összes általunk vizsgált paraméter tekintetében. A FGY hossz koncentrációfüggő növekedésgátlást szenvedett el (14. ábra), az oldalgökerek száma pedig szintén csökkent a szelén hatására (ábra). Ez alól egyedül a 10 μM Se koncentráció volt kivétel, mely morfogenetikai választ (SIMV) váltott ki; mind az OGY iniciációja, mind pedig azok későbbi fejlődése indukálódott hosszú távon (15. ábra). Hasonló stressz indukálta morfogenetikai választ figyeltek meg réz-kezelt *Arabidopsis*-ban is (Pasternak és mtsai, 2005). A 10 μM Se indukálta megváltozott növekedés alapvető fontosságú eleme lehet az akklimatizáció és így a tolerancia folyamatának, hiszen a nagyobb számú és méretű oldalgökérzet jobb víz- és tápanyagfelvételt biztosít, ezáltal segítheti a növényt a túlélésben. A FGY merisztéma életképességét a korai fejlődés során csak a legmagasabb koncentráció (40 μM) rontotta, később az összes koncentráció, méghozzá dózisfüggő módon (16. ábra).

Szelenit hatására tehát teljes körű növekedésgátlás lépett fel a lúdfű növényekben, mely a gyökér- és hajtásrendszerüket is érintette. Ez a Se-indukált fejlődésgátlás jó összefüggést mutat a sejtek életképességének csökkenésével a teljes növekedési periódus alatt. A bekövetkező sejthalál egyik oka az lehet, hogy a Se megzavarja a fehérjeszintézist, szelenocisztein és szelenometionin képződik a növényi szervezetben, melyek a cisztein és metionin helyére épülnek be, így funkciójukat rosszul ellátó vagy ellátni képtelen fehérjék képződnek (Barillas és mtsai, 2011). A Se-indukált sejthalál következtében a sejtosztódás a gyökér apikális merisztémájában csökken vagy teljesen leáll (Lequeux és mtsai, 2010). Eredményeink viszont azt mutatják, hogy a sejtosztódás markereként használt CYCB1;1::GFP expressziója szelén kezelés hatására nem változik, mely alapján - a Se FGY merisztémát érintő növekedésgátló hatását is figyelembe véve (17. ábra), arra következtethetünk, hogy egyéb sejtciklus géneknek nagyobb jelentősége lehet a FGY merisztéma sejtjeinek osztódásában szelén stressz alatt, továbbá a szelenit képes lehet a sejtek korábbi elongációját előidézni. A szelenit ezen sejtszintű hatása további vizsgálatokat igényel.

VI.1.3. A szelenit megváltoztatja a belső hormonális homeosztázist

A jelátviteli és hormonális rendszer összehangolt munkája révén alakulnak ki azok a fejlődési jelek, melyek lehetővé teszik a növények környezethez és annak változásaihoz való alkalmazkodását, és amely helyhez kötött élőlényként nélkülözhetetlen a növények számára. Kutatásunk során igyekeztünk feltárni a növekedési válaszok hátterében húzódó hormonális folyamatokat, ezért auxin-, citokinin- és etilénválaszt vizsgáltunk az *Arabidopsis* gyökérrendszerében *in situ* mikroszkópiás módszerrel. A DR5 gén egy nagy aktivitású szintetikus auxin válaszelem (Ulmasov és mtsai, 1997), melyhez a GUS riporter kapcsolódik és ennek aktivitási mintázata információval szolgált az endogén auxinválaszról. A DR5::GUS aktivitása csökkent Se hatására (18. ábra A-L), mely az auxinválasz csökkenését mutatja a FGY merisztémában. Ezt Wang és mtsai (1992) munkája is alátámasztja, amiben a Na-szelenit csökkentette a belső indol-3-vaajsav szintet dohány növényben. Továbbá csökkent DR5 expressziót találtak réz- és kadmium kezelt *Arabidopsis* FGY merisztémájában (Potters és mtsai, 2009; Lequeux és mtsai, 2010). Az irodalomból tudjuk, hogy a Se kezelés befolyásolja az auxin transzportját és konjugációját, hiszen hatására az auxin efflux carrier PIN1 fehérje génje downregulálódik, ám az indol-3-acetát- β -glukoziltranszferáz gén expressziója fokozódik, mely inaktív auxin konjugátumokat képez. Valamint számos auxin-szabályozott jelátviteli komponens kódoló gén expressziója alacsonyabb Se-kezelt lúdfüben (Van Hoewyk és mtsai, 2008).

A citokininek képződésének fő helye a gyökér, ahonnan a xilém elemeken keresztül mobilizálódnak a többi szervbe (Kudo és mtsai, 2010). Kísérleteink során a citokininválaszt szabályozó gén-függő (ARR5) GUS *in situ* expressziója a korai fejlődés során erőteljesen megnövekedett (18. ábra D-F), mely szintén oka lehet a FGY növekedésgátlásának, hiszen a CK negatív szabályozója e folyamatnak (Mähönen és mtsai, 2006). Ezzel összefüggésben, szelenát kezelt lúdfüben egy CK jelátvitelben szereplő negatív szabályozó komponens (At1g74890) gátlását mutatták ki (Van Hoewyk és mtsai, 2008).

Az etilén bioszintézisben résztvevő ACS8 szintáz gén mind a korai, mind a késői fejlődési szakaszban fokozott GUS aktivitást mutatott, tehát feltételezhetjük, hogy a Se kezelés az etilén bioszintézisének fokozódását okozta (18. ábra G-I). Kék hajnalka (*Ipomoea tricolor* Cay.) öregedő virág szövetein végzett kísérletek során kimutatták, hogy szelenometionin kezelés

hatására az etilén képződés fokozódik (Konze és mtsai, 1978), csakúgy, mint szelenát kezelés után *Stylosanthes humillis* csíranövényekben (Ribeiro és mtsai, 2011). A Se-indukálta etilén-produkció háttérében az etilén szintéziséhez és jelátviteléhez kapcsolódó gének expressziójának fokozódása állhat (Tamaoki és mtsai, 2008; Van Hoewyk és mtsai, 2008).

VI.1.4. A hormon mutáns növények növekedési válasza és szelén toleranciája

Az *aux1-7* növényekben mutációjuk révén a hajtásból gyökérbe történő auxin transzport hibás, ezért alacsonyabb auxin szinttel rendelkeznek és kevésbé érzékenyek az auxinra (Pickett és mtsai, 1990), mint a vad típusú növények. Eredményeink azt mutatják, hogy auxin és etilén hiányában a szelenit kezelés képes volt növekedést gátló és életképesség csökkentő hatását kifejteni a gyökérrendszerben, mely ezen növények Se érzékenységre utal (19. ábra).

A két etilén hiányos vonal közül a *hls1-1*, mely alacsony etilén szintet tartalmaz, érzékenynek bizonyult, ám az *etr1-1* vonal, mely az etilén jelátvitelében hibás és etilén szintje a vad típuséhoz hasonló, rezisztensnek bizonyult, hiszen életképessége csak egy bizonyos koncentráció (10 μ M) hatására csökkent szignifikánsan (19. ábra B). Ezek alapján úgy tűnik, hogy az etilén szintben történő változás inkább meghatározza a Se tűrőképességet, mint az etilén rezisztencia. Tamaoki és mtsai (2008) hasonló hatást tapasztaltak, hiszen munkájukban a 15 μ M szelenit kezelés jelentősen megemelte az etilén szintet, ami szükséges volt a kén-asszimilációjáért felelős gének szelén általi indukciójához.

Az *ipt-161* növények, melyek 10-szeres zeatin tartalommal bírnak a vad típuséhoz képest, nem mutattak sem gyökérmorfológiájuk, sem életképességük tekintetében szelén-indukált gátlást (19. ábra), melyből arra következtetünk, hogy a CK hormon szerepet játszik a Se toleranciában. Kimutatták, hogy magas CK szint hatására fokozódik az adozin-foszfoszulfát-reduktáz1 (APR1) gén transzkripciója, ami elősegíti a Se metabolizmust (Ohkama és mtsai, 2002), végső soron toleranciát idézve elő. Azt is meg kell említeni, hogy a nitrát reduktáz egy CK-indukálható enzim (Samuelson és mtsai, 1995), mely aktivitásának növekedése hatékonyabb nitrogén metabolizmushoz, így a Se tolerancia fokozódásához vezethet. A gyökerek NO bioszintézisének kulcsenzimeként a NR hozzájárulhat a NO szint emelkedéséhez (Xu és Zhao, 2003), ami pedig

tolerancia folyamatokat aktiválhat. Éppen ezért további kísérleteinkben a NO szintek vizsgálatával foglalkoztunk.

VI.1.5. A NO szerepe Se stressz alatt vad típusú és hormon mutáns növényekben

A vad típusú (*Col-0*) és megváltozott hormon tartalommal rendelkező növények gyökerében detektáltuk a NO szinteket, és arra kerestük a választ, hogy a Se stressz hogyan befolyásolja a NO képződését, és milyen kapcsolat áll fenn a hormonális és jelátviteli rendszer elemei között, vagyis, hogy befolyásolja-e a NO produkciót egy adott hormon többlete vagy hiánya.

A *Col-0 Arabidopsis* korai fejlődése során a FGY merisztéma nagyon magas NO tartalommal rendelkezett, míg később ez lecsökkent és alacsony szinten maradt (20. ábra A). Ez az eredmény is megerősíti a NO szerepét a csíranövények korai egyedfejlődésében (Gniazdowska és mtsai, 2010). A szelén NO metabolizmusra gyakorolt hatása érdekes, hiszen a korai fejlődési szakaszban csökkenti a NO szintet, míg később emelkedést idéz elő. A fejlődés kezdeti szakaszán a NO Se-indukált eliminációjáért az oxigénnel, glutationnal, növényi hemoglobinnal vagy különböző ROF-kal (pl. hidrogén-peroxid, szuperoxid gyök) történő reakciója lehet a felelős (Misra és mtsai, 2011). Ezek a reakciók alapvető fontosságúak a NO aktuális szöveti koncentrációjának precíz szabályozásában, ami lehetővé teszi a NO számára, hogy szignál molekulaként válaszokat generáljon. A szelén hatására, a későbbi fejlődés során tapasztalt NO képződés többek között a NR enzim aktivitásának eredménye lehet. Rios és mtsai (2010) a NR aktivitás fokozódását tapasztalták szelenit kezelt saláta növényben, ami lehet közvetlen hatás, vagy megvalósulhat a kénhiány által indukált molibdén koncentráció növekedésén keresztül (Shinmachi és mtsai, 2010). De meg kell jegyezni, hogy a szelén-indukált NO képződés egyéb enzimátikus és/vagy nem enzimátikus folyamatai is hozzájárulhatnak a NO szintek változásaihoz ebben a rendszerben.

A NO és auxin közötti negatív kapcsolatra utal az az eredményünk, mely szerint a kontroll *aux1-7* növények magas NO szintet mutatnak (21. ábra). Hasonlóan negatív NO-auxin kapcsolat volt megfigyelhető réz-kezelt *Arabidopsis*-ban is (Pető és mtsai, 2011), és magas NO

szint hatására csökkent a DR5::GUS expressziója és a PIN1-szabályozott auxin transzport szintén lúdfűben (Fernández-Marcos és mtsai, 2011).

A CK-túltermelő (*ipt-161*) vonal a vad típusnál kissé nagyobb NO tartalommal rendelkezett kontroll körülmények között (21. ábra), és a szelén kezelések nem csökkentették a NO szintet, hanem egy enyhe emelkedést okoztak. Ezek az eredmények a CK és a NO közötti kölcsönhatás meglétére utalnak a Se kezelésnek kitett növényekben. Ennek a kapcsolatnak a vizsgálatával dolgozatom későbbi részében foglalkozom részletesen.

A két etilén mutáns (*hls1-1* és *etr1-1*) gyökerében, kontroll körülmények között tapasztalt nagyon magas NO szintet (21. ábra) az magyarázhatja, hogy az etilén és nitrogén-monoxid között antagonistá kapcsolat áll fenn a gyökér növekedése során. A negatív NO-etilén kapcsolatra példa, hogy a NO képes downregulálni az etilén bioszintézisében résztvevő ACC oxidáz géneket (ACO4) (Besson-Bard és mtsai, 2009). A Se kezelés hatására azonban vad típushoz hasonló változás következett be a NO szintekben ezeknél a növényeknél (21. ábra), mely arra enged következtetni, hogy szelén stressz alatt nem áll fenn szabályozó kapcsolat az etilén és NO között.

VI.1.6. A hidrogén-peroxid szintek alakulása *Col-0* és hormon mutáns növényekben

A NO képes reakcióba lépni egyes reaktív oxigénformákkal, mely során saját endogén koncentrációja lecsökken, vagy akár teljesen eliminálódhat is a rendszerből. A NO egyik fontos reakciópartnere a hidrogén-peroxid. A korai fejlődés során, a *Col-0* növények FGY merisztémájában a NO szintje magas, a H₂O₂ szintje pedig alacsony volt, míg az idősebb gyökerekben a magas H₂O₂ szinthez alacsony NO szint társult (23. ábra A). Ez is arra enged következtetni, hogy e két jelmolekula kölcsönösen egymás reakciópartnerei a csíranövény fejlődése során. A szelén H₂O₂ akkumulációt kiváltó hatása a glutation fogyasztás direkt vagy indirekt következménye lehet (Grant és mtsai, 2011). A 7. és 14. napon mért alacsonyabb rezorufin fluoreszcencia feltehetően már az antioxidáns rendszer aktiválódásának köszönhető, hiszen a kontroll szintjét nem haladta meg. A NO-H₂O₂ között fennálló antagonizmus oka lehet az a kémiai reakció, mely során a H₂O₂ a NO-dal reagálva peroxinitrit (ONOO⁻) képződéséhez

vezet, vagy állhatnak a háttérben enzimatikus és nem-enzimatikus folyamatok is (pl. NR vagy antioxidánsok).

Az *aux1-7* növények alacsony H_2O_2 tartalma (23. ábra B és C) magyarázatul szolgálhat ennek a mutánsnak az oxidatív stresszel szembeni kismértékű érzékenységre (Blomster és mtsai, 2011) és az auxin-hidrogén-peroxid közötti pozitív kapcsolatra. A ROF szerepelhet az auxin jelátvitel downstream elemeként bizonyos folyamatokban, mint pl. a gravitropizmus, és az auxinok is képesek a hidrogén-peroxid szintjét befolyásolni a zárósejtekben (Potters és mtsai, 2009). A Se kezelés a *Col-0*-hoz hasonló csökkenést váltott ki a hidrogén-peroxid szintben, bár ez nem bizonyult szignifikánsnak (23. ábra B). Az általunk felállított hipotézis szerint a csíranövények fejlődésének kezdeti szakaszában a H_2O_2 -függő mitogén-aktivált protein kináz kaszkád (MAPK) csökkenti az auxin érzékenységet az auxin indukálható génexpresszió downregulációja révén (Nakagami és mtsai, 2006), és ez növekedésgátlást eredményez. A későbbi szakaszban (DAG14) a szelén kezelés által indukált NO gátolja a PIN1-közvetítette auxin transzportot, így alacsony auxin szintet és a FGY merisztéma növekedésgátlását kialakítva. A jelátviteli és hormonális rendszer szabályozása tehát szorosan összefügg és együttesen alakítják ki a stresszre adott növekedési választ. Az *ipt-161* mutáció redukált H_2O_2 képződéshez vezetett (23. ábra B és C), mely egy CK-ROF között fennálló antagonizmust feltételez. Feltehetően a H_2O_2 az etilén jelátvitel downstream regulátora, hiszen a két etilén mutáns (*hls1-1* és *etr1-1*) növényünk kontroll körülmények között alacsony rezorufin fluoreszcencia jelet mutatott, valamint a Se a vad típussal ellentétben nem volt képes etilén termelést kiváltani (23. ábra B és C). A H_2O_2 és etilén közötti kapcsolatot támasztja alá, hogy a hisztidin kinázok erősen H_2O_2 -függőek, és etilénhez kapcsolódó sejtválaszokat szabályoznak (Desikan és mtsai, 2001).

VI.1.7. A jelátviteli molekulák szintjében mutáns növények növekedési válasza Se stressz hatására

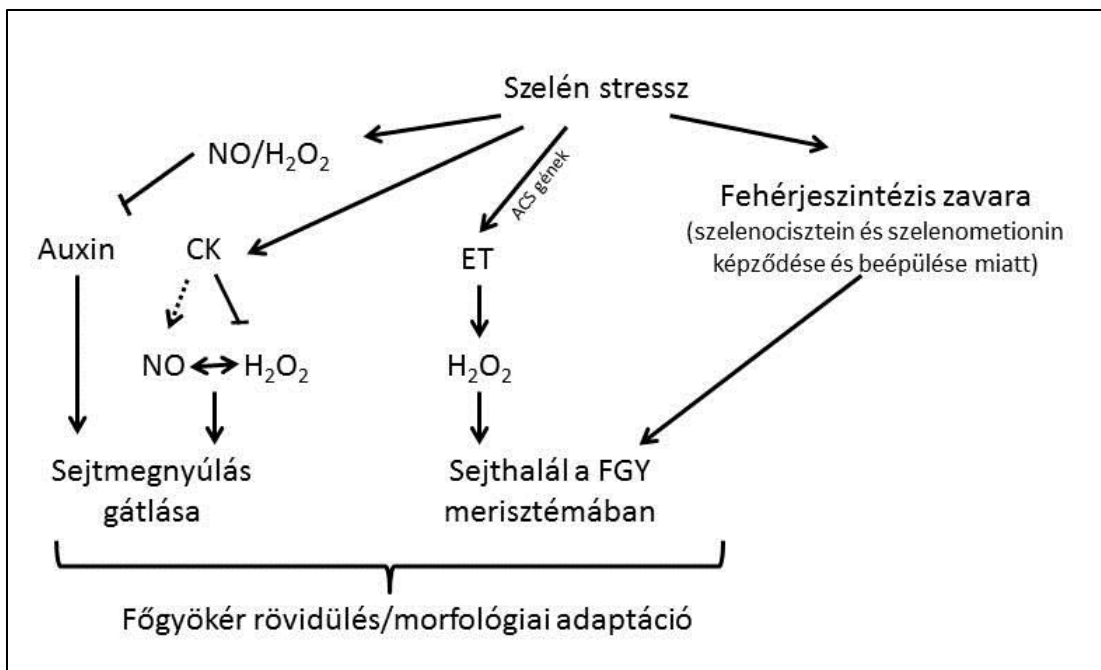
A NO és a H_2O_2 Se toleranciában betöltött szerepének tanulmányozása céljából alkalmaztuk az S-nitrozoglutation reduktáz (GSNOR)-deficiens *gsnor1-3*, a NO-hiányos *nia1nia2*, valamint az aszkorbát-hiányos *vtc2-1* és a *myo*-inozitol oxigenáz mutációja révén aszkorbát-túltermelő *miox4* növényeket. A NO többlete esetén (*gsnor1-3*) a Se kezelés gátolta a FGY merisztéma

megnyúlását (24. ábra A), de az életképességre nem volt hatással (24. ábra B), ami arra utal, hogy a NO hozzájárul a Se-indukált gyökérnövekedés gátláshoz és a Se toleranciához egyaránt. A magasabb S-nitrozoglutation szint jótékony hatását már bizonyították betegségellenállóság illetve hő tolerancia folyamataiban (Feechan és mtsai, 2005; Lee és mtsai, 2008). Létrehoztak továbbá egy olyan paradicsom mutánst is (short-root mutáns; *shr*), melyben a rövid gyökér fenotípus és a betegségekkel szembeni fokozott ellenállóképesség a NO többletének volt köszönhető (Negi és mtsai, 2010). A NR-deficiens *nia1nia2* növények csökkent NO tartalma szelén szenzitivitáshoz vezetett, ami a NR Se stressz során betöltött szerepére utal (24. ábra). További kutatási eredmények is alátámasztják a *nia1nia2* növények érzékenységét különböző stressz faktorok, mint pl. vízhiány hatására (Lozano-Juste és León, 2010). A *vtc2-1* növények alacsony aszkorbát tartalmából eredő magasabb H₂O₂ szint (Pető és mtsai, 2013) hozzájárult a szelénit szenzitivitáshoz, de enyhítette a FGY merisztéma növekedésének gátlását (24. ábra).

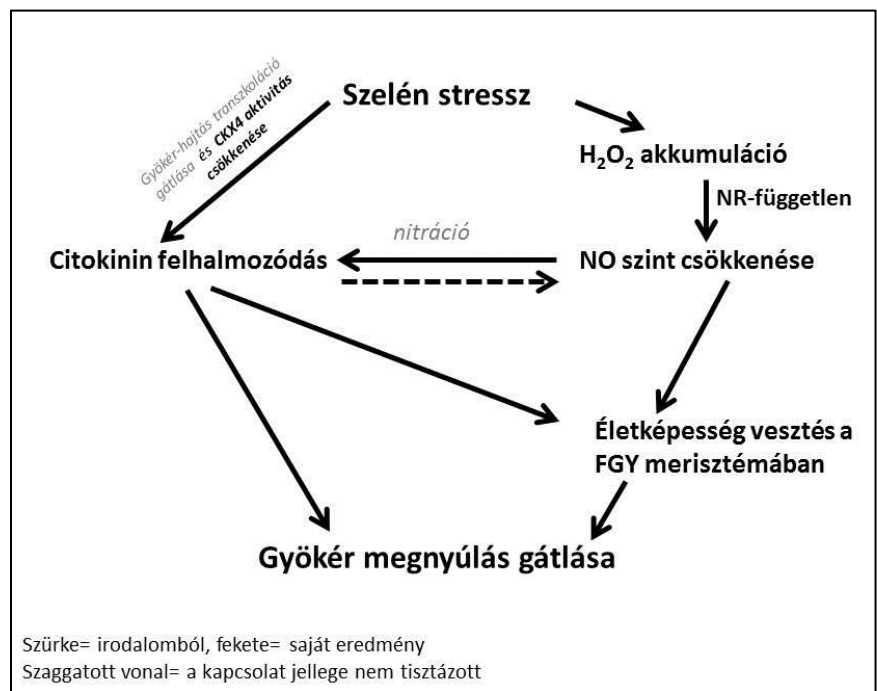
Az endogén NO szint a *Col-0* növények FGY merisztémájában Se koncentrációfüggő módon csökkent (22. ábra), és ez a *nia1nia2* növényekre is igaznak bizonyult (ábra). Ebből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a NR enzim aktivitása a szelénit által generált stresszhelyzetben nem felelős a NO szint változásáért. Újabb eredmények szerint a NO képes a citokinin adenin csoportjával reakcióba lépni, ami a saját, endogén szintjének redukációjához vezet (Liu és mtsai, 2013), és háttérmechanizmusa lehet a Se-indukált NO csökkenésnek.

Mindezek alapján úgy tűnik, hogy azok a növények, melyek (gyökér) növekedésüket jelentősen képesek redukálni, ezáltal képesek erőforrásaikat a fejlődésről a védekezésre átcsoportosítani, nagyobb eséllyel akklimatizálódnak és élnek túl szuboptimális környezeti feltételek esetén.

Szelénnel kapcsolatos átfogó kutatási eredményeimet a 37. ábrán modellezem.



37. ábra: Modell ábra: áttekintő ábra a szelén kezelés hatására bekövetkező változásokról, és ezen változások kapcsolatáról.



38. ábra: Modell ábra: a CK-NO kölcsönhatás részletesebb vizsgálata során kapott eredmények összegzése.

VI.2. A citokinin és nitrogén-monoxid szelén stressz tűrésben betöltött szerepének részletesebb tanulmányozása

VI.2.1. A Se ellentétesen hat a citokinin és nitrogén-monoxid szöveti eloszlására és szintjére az *Arabidopsis* szerveiben

A növényi szervezet fejlődését és működését a külső környezet és a belső hormonális rendszer összehangolt működése határozza meg. Ezen elemek között a jelátviteli rendszer és annak komponensei jelentik a kapcsolatot. A fejlődési folyamatok során a citokininek a nitrogén-monoxiddal együttműködve hatnak és a kettejük kapcsolata növényfajtól, valamint fiziológiai válaszoktól függően szinergista és antagonistá is lehet (Freschi, 2013; Wilhelmová és mtsai, 2006).

A CK-függő ARR5 promóter expressziója a 4 napos, kontroll *Arabidopsis* növények FGY merisztémájára korlátozódott, míg a sziklevek és a hipokotil teljes egészében megfigyelhető volt az X-Gluc festés indigókék színe. Ez a festődés Se kezelés hatására a sziklevelekből és a hipokotilból eltűnt, ám a gyökérben fokozódott (25. ábra A). A Se kezelés morfológiai paraméterekre kifejtett negatív hatását magyarázhatja az ARR5::GUS aktivitás, így a citokininválasz változása a gyökér- és hajtásrendszerben, hiszen ez a hormon a gyökér fejlődését pozitívan, míg a hajtásét negatívan szabályozza (Werner és mtsai, 2003). Mivel a CK bioszintézisének fő helye a gyökércsúcs (Torrey és mtsai, 1976), és a gyökérből hajtásba irányuló, xilém elemeken történő citokinin szállítást környezeti jelek szabályozzák (Kudo és mtsai, 2010), feltételezhetjük, hogy a Se terhelés gátolja a gyökér és hajtás közötti CK transzportot, és ennek hatására alakul ki a tapasztalt aktivitási mintázat: a gyökérben felhalmozódik a jel, a hajtásból pedig eltűnik. Szárazság stressz hatására csökken a xilémekben a citokinin szintje (Bano és mtsai, 1993; Shashidhar és mtsai, 1996), ami gyengülő gyökér-hajtás transzportot vonhat maga után.

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a citokinin lebontásáért felelős citokinin oxidáz/dehidrogenáz gének *in situ* GUS aktivitásában bekövetkező változások hozzájárulnak-e a tapasztalt CK-válaszbeli (ARR5-függő) módosulásokhoz Se stressz alatt. Eredményeink alapján elmondható, hogy az AtCKX4 és AtCKX5 aktivitásának fokozódása a sziklevéiben oka lehet a

CK jel (ARR5::GUS aktivitás) eliminációjának a hajtásból, illetve az AtCKX4 gátlódása a gyökérben okozhatja a Se-indukálta CK-válasz (ARR5::GUS aktivitás) növekedését (25. ábra B).

VI.2.2. A CK-NO közötti cross talk viszonyának tisztázása

A CK-NO közötti kapcsolati viszonyt először Se terhelés nélkül, kontroll körülmények között tanulmányoztuk. Benziladenin kezelést alkalmaztunk és monitoroztuk az ARR5-függő GUS aktivitást, valamint a NO szintet a FGY merisztémában. A CK-függő válasz mind a sziklevélben, mind a gyökérrendszerben fokozódott a BA kezelés hatására (26. ábra). Az exogén CK kezelés emellett a NO szint csökkenését idézte elő a vad típusú növényekben (27. ábra A), a NO donor pedig az ARR5::GUS aktivitás teljes eliminációját okozta a merisztémában (28. ábra). Ezek az eredmények egyértelműen rámutatnak a NO és a CK közötti kölcsönösen negatív kapcsolatra stresszmentes körülmények között. Hasonlóan antagonisztikus kapcsolat áll fenn a molekulák között *Arabidopsis* zárósejtekben (Xiao-Ping és Xi-Gui, 2006; Liu és mtsai, 2013). A szelén-indukált NO képződés elmaradása az *ipt-161* és a *35S:CKX2* növényekben arra utal (27. ábra B), hogy a CK befolyásolja a NO metabolizmusát a Se stressz alatt. Továbbá, a NO szint csökkenése feltehetően szükséges a szelén által kiváltott ARR5 promóter aktiválódásához, ami szintén a szelén stressz alatt a CK-NO között fennálló antagonista kapcsolatra enged következtetni. A CK NO általi nitrációjára vonatkozó hipotézis igazolódni látszik, hiszen a szelénnek kitett növények sziklevelében az ARR5-válasz teljesen gátolt volt (25. ábra A), míg a NO szintek változatlanok maradtak (20. ábra B), ezzel szemben a gyökérben a NO szintje lecsökkent (27. ábra B), de a CK-függő aktivitás indukálódott (25. ábra A). A NO szint csökkenése mögött a CK jelenlétében fokozott expressziót mutató nem-szimbióta hemoglobinok (nsHB-ok) is állhatnak (Ross és mtsai, 2004). Az nsHB-ok szabályozó funkcióval bírnak és fontos szerepet töltenek be a NO nagy mennyiségben történő előállításában stressz esetén (Dordas és mtsai, 2003), ám képesek azt nitráttá alakítva kivonni a rendszerből, ha túl nagy az endogén NO koncentráció (Perazzolli és mtsai, 2006).

VI.2.3. A Se toleranciában résztvevő CK és NO

A növények stressz toleranciájának két markereként az életképességet és a morfológiai paramétereken alapuló tolerancia indexet határoztuk meg.

Megállapítható, hogy a CK-túltermelő *ipt-161* növények toleránsnak bizonyultak a kísérleteink során a Se stresszel szemben (29 ábra A), melyet az életképesség csökkenésének hiánya és a magas tolerancia index bizonyít (29. ábra B). Hasonlóan, az IPT transzgenikus *Agrostis stolonifera* és dohány növény nagy CK tartalma elősegítette a szárazság tűrést (Merewitz és mtsai; 2012, Rivero és mtsai, 2010). Ha azonban a szelén terhelés mellett a növényeket BA kezelésnek is kitettük, az jelentős életképesség romlást idézett elő (31. ábra). Ennek háttérében az állhat, hogy az exogén citokinin egy bizonyos koncentráció fölött képes sejthalált indukálni (Carimi és mtsai, 2004) és így csökkenteni a sejtek életképességét. A NO-túltermelő *gsnor1-3* fokozott FGY gátlása és NO-hiányos *nia1nia2* növények gyökérnövekedésének stresszkörülmények között történő fennmaradása alátámasztja a NO gátló hatását a FGY megnyúlásra (Pagnussat és mtsai, 2002; He és mtsai, 2004; Fernández-Marcos és mtsai, 2011). Ebben a folyamatban a merisztéma sejtek metabolikus aktivitása nem érintett. Ezt alátámasztja az is, hogy a NO többlete esetén a Se-indukált életképesség vesztés a megnyúlási zónában volt kifejezett (30. ábra), vagyis a NO Se stressz alatt valószínűleg a sejtmegnyúlást gátolja. Továbbá az exogén NO életképességet javító hatása megerősíti a feltételezést, hogy a NO hozzájárul a Se stressz toleranciához. A NO stresszt enyhítő hatását számos más kedvezőtlen környezeti feltétel mellett, mint pl. szárazság, só, nehézfém többlet, UV sugárzás igazolták már (Siddiqui és mtsai, 2011).

A CK-NO kölcsönhatás részletesebb vizsgálata során kapott eredményeimet a 38. ábrán összegzem, mely modell ábrához irodalmi adatokat is felhasználtam.

VI.3. *Pisum sativum* L. növényen végzett kísérletek értékelése

VI.3.1. A szelén negatívan befolyásolja a borsó növények fejlődését és termésképzését

A biofortifikációs kísérleti rendszerben a borsó növények hosszú távú szelén stressznek voltak kitéve, mely eredményeink alapján jelentősen befolyásolta a növekedést és fejlődést, továbbá kihatott a növények reprodukciós fázisára is (32. ábra, 33. ábra). A szelén esetében nagyon szűk az a tartomány, mely még nem okoz toxicitási tüneteket. Se hiperakkumulátor növényeknél megfigyelték, hogy a növekedési paraméterekre pozitívan hatott a szelén kezelés, méghozzá oly annyira, hogy azt is kijelentették, hogy talán ezeknek a növények szükségük van Se-re az optimális fejlődésükhöz (Pilon-Smits és mtsai, 2009). A *Pisum sativum* nem tekinthető Se hiperakkumulátornak, mely magyarázhatja a bekövetkezett nagymértékű növekedésgátlást az alkalmazott Se koncentrációk hatására (32. ábra). A növekedésgátlás okát ebben az esetben is visszavezethetjük a modellnövénynél leírt okokra, mely szerint a szelén fehérjékbe történő beépülése esetén megzavarja a fehérjeszintézist (Barillas és mtsai, 2011), mely végül sejthalálhoz vezethet.

A kísérlet időtartama alatt egyértelműen jelentkező negatív hatás a növények fejlődésére felvetette azt a kérdést, hogy vajon a növények számára nem esszenciális szelén hogyan befolyásolja a reprodukciós fázist, képes lesz-e a borsó termést hozni. Megfigyeléseink azt mutatták, hogy a fokozódó stressz miatt, melyet a hosszú távú kezelés okozott, a növények stratégiája a reprodukciós fázis előrehozása és a termés minél hamarabbi érlelése volt. A termés általunk vizsgált paraméterei is Se-indukálta redukción mutattak (34. ábra), csak úgy, mint például Hartikainen és mtsai (2000) eredményei.

VI.3.2. A szelén biofortifikációja borsó növényekben

Az állati és emberi szervezet számára a Se egyik lehetséges forrása a növényi eredetű táplálék. A növények számára ugyan a Se nem esszenciális, de egyes fajok (*Stanleya*, *Astragalus*) képesek nagy mennyiségben akkumulálni és átalakítani olyan formává, mely

felvehető és hasznosítható a fogyasztó szervezet számára, ezért fontos olyan eljárások kidolgozása, melyek során növelni tudjuk a konyhakerti növények Se tartalmát. Az ajánlott napi Se bevitel felnőtt nők és férfiak számára is 55 µg (<http://ods.od.nih.gov>). Az emberi szervezetben a szelén rákellenes hatását a szelenoproteineknek, glutation peroxidáznak és tioredoxin reduktázoknak tulajdonítják, melyek mind Se tartalmúak (bár az utóbbi még kérdéses). A szelén terápiás adagolása általában 200 µg-nyi mennyiségben történik, mellyel már pozitív eredményeket értek el a rákos megbetegedések megelőzésében (Rayman, 2005).

Az általunk használt dúsítási folyamat végére a kontroll növények Se tartalmához képest mind a hajtásban, mind a gyökérben szignifikánsan megemelkedett a Se mennyisége (35. ábra). A hajtásban ez közel 300-szoros, még a gyökérben 12 000-szeres növekedést jelentett. Ez az eredmény nagyban különbözik az *Arabidopsis*-ban tapasztalt transzlokáció mértékétől. A felvett szelén nagy része ugyanis a gyökérben maradt és csak kisebb része transzlokálódott a borsó hajtásába (35. ábra B). Ám a Se akkumulációja ennél a növényfajnál is koncentrációval arányos módon ment végbe, az akkumulációs ráták pedig a gyökér és hajtásban, valamint a borsószemben is 1-hez közeliak voltak, míg a hajtás:gyökér arány a kontrollnál volt a legnagyobb (5. táblázat).

Amennyiben az elemfelvételi adatok tendenciáját összevetjük a levél hosszakkal (33. ábra B és 35. ábra A), akkor egyenes arányosság figyelhető meg közöttük. A kezelés koncentrációjának növekedésével, a levél megnyúlása csökkent. Következtetésképpen, bár a hajtásba csak a gyökérben akkumulálódott Se tartalom pár százaléka került, az éppúgy kifejtette a hatását, méghozzá dóziszfüggő módon. Korábban, a morfológiai paraméterek alapján szintén a hajtás bizonyult érzékenyebbnek.

A kezelés hatására nem csak a Se tartalom, hanem a többi mikro- és makroelem tartalom is változott (6. és 7. táblázat). A vizsgált elemek egy része koncentrációfüggő változást mutatott (pl. Mo, K és Ca), de voltak olyan elemek, melyek mennyisége Se-indukálta növekedést mutatott (pl. Zn, Cu, Fe). A hajtás és gyökér elem homeosztázisa másként reagált a kezelésre.

Döntő fontosságú volt megtudni, hogy a felvett Se a borsóhévelyben vagy a borsószemekben dúsul-e fel, hiszen a legtöbb esetben a borsószem az, amelyet étkezési célból elfogyasztunk. A biofortifikáció sikerességét a képződött termésben tapasztalt Se tartalom emelkedés jelentette

(36. ábra). A három alkalommal történt mintagyűjtés eredményei szerint a Se idő- és koncentrációfüggő módon akkumulálódott a fejlődő borsóhüvelyben és borsószemekben, és telítődés nem volt tapasztalható. A hajtás elemtartalmához képest a borsószemekbe nagyobb mértékű transzlokáció történt, mely magyarázhatja a hajtás relatíve alacsony Se koncentrációját (35. ábra A és 36. ábra). Az így felhalmozódott szelén felvehetőségét és fajtáját persze további vizsgálatoknak kellene alávetni, hogy a gyakorlatban is alkalmazható legyen ez a módszer, de kijelenthetjük, hogy alapvetően szinten ez a módszer működőképesnek bizonyult, mint biofortifikációs eljárás.

VII. Összefoglalás

Ph.D. munkám során genetikai és biokémiai módszerek felhasználásával megvizsgáltam, hogy a szelenit különböző koncentrációban alkalmazva milyen fejlődésbeli, hormonális és jelátviteli változásokat indukál a modell organizmusként használt *Arabidopsis thaliana* L. növényekben. Tanulmányoztam továbbá, hogy az általunk felállított biofortifikációs rendszerben feldúsul-e a Se a borsó növények termésében, és ez a fajta hosszú távú Se kitettség milyen növekedési változásokat idéz elő. A két rendszer használatával nem csak a növényélettani alapismeretek, hanem a gyakorlati hasznosítás lehetőségének bővítéséhez is hozzájárultam.

Munkám során kapott eredményeim alapján elmondható, hogy:

1. A magasabb Se koncentrációk (20 és 40 μM) a **hajtás és a főgyökér növekedésgátlását** idézték elő, hosszú távon (14 nap), enyhe Se kitettség esetén (10 μM) pedig a stressz indukált morfogenetikai válasz megjelenését tapasztaltuk. Ezek a növekedésbeli válaszok az **adaptáció folyamatának tekinthetők**, hiszen az erőforrások fejlődésről védekezésre történő átcsoportosítása a növény jobb túlélését jelentheti. A növekedésgátlás mellett sejthalál is történt, amit a Se fehérjékbe történő beépülése (szelenocisztein és szelenometionin kialakulása) okozhat.
2. Kimutattam, hogy a Se terhelés jelentős **változásokat idéz elő a gyökér hormonháztartásában**: az auxinválaszt (DR5-függő GUS aktivitás) csökkenti, az etilén bioszintézist (ACS8-függő GUS aktivitás) jelentős mértékben megnöveli. A citokininválasz promóter-függő (ARR5) GUS aktivitása és térbeli mintázata szintén módosul szelén kitettség hatására, feltehetően a gyökérből hajtásba irányuló CK transzlokáció gátlása és az AtCKX4 és AtCKX5 regulációja révén.
3. A korai csíranövény fejlődés során a szelén többlet csökkenti a **nitrogén-monoxid** tartalmat (ez a NR aktivitásától függetlenül történik), és emeli a **hidrogén-peroxid** szintet a gyökérben, ami a két molekula antagonizmusára utal. Továbbá biokémiai (NO donor kezelés) és genetikai (*gsnor1-3* és *nialnia2* mutánsok) módszerekkel bizonyítottam, hogy a nagy **NO tartalom hozzájárul a szelén tolerancia kialakulásához, míg a H_2O_2 optimális szintje szükséges a Se tűréshez.**

4. Feltételezhető, hogy a korai fejlődés során a szelén által indukált **H₂O₂ csökkenti az auxin-függő génexpressziót, míg az idősebb gyökerekben a NO gátolja az auxin transzportját, így redukálva a gyökér auxin szintjét és növekedésgátlást okozva.** A szelén terhelés által fokozott **etilén** bioszintézis (az ACS8::GUS aktivitása) részt vesz a sejthalál indukációjában, így a növekedésgátlásban és a **H₂O₂ downstream eleme a jelátvitelnek.** Eredményeim azt mutatják továbbá, hogy **az etilén és a NO között nincs szabályozó kapcsolat** szelén stressznek kitett gyökerekben. Kontroll körülmények között **kölcsönösen negatív szabályozó kapcsolat áll fenn a CK és a NO között az Arabidopsis gyökerekben. Szelén terhelés esetén a CK befolyásolja a NO metabolizmusát, és a NO szint csökkenése szükséges az ARR5 promóter aktivációjához.** Ez utóbbi eredmény a **negatív CK-NO kapcsolatra utal szelén stressz alatt is.**
5. A szelén **hosszú távon negatívan hat a borsó növények növekedésére** és a reprodukzív fázisban a növények túlélési stratégiája a terméshozásra és érlelésre fókuszál.
6. A termés fejlődését szintén gátolja a szelenit, ám **a biofortifikáció sikeresnek bizonyult, hiszen a borsószemekben a Se feldúsul.**

Mindezekből világosan látszik, hogy a hormonális (auxin, citokinin és etilén) és jelátviteli rendszer (NO és H₂O₂) elemei együttesen, egymással kapcsolatban állva regulálják a szelén többlete által kiváltott fejlődési válaszokat. Munkacsoportunk elsőként írta le a NO metabolizmusában szelén hatására bekövetkező változásokat és részvételét, illetve szerepét a tolerancia kialakulásában. Fontos új eredményünk a NO és a citokinin közötti kapcsolat kimutatása és jellegének feltárása abiotikus (szelén) stressz alatt.

Véleményünk szerint, az elvégzett kísérleti munkával hozzájárultam a növényi NO szerepének és interakcióinak jobb megértéséhez.

VIII. Summary

During my Ph.D. studies, I investigated the developmental, hormonal and signalling responses of the model organism *Arabidopsis thaliana* L. with the help of genetical and biochemical methods under different concentrations of selenite treatment. Furthermore, I studied in our experimental system whether selenium accumulates in the seeds of pea plants during the biofortification experiments and how this long-term Se exposure affects the development of *Pisum sativum* L. plants. With the use of these experimental systems, it became possible to widen our understanding not only on the field of plant physiology but also add useful information to the opportunity of biofortification.

Based on my results, I can summarise:

1. The higher Se concentrations (20 and 40 μM) caused **growth inhibition of the shoot and primary root** however, under long-term (14 days), mild Se exposure (10 μM) resulted in stress induced morphogenetic response. These developmental responses are considered **elements of the adaptation process** since the re-orientation of means from development for protection mechanisms ensures better survival. Besides the growth inhibition, the death of cells is also possible, which may happen *via* incorporation of Se into proteins (as selenocystein and selenomethionne).
2. I pointed out that Se exposure can cause significant **changes in hormone homeostasis**: Se decreases the auxin response (DR5-dependent GUS activity), increases the biosynthesis of ethylene (ACS8::GUS expression). The activity and spatial distribution of the cytokinin response promoter (ARR5)-dependent GUS change under selenite stress as well, presumably *via* the inhibition of root-to-shoot translocation and the regulation of AtCKX4 and AtCKX5.
3. During the early development of the seedlings, selenium excess decreased the amount of **nitric oxide** (which happens independently from NR), and increases the **hydrogen peroxide** level in the root, which implicates the antagonistic relationship between these two molecules. Furthermore, using biochemical (NO donor treatment) and genetical (*gsnor1-3* and *nia1nia2* mutants) methods, I proved, that **high NO levels contribute to**

the induction of selenium tolerance, while the optimal level of H₂O₂ is necessary to the Se endurance.

4. It can be hypothesized, that the **Se induced H₂O₂ decreases the auxin-dependent gene expression during early development, whereas in older roots NO inhibits the transport of auxin, resulting in reduction of total auxin level and growth inhibition of the root.** The selenium-induced intensified **ethylene** biosynthesis (ACS8::GUS activity) takes part in cell death induction, thus in inhibition of growth and the **H₂O₂ is a downstream component of the signalling.** Furthermore, my results show, that in selenium treated roots there is **no regulatory relationship between NO and ethylene.** Under control conditions, there is a **mutual negative relationship between CK and NO** in *Arabidopsis* roots. **In case of Se exposure, CK influences the metabolism of NO, and the decrease of NO level proved to be necessary for the activation of ARR5 promoter. This result shows a negative CK-NO cross talk under selenium stress.**
5. Selenium affects **negatively the long-term development of pea** plants, and in the reproductive phase plants survival strategy focuses on the producing and ripening of the seeds.
6. The development of seeds was also limited by selenium treatment, however, the **biofortification proved to be successful because selenium accumulated in the new seeds.**

Taken together, it is clear, that the elements of the hormonal (auxin, cytokinin and ethylene) and signalling (NO and H₂O₂) networks act together and are in a relationship, they regulate the Se exposure induced developmental changes. Our research group reported for the first time the changes in NO metabolism caused by selenium, and the role of NO in the selenium tolerance. Our new and important result is the investigation of the relationship between NO and cytokinin, and its nature under abiotic (selenium) stress condition.

In our opinion, with the work I have done, I contributed to the understanding of the role and interactions of nitric oxide in plants.

IX. Irodalomjegyzék

- Alemi MH, Goldhamer DA, Nielsen DR (1988) Selenate transport in steady-state, water-saturated soil columns. *Journal of Environmental Quality* 17: 608-613.
- Alvarez ME (2000) Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Molecular Biology* 44: 429-442.
- Arredondo-Peter R, Hargrove MS, Moran JF, Sarath G, Klucas KV (1998) Plant hemoglobins. *Plant Physiology* 118: 1121-1125.
- Ashikari M, Sakakibara H, Lin S, Yamamoto T, Takashi T, Nishimura A, Angeles ER, Qian Q, Kitano H, Matsuoka M (2005) Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science* 309: 741-745.
- Astier J and Lindermayr C (2012) Nitric oxide-dependent posttranslational modifications in plants: an update. *International Journal of Molecular Sciences* 13: 15193-15208.
- Bano A, Dorffling K, Bettin D and Hahn H (1993) Abscisic acid and cytokinins as possible root-to-shoot signals in xylem sap of rice plants in drying soil. *Australian Journal of Plant Physiology* 20: 109-115.
- Barillas JRV, Quinn CF, Pilon-Smits EAH (2011) Selenium accumulation in plants—Phytotechnological Applications and Ecological Implications. *International Journal of Phytoremediation* 13: 166-178.
- Beligni MV, Lamattina L (2000) Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* 210: 215-221.
- Beligni MV, Lamattina L (2001) Nitric oxide in plants: the history is just beginning. *Plant, Cell & Environment* 24: 267-278.
- Besson-Bard A, Astier J, Rasul S, Wawer I, Dubreuil-Maurizi C, Jeandroz S, Wendehenne D (2009) Current view of nitric oxide-responsive genes in plants. *Plant Science* 177: 302-309.
- Bhattacharjee S (2012) The language of reactive oxygen species signalling in plants. *Journal of Experimental Botany* article ID 985298, doi: 10.1155/2012/985298.
- Blomster T, Salojärvi J, Sipari N, Brosché M, Ahlfors R, Keinänen M, Overmyer K, Kangasjärvi J (2011) Apoplastic reactive oxygen species transiently decrease auxin signalling and cause stress-induced morphogenic response in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 157: 1866-1883.
- Broadley MR, White PJ, Bryson RJ, Meacham MC, Bowen HC, Johnson SE, Hawkesford MJ, McGrath SP, Zhao F-J, Breward N, Harriman M, Tucker M (2006) Biofortification of UK food crops with selenium. *Proceedings of the Nutrition Society* 65: 169-181.
- Çakır Ö, Turgut-Kara N, Arı Ş (2012) Selenium Metabolism in Plants: Molecular Approaches, *Advances in Selected Plant Physiology Aspects*, Dr. Giuseppe Montanaro (Ed.), ISBN: 978-953-51-0557-2.
- Carimi F, Terzi M, De Michele R, Zottini M, Lo Schiavo F (2004) High levels of the cytokinin BAP induce PCD by accelerating senescence. *Plant Science* 166: 963-969.
- Carimi F, Zottini M, Costa A, Cattelan I, De Michele R, Terzi M, Lo Schiavo F (2005) NO signalling in cytokinin-induced programmed cell death. *Plant, Cell & Environment* 28: 1171-1178.

- Casimiro I, Beeckman T, Graham N, Bhalerao R, Zhang H, Casero P, Sandberg G, Bennett MJ (2003) Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends in Plant Science* 8: 165-171.
- Cedzich A, Stransky H, Schulz B, Frommer WB (2008) Characterization of cytokinin and adenine transport in *Arabidopsis* cell cultures. *Plant Physiology* 148: 1857–1867.
- Chang C, Kwok SF, Bleecker AB, Meyerowitz EM (1993) *Arabidopsis* ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. *Science* 262: 539-544.
- Chen CM, Kristopeit SM (1981a) Metabolism of cytokinin: dephosphorylation of cytokinin ribonucleotide by 5'-nucleotidases from wheat germ cytosol. *Plant Physiology* 67: 494–498.
- Chen CM, Kristopeit SM (1981b) Metabolism of cytokinin: deribosylation of cytokinin ribonucleoside by adenine nucleosidase from wheat germ cells. *Plant Physiology* 68: 1020–1023.
- Conklin PL, Pallanca JE, Last RL, Smirnov N (2000) Identification of ascorbic acid-deficient *Arabidopsis thaliana* mutants. *Genetics* 154: 847-856.
- Corpas FJ and Barroso JB (2013) Nitro-oxidative stress vs oxidative or nitrosative stress in higher plants. *New Phytologist* 199: 633-635.
- Corpas FJ, Barroso JB, Carreras A, Valderrama R, Palma JM, del Río LA (2007) Nitrosative stress in plants: A new approach to understand the role of NO in abiotic stress. *Nitric Oxide in Plant Growth, Development and Stress Physiology, Plant Cell Monographs* 5: 187-205.
- Corpas FJ, Chaki M, Fernández-Ocaña A, Valderrama R, Palma JM, Carreras A, Begara-Morales JC, Airaki M, del Río LA, Barroso JB (2008) Metabolism of reactive nitrogen species in pea plants under abiotic stress conditions. *Plant & Cell Physiology* 49: 1711-1722.
- Corpas FJ, Palma JM, del Río LA, Barroso JB (2013) Protein tyrosine nitration in higher plants grown under natural and stress conditions. *Frontiers in Plant Science* 4: article nu. 29.
- Correa-Aragunde N, Graziano M, Chevalier C, Lamattina L (2006) Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato. *Journal of Experimental Botany* 57: 581-588.
- Correa-Aragunde N, Graziano M, Lamattina L (2004) Nitric oxide plays role in determining lateral root development in tomato. *Planta* 218: 900-905.
- Crawford NM, Galli M, Tischner R, Heimer YM, Okamoto M, Mack A (2006) Response to Zemojtel *et al*: Plant nitric oxide synthase: back to square one. *Trends in Plant Science* 11: 526-527.
- D' Agostino IB, Deruère J, Kieber JJ (2000) Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiology* 124: 1706-1717.
- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C (1998) Nitric oxide as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394: 585-588.
- Desikan R, A-H-Mackerness S, Hancock JT, Neill SJ (2001) Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiology* 127: 159-172.
- Dhillon KS, Dhillon SK (2003) Distribution and management of seleniferous soils. *Advances in Agronomy* 79: 119–184.

- Dhillon SK, Dhillon KS, Kohli A, Khera KL (2008) Evaluation of leaching and runoff losses of selenium from seleniferous soils through simulated rainfall. *Journal of Plant Nutrition and Soil* 171: 187 – 192.
- Doerner P, Potuschak T (2001) Cell cycle controls: genome-wide analysis in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 501-506.
- Dordas C, Hasinoff BB, Igamberdiev AU, Manac'h N, Rivoal J, Hill RD (2003) Expression of a stress-induced haemoglobin affects NO levels produced by alfalfa root cultures under hypoxic stress. *The Plant Journal* 35: 763-770.
- Durner J and Klessig DF (1999) Nitric oxide as a signal in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 369-374.
- Ellis DR and Salt DE (2003) Plants, selenium and human health. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 273-279.
- Feechan A, Kwon E, Yun B-W, Wang Y, Pallas JA, Loake GJ (2005) A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 8054-8059.
- Feng J, Wang C, Chen Q, Chen H, Ren B, Li X, Zuo J (2013) S-nitrosylation of phosphotransfer proteins represses cytokinin signalling. *Nature* 4: article nu. 1529, doi:10.1038/ncomms2541.
- Fernández-Marcos M, Sanz L, Lewis DR, Muday GK, Lorenzo O (2011) Nitric oxide causes root apical meristem defects and growth inhibition while reducing PIN-FORMED 1 (PIN1)-dependent acropetal auxin transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 18506-18511.
- Finley JW, Davis CD (2001) Selenium (Se) from high-selenium broccoli is utilized differently than selenite, selenate, and selenomethionine, but is more effective in inhibiting colon carcinogenesis. *BioFactors* 14: 191-196.
- Fordyce FM (2005) Selenium deficiency and toxicity in the environment. *Essentials of Medical Geology*, Elsevier, 373-415.
- Foresi N, Correa-Aragunde N, Parisi G, Caló G, Salerno G, Lamattina L (2010) Characterization of a nitric oxide synthase from the plant kingdom: NO generation from green alga *Ostreococcus tauri* is light irradiance and growth phase dependent. *The Plant Cell* 22: 3816-3830.
- Freschi L (2013) Nitric oxide and phytohormone interactions: current status and perspectives. *Frontiers in Plant Science* 4: article nu. 398, doi: 10.3389/fpls.2013.00398.
- Galuszka P, Frebort I, Sebelá M, Sauer P, Jacobsen S, Pec P (2001) Cytokinin oxidase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals. *European Journal of Biochemistry* 268: 450–461.
- Geisler M and Murphy AS (2006) The ABC of auxin transport: The role of p-glycoproteins in plant development. *FEBS Letters* 580: 1094-1102.
- Giba Z, Grubii D, Todorovi S, Sajc L, Stojakovi D, Konjevi R (1998) Effect of nitric oxide – releasing compounds on phytochrome-controlled germination of Empress tree seeds. *Plant Growth Regulation* 26: 175-181.
- Gniazdowska A, Krasuska U, Czajkowska K, Bogatek R (2010) Nitric oxide, hydrogen cyanide and ethylene are required in the control of germination and undisturbed development of young apple seedlings. *Plant Growth Regulation* 61: 75-84.

- Goldhaber SB (2003) Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 38: 232–242.
- Gomes A, Fernandes E, Lima JLFC (2005) Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 65: 45-80.
- Gouvêa CMCP, Souza JF, Magalhães ACN, Martins IS (1997) NO⁻-releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Regulation* 21: 183-187.
- Grant K, Carey NM, Mendoza M, Schulze J, Pilon M, Pilon-Smits EAH, Van Hoewyk D (2011) Adenosine 5'-phosphosulphate reductase (APR2) mutation in *Arabidopsis* implicates glutathione deficiency in selenite toxicity. *The Biochemical Journal* 438: 325-335.
- Grün S, Lindermayr C, Sell S, Durner J (2006) Nitric oxide and gene regulation in plants. *Journal of Experimental Botany* 57: 507-516.
- Guo FQ, Okamoto M, Crawford NM (2003) Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signalling. *Science* 302: 100-103.
- Gupta KJ, Fernie AR, Kaiser WM, van Dongen JT (2011) On the origins of nitric oxide. *Trends in Plant Science* 16: 160-168.
- Guzmán P, Ecker JR (1990) Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell* 2: 513-523.
- Hartikainen H (2005) Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 18: 309–318.
- Hartikainen H, Xue T, Piironen V (2000) Selenium as an anti-oxidant and pro-oxidant in ryegrass. *Plant and Soil* 225: 193-200.
- Harvey JJW, Lincoln JE, Gilchrist DG (2008) Programmed cell death suppression in transformed plant tissue by tomato cDNAs identified from an *Agrobacterium rhizogenes*-based functional screen. *Molecular Genetics and Genomics* 279: 509-521.
- Hasnain S, Sabri AN (1997) Growth stimulation of *Triticum aestivum* seedlings under Cr-stresses by non-rhizospheric pseudomonad strains. *Environmental Pollution* 97: 265-273.
- Hayat S, Mori M, Pichtel J, Ahmad A (2010) Nitric oxide in Plant Physiology. *WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim*, ISBN: 978-3-527-32519-1.
- He Y, Tang R-H, Hao Y, Stevens RD, Cook CW, Ahn SM, Jing L, Yang Z, Chen L, Guo F, Fioriani F, Jackson RB, Crawford NM, Pei Z-M (2004) Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science* 305: 1968-1971.
- Henry YA, Ducastel B, Guissani A (1997) Basic chemistry of nitric oxide and related nitrogen oxides. *Nitric oxide research from chemistry to biology*, 15-46, ISBN 978-1-4612-8503-8.
- Heyl A and Schmölling T (2003) Cytokinin signal perception and transduction. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 480-488.
- Hopper JL, Parker DR (1999) Plant availability of selenite and selenate as influenced by the competing ions phosphate and sulphate. *Plant Soil* 210: 199-207.

<http://ods.od.nih.gov> U.S. Department of Health & Human Services, National Institutes of Health, Office of Dietary Supplements.

Hu XY, Neill SJ, Tang ZC, Cai WM (2005) Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. *Plant Physiology* 137: 663-670.

Hummel I, Bourdais G, Gouesbet G, Couée I, Malmberg RL, El Amrani A (2004) Differential gene expression of ARGININE DECARBOXYLASE ADC1 and ADC2 in *Arabidopsis thaliana*: characterization of transcriptional regulation during seed germination and seedling development. *New Phytologist* 163: 519-531.

Ioio RD, Linhares FS, Scacchi E, Casamitjana-Martinez E, Heidstra R, Constantino P, Sabatini S (2007) Cytokinins determine *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation. *Cell* 17: 678-682.

Ip C, Birringer M, Block E, Kotrebai M, Tyson J, Uden PC, Lisk D (2000) Chemical speciation influences comparative activity of selenium-enriched garlic and yeast in mammary cancer prevention. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 2062-2070.

Ip C, Ganther HE (1992) Relationship between the chemical form of selenium and anticarcinogenic activity. *Cancer Chemoprevention*, I. Wattenberg, M. Lipkin, C. W. Boon, G. J. Kellott & R. Boca, pp. 479-488, CRC Press.

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* 6: 3901-3907.

Jia L, Bonaventura C, Bonaventura J, Stamler JS (1996) S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature* 380: 221-226.

Johnson CC, Fordyce FM, Rayman MP (2010) Symposium on “Geographical and geological influences on nutrition”: factors controlling the distribution of selenium in the environment and their impact on health and nutrition. *Proceedings of the Nutrition Society* 69: 119-132.

Kojima H, Urano Y, Kikuchi K, Higuchi T, Hirata Y, Nagano T (1999) Fluorescent indicators for imaging nitric oxide production. *Angewandte Chemie International Edition* 38: 3209-3212.

Kolbert Zs, Bartha B, Erdei L (2008) Exogenous auxin-induced NO synthesis is nitrate reductase-associated in *Arabidopsis thaliana* root primordial. *Plant Physiology* 165: 967-975.

Konze JR, Schilling N, Kende H (1978) Enhancement of ethylene formation by selenoamino acids. *Plant physiology* 62: 397-401.

Kovacs I, Lindermayr C (2013) Nitric oxide-based protein modification: formation and site-specificity of protein S-nitrosylation. *Front Plant Science* 4: 137.

Kuderová A, Urbánková I, Válková M, Malbeck J, Brzobohatý B, Némethová D, Hejátko J (2008) Effects of conditional IPT-dependent cytokinin overproduction on root architecture of *Arabidopsis* seedlings. *Plant & Cell Physiology* 49: 570-582.

Kudo T, Kiba T, Sakakibara H (2010) Metabolism and long-distance translocation of cytokinins. *Journal of Integrative Plant Biology* 52: 53-60.

- Kurakawa T, Ueda N, Maekawa M, Kobayashi K, Kojima M, Nagato Y, Sakakibara H, Kyojuka J (2007) Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* 445: 652–655.
- Lanteri ML, Pagnussat GC, Mamattina L (2006) Calcium and calcium-dependent protein kinases are involved in nitric oxide- and auxin-induced adventitious root formation. *Journal of Experimental Botany* 57: 1341-1351.
- Larkindale J, Knight MR (2002) Protection against heat stress-induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant Physiology* 128: 682-695.
- Lee U, Wie C, Fernandez BO, Feelisch M, Vierling E (2008) Modulation of nitrosative stress by S-nitrosoglutathione reductase is critical for thermotolerance and plant growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 20: 786-802.
- Lequeux H, Hermans C, Lutts S, Verbruggen N (2010) Response to copper excess in *Arabidopsis thaliana*: impact on the root system architecture, hormone distribution, lignin accumulation and mineral profile. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 673-682.
- Leshem YY, Pinchasov Y (2000) Non-invasive photoacoustic spectroscopic determination of relative endogenous nitric oxide and ethylene content stoichiometry during the ripening of strawberries *Fragaria ananassa* (Duch.) and avocados *Persea Americana* (Mill.). *Journal of Experimental Botany* 51: 1471-1473.
- Leshem YY, Wills RBH, Veng-Va KuV (1998) Evidence for the function of the free radical gas-nitric oxide (NO) as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 36: 825-833.
- Li H-F, McGrath SP, Zhao F-J (2008) Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenite and selenate. *New Phytologist* 178: 92-102.
- Lin ZF, Zhong SL, Grierson D (2009) Recent advances in ethylene research. *Journal of Experimental Botany* 60: 3311-3336.
- Lindermayr C, Saalbach G, Durner J (2005) Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 137: 921-930.
- Liu W-Z, Kong D-D, Gu X-X, Gao H-B, Wang J-Z, Xia M, Gao Q, Tian L-L, Xu Z-H, Bao F, Hu Y, Ye N-S, Pei Z-M, He Y-H (2013) Cytokinins can act as suppressors of nitric oxide in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 1548-1553.
- Lombardo MC, Graziano M, Polacco JC, Lamattina L (2006) Nitric oxide functions as a positive regulator of root hair development. *Plant Signalling & Behavior* 1: 28-33.
- Lorence A, Chevone BI, Mendes P, Nessler CL (2004) myo-Inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. *Plant Physiology* 134: 1200-1205.
- Lozano-Juste J, León J (2010) Enhanced abscisic acid-mediated responses in *nialniaInoa1-2* triple mutant impaired in nia/NR- and Atnoa1-dependent nitric oxide biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 152: 891-903.
- Lu J, Pei H, Ip C, Lisk DJ, Ganther H, Thompson HJ (1996) Effect of an aqueous extract of selenium-enriched garlic on *in vitro* markers and *in vivo* efficacy in cancer prevention. *Carcinogenesis* 17: 1903-1907.

- Maher EP, Martindale SJB (1980) Mutants of *Arabidopsis thaliana* with altered responses to auxins and gravity. *Biochemical Genetics* 18: 1041–1053.
- Mähönen AP, Bishopp A, Higuchi M, Nieminen KM, Kinoshita K, Törmäkangas K, Ikeda Y, Oka A, Kakimoto T, Helariutta Y (2006) Cutokinin signalling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development. *Science* 311: 94-98.
- Malamy JE, Benfey PN (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124: 33-44.
- Martí MA, Capece L, Crespo A, Doctorovich F, Estrin DA (2005) Nitric oxide interaction with phytochrome *c'* and its relevance to guanylate cyclase. Why does the iron-histidine bond break? *Journal of The American Chemical Society* 127: 7721-7728.
- McKenzie MJ, Hunter DA, Pathirana R, Watson LM, Joyce NI, Matich AJ, Rowan DD, Brummell DA (2009) Accumulation of an organic anticancer selenium compound in a transgenic *Solanaceous* species shows wider applicability of the selenocysteine methyltransferase transgene from selenium hyperaccumulators. *Transgenic Research* 18: 407-424.
- Medina D, Thompson H, Ganther H, Ip C (2001) Se-Methylselenocysteine: a new compound for chemoprevention of breast cancer. *Nutrition and Cancer* 40: 12-17.
- Merewitz EB, Du H, Yu W, Liu Y, Gianfagna T, Huang B (2012) Elevated cytokinin content in *ipt* transgenic creeping bentgrass promotes drought tolerance through regulating metabolite accumulation. *Journal of experimental Botany* 63: 1315-1328.
- Minorsky PV (2003) Selenium in plants. *Plant Physiology* 133: 14-15.
- Mishina TE, Lamb C, Zeier J (2007) Expression of a nitric oxide degrading enzyme induces a senescence programme in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment* 30: 39-52.
- Misra AN, Misra M, Singh R (2011) Nitric oxide: a ubiquitous signalling molecule with diverse role in plants. *African Journal of Plant Science* 5: 57-74.
- Miyawaki K, Matsumoto-Kitano M, Kakimoto T (2004) Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *The Plant Journal* 37: 128–138.
- Mok DWS, Mok MC (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Biology* 52: 89–118.
- Mravec J, Kubeš M, Bielach A, Gaykova V, Petrášek J, Skúpa P, Chand S, Benková E, Zažímalová E, Friml J (2008) Interaction of PIN and GFP transport mechanisms in auxin distribution-dependent development. *Development* 135: 3345-3354.
- Mur LAJ, Mandon J, Persijn S, Cristascu SM, Mashkov IE, Novikova GV, Hall MA, Harren FJM, Hebelstrup KH, Gupta KJ (2013) Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge. *AoB PLANTS* 5: pls052; doi:10.1093/aobpla/pls052.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

- Nakagami H, Soukupová H, Schikora A, Žarský V, Hirt H (2006) A mitogen-activated protein kinase kinase kinase mediates reactive oxygen species homeostasis in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 38697-38704.
- Nappi AJ, Vass E, Frey F, Carton Y (2000) Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. *Nitric Oxide* 4: 423-430.
- Negi S, Santisree P, Kharshiing EV, Sharma R (2010) Inhibition of ubiquitin-proteasome pathway alters cellular levels of nitric oxide in tomato seedlings. *Molecular Plant* 3: 854-869.
- Neill S, Barros R, Bright J, Desikan R, Hancock J, Harrison J, Morris P, Ribeiro D, Wilson I (2008) Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* 59: 165-176.
- Neill SJ, Desikan R, Hancock JT (2003) Nitric oxide signalling in plants. *New Phytologist* 159: 11-35.
- Ohkama N, Takei K, Sakakibara H, Hayashi H, Yoneyama T, Fujiwara T (2002) Regulation of sulphur-responsive gene expression by exogenously applied cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* 43: 1493-1501.
- Ohlendorf HM, Hoffman DJ, Slaki MJ, Aldrich TW (1986) Embryonic mortality and abnormalities of aquatic birds: apparent impacts of selenium from irrigation drain water. *Science of The Total Environment* 52: 49-63.
- Olmos E, Kiddle G, Pellny TK, Kumar S, Foyer CH (2006) Modulation of plant morphology, root architecture, and cell structure by low vitamin C in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 57: 1645-1655.
- Pagnussat GC, Lanteri ML, Lamattina L (2003) Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. *Plant Physiology* 132: 1241-1248.
- Pagnussat GC, Lanteri ML, Lombardo MC, Lamattina L (2004) Nitric oxide mediates the indole acetic acid induction activation of a mitogen-activated protein kinase cascade involved in adventitious root development. *Plant Physiology* 135: 279-286.
- Pagnussat GC, Simontacchi M, Puntarulo S, Lamattina L (2002) Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiology* 129: 954-956.
- Pasternak T, Rudas V, Potters G, Jansen MAK (2005) Morphogenic effects of abiotic stress: reorientation of growth in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Environmental and Experimental Botany* 53: 299-314.
- Perazzolli M, Romero-Puertas MC, Delledonne M (2006) Modulation of nitric oxide bioactivity by plant haemoglobins. *Journal of Experimental Botany* 57: 479-488.
- Pető A, Lehotai N, Feigl G, Tugyi N, Ördög A, Gémes K, Tari I, Erdei L, Kolbert Zs (2013) Nitric oxide contributes to copper tolerance by influencing ROS metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports* 32: 1913-1923.
- Pető A, Lehotai N, Lozano-Juste J, León J, Tari I, Erdei L, Kolbert Zs (2011) Involvement of nitric oxide (NO) in signal transduction of copper-induced morphological responses in *Arabidopsis* seedlings. *Annals of Botany* 108: 449-457.
- Pickett FB, Wilson AK, Estelle M (1990) The *aux1* mutation of *Arabidopsis* confers both auxin and ethylene resistance. *Plant Physiology* 94: 1462-1466.
- Pii Y, Crimi M, Cremonese G, Spena A, Pandolfini T (2007) Auxin and nitric oxide control indeterminate nodule formation. *BMC Plant Biology* 7: 21. doi: 10.1093/jxb/erj051.

- Pilon-Smits EAH, Quinn CF (2010) Selenium metabolism in plants. In: Hell R, Mendel R-R, eds.. *Cell Biology of Metals and Nutrients, Plant Cell Monographs*. Berlin, Heidelberg: Springer, 225-241.
- Pilon-Smits EAH, Quinn CF, Tapken W, Malagoli M, Schiavon M (2009) Physiological functions of beneficial elements. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 267-274.
- Planchet E, Kaiser WM (2006) Nitric oxide production in plants. Facts and Fictions. *Plant Signaling & Behavior* 1: 46-51.
- Potters G, Pasternak TP, Guises Y, Jansen MAK (2009) Different stresses, similar morphogenetic responses: integrating a plethora of pathways. *Plant, Cell & Environment* 32: 158-169.
- Potters G, Pasternak TP, Guises Y, Palma KJ, Jansen MAK (2007) Stress-induced morphogenetic response: growing out of trouble? *Trends in Plant Science* 12: 98-105.
- Prado AM, Porterfield DM, Feijó JA (2004) Nitric oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes. *Development* 131: 2707-2714.
- Rao MV, Lee H, Davis KR (2002) Ozone-induced ethylene production is dependent on salicylic acid, and both salicylic acid and ethylene act in concert to regulate ozone-induced cell death. *The Plant Journal* 32: 447-456.
- Rayman MP (2000) The importance of selenium to human health. *The Lancet* 356: 233-241.
- Rayman MP (2005) Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *Proceedings of the Nutrition Society* 64: 527-542.
- Reinhardt D, Pesce E-R, Stieger P, Mandel T, Baltensperger K, Bennett M, Traas J, Friml J, Kuhlenmeier C (2003) Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature* 426: 255-260.
- Ribeiro DM, Mapeli AM, Antunes WC, Barros RS (2011) A dual role of selenium in the growth control of seedlings of *Stylosanthes humillis*. *Agricultural Sciences* 2: 78-85.
- Rios JJ, Blasco B, Rosales MA, Sanchez-Rodriguez E, Leyva R, Cervilla LM, Romero L, Ruiz JM (2010) Response of nitrogen metabolism in lettuce plants subjected to different doses and forms of selenium. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90: 1914-1919.
- Rivero RM, Gimeno J, Deynze AV, Walia H, Blumwald E (2010) Enhanced cytokinin synthesis in tobacco plants expressing $P_{SARK}::IPT$ prevents the degradation of photosynthetic protein complexes during drought. *Plant and Cell Physiology* 51: 1929-1941.
- Romanov GA, Lomin SN, Rakova NY, Heyl A, Schmülling T (2008) Does NO play a role in cytokinin signal transduction? *FEBS Letters* 582: 874-880.
- Ross EJH, Stone JM, Elowsky CG, Arredondo-Peter R, Klucas RV, Sarath G (2004) Activation of the *Oryza sativa* non-symbiotic haemoglobin-2 promoter by the cytokinin-regulated transcription factor, ARR1. *Journal of Experimental Botany* 55: 1721-1731.
- Rümer S, Kapuganti JG, Kaiser WM (2009) Oxidation of hydroxylamines to NO by plant cells. *Journal of Experimental Botany* 60: 2065-2072.
- Sakamoto A, Ueda M, Morikawa H (2002) *Arabidopsis* glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an S-nitrosoglutathione reductase. *FEBS Letters* 515: 20-24.

- Samuelson ME, Campbell WH, Larsson C-M (1995) The influence of cytokinins in nitrate regulation of nitrate reductase activity and expression in barley. *Physiologia Plantarum* 93: 533-539.
- Samuelson ME, Eliasson L, Larsson CM (1992) Nitrate-regulated growth and cytokinin responses in seminal roots of barley. *Plant Physiology* 98: 309–315.
- Santner A, Calderon-Villalobos LIA, Estelle M (2009) Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature Chemical Biology* 5: 301-307.
- Scherer GFE and Holk A (2000) NO donors mimic NO inhibitors inhibit cytokinin action in betalaine accumulation in *Amaranthus caudatus*. *Plant Growth Regulation* 32: 345-350.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J-Y, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 9: 676-682 PDF Supplement.
- Schmülling T, Werner T, Riefler M, Krupková E, Bartrina y Manns I (2003) Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *Journal of Plant Research* 116: 241-252.
- Schopfer FJ, Baker PR, Freeman BA (2003) NP-dependent protein nitration: A cell signalling event or an antioxidative inflammatory response? *Trends in Biochemical Sciences* 28: 646-654.
- Shashidhar VR, Prasad TG, Sudharshan L (1996) Hormone signals from roots to shoots of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Moderate soil drying increases delivery of abscisic acid and depresses delivery of cytokinins in xylem sap. *Annals of Botany* 78: 151-155.
- Shen Q, Wang Y-T, Tian H, Guo F-Q (2012) Nitric oxide mediates cytokinin functions in cell proliferation and meristem maintenance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* 6: 1214-1225.
- Shinmachi F, Buchner P, Stroud LJ, Parmar S, Zhao F-J, McGrath SP, Hawkesford MJ (2010) Influence of sulphur deficiency on the expression of specific sulphate transporters and the distribution of sulphur, selenium, and molybdenum in wheat. *Plant Physiology* 153: 327-336.
- Siddiqui MH, Al-Wahaibi MH, Basalah MO (2011) Role of nitric oxide in tolerance of plants to abiotic stress. *Protoplasma* 248: 447-455.
- Signorelli S, Corpas FJ, Borsani O, Barroso JB, Monza J (2013) Water stress induces a differential and spatially distributed nitro-oxidative stress response in roots and leaves of *Lotus japonicus*. *Plant Science* 201-202: 137-146.
- Simontacchi M, García-Mata C, Bartoli CG, Santa-María GE, Lamattina L (2013) Nitric oxide as a key component in hormone-regulated processes. *Plant Cell Reports* 32: 853-866.
- Sors TG, Ellis DR, Salt DE (2005) Selenium uptake, translocation, assimilation and metabolic fate in plants. *Photosynthesis Research* 86: 373-389.
- Stöhr C, Stremmlau S (2006) Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. *Journal of Experimental Botany* 57: 463-470.

- Stöhr C, Ullrich WR (2002) Generation and possible roles of nitric oxide in plant roots and their apoplastic space. *Journal of Experimental Botany* 53: 2293-2303.
- Takatsuka H és Umeda M (2014) Hormonal control of cell division and elongation along differentiation trajectories in roots. *Journal of Experimental Botany* 65: 2633-2643.
- Takei K, Sakakibara H, Taniguchi M, Sugiyama T (2001) Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. *Plant and Cell Physiology* 42: 85-93.
- Takei K, Ueda N, Aoki K, Kuromori T, Hirayama T, Shinozaki K, Yamaya T, Sakakibara H (2004a) *AtIPT3* is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant & Cell Physiology* 45: 1053-1062.
- Takei K, Yamaya T, Sakakibara H (2004b) *Arabidopsis* CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of trans-zeatin. *Journal of Biological Chemistry* 279: 41866-41872.
- Tamaoki M, Freeman JL, Pilon-Smits EAH (2008) Cooperative ethylene and jasmonic acid signalling regulates selenite resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 146: 1219-1230.
- Tanou G, Filippou P, Belghazi M, Job D, Diamantidis G, Fotopoulos V, Molassiotis A (2012) Oxidative and nitrosative-based signalling and associated post-translational modifications orchestrate the acclimation of citrus plants to salinity stress. *The Plant Journal* 71: 585-599.
- Terrile MC, París R, Calderón-Villalobos LIA, Iglesias MJ, Lamattina L, Estelle M, Casalagué CA (2012) Nitric oxide influences auxin signalling through S-nitrosylation of the *Arabidopsis* TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 auxin receptor. *The Plant Journal* 70: 492-500.
- Terry N, Zayed AM, de Souza MP, Tarun AS (2000) Selenium in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 401-432.
- Torrey JG (1976) Root hormones and plant growth. *Annual Review of Plant Physiology* 27: 435-459.
- Tsuchisaka A, Theologis A (2004) Unique and overlapping expression patterns among the *Arabidopsis* 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family members. *Plant Physiology* 136: 2982-3000.
- Tsukagoshi H, Busch W, Benfey PN (2010) Transcriptional regulation of ROS transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell* 143: 606-616.
- Tun NN, Holk A, Scherer GFE (2001) Rapid increase of NO release in plant cell cultures induced by cytokinin. *FEBS Letters* 509: 174-176.
- Tun NN, Livaja M, Kieber JJ, Scherer GFE (2008) Zeatin-induced nitric oxide (NO) biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* mutants of NO biosynthesis and of two-component signaling genes. *New Phytologist* 178: 515-531.
- Tun NN, Santa-Catarina C, Begum T, Silveira V, Handro W, Floh EIS, Scherer GFE (2006) Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant and Cell Physiology* 47: 346-354.
- Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle TJ (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9: 1963-1971.

- Valderrama R, Corpas FJ, Carreras A, Fernández-Ocaña A, Chaki M, Luque F, Gómez-Rodríguez MV, Colmenero-Varera P, del Río LA, Barroso JB (2007) Nitrosative stress in plants. *FEBS Letters* 581: 453-461.
- van der Graaff EE, Hooykaas PJJ, Auer CA (2001) Altered development of *Arabidopsis thaliana* carrying the *Agrobacterium tumefaciens* ipt gene is partially due to ethylene effects. *Plant Growth Regulation* 34: 305-315.
- Van Hoewyk (2013) A tale of two toxicities: malformed selenoproteins and oxidative stress both contribute to selenium stress in plants. *Annals of Botany* doi: 10.1093/aob/mct163.
- Van Hoewyk D, Takahashi H, Inoue E, Hess A, Tamaoki M, Pilon-Smits EAH (2008) Transcriptome analyses give insights into selenium-stress responses and selenium tolerance mechanisms in *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum* 132: 236-253.
- Vanneste S, Friml J (2009) Auxin: A trigger for change in plant development. *Cell* 136: 1005-1016.
- Wang N, Ruqian L, Liangji Z, Zhaoda T (1992) The relationship between the effect of sodium selenite on the growth of *Nicotiana tabacum* crown gall tissue and the level of endogenous hormones. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology* 18: 160-166.
- Wang Z, Jiang C, Lu J (2002) Induction of caspase-mediated apoptosis and cell-cycle G1 arrest by selenium metabolite methylselenol. *Molecular Carcinogenesis* 34: 113-120.
- Welch RM and Graham RD (2004) Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. *Journal of Experimental Botany* 55: 353-364.
- Wendehenne D, Pugin A, Klessig DF, Durner J (2001) Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends in Plant Science* 6: 177-183.
- Werner T and Schmülling T (2009) Cytokinin action in plant development. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 527-538.
- Werner T, Motyka V, Laucou V, Smets R, Onckelen H V, Schmülling T (2003) Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* 15: 2532-2550.
- Werner T, Motyka V, Strnad M, Schmülling T (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 10487-10492.
- Werner T, Nehnevajova E, Köllmer I, Novák O, Strnad M, Krämer U, Schmülling T (2010) Root-specific reduction of cytokinin causes enhanced root growth, drought tolerance, and leaf mineral enrichment in *Arabidopsis* and *Tobacco*. *Plant Cell* 22: 3905-3920.
- White PJ and Broadley MR (2005) Biofortifying crops with essential mineral elements. *TRENDS in Plant Science* 10: 586-593.
- Wilhelmová N, Fuksova H, Srbova M, Mikova D, Mytinova Z, Prochazkova D, Vytásek R, Wilhelm J (2006) The effect of plant cytokinin hormones on the production of ethylene, nitric oxide and protein nitrotyrosine in ageing tobacco leaves. *BioFactors* 27: 203-211.

- Wilkinson JQ, Crawford NM (1993) Identification and characterization of a chlorate resistant mutant of *Arabidopsis* with mutations in both NIA1 and NIA2 nitrate reductase structural genes. *Molecular and General Genetics* 239: 289-297.
- Wilson ID, Neill SJ, Hancock JT (2008) Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant, Cell & Environment* 31: 622-631.
- Wojtaszek P (2000) Nitric oxide in plants: to NO or not to NO. *Phytochemistry* 54: 1-4.
- Xiao-Ping S, Xi-Gui S (2006) Cytokinin- and auxin-induced stomatal opening is related to the change of nitric oxide levels in guard cells in broad bean. *Physiologia Plantarum* 128: 569-579.
- Xiong J, Fu G, Tao L, Zhu C (2010) Roles of nitric oxide in alleviating heavy metal toxicity in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 497: 13-20.
- Xu YC, Zhao BL (2003) The main origin of endogenous NO in higher non-leguminous plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 833-838.
- Yang Z-Y, Chen F-H, Yuan J-G, Zheng Z-W, Wong M-H (2004) Responses of *Sesbania rostrate* and *S. cannabina* to Pb, Zn, Cu and Cd toxicities. *Journal of Environmental Sciences* 16: 670-673.
- Zayed A, Lytle CM, Terry N (1998) Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants. *Planta* 206: 284-292.
- Zhang L, Ackley AR, Pilon-Smits EAH (2007) Variation in selenium tolerance and accumulation among 19 *Arabidopsis thaliana* accessions. *Journal of Plant Physiology* 164: 327-336.
- Zhu Y-G, Pilon-Smits EAH, Zhao F-K, Williams PN, Meharg AA (2009) Selenium in higher plants: understanding mechanisms for biofortification and phytoremediation. *Trends in Plant Science* 14: 436-442.

X. Publikációs lista

Tudományos közlemények referált folyóiratokban

(A *-gal jelölt közlemények közvetlenül kapcsolódnak a Ph.D. értekezéshez)

Lehotai N, Pető A, Bajkán Sz, Erdei L, Kolbert Zs (2011) *In vivo* and *in situ* visualization of early physiological events induced by heavy metals in pea root meristem. *Acta Physiologiae Plantarum* 33: 2199-2207. (IF: 1,639)

Pető A, **Lehotai N**, Lozano-Juste J, León J, Tari I, Erdei L, Kolbert Zs (2011) Involvement of nitric oxide and auxin in signal transduction of copper-induced morphological responses in *Arabidopsis* seedlings. *Annals of Botany* 108: 449-457. (IF: 4,030)

Lehotai N, Pető A, Weisz M, Erdei L, Kolbert Zs (2011) Generation of reactive oxygen and nitrogen species in pea cultivars under copper excess. *Acta Biologica Szegediensis* 55: 273-278.

***Lehotai N**, Pető A, Erdei L, Kolbert Zs (2011) The effect of selenium (Se) on development and nitric oxide levels in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Acta Biologica Szegediensis* 55: 105-107.

Kolbert Zs, Pető A, **Lehotai N**, Feigl G, Ördög A, Erdei L (2012) *In vivo* and *in vitro* studies on fluorophore-specificity. *Acta Biologica Szegediensis*. 56: 37-41.

Kolbert Zs, Pető A, **Lehotai N**, Feigl G, Erdei L (2012) Long-term copper (Cu²⁺) exposure impacts on auxin, nitric oxide (NO) metabolism and morphology of *Arabidopsis thaliana* L.. *Plant Growth Regulation*. 68:151-159. (IF: 2,859)

***Lehotai N**, Kolbert Zs, Pető A, Feigl G, Ördög A, Kumar D, Tari I, Erdei L (2012) Selenite-induced hormonal and signalling mechanisms during root growth of *Arabidopsis thaliana* L.. *Journal of Experimental Botany* 63: 5677-5687. (IF: 5,364)

Feigl G, Kumar D, **Lehotai N**, Tugyi N, Molnár Á, Ördög A, Szepesi Á, Gémes K, Laskay G, Erdei L, Kolbert Zs (2013) Physiological and morphological responses of the root system of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern) and rapeseed (*Brassica napus* L.) to copper stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 94: 179-189. (IF: 2,482)

Pető A, **Lehotai N**, Feigl G, Tugyi N, Ördög A, Gémes K, Tari I, Erdei L, Kolbert Zs (2013) Nitric oxide contributes to copper tolerance by influencing ROS metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports*, 32: 1913-1923. (IF: 2,936)

Elfogadva (2014): Feigl G, Kumar D, **Lehotai N**, Pető A, Molnár Á, Rácz É, Ördög A, Erdei L, Kolbert Zs, Laskay G: Comparing the effects of excess copper in the leaves of *Brassica juncea* (L. Czern) and *Brassica napus* (L.) seedlings: growth inhibition, oxidative stress and photosynthetic damage. Acta Biologica Hungarica. (IF: 0,563)

Benyújtott kézirat (2014): ***Lehotai N**, Feigl G, Koós Á, Ördög A, Pető A, Erdei L, Kolbert Zs: Cytokinin-Nitric Oxide Interaction During Selenium Stress Responses of *Arabidopsis*.

Tudományos riport

Lehotai N (2012) The possibilities and enzymatic background of selenium and zinc biofortification of pea plants. Report for Short-Term Scientific Mission (STSM) in the framework of COST Action FA 0905 (Reference code COST-STSM-ECOST-STSM-FA0905-010212-013321).

Konferencia előadások

Pető A, **Lehotai N**, Kolbert Zs, Erdei L (2010) The effect of heavy metal-induced reactive oxygen- (ROS) and nitrogen species (RNS) generations on cell viability of pea roots. p27, L18. 3rd Plant NO Club International Meeting, 2010. július 15-16., Olmütz, Csehország.

Kolbert Zs, Pető A, **Lehotai N**, Erdei L (2011) A nitrogén-monoxid (NO), mint a nehézfém-indukált növekedési válaszok regulátora. S4-02. A Magyar Növénybiológiai Társaság X. Kongresszusa, 2011. augusztus 31-szeptember 2., Szeged, Magyarország.

Feigl G, Kumar D, Pető A, **Lehotai N**, Szepesi Á, Erdei L, Kolbert Zs (2012) Studying the effect of copper in *Brassica juncea* and *Brassica napus* root tips: metabolism of reactive oxygen and nitrogen species and morphological adaptation. p51. 7th PhD Student Conference, Scandinavian Plant Physiology Society (SPPS), 2012. szeptember 12-15., Laulasmaa, Észtország.

Feigl G, Kumar D, Pető A, **Lehotai N**, Ördög A, Molnár Á, Kolbert Zs, Erdei L (2012) The effect of zinc on the microelement homeostasis and the metabolism of reactive signal molecules in *Brassica juncea* and *Brassica napus*. Third Annual Workshop of COST Action FA 0905 – Mineral improved crop production for healthy food and feed. 2012. október 23-26., Lisszabon, Portugália.

Lehotai N, Lyubenova L, Drews N, Ördög A, Feigl G, Kolbert Zs, Erdei L, Schröder P (2012) The possibilities and enzymatic background of Se and Zn biofortification of pea plants. Third Annual Workshop of COST ACTION FA 0905 – Mineral improved crop production for healthy food and feed. 2012. október 23-26., Lisszabon, Portugália.

Horváth E, Kolbert Zs, **Lehotai N**, Feigl G, Tari I, Erdei L (2012) Role of reactive oxygen- and nitrogen species in poplar plants during zinc, copper and polyethylene glycol treatments. Characterization and oxidative stress tolerance in plants: from models to trees (OXIT) HUSRB/1002/214/036. Interim Conference, 2012. november 20., Szeged, Magyarország.

Lehotai N, Feigl G, Koós Á, Erdei L, Kolbert Zs (2014) Cytokinin-nitric oxide relationship in selenium-stressed *Arabidopsis*. Societas Biologiae Plantarum Hungarica, Conference of Young Biologists, 2014. január 30., Budapest, Magyarország.

Feigl G, **Lehotai N**, Molnár Á, Erdei L, Rodríguez-Ruiz M, Palma JM, Corpas FJ, Kolbert Zs (2014) Zinc induced nitro-oxidative stress in *Brassica* species. L23. 5th Plant NO Club Meeting, 2014. július 24-25., München, Németország.

Kolbert Zs, Pető A, **Lehotai N**, Feigl G, Erdei L (2014) Growth responses induced by microelement excess: the role of reactive nitrogen species. S1-11. Societas Biologiae Plantarum Hungarica, 11th Congress, 2014. augusztus 27-29., Szeged, Magyarország.

Konferencia poszterek

Kolbert Zs, Vashegyi Á, Ördög A, **Lehotai N**, Méri Á, Erdei L (2009) Short time effect of copper ion (Cu^{2+}) on nitric oxide (NO) production in *Sorghum sudanense* L. roots. p58., P19. COST 859 Workshop of WG1 and WG2 on Uptake, Sequestration and Detoxification - an Integrated Approach, 2009. április 16-17., Szeged, Magyarország.

Pető A, **Lehotai N**, Erdei L, Kolbert Zs (2010) Metal content and nitric oxide (NO) production in the roots of heavy metal-treated pea plants. SB-23. ISIRR 11th International Symposium Interdisciplinary Regional Research, 2010. október 13-15., Szeged, Magyarország.

Lehotai N, Pető A, Weisz M, Kolbert Zs, Erdei L (2011) The effect of long-term copper (Cu^{2+}) exposure on reactive nitrogen- and oxygen species generation in two pea cultivars. P110, p174. 10th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants, 2011. július 5-8., Budapest, Magyarország.

Kolbert Zs, Pető A, **Lehotai N**, Erdei L (2011) Nitric oxide as negative regulator of auxin during copper induced morphological responses. P141, p220. 10th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants, 2011. július 5-8., Budapest, Magyarország.

Kolbert Zs, Pető A, **Lehotai N**, Tari I, Erdei L (2011) Endogenous reactive oxygen species (ROS) status and cell death in nitric oxide (NO) mutants under copper excess. XXIV Scandinavian Plant Physiology Society (SPPS) Congress, 2011. augusztus 21-25., Stavanger, Norvégia.

Lehotai N, Pető A, Erdei L, Kolbert Zs (2011) The effect of selenium (Se) on development and nitric oxide levels in *Arabidopsis thaliana* seedlings. S4-P02. Societas Biologiae Plantarum 10th Congress, 2011. augusztus 31-szeptember 2., Szeged, Magyarország.

Lehotai N, Pető A, Feigl G, Kumar D, Erdei L, Kolbert Zs (2011) Early responses in root meristem of *Pisum sativum* and *Arabidopsis thaliana* induced by copper and selenium. Second Annual Conference and MC Meeting COST Action FA 0905, Mineral Improved Crop Production for Healthy Food and Feed, 2011. november 23-26., Velence, Olaszország.

Kolbert Zs, **Lehotai N**, Pető A, Feigl G, Kumar D, Erdei L (2012) Selenium-induced growth responses and their hormonal background. Plant growth, Nutrition & Environment Interactions, 2012. február 18-21., Bécs, Ausztria.

Lehotai N, Pető A, Feigl G, Kumar D, Erdei L, Kolbert Zs (2012) Study of selenite-induced hormonal and signalling mechanisms during root growth of *Arabidopsis thaliana* L. by light- and fluorescence microscopy. p54. 7th PhD Student Conference, Scandinavian Plant Physiology Society (SPPS), 2012. szeptember 12-15., Laulusmaa, Észtország.

Kolbert Zs, Pető A, **Lehotai N**, Feigl G, Tugyi N, Ördög A, Erdei L (2013) Relationship between nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS) in copper-treated *Arabidopsis* roots. p189. Society for Experimental Biology (SEB) Annual Main Meeting, 2013. július 3-6., Valencia, Spanyolország.

Kolbert Zs, **Lehotai N**, Pető A, Feigl G, Tugyi N, Erdei L (2013) Cytokinin overproducing *ipt6-1 Arabidopsis* shows altered NO generation and insensitivity to selenite. 11th International POG Conference, 2013. július 17-19., Varsó, Lengyelország.

Lehotai N, Feigl G, Koós Á, Pető A, Erdei L, Kolbert Zs (2013) Relationship between cytokinin and nitric oxide in selenium-treated *Arabidopsis* plants. p51. Biomedica Minikonferencia, 2013. december 13., Szeged, Magyarország.

Feigl G, Pető A, **Lehotai N**, Molnár Á, Erdei L, Kolbert Zs (2013) Comparison of the effect of copper and zinc in *Brassica juncea* and *Brassica napus* roots: microelement homeostasis, metabolism of reactive signal molecules and morphological adaptation. p44. Biomedica Minikonferencia, 2013. december 13., Szeged, Magyarország.

Lehotai N, Feigl G, Koós Á, Erdei L, Kolbert Zs (2014) Cytokinin-nitric oxide interaction: an antagonistic relationship in selenite-exposed *Arabidopsis*. C7.40. Society for Experimental Biology (SEB) Annual Main Meeting, 2014. július 1-4, Manchester, Anglia.

Feigl G, **Lehotai N**, Molnár Á, Erdei L, Kolbert Zs (2014) Zinc excess affects root architecture and reactive oxygen- and nitrogen species metabolism in *Brassica juncea* and *Brassica napus*. C7.39. Society for Experimental Biology (SEB) Annual Main Meeting, 2014. július 1-4, Manchester, Anglia.

Feigl G, **Lehotai N**, Molnár Á, Erdei L, Kolbert Zs (2014) Detection of protein tyrosine nitration in zinc-treated *Brassica* plants. S1-P03. Societas Biologiae Plantarum Hungarica, 11th Congress, 2014. augusztus 27-29., Szeged, Magyarország.

Lehotai N, Feigl G, Koós Á, Pető A, Erdei L, Kolbert Zs (2014) The role of nitric oxide under selenium tolerance. S1-P09. Societas Biologiae Plantarum Hungarica, 11th Congress, 2014. augusztus 27-29., Szeged, Magyarország.

Molnár Á, Feigl G, **Lehotai N**, Erdei L, Kolbert Zs (2014) Microscopic study of zinc localization in *Brassica* roots. S1-P14. Societas Biologiae Plantarum Hungarica, 11th Congress, 2014. augusztus 27-29., Szeged, Magyarország.

Díjak és elismerések

Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD) Ösztöndíj, Rövid Tanulmányút, 2009. – Kiel, Németország.

Tudományos Diákköri Konferencia, helyi forduló, 2010 – I. díj

Országos Felsőoktatási Környezettudományi Diákkonferencia, 2010. – II. díj

European Cooperation in Science and Technology (COST) Short-Term Scientific Mission (STSM) Ösztöndíj, 2012. – Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Németország.

Travel Grant of the 7th Scandinavian Plant Physiology Society (SPPS) PhD Student Conference, 2012.

Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése országos és konvergencia program Ösztöndíj, 2013-2014.

SZTE Talent Ösztöndíj és Kiválósági Lista, 2013. – Ezüst fokozat

Campus Hungary Ösztöndíj, 2013. – Gregor Mendel Institute of Plant Molecular Biology, Bécs, Ausztria.

Travel Grant of the Society for Experimental Biology (SEB) Annual Main Meeting, 2014.

XI. Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönettel tartozom témavezetőimnek, Dr. Ördögné Dr. Kolbert Zsuzsannának és Prof. Dr. Erdei Lászlónak, akik szakdolgozó koromtól kezdve fáradhatatlanul támogattak és tanítottak. Iránymutatásuknak köszönhetően elindulhattam a kutatói pályán, lehetőséget kaptam hazai és nemzetközi konferenciákon, tanulmányutakon való részvételen és felbecsülhetetlen szakmai tudásuk révén eredményeinket színvonalas publikációk őrzik. Köszönöm felbecsülhetetlen munkájukat és odafigyelésüket.

Köszönöm Dr. Görgényi Miklósné Dr. Tari Irma Tanszékvezető egyetemi docensnek a kedves támogatását és, hogy lehetővé tette Ph.D. tanulmányomat és a dolgozatom megírását a Növénybiológiai Tanszéken.

Köszönettel tartozom Megyeriné Pető Andreának tanításáért, kedvességéért és fáradhatatlan jókedvéért. Andi, öröm volt veled dolgozni!

Köszönettel tartozom a volt és jelenlegi PhDsoknak; Daninak, Editnek, Krisztinek, Szilvinek, Zolinak, Juditnak és Lacinak a vidám hétköznapiért és a sok segítségért. Kispajtások, köszönöm!

Köszönöm a Tanszék valamennyi volt és jelenlegi munkatársának a sok-sok segítséget és támogatást a munkám során, melyet tőlük kaptam.

Köszönöm a szakdolgozóinknak, Tugyi Nórának, Koós Ágnesnek, Weisz Máténak és Molnár Árpádnak a kísérletek kivitelezéséhez nyújtott segítségüket és, hogy együtt dolgozhattunk.

Örök hálával tartozom Horváth Editnek és Feigl Gábornak, akik mindenkor és mindenben támogattak, tanítottak és jókedvre derítettek. Köszönöm a közös utazásokat! Kiscsillagaim, köszönöm, hogy vagytok nekem!

Örök hálával tartozom a családomnak és barátaimnak, akik sosem kételkedtek bennem, gondoskodásukkal és szeretetükkel mindvégig támogattak és támogatnak. I would like to thank my family and friends for their unconditional support and love. Köszönöm, hogy eljuthattam ide!

Köszönet illeti Prof. Tom Guilfoylet (University of Missouri, USA), Prof. Dr. G. F. E. Scherert (University of Hannover, Németország), Dr. Christian Lindermayrt (Helmholtz Zentrum München, Németország), Dr. Zsigmond Laurát (SZTE), Prof. Dr. Thomas Schmüllinget és Dr. Thomáš Wernert (Freie Universität Berlin, Németország), a SALK Intézetet (SALK Institute for Biological Studies), közvetlenül Dr. Peter Doernert, és a European Arabidopsis Stock Centre-t (uNASC) (UK), hogy rendelkezésünkre bocsátották a kísérletekhez használt *Arabidopsis* magokat.

I would like to say thank to Prof. Dr. Peter Schröder and Dr. Lyudmila Lyubenova at the Helmholtz Zentrum München for their supervision, theoretical support and kindness of the whole Schröder Group. I am grateful to Dr. Wolfgang Busch at the Gregor Mendel Institute for his great knowledge, support, and to the Busch Group for their kindness.

Végezetül, szeretném megköszönni a COST-nak (European Cooperation in Science and Technology, STSM program, COST FA 0905), a Nemzeti Kiválóság Programnak (Apáczai Csere János Ösztöndíj), a Balassi Intézetnek (Campus Hungary Ösztöndíj Program), az OTKA PD100504 pályázatnak és a HURO/0901/147/2.2.2 SZETISA 1. pályázatnak, hogy mind anyagi, mind pedig infrastrukturális támogatásukkal lehetővé tették új módszerek elsajátítását, kapcsolatépítést és az eszköz háttért a kísérletek kivitelezéséhez.