

DEBRECENI EGYETEM
Kerpely Kálmán Doktori Iskolája
Növénytermesztés és kertészeti tudományok doktori program

Témavezető: Prof. Fári Miklós D.Sc.

**SZERVETLEN SZELÉNMODOSULATOK BIOLÓGIAI HATÁSÁNAK ÉS A
FORTIFIKÁCIÓ LEHETŐSÉGEINEK TANULMÁNYOZÁSA NÖVÉNYI
RENDSZEREKBEN**

Jelölt: Domokosné Szabolcsy Éva

Készült:
Debreceni Egyetem AGTC MÉK Diószegi Sámuel Agrárinnovációs Intézet
Növényi Biotechnológia nem önálló Tanszék

Debrecen, 2011

**SZERVETLEN SZELÉNMÓDOSULATOK BIOLÓGIAI HATÁSÁNAK ÉS A
FORTIFIKÁCIÓ LEHETŐSÉGEINEK TANULMÁNYOZÁSA NÖVÉNYI
RENDSZEREKBEN**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a növénytermesztési és kertészeti tudományok tudományágban

Írta: Domokosné Szabolcsy Éva

okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem **Kerpely Kálmán Doktori Iskolája**
(Növénytermesztés és kertészeti tudományok doktori program) keretében

Témavezető: Dr. Fári Miklós DSc.

A doktori szigorlati bizottság:

Név	Tud. fokozat
elnök: <u>Prof. Szabó Zoltán</u>	<u>D.Sc.</u>
tagok: <u>Dr. Bisztray György</u>	<u>Ph.D.</u>
<u>Dr. Mészáros Annamária</u>	<u>Ph.D.</u>

A doktori szigorlat időpontja: 2010.02.18.

Az értekezés bírálói:

Név	Tud. fokozat
<u>Prof. Hodossi Sándor</u>	<u>D.Sc.</u>
<u>Dr. Stefanovitsné Prof. Bányai Éva</u>	<u>D.Sc.</u>

A bíráló bizottság:

	Név	Tud. fokozat	Aláírás
Elnök:	<u>Dr.</u>	<u> </u>	<u> </u>
Tagok:	<u>Dr.</u>	<u> </u>	<u> </u>
	<u>Dr.</u>	<u> </u>	<u> </u>
	<u>Dr.</u>	<u> </u>	<u> </u>
Titkár:	<u>Dr.</u>	<u> </u>	<u> </u>

Az értekezés védésének időpontja: 20..... .. .

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS.....	8
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	11
2.1. A szelén története	11
2.2. A szelén jellemzése és előfordulása.....	11
2.2.1. A szelén kémiai tulajdonságai.....	12
2.2.2. A szelén előfordulása az élettelen környezetben	12
2.2.2.1. Szelénformák a talajokban	12
2.2.2.2. A szelén geográfiai megoszlása Földünkön	15
2.2.3. Szelén jelenléte az élővilágban	16
2.2.4. A szelén jelenléte az élővilág fehérjéiben	16
2.2.4.1. A szelenoaminosavak, szelén beépülése fehérjékbe	17
2.2.4.2. A szelén tartalmú fehérjék rendszerezése	18
2.3. A szelén biológiája az emberi szervezetben	19
2.3.1. Szelén szerepe enzim szinten.....	19
2.3.2. Szelén szerepe szervezeti szinten	20
2.3.3. Szelén hiány, és annak háttere.....	21
2.3.4. A szelénhiány pótlásának alternatívái	22
2.3.4.1. Természetes szelénforrások	23
2.3.4.2. Mesterséges szelénforrások	23
2.3.5. Szelén túladagolása	26
2.4. Szelén biológiája a magasabbrendű növényekben.....	26
2.4.1. A növények szelén felvétele	26
2.4.2. A szelén szállítása és eloszlása.....	29
2.4.3. A növények szelén eltávolítása, volatilizációja	31
2.4.5. A szelén hatása <i>in vitro</i> rendszerekben	33
2.5. Stressz hatás és stresszválasz növényekben.....	33
2.6. A szelén és az antioxidáns-aktivitás közötti kapcsolat	35
3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	37
3.1. Szervetlen szelénformák növénybiológiai hatásának <i>in vitro</i> modellezése ...	37
3.1.1. Dohány szövettenyésztése	37
3.1.2. Nanoszelén szuszpenzió előállítása	38
3.1.3. Dohány szövettenyésztésből elvégzett mérések.....	38

3.2. Zöldségcsírák <i>in vitro</i> fortifikálása nátrium-szelenáttal.....	39
3.2.1. Kísérleti tenyészlet beállítása	39
3.2.2. Retek és paprika csíranövényekből elvégzett mérések.....	39
3.3. Zöldhagyma fortifikálása szelenáttal	39
3.3.1. Kísérleti tenyészlet beállítása	39
3.3.2. A zöldhagymákból elvégzett mérések	40
3.4. Morfogenetikai és tömegmérések részletes leírása	40
3.4.1. Friss tömeg mérése.....	40
3.4.2. Szárazanyag tartalom mérése.....	41
3.4.3. Hosszúság mérése.....	41
3.4.4. Csírázási erély vizsgálat	41
3.4.5. Gyökeresedési erély vizsgálata	41
3.5. Biokémiai mérések	41
3.5.1. Mintaelőkészítési módszerek biokémiai és analitikai mérésekhez	41
3.5.1.1. Mintaelőkészítés összes szeléntartalom méréshez.....	41
3.5.1.2. Mintaelőkészítés szelénmódosulatanalitikai méréshez	42
3.5.1.3. Mintaelőkészítés nikotinsav, nikotinamid és trigonellin méréshez .	42
3.5.1.4. Mintaelőkészítés klorofill tartalom meghatározáshoz.....	42
3.5.1.5. Mintaelőkészítés teljes antioxidáns sűrűség (ACW és ACL) meghatározáshoz.....	43
3.5.1.6. Mintaelőkészítés glutation-peroxidáz aktivitás meghatározáshoz..	43
3.5.2. Biokémiai és analitikai mérések módszertani leírása.....	43
3.5.2.1. Összes szeléntartalom meghatározása AFS módszerrel.....	43
3.5.2.2. Összes szeléntartalom meghatározása ICP-MS módszerrel.....	43
3.5.2.3. Szelénmódosulatok elválasztása HPLC-ICP-MS módszerrel.....	44
3.5.2.4. Nikotinsav, nikotinamid és trigonellin tartalom meghatározása HPLC módszerrel	46
3.5.2.5. Klorofill tartalom meghatározása	47
3.5.2.6. Csírák teljes antioxidáns tartalmának mérése kemiluminometriás módszerrel	48
3.5.2.7. Glutation-peroxidáz (GSH-px) aktivitás mérése	50
3.6. Statisztikai elemzés	51
4. EREDMÉNYEK	52

4.1. Szervetlen szelénformák növénybiológiai hatásának <i>in vitro</i> értékelése	
dohány szövettenyészetben.....	52
4.1.1. Tömeg- és morfológiai változások dohány szövettenyészetben	52
4.1.2. Szárazanyagtartalom-változások dohány szövettenyészetben.....	56
4.1.3. Regenerálódó dohány gyökeresedési erélye	56
4.1.4. AFS módszerrel mért teljes szeléntartalom szövettenyészetben	57
4.1.5. Trigonellin, nikotinsav és nikotinamid tartalom szövettenyészetben	60
4.1.5.1. Trigonellin tartalom dohány szövettenyészetben.....	60
4.1.5.2. Nikotinsav tartalom dohány szövettenyészetben	62
4.1.5.3. Nikotinamid tartalom dohány szövettenyészetben	64
4.1.6. Klorofilltartalom szövettenyészetben.....	65
4.2. Növények fortifikálási lehetősége, nátrium-szelenát biológiai hatásvizsgálata	
.....	67
4.2.1. Nátrium-szelenát összehasonlító biológiai vizsgálata szelénakkumuláló és nemakkumuláló zöldségcsírákban	67
4.2.1.1. Fortifikálási háttér szeléntartalma	67
4.2.1.2. Zöldségcsírák csírázási erélye.....	68
4.2.1.3. Zöldségcsírák tömegeredményei	70
4.2.1.4. Zöldségcsírák szelén tartalma.....	71
4.2.2. Nátrium-szelenát összehasonlító biológiai vizsgálata Makói bronz és Makói lila zöldhagyma fajtákban.....	74
4.2.2.1. Szelenizált zöldhagyma tömegeredményei	74
4.2.2.2. Szelenizált zöldhagyma szeléntartalma	77
4.2.2.3. Szelénmódosulatok eloszlása szelenizált zöldhagymában	77
4.2.2.4. Szelenizált zöldhagyma teljes antioxidáns sűrűsége	82
4.2.2.5. Szelenizált zöldhagyma klorofill tartalma.....	84
4.2.2.6. Glutation-peroxidáz aktivitás szelenizált zöldhagymában	86
4.2.2.7. Szelenizált zöldhagyma, mint funkcionális termék	87
5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK.....	89
5.1. Vörös elemi nanoszelen biológiai hatása dohány szövettenyészetben szelenáttal összehasonlítva	89
5.2. Nátrium-szelenát biológiai hatása <i>in vitro</i> nevelt zöldségcsírákra	91
5.3. Összehasonlító biológiai hatásvizsgálat és fortifikáció lehetősége szelenáttal két zöldhagyma fajtában	91

6. ÚJ ÉS ÚJSZERŰ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	94
8. SUMMARY	98
9. SZAKIRODALMI JEGYZÉK	101
10. PUBLIKÁCIÓK AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN.....	120
INNOVÁCIÓS EREDMÉNYEK AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN.....	127
ÁBRA ÉS TÁBLÁZATJEGYZÉK	128
KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	132
NYILATKOZAT	133

Rövidítések:

ACL	Antioxidative Capacity of Lipid Soluble Compounds
ACW	Antioxidative Capacity of Water Soluble Compounds
APSe	Adenozin-foszfoszelenát
DPPH	α,α -diphenyl- β -picrylhydrazyl
GPx, GSH-Px	Glutation-peroxidáz
GS-Se-SG	Szelenodiglutation
HPLC-ICP-MS	High performance liquid chromatography/ inductively coupled plasma-mass spectrophotometry
MetSeCys	Metil-szelenocisztein
MTK	Mikrohajtással rendelkező kallusz
NAA	Naftilecetsav
NaAD	Nicotinic acid adenine dinucleotide
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide
NaMN	Nicotinic acid mononucleotide
nanoSe	Vörös elemi nanoszelen
NMN	Nicotinamide mononucleotide
RGY	Regenerálódó növény gyökér része
RH	Regenerálódó növény hajtás része
ROS	Reaktív oxigen species
SBP2	SECIS binding protein
SECIS	Selenocysteine inserting sequence
SeCys	Szelenocisztein
SeCys ₂	Szelenocisztin
SeMet	Szelenometionin
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances

1. BEVEZETÉS

Természetes környezetünkben a szelén kőzetekben, talajokban, vizekben egyaránt előforduló mikroelem. Ugyanakkor napjaink felgyorsult iparosodásának következményeként is jelentős mennyiségű szelén kerül a környezetbe ipari melléktermékként. Így összességében viszonylag nagy szelén készletek vannak Földünkön, eloszlásuk azonban nagyon egyenlőtlen. Miért lényeges ez? A szelén kétélű kardként viselkedik biológiai rendszerekben, nagyon szűk az a koncentrációtartomány, ami szükséges és hasznos az emberi és állati szervezeteknek, e szint alatt a hiánytünetek hamar jelentkeznek, ugyanakkor a toxikus tartományt is könnyen el lehet érni.

A szelén a legintenzívebben kutatott mikroelemek egyike, több tudományterületen végzett vizsgálatok eredményeiből mára már sok információ halmozódott fel. Analitikai kémiai kutatások segítségével világossá vált, hogy a szelén az élettelen környezetben különböző koncentrációban és módosulatként lehet jelen, a külső fizikai és kémiai tényezőktől függően. Megjelenési formája nagymértékben befolyásolja felvételét Prokaryotákban és Eukaryotákban egyaránt. Az is nyilvánvalóvá vált, hogy bizonyos élőlény csoportok (baktériumok, magasabb rendű állatok, ember) normális anyagcsere működéséhez elengedhetetlen a szelén. Más szervezetek létezéséhez azonban nem feltétlenül szükséges (gombák és magasabb rendű növények), de akkumuláló képességük előnyt jelenthet.

Ahogy minden kutatási terület közvetve vagy közvetetten az ember irányába központosított, nem kivétel ez alól a szelén sem. Miután bebizonyosodott a szelénről, hogy létfontosságú az emberi szervezet számára (*Schwartz és Foltz 1957*), az orvostudományi területeken élénk érdeklődés vette körül. A szakirodalomban egymás után írták le a szeléntartalmú enzimeket, illetve egyéb proteineket. Kimutatták, hogy a szelén nélkülözhetetlen az immunrendszer normális működéséhez, a spermiumok mozgékonyaságához, valamint úgy tűnik szerepet játszik a HIV fertőzés AIDS-é alakulásának gátlásában (*Rayman, 2000*). Az is bizonyossá vált, hogy vannak kifejezetten szelénhiányhoz köthető betegségek is, mint a Keshan illetve Beck-Kashin betegségek.

Az orvostudományban elért felismeréseknek köszönhetően az utóbbi években felértékelődött a megfelelő szelénbevitel jelentősége. A múltban a legfontosabb szelén forrást a gabonafélék, zöldségek, húsok, állati termékek jelentették. Napjainkban azonban számos országban küzdenek az alacsony szelénbevittel a változó táplálkozási

szokások, illetve a természetes növényi és állati élelmiszerek csökkenő szelén tartalma miatt. Emiatt a megfelelő szelénpótlás nagy kihívást jelent. A vegy- és gyógyszeripar hamar reagált az igényre, és ma már számos szeléntartalmú készítményt találunk a boltok és gyógyszertárak polcain. Ugyanakkor kézenfekvő lehetőség a táplálékok szeléntartalmának közvetlen vagy közvetett növelése. A zöldségnövények különösen nagy jelentőségűek e tekintetben, hiszen sok közülük képes a felvett szerves szelénformákat olyan szelenoaminosav származékokká alakítani, amelyek humán-egészségügyi szempontból nagyon kedvező hatásúak.

Ezen előnyös tulajdonságuk miatt intenzíven kutatják a különböző szelénformák hatását zöldségekben, de más magasabb rendű növényekben is. A kutatások homlokterében elsősorban a szelenát és a szelenit forma áll, mivel ezek a leggyakoribb és legkönnyebben felvehető formák. A természetes környezetben ritkábban előforduló szelenidről és elemi szelénről ismert, hogy szinte felvehetetlen a növények számára. Van azonban egy érdekes, kevésbé kutatott szelénforma is, a vörös elemi nanoszelén, mely állatkísérletekben meglepő eredményeket mutatott, de növényekben eddig még senki nem vizsgálta. Nincsenek információk sem felvehetőségéről, sem pedig biológiai hatásáról.

Összekapcsolva a növények és szelén kapcsolatán alapuló megválaszolatlan kérdéseket a lehetőségekkel, melyek tanszékünk munkaterületéből adódott, fokozatosan alakult ki a doktori munkám hipotézise, célja. Alapvetően a zöldségnövényekre fókuszáltam, mint humán egészségügyi szempontból kiemelkedő jelentőségű, szelénfelvételre alkalmas forrásra. Ugyanakkor növényi szempontból is nagyon érdekesnek tűnt a különböző szelénformák biológiai, kémiai hatásvizsgálata, hiszen (különösen) *in vitro* vonatkozásban kevésbé kutatott terület.

Mindezek alapján munkám három alapvető pillérre épült fel, melyek egymástól függetlenek, mégis szorosan összekapcsolódnak:

- Célom volt egy eddig növényekben sohasem vizsgált szelénforma, a vörös elemi nanoszelén alapvető morfogenetikai, élettani, biokémiai hatásának összehasonlító vizsgálata nátrium-szelenáttal dohánymodellen, *in vitro* szövettenyészetben.
- Továbbá a szelenát, mint könnyen hozzáférhető, s egyben leggyakrabban használt szerves szelénmódosulat biológiai hatását és a fortifikáció lehetőségét vizsgáltam meg két eltérő szelénakkumuláló képességű zöldségfaj esetében *in vitro* csíranövényeken.

- Harmadrészt üvegházi körülmények között vizsgáltam a szelenát biológiai hatását fajta összehasonlító kísérletben. A kísérletet zárt fortifikációs rendszerben végeztem, mely egyúttal lehetővé tette szerves szelénben gazdag funkcionális zöldhagyma hajtását. Az így módon előállított zöldhagymából feldolgozott, késztermék megvalósításáig is eljutottunk.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A szelén története

1817-ben Jöns Jakob Berzelius fedezte fel a szelént, a Hold görög istennőjének, Szelénének nevéből nevezte el. Berzelius megfigyelte, hogy haszonállatokban és emberben többféle megbetegedést okoz. A felfedezést követő közel 140 évben a szelén, mint toxikus ásványként élt az emberek tudatában.

1954-ben Pinsent észrevette, bizonyos baktériumok gyorsabban nőnek szelénnel dúsított táptalajon (Pinsent, 1954), majd további kísérletek után (Schwartz és Foltz, 1957) igazolták a szelén vitális szerepét az emberben is. Felismerték azt is, hogy a szelén és az E vitamin együttesen részt vesznek az izom kóros elváltozásainak megelőzésében fiatal kőrödzöknél (Hogue et al., 1962; Muth 1963). Később igazoltta vált, hogy a szelén a glutation-peroxidáz enzimcsalád nélkülözhetetlen része (Rodtruck et al., 1973). Az 1990-es években egymás után fedeztek fel további szelén tartalmú enzimeket: Berry et al., (1991) tisztították ki és jellemezték először a pajzsmirigy egyes-típusú deiodáz enzimét. A selenoprotein W-t patkányizomból izolálták és tisztították ki első alkalommal (Vendeland et al., 1993), később a fehérjét kódoló gént részletesen is jellemezték öt állatfaj párhuzamos vizsgálatával (Whanger et al. 1997). A selenoprotein P részletes jellemezésével egyidőben írták le a mitokondriális kapszula-szenoproteint is (Burk és Hill 1994.; Kleene, 1994). A tioredoxin-reduktázt, mint szelén tartalmú enzimet először humán adenokarcinóma sejtekben írták le (Tamura és Stadtman, 1996). Behne et al. (1997) két különböző szenoproteint fedeztek fel, mely közül az egyiket prosztata mirigyhámsejtjeiben találták, míg a másikat a spermatid sejtmagban. Később egy 15kDa szenoproteint találtak, mely általánosan előfordult emlősökben (Gladyshev et al., 1998).

2.2. A szelén jellemzése és előfordulása

A szelén a természetben nagy jelentőséggel bíró mikroelem. Létfontossága az élőlények több csoportjában (pl. Baktériumok törzse, Emlősök osztálya) is megkérdőjelezhetetlen (Birringer et al., 2002). Ugyanakkor az emberi kéz alkotta környezetünkben is nagyon fontos. Elsősorban a xerográfiában használják, de fotofélvezető tulajdonsága révén az elektrofotográfiában is jól hasznosítható.

A szelén jelentősége szoros összefüggésben van kémiai tulajdonságaival.

2.2.1. A szelén kémiai tulajdonságai

A szelén periódusos rendszer VI. főcsoportjában helyezkedik el, közvetlenül a kén alatt. Vegyjele Se, rendszáma 34, relatív atomtömege 78,96 g (Win, 2003). A természetben hat stabil izotópja (74, 76, 77, 78, 80, 82) fordul elő, mely közül a ^{80}Se (49,83 %) a leggyakoribb. Az utóbbi időkben ezeknek a stabil izotópoknak nagy szerepet tulajdonítanak a szelén biológiai rendszerekben betöltött szerepének tanulmányozása kapcsán (Fairweather-Tait, 1997). A szelén biológiai aktivitása függ kémiai alakjától. A kénhez hasonlóan 4 oxidációs állapotban fordul elő: a szelenát (SeO_4) $^{2-}$ valamint szelenit (SeO_3) $^{2-}$ vízoldékony és biológiai rendszerekben már alacsony koncentrációban is toxikus. Se^0 atom vízben nem oldódó forma, míg a Se^{2-} szelenid erősen toxikus, reaktív de könnyen oxidálódik Se^0 -á (Skinner, 1999). Kémiai tulajdonságaikból adódóan a szelén és a kén biológiai rendszerekben hasonlóan működik. Több lényeges eltérés van azonban közöttük. Egyrészt, hogy a protonált H_2Se és a H_2SeO_3 sokkal savasabb jellegű, mint kén analógjai, oldatban pedig semleges pH-n disszociálnak és ionizáltak. Másrészt, a szervezetben a kén tartalmú vegyületek oxidált végtermékek létrehozására törekednek, míg a szelén vegyületek redukált formákba alakulva választódnak ki tüdőn vagy a vesén át (Brody, 1994).

2.2.2. A szelén előfordulása az élettelen környezetben

A szelén geoszférában a vulkanikus eredetű kőzetekben, talajokban fordul elő nagyobb mennyiségben, emellett ismert néhány szelénben gazdag szénréteg is, ahol főképp szerves, ill. kelátos formában található.

A vizekben és talajokban, sok esetben ipari tevékenységekből származó szelénnel is találkozhatunk. Nagy mennyiségű szelént bocsájtanak ki az olajfinomítók, valamint az elektromos erőművek (Nriagu és Pacyna, 1988; Molnárová és Fargasová, 2009).

2.2.2.1. Szelénformák a talajokban

A szelén oxidációs állapottól függő módosulatait a talajban erősen befolyásolják a pH, a talaj környezeti állapota, mikrobiális tevékenységek illetve más faktorok (Girling, 1984; Skinner, 1999).

Savas pH-jú, levegőtlen talajban a szelén főleg oldhatatlan szelenid formában van jelen, a talaj erózió azonban lehetővé teszi, hogy átalakuljon oldható szelénformákba. A szelenidet a növények és az állatok alig képesek felvenni. Lúgos pH-jú, jól szellőző

talajban a szelenát a leginkább előforduló szelénforma (*Mayland, 1986*). A növények könnyen fel tudják venni, mivel a talaj szemcsékhez kevésbé abszorbeálódik. Felszívódása azonban rosszabb, mint a szelenit (*Xiao-Zhang és Ji-Dong, 2008*). Semleges pH-jú, jól szellőzött talaj a szelenit jelenlétének kedvez, ami a növények számára nehezebben felvehető forma, mint a szelenát. Amennyiben a talaj nagy koncentrációban szelenittel szennyeződik, a magas szelén tartalom évekkel később is kimérhető, de jó része szelenáttá oxidálódik (*Széles et al., 2007*).

Az üledékes kőzetekben, redukált, anaerob körülmények között főként elemi formában van jelen a szelén. Nagyon kis mértékben oldékony és mobilis, így az emberi szervezet számára nem jelenthet komolyabb mérgezési forrást (*Banuelos és Lin, 2005*). A kolloidális elemi szelén a növények számára szinte felvehetetlen, nem képesek hasznosítani (*Hurd-Karrer, 1935; White et al., 2004*). A magas vastartalmú talajokban az elemi szelén szorosan kötődik a vashoz, ami még inkább megnehezíti a növények szelén felvételét (*Reilly, 1996*). Ha az üledék oxidálódni kezd, akkor a szelén jó része átalakul szelenáttá vagy szelenitté.

Az elemi szelénnek három fő formája ismert a természetben. A szürke elemi szelén kristályos szerkezetű, hexagonális kristályrácsban elhelyezkedő szelénatomokból épül fel, biológiai rendszerekben inert. A vörös elemi változat amorf szerkezetű vagy monoklin kristályrácsú, nem rendelkezik fémes tulajdonsággal. A harmadik forma a szürke amorf szerkezetű szelén (*Kessi et al., 1999*). Talajokban az utóbbi két amorf, allotróp módosulat fordul elő leggyakrabban. 30 °C hőmérséklet felett a vörös elemi szelén fokozatosan átalakul szürke formává, idővel pedig stabil, hexagonális szürke módosulattá alakul tovább, vagy visszaoxidálódik a pH-tól, ill. redox viszonyoktól függően (*Gattow et al., 1964; Geering et al., 1968*).

Nanométerű vörös elemi szelén előállítására több különböző baktérium törzs is képes a természetben (*Garbisu et al., 1995; Tomei et al., 1995*). Valószínűleg a baktérium védekezési mechanizmusának része az, hogy elemi szelén partikulumokat állít elő. A természetben a baktériumok átlagosan 300 nm nagyságú nanorészecskéket állítanak elő. Érdekes, hogy filogenetikailag eltérnek az egyes baktériumfajok által létrehozott elemi szemcsékben a szelénatomok elrendeződése (*Oremland et al., 2004*). A talajlakó baktériumok e képessége ígéretesnek tűnik ott, ahol extrém magas a talaj szelenit vagy szelenát szintje, mivel ily módon átalakulhat sokkal kevésbé toxikus vörös elemi szelénné.

A természetben előforduló talajbaktériumok mellett iparban alkalmazott baktérium fajok is képesek a szelenitet elemi nanoszelénné redukálni. Többek között ilyen, a joghurtgyártásban is használt *Lactobacillus acidophilus* baktérium törzs, melyről bebizonyították, hogy nagy hatékonysággal képes egy lépésben redukálni a szelenitet 200 ± 20 nm vörös elemi nanoszelénné (Prokisch és Zommara, 2008). A baktérium sejtekből a nanorészecskék savas roncsolással feltárhatóak, s az így kapott szuszpenziót már a forgalomba is bevonták.

A szelenit kémiai redukciójával szürke, üvegszerű elemiszelén allotróp módosulat képződik széles nanomérettartományban (10 nm-50 μ m) (Oremland et al., 2004). Ugyanakkor vörös nanoszelén (5-100 nm tartomány) előállítható szelenitből is kémiai redukcióval marha szérum albumin (BSA) hozzáadásával. A BSA a szelén atomok összetapadásához szükséges, és szabályozza a keletkező aggregátumok méretét: nagyobb BSA koncentráció mellett kisebb nanoszelén részecskék várhatóak (Huang et al., 2003).

Érdekes említést tenni arról is, hogy amorf elemi szelén létrehozható paprikából (*Capsicum annuum* L.) készült extraktum segítségével szelenitből (Li et al., 2007). Az extraktumban lévő 30 kDa molekulatömegű α -Se/protein képes szobahőmérsékleten a szelenit oldatot elemi szelénné redukálni és szabályozza annak göcképződését, növekedését is.

Az utóbbi időkben több közlemény jelent meg, melyekben a nanoszelén előnyeiről számolnak be más szelénmódosulatokkal összehasonlítva. Előnyös tulajdonságait valószínűleg méretének köszönheti: ugyanis ismert, hogy a részecskék nanomérettartományban új tulajdonságokkal rendelkeznek: ilyen a megnövekedett felület, kvantum effektus, magas reaktivitás (Huang et al., 2003).

In vitro körülmények között vizsgálták a nanoszelén szabadgyökökkel szembeni védő hatását. Azt tapasztalták, hogy a kisebb mérettartományba eső (5-15 nm) nanoszelén hatékonyabban véd a szabadgyökökkel szemben, mint a nagyobb méretűek (80-200 nm). Ugyanakkor lehetséges, hogy a BSA-n kívül egyéb fehérjékhez is kötődik. Így más funkcionális fehérjékhez kapcsolódva gátolhatja, azok működését (Huang et al., 2003). Patkányokkal végzett vizsgálatok azt igazolták, hogy a nanoszelén biológiai hozzáférhetősége és antioxidáns hatása hasonló a szelenithez, viszont sokkal kevésbé toxikus akut körülmények között (Zhang et al., 2001).

Szenenometionint is összehasonlítottak nanoszelénnel állatkísérletekben. Az eredmények azt bizonyították, hogy a nanoszelén sokkal kevésbé toxikus (LD_{50} értéket,

rövidtávú toxicitást, akut májfunkciót vizsgálva), mint a szelenometionin. Ugyanakkor megnövekedett az antioxidáns enzimek (GPx) aktivitása. A szelén akkumuláció pedig magasabb a szelenometioninnal kezelt egerekben, mint nanoszelénnel kezeltékben, különösen azoknál, ahol toxikus koncentrációt alkalmaztak (Wang *et al.*, 2007).

Nanoszelén hatásáról magasabb rendű növényekben nem található információ a szakirodalomban.

2.2.2.2. A szelén geográfiai megoszlása Földünkön

A szelén bőséges mennyiségben van a Föld különböző részein, de eloszlása a talajokban erősen változik a természetes szubsztrátoknak, a klimatikus viszonyoknak, illetve az ott élő növényközösségnek megfelelően. Így nagy különbségek alakulnak akár egy országon belül is az egyes területek szelénellátottsága között (Hartill, 2004).

Szelénben leggazdagabb területek közé tartozik az USA középső része, elsősorban Nebraska Wyoming és Dakota államok, ahol a toxikus szintet is eléri a talaj szeléntartalma (Tin Win, 1991). Kína egyes tartományaiban szintén toxikus mennyiségű szelént lehet kimutatni a talajból, csakúgy, mint India Harayana régiójában (Dhillon és Dhillon, 1991). Európán belül Wales és Írország egyes részein mértek toxikus szelénszinteket (Fleming, 1962). A Dél-Amerikai kontinensen Kolumbiában és Venezuelában találtak kimagasló szelénértékeket a talajban (Haug *et al.*, 2007).

A világon több mint 40 országban illetve régióban mutattak ki szelénhiányt, beleértve Európát, USA és Kanada egyes részeit, ill. Ázsia több részét. Kína egyes északkeleti és délnyugati tartományaiban nagyon komoly szelénhiánnyal küzdenek (Cuvaradic, 2003). Európán belül Oroszország, Görögország, Lengyelország, Bulgária és a volt Jugoszlávia jelentős területein mutatható ki nagyobb mértékű szelénhiány (Aro *et al.*, 1994; Bombik *et al.*, 2010; Bratakos és Ioannou, 1989; Hartill, 2004). Kanada nagy része szelénben szegény, illetve az USA keleti és nyugati partjain is több államban komoly szelénhiány van (Hartill, 2004). Ugyanakkor Ausztrália déli és nyugati részeire, valamint Új-Zélandra is jellemző a szelénhiány, az itt élők átlagosan 30 µg-nál kevesebb szelént fogyasztanak naponta (Duffield *et al.*, 1999; Welsh *et al.*, 1981). Az afrikai kontinensen a szelénhiány több országban szintén problémát jelent: ilyen Kongó, Zambia és Dél-Afrika (Haug *et al.*, 2007; Ryssen, 2001).

2.2.3. Szelén jelenléte az élővilágban

A prokaryotákban sokféle szelenoprotein figyelhető meg, esszenciális szerepük már bizonyított (Stadtman, 1996). Az élesztőkből azonban teljesen hiányoznak a szelenoproteinek kódoló szekvenciák (Lobanov *et al.*, 2009). Az alacsonyabb rendű gombák anyagcseréjükben nem tesznek különbséget a kén és a szelén között. A gombákhoz hasonlóan a magasabb rendű növényekben sem bizonyították még eddig a szelén létfontosságú voltát, bár vannak olyan fajok, melyek nagy mennyiségben képesek akkumulálni, s ez bizonyos fokú védelmet nyújt nekik a kártevőkkel szemben (Birringer *et al.*, 2002; Hanson *et al.*, 2003; Hanson *et al.*, 2004; Sors *et al.*, 2005a). Vannak vizsgálatok melyek szerint alacsony koncentrációban a szelén stimulálja a növények növekedését, és ellensúlyoz egyéb stresszhatást (Stadtman 1990; Xue *et al.*, 2001; Luz Mora *et al.*, 2008; Lyons *et al.*, 2009). Ugyanakkor magasabb koncentrációban pro-oxidánsként hozzájárul a termésmennyiség csökkenéséhez (Hartikainen *et al.*, 2000; Gomez-Junior *et al.*, 2007). Vízi növények körében végzett vizsgálatok arra utalnak, hogy a szelén itt létfontosságú lehet (Severi *et al.*, 2001).

Az állatvilágban a magasabb rendűek között a szelén létfontosságú elem (WHO, 1996). Az emlős és a nem emlős gerincesekben egyaránt jelen van, mint enzimalkotó pl. glutation-peroxidázokban (Girling, 1984; Whanger, 2002).

Az emberben, illetve egyéb emlősökben kb. 100 szelenoprotein létezését feltételezik, közülük harmincat már bizonyítottak, és tizenötöt kitisztítottak, klónoztak (Brown *et al.*, 2001; Kyriakopoulos és Behne, 2002). Legismertebbek a GPx emzimcsalád, a pajzsmirigy dejonáz enzim, szelenoprotein P, W, X, R, T.

A különböző szervesetlen szelénformák közül a szelenitet és a szelenidet az összes mikroorganizmus képes asszimilálni, míg a szelenát asszimilációt csak a szárazföldi növényeknél és a baktériumoknál igazolták. A zöld algák esetében azt mutatták ki, hogy a szelén, elsősorban a szelenometionin formában gátolja a sejt növekedést, ill. osztódást (Umysova *et al.*, 2009). A mai napig kérdés maradt azonban, hogy a magasabb rendű állatok fel tudnák-e használni a szervesetlen szelént a bélflóra működése nélkül.

2.2.4. A szelén jelenléte az élővilág fehérjéiben

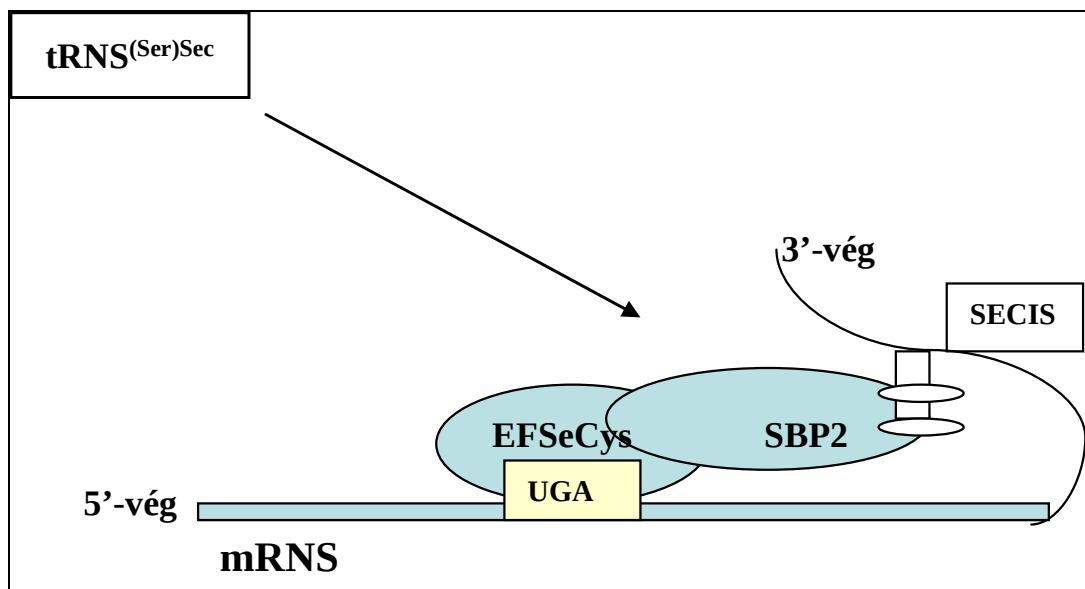
A szelén az élő szervezetek fehérjéiben előfordulhat egyrészt szelenometionin (SeMet) másrészt szelenocisztein (SeCys) aminosavak formájában. A SeMet a fehérjékbe exogén módon képes beépülni a metionin AUG kodonja által, mivel a kodon nem tud különbséget tenni a szelenometionin illetve metionin között (Suzuki és Ogra, 2002).

A SeCys kódolásához szükséges tRNS-t sokáig nem tudták kimutatni növényekben, de Hatfield et al. (1992) sikeresen bizonyították jelenlétét *Beta vulgaris*-ban. A szelenocisztein beépülése szelenoproteinekbe endogén módon történik.

2.2.4.1. A szelenoaminosavak, szelén beépülése fehérjékbe

A szelenocisztein beépülése szelenoproteinekbe a fehérjeszintézis speciális esete, mely során a fő polipeptid láncba egy vagy több szelenocisztein származék épül be. A szelenocisztein beépülés kotranszlációs folyamat, mely mikroszómához kötött. Ezt az aminosavat a DNS-ben TGA, míg az RNS-ben az ennek megfelelő UGA triplet kódolja. Az UGA triplet eukaryotákban a polipeptid szintézis befejezését jelző stop kodont determinálja, míg a mitokondriumban és a baktériumokban triptofán aminosavat. Az UGA dekódolása bonyolult mechanizmus, melynek értelmezése eltérő a prokaryotákban illetve eukaryotákban.

Az UGA (mint szelenocisztein kodon) felismerése függ a mRNS másodlagos szerkezetétől pl. a stem loopoktól melyeket SECIS-nek neveznek. A helyes transzlációhoz szükségesek olyan fehérjék, melyek specifikusakn felismerik a SECIS-t (*Gladyshev és Hatfield, 1999*). Eubaktériumokban ezt a szerepet a selB gén terméke, míg eukaryotákban a SBP2 (SECIS binding protein) nevű fehérje tölti be (1. ábra).



1. ábra: A szelenoprotein transzlációja (*Gergely, 2006* nyomán)

A SelB protein egyidejűleg elongációs faktorként is működik szelenociszteint szállító tRNS-hez kötődve, és így irányítja a riboszóma (A) helyére. eukaryotákban és archae baktériumokban e feladatot két különböző protein látja el.

A tRNS^{(ser)sec} mind méretben, mind formában lényegesen különbözik a szokásos tRNS-től. A tRNS-hez először szerin kötődik, majd a szeril származék enzimatikusan alakul át szelenociszteil származékká a feltöltött tRNS-en.

A szelenociszteinnel inzertált elongációs faktornak versenyeznie kell a release faktorra, mely az UGA terminációs kodonhoz kötődik az (A) helyen s ennek hatására a peptidil transzferáz levágja a polipeptid láncot a (P) helyen a tRNS-ről (Birringer *et al.*, 2002).

Ilyen módon a szelenocisztein képes beépülni a fehérjékbe, miután felismerték, mint szelénmódosulatot. Emlősök esetében a szelenoprotein szintézishez fel nem használt szelén a vesébe szállítódik, és a vizelettel kiürül.

2.2.4.2. A szelén tartalmú fehérjék rendszerezése

A szelén tartalmú fehérjék csoportosítása:

- Nem specifikus szelén tartalmú fehérjék:

A táplálékkal bejutott szelenometionin jó része a szelén metabolikus útba kapcsolódik be, bár bizonyos százalékban közvetlenül beépül fehérjékbe, a metionin helyére. Ilyen esetben a metionin anyagcserébe kapcsolódik be, s mennyisége a metionin/szelenometionin megoszlási hányadától függ. E folyamat befolyásolható a metionin/szelenometionin koncentrációjának változtatásával, ami azt jelenti, hogy a szelén mennyiségének beépülése a fehérjékbe emelhető, amennyiben növeljük a szelenometionin bevitelt vagy csökkentjük a metionin szintet a táplálékban. Ez főként olyan szervezeteknél érdekes, ahol nagy mennyiségben fordul elő metioninban gazdag fehérje (Behne *et al.*, 1991).

- Specifikus szelén kötésű fehérjék esetében a szelén csak hozzákapcsolódik a molekulához

- Szelenoproteinek:

Olyan fehérjék, melyekben a szelenocisztein genetikailag kódolt formában van jelen. A felvett szerves vagy szervetlen szelénmódosulat a szelénanyagcsere útba kapcsolódik be. A szelenoproteinek szintje a szervezet homeosztázisának megfelelően kontrollált, ezért plusz szelén bevitellel sem emelhető meg (lásd részletesebben később).

2.3. A szelén biológiája az emberi szervezetben

2.3.1. Szelén szerepe enzim szinten

A szelén az emberi szervezet minden szövétében jelen van szelenotriszulfid formában; a máj, vese, lép, hasnyálmirigy és a herék azonban kiemelkednek, mint főbb szelén raktározók. A máj és az izom kb. 30%-ban, a vese 15%-ban, a vérplazma pedig 10%-ban tartalmazza ezt az esszenciális nyomelemet (*Reilly, 2001*). A vérplazmában lévő szelén túlnyomórészt az albumin frakcióba, ill. az eritrocitákba épül be (*Ganther, 1986*).

Az agyban lévő fehérjék is jelentős mennyiségű szelént tartanak vissza, szelenometionin formájában (*Gronbaek és Thorlacius-Ussing, 1992*).

A szelén kéntartalmú aminosavakba a kén helyére lép be, s a képződött szelenometionin, vagy szelenocisztein szelenoproteinek, illetve szelén tartalmú fehérjék alkotórésze, ahogyan ezt korábban „A szelenoaminosavak, szelén beépülése fehérjékbe” című fejezetben részleteztem.

A szelenoproteinek az anyagcserében aktív szerepet betöltő fehérjék, enzimek, amelyek szervezeten belül keletkezett szelenociszteint tartalmaznak. Ezzel szemben a szelén tartalmú fehérjék, mint például a vázizomzat fehérjéi inkább külső forrásból származó SeMet-t és SeCys-t építenek be a szerkezetükbe. A külső forrásból származó SeCys szeléntartalmú fehérjékbe közvetlenül be tud épülni, szelenoproteinekbe azonban csak közvetett módon (*Levander és Burk, 1996*).

Az egyik legjelentősebb szelenociszteint tartalmazó enzimcsalád a glutation-peroxidáz (GSH-Px), mely testünk minden szövétében előfordul, 4 izoformája létezik (*Eshdat et al., 1997*): foszfolipid-hidroperoxid GSH-Px, citoszolikus GSH-Px, plazma GSH-Px, gasztrointestinális GSH-Px (*Ursini et al., 1995; Maiorino et al., 1990; Maiorino et al., 1995*). A glutation-peroxidázok feladata átalakítani a hidrogén-peroxid szabad gyököket nem toxikus formákká, redukált glutation terhére.

A pajzsmirigyben működő I. típusú jódtironin-5-dejodináz enzim aminosavláncában szintén szelenocisztein található (*Arthur et al., 1990*). Ez az enzim felelős az inaktív T₄ (tetrajód-tironin) aktív T₃ (trijód-tironin) hormonná alakításáért (*Cser és Sziklai-László, 1998*). A II. és III. típusú dejodináz enzimek az aktív, ill. inaktív T₃ regulációjáért felelősek. A tioredoxin-reduktázt már 1970-ben leírták, de 1996-ig nem tudták róla, hogy szelént tartalmaz. Legfontosabb funkciója, hogy katalizálja a NADPH-dependens tioredoxin redukcióját a citoszolban (*Gladyshev és Hatfield, 1999*). A spermakapszula-reduktáz szervspecifikus szelenoprotein csakúgy, mint a spermatid sejtmagi

szenoprotein, melynek fontos szerepe van a sperma érési folyamatában (Lyons és Jacques, 2001; Pfeifer et al., 2001). Egyéb szenoproteinek közül ismert a szenoprotein P, mely valószínűleg a szelén transzportban jelentős. A szenoprotein W, R, T, X, N, P12 pontos funkcióját napjainkban is kutatják.

2.3.2. Szelén szerepe szervezeti szinten

A szelén fontos a máj, vese, központi idegrendszer és az immunrendszer homeosztázisában (Wachowicz et al., 2001).

Szakirodalmi leírások szerint a szelén hiány következtében csökken a plazma cisztein, cisztation és homocisztein koncentrációja (Uthus et al., 2002). A csökkent homocisztein szint pedig maga után vonja a kardio-vaszkuláris megbetegedések kockázatát, valamint a folát hiány klinikai markere is (Ashfield-Watt et al., 2001; Chern et al., 2001).

Ugyanakkor a szelénhiány szerepet játszhat az immunrendszer hibás működésében, ami negatívan befolyásolja az enterovírusokkal szembeni védekezést is (Beck et al., 1995). Közvetett módon a baktériumokkal szembeni védekezésben is nagy jelentőségű a szelén, ugyanis bakteriális fertőzés kezdetekor neutrofil granulociták (a celluláris immunválasz résztvevői) szabadgyököket használva pusztítják a kórokozókat. Ha azonban sok káros oxidatív termék halmozódik fel, magára a fehérvérsejtre és a szöveti környezetére is káros. A szelén GPx enzimekbe épülve védelmet nyújt ezekkel az oxidatív termékekkel szemben. Az E vitamin szinergista hatása a szelénnel ezért sok esetben kombináltan alkalmazzák (Hartamn, et al., 1998).

Ugyanakkor a szelén részese a szteroid hormon szintézisnek is, valamint létfontosságú a gyomor-bélrendszer és az izom zavartalan működésénél, ill. a szaporodási és növekedési folyamatokban is (Chanonine et al., 2001; Fekete, 1998). Lassítja az öregedési folyamatokat, befolyásolja a csecsemőmirigy (thymus) normális működését (McKenzie, 2006). A szabadgyökök károsítják a mitokondriális és sejtmagi DNS-t egyaránt, illetve lipidperoxidációt okoznak. Több tanulmány bizonyítja, hogy az öregedő sejtek felhalmozzák ezeket az oxidatív károsodásokat okozó szabadgyököket (Finkel és Holbrook, 2000). A szeléndependens glutation-peroxidázok szerepet játszhatnak a sejtek sérüléseinek lassításában, az öregedési folyamatban (Tapiero et al., 2003).

Antioxidánsként, megelőző szerepe lehet a rák kialakulásában (Miyamoto et al., 1987). Több vizsgálat alátámasztja, hogy a tüdő-, vastagbél-, valamint prosztatákban szenvedők között alacsonyabb a mortalitás ott, ahol nagyobb a szelén felvétel s így magasabb a vér szelén szintje. Ugyanakkor szintén antioxidáns tulajdonsága révén segít

a szelén meggátolni az LDL oxidációját, s így részt vesz a koszorúerek meszesedésének megelőzésében (Ozer *et al.*, 1995; Neve, 1996). Ismert az is, hogy az E-vitamin nagymértékben erősíti hatását, ezért a szívbetegeknek a szelénpótlás mellett érdemes E-vitaminban gazdag táplálékot fogyasztani (Rayman *et al.*, 2000).

Az emberi immunhiány-előidéző vírussal (HIV) fertőzöttek körében végzett vizsgálatok igazolják, hogy a szelénhiány és a HIV fertőzés között összefüggés van (Tapiero *et al.*, 2003). Azt találták, hogy a teljes limfocita mennyiség csökkenése szoros összefüggésben áll a szelénhiánnyal a HIV fertőzötteket vizsgálva. Ugyanakkor az is bizonyítást nyert, hogy a plazma szérum szelén szintje korrelál a CD4 helper-T sejtek mennyiségével, valamint CD4/CD8 (citotoxikus T sejtek) arányával (Look *et al.*, 1997). Szelénhiányosok körében nagyobb mortalitást is tapasztaltak, ami az immunrendszerben betöltött szerepéből adódhat (Baum, 1997).

A Keshan-kór elsősorban azokon a területeken fordul elő, ahol a talajban és a táplálékláncban túl kevés szelén és jód van, ezáltal a humán plazma szelén és jód szintje nagyon alacsony (Cong *et al.*, 2011; Vanderpas *et al.*, 1990; Vanderpas *et al.*, 1993). Szelén hiányában a glutation-peroxidáz elégtelen működése mellett olyan peroxidációs folyamatok indulnak meg, ami a szívizomszövet elhaláshoz és végül halálhoz vezethet (Aro *et al.*, 1994). A betegség a kettő és tíz éves kor közötti gyerekeket, és a várandós nőket fenyegeti elsősorban Észak-Kelet és Dél- Nyugat Kínában (Levander, 1991).

A Beck-Kashin kór is elsősorban a szelénhiányra vezethető vissza (Li *et al.*, 2009; Pais, 1997). E betegség szintén Kínában az 5 és 13 év közötti gyerekek körében gyakori. A kór jellemzője, hogy csont és ízületi problémák lépnek fel, ami többek között az ízületek elhalásában nyilvánul meg (Yang *et al.*, 1993). Jellemző, hogy a végtagok növekedése késleltetetté válik, néha teljesen elsatnyul (Cser *et al.*, 1998).

A felsoroltak mellett vannak utalások arra vonatkozólag, hogy E-vitaminnal kombinálva a szelén gyulladáscsökkentésre, reumás ízületi gyulladásra, pikkelysömörre, a bőrfarkas és az ekcéma tüneteinek enyhítésére is alkalmas lehet. Arthritist sok esetben olyan embereknél észleltek, akiknek a vérében kevés szelént találtak.

2.3.3. Szelén hiány, és annak háttere

A WHO, a FAO és a Nemzetközi Atomenergia-ügynökség (IAEA) közös szakértői bizottsága által megjelentetett legutóbbi kiadvány WHO (1996) szerint a normális napi szelén bevitel 20-70 µg. FDA által javasolt napi szelén-bevitel 70 kg-os felnőtt szervezetre számolva azonban 350 µg (RfD: reference dose for selenium). Ezeket az

értékeket összevetve 200 µg körüli átlagfogyasztás számolható ki. Ugyanakkor mérések bizonyították, hogy 750-850 µg szelén hosszú távú fogyasztása sem okoz káros mellékhatásokat (FDA, 2000).

Közismert azonban, hogy a Föld viszonylag nagy területén (Kína, Zaire, Új-Zéland, India egyes részei és Európa számos országa, köztük Magyarország) ennél az értéknél jóval kevesebb szelént vesznek magukhoz az emberek naponta (Kumar és Krishnaswamy, 1997).

Csehországban végzett öt éves vizsgálatsorozat kimutatta, hogy bár évről évre javult a vér szelén státusza átlagosan, de közepes szelén hiány továbbra is fennállt (Batárióvá, 2005).

Az emberek szelén ellátottságára vonatkozóan gyermek és felnőtt korú egészséges emberek szelén státusát hasonlították össze Magyarországon, ill. Németországban azonos időben. Az eredmények alapján a vér szelén koncentrációja szignifikánsan magasabb volt a németeknél mind a gyermekek, mind a felnőttek körében a magyarokéhoz viszonyítva. Szlovákiában, Csehországban és Ausztriában a magyar gyermekekhez hasonló, alacsony értékeket mutattak ki a szelén status vizsgálata során (Cser et al., 1998).

A szelén hiány hátterét vizsgálva, a kutatók arra jutottak, hogy elsősorban a talajok alacsony szelén tartalma okozhatja a legnagyobb problémát. A fokozott talajművelés, az állati vizeletben lévő N és P mennyisége valamint a savas esők miatt a talaj savassá válik, a kén leülepszik (mely viszont növeli a növények nitrogén felhasználását) ezzel együtt csökkenti a vele antagonista szelén hozzáférhetőségét is. A talaj savassága csökkenti a szelénfelvételt, míg a lúgos irányba történő elmozdulás növeli. A megnövekedett szerves anyag mennyisége, vas-hidroxidok, alumínium komponensek megköthetik a szelént, ezzel továbbcsökkentve a növények hozzáférhetőségét.

Az utóbbi évtizedekben több európai országhoz hasonlóan hazánkban is sok helyen savanyúbbá váltak a talajok, ezzel együtt egyre nagyobb mennyiségű szelén kerül ki a körforgalomból (Kádár, 1998).

2.3.4. A szelénhiány pótlásának alternatívái

Szervezetünk szelén igényének kielégítésére természetben előforduló forrásokat használhatunk, vagy mesterséges, szelénrel dúsított élelmiszereket, táplálék kiegészítőket vehetünk igénybe.

2.3.4.1. Természetes szelénforrások

A szelén felvétel lehetséges forrásait keresve a táplálékláncot kell áttekinteni. A természetben megtalálható leggazdagabb „szelénforrások” közé tartoznak az állati belsőségek és húsok, tengeri szervezetek (rákok, halak) (*Plessi et al., 2001*). Növények közül a brazil dió rendelkezik a legmagasabb szeléntartalommal, de viszonylag nagy mennyiséget tartalmaz a szezám is (*Palmer et al., 1982*). A zöldségek, gabona-félék általában szelénben szegények, a bennük felhalmozódott mennyiséget azonban nagymértékben befolyásolja a talaj szeléntartalma, pH-ja és az ott élő mikrobiális közösség is.

2.3.4.2. Mesterséges szelénforrások

Napjainkban egyre inkább terjedőben vannak az étrend kiegészítő tabletták, illetve funkcionális élelmiszerek, mint a hiányzó vitamin illetve ásványanyag mesterséges pótlásai. Mivel a táplálékláncba mind kevesebb a hozzáférhető szelén ezért szükségessé váltak, válnak e mikroelemből is a kiegészítések:

- A jódozott sóhoz hasonlóan Kína egyes tartományaiban szelenizált asztali sóval enyhítik a szelén hiányt.
- A szelén pótlásra egyszerű, könnyen beszerezhető lehetőséget kínálnak a tabletták, kapszulák. A gyártó szempontjából előnyös, hogy viszonylag könnyen kézben tartható gyártási technológiával költségkímélő terméket tudnak előállítani. Hátrányuk azonban, hogy több közülük szervesetlen kötésű szelénmódosulatot tartalmaz (szelenit, esetleg szelenát), és ezek kevésbé hozzáférhetőek az emberi szervezet számára és könnyen elérhető belőle a toxikus szint. Ezenkívül biológiai hasznosulásukat más tényezők is befolyásolják: többek között a táplálékkiegészítőben lévő esetleges egyéb mikroelemekkel történő interakció, vagy más gyógyszerrel történő párhuzamos alkalmazás, stb. (*Navarro-Alacorn et al., 2002*).
- A szervesetlen tabletták mellett a szelénrel dúsított élesztő legelterjedtebb a humán fogyasztásban, illetve állattakarmányozásban egyaránt. A szelenizált élesztőt (*Saccharomyces cerevisiae*) aerob fermentációs technológiával állítják elő, megfelelő koncentrációjú szelén (legtöbb esetben szelenit forma) jelenlétében. Előnye, hogy a felvetetett szelén nagy hányada szelenometioninba épül be (*Polatajko et al., 2004*). Az előlt, szelénben gazdag élesztőt szárítják, majd különböző formában kerül a boltok polcaira, illetve takarmányozási

célokra. 2000-ben az Egyesült Államokban „Sel-Plex” néven helyezetek forgalomba szelenizált élesztőt (*Edens, 2001*). A szelenometionin képes nem specifikusan beépülni fehérjékbe, ezáltal hosszabb távon raktározódik, nehezebben ürül ki (*Dumont et al., 2006*). Lazacokkal végzett kísérletekben azonban azt tapasztalták, hogy bár a szelenometionin volt a legfelvehetőbb forma, azonban a szelenocisztien, ill. szelenit módosulatok növelték meg nagyobb mértékben a glutation-peroxidáz aktivitást, vagyis ezek jobban hasznosultak (*Bell és Cowey, 1989*). Ugyanakkor kisállat kísérletek azt is mutatták, hogy a szelenometionnál hatékonyabbak a szelenocisztein és azok metilezett származékai daganatos megbetegedések prevenciójában (*Ip et al., 2000*)

- Az állati eredetű táplálékok: húсок, belsőségek, tejtermékek és a tojás alapvető ásványanyag forrásnak számítanak (*Kadřabová et al., 1997*). Az állattenyésztéssel foglalkozó szakemberek is felismerték, hogy a takarmányok nem tartalmaznak megfelelő mennyiségű szelént és egyéb nyomelemet. Ennek kompenzálására a takarmányokat inorganikus szelenit sókkal dúsítják, mely ugyan kis mértékben hasznosul az állati szervezetben, de olcsó és széles körben elterjedt. *Lyon (1996)* szerint azonban a szelenit só oxidáns hatású, s nem lehetne az állati takarmány része, helyette a szelenizált élesztő sokkal optimálisabb. A takarmányhoz kevert szelén eredménye a szelénben gazdag tojás (*Fisinin et al., 2008*), tej, és a különböző állati húсок: csirke, szarvasmarha, sertés, mint funkcionális élelmiszerek.
- A búza és egyéb gabonafélék szeléndúsításával is számos kutató foglalkozik Észak-Amerikában és Európában is. A 70-es években, Európában a finneknel volt a legnagyobb szelénhiány, de a többi skandináv ország helyzete is aggodalomra adott okot. A finn lakosság naponta 20-30 µg szelént „fogyasztott”, mivel a finn agrártermékek kevés szelént tartalmaztak. 1984-től a finnek, gabonatermékeik szelén dúsítására Na-szelenátot (16 µg/kg) adagoltak talajtrágyába (*Varo, 1988*). Így elérték, hogy a búza szelénszintje 7-18 µg/kg-ról megnőtt 230 µg/kg-ra, az emberi vér szelén szintje pedig 105 mg/l-re emelkedett. A szelén hiány jelentőségét felismerve Magyarországon az élelmiszerek szelén és egyéb mikroelem tartalmának növelésére 1997-ben született szabadalom. Lényege, hogy gabonaféléket (a csírázás és az érés között) 2-5 alkalommal bepermetezték szelenáttal és huminsavval vagy fulvósavval. A

humín- vagy a fulvósav a szelenátion felvételét segíti elő. A lomb-, csíra és talajtrágyával elérték a talaj szelén és humusztartalmának megnövelését, amely a csírázási esély javítása mellett a búzaminőséget, és a szemtermésbe való beépülést is fokozta (Polhammer et al., 1997).

- A friss zöldségek és gyümölcsök általában vitaminban gazdagok, viszont ásványanyagot (beleértve a szelént is), néhány kivételtől eltekintve viszonylag keveset tartalmaznak. Ezek a növények ellenben képesek arra, hogy ha környezetükben koncentráltan van egy-egy, esetleg több mikro-, makroelem, akkor felhalmozzák szervezetükben. Jó példa erre a hidrokultúrában nevelt indián mustár (*Brassica juncea*) mely alkalmas arra, hogy mikroelemekkel (Se, Mn, Zn, Cr, Fe) dúsítsák. Ezzel az eljárással átlagban 2000 mg/kg Se koncentrációt értek el az ehető növényi szövetekre vonatkozóan (Elless et al., 2000).

A hagymafélékről is bizonyított, hogy jó szelénakkumuláló-képességű zöldségnövények, és nagy előnyük, hogy a felvett szelént főként szelenocisztein és annak metilezett származékává alakítják. A szakirodalom szerint ezek a módosulatok hatékonyabbak a daganatos betegségek elleni védekezésben (Ip., 2000; Ip et al., 2002; Lü et al., 2005). A „Granex 33” hagyma fajta szelén tartalmát 1,0 mg/l koncentrációjú Na_2SeO_4 kezelés szignifikánsan megnövelte, anélkül, hogy gátolta volna a növény normális növekedését (Kopsell et al., 1997). Az Appalache-hegységben előforduló (*Allium tricoccum*) vad póréhagymát szelén tartalmú vermikulit mohaágyásba ültettek. A betakarított hagymagumókban a szeléntartalom 700 mg/kg-ot is elérte, melynek legnagyobb része Se-metilszelenocisztein volt. A szárított póréhagymát patkányokkal etették, amiket előzőleg karcinogén anyagokkal kezeltek. Azt tapasztalták, hogy a szelénrel dúsított póréhagymát fogyasztókban 43%-kal csökkent a tumor elterjedése. Azt is megfigyelték, hogy a szelénrel dúsított póréhagyma az inorganikus szelénhez képest kb. 15%-kal növeli meg a hozzáférhetőséget patkányokban (Whanger, 2000).

Szelénrel dúsított fokhagyma sokkal hatékonyabbnak bizonyult, mint a szelenizált élesztő adenokarcinómák és rosszindulatú léziók kialakulásának gátlásában patkányok emlőmirigyeiben. A fokhagymakivonatban γ -glutamil-Se-metilszelenocisztein módosulatot mutattak ki legnagyobb mennyiségben (Ip et al., 2000). Zöldhagymában végzett szelénspeciáció mérések is azt erősítették

meg, hogy szelenocisztein és annak metilezett származékai a legjelentősebb módosulatok hagymafélékben (*Shah et al., 2004*).

A hagymafélék mellett a keresztesvirágúak közé tartozó növényfajok bizonyultak még jó szelénfelhalmozó zöldségeknek: Hidropóniás körülmények között nevelt retek növényekben a szelenát nagy része változatlan formában maradt meg. A szelenit azonban ~75%-ban átalakult SeMetSeCys-é, emellett kisebb mennyiségben találtak még SeCys₂ és SeMet-t is (*Pedrero et al. 2006*). Szelénnel dúsított brokkoliban szintén a MetSeCys található legnagyobb mennyiségben (*Finley et al., 2001; Hama et al., 2008; Abdulah et al., 2009*).

Rövid tenyészidejű káposzta esetében a tápközegbe juttatott szelenát mennyiségével arányosan nőtt a növények leveles hajtásában az összes szelén mennyisége (*Kopsell et al., 1999*). Rayman et al. (2008) mérései szerint azonban a káposztában, a brokkolitól eltérően szelenometionin a fő szelénmódosulat.

Levélen keresztül nátrium-szelenáttal kezelt borsó növények szemtermésében is SeMet volt a fő módosulat, ehhez hasonló eredményeket kaptak sütőtök, ill. pohánka esetében is (*Smrkolj et al., 2006a,b*).

A szelénnel gazdagított zöldségfélék, mint hozzáadott értékű, ún. funkcionális zöldségek nagy jelentőséggel bírhatnak a szelénhiány csökkentésében.

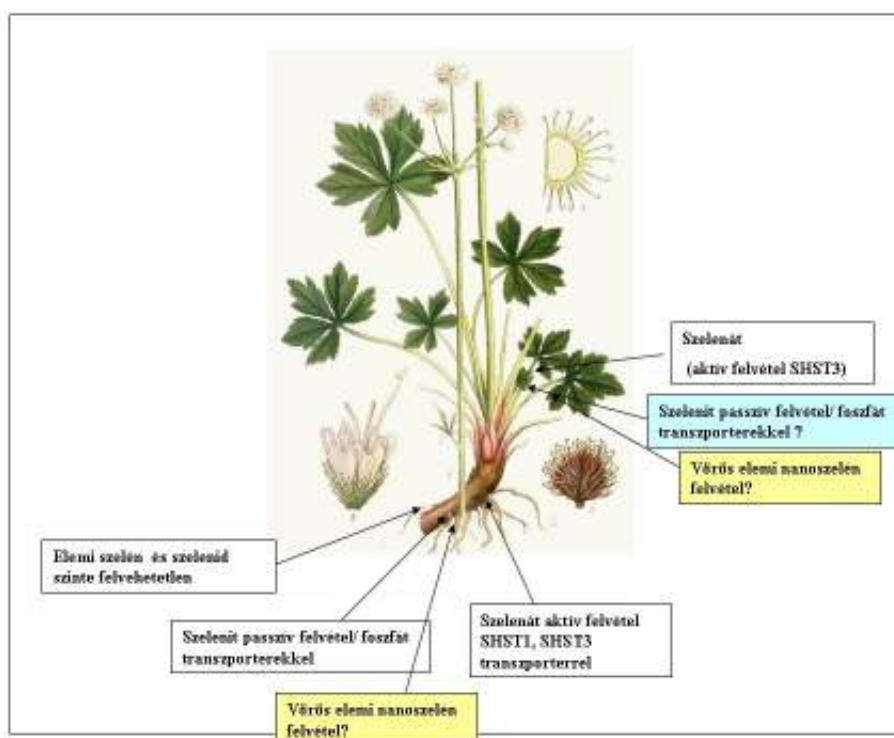
2.3.5. Szelén túladagolása

Az FDA szerint több hónapig tartó 1000-1500 µg napi szelén fogyasztás esetén jelennek meg az egészségkárosító tünetek, amit szelenosishoz neveznek (*FDA, 2000*). Tünetei hasonlítanak a szelén hiányhoz: a gyomor és bél rendszer elégtelen működése, hajhullás, köröm fehér foltossá válása, enyhe idegi probléma. Emellett depresszió, hányinger és izzadás is felléphet.

2.4. Szelén biológiája a magasabbrendű növényekben

2.4.1. A növények szelén felvétele

A szelénben gazdag mezőgazdasági szennyvizekben valamint földterületeken a szelén leggyakrabban könnyen hozzáférhető szelenát anionként fordul elő. A gyökérben a szelenát felvétel carrier mediált szulfát transzporterekkel át történik, melyek a membránban vannak beépülve és az elektrokémiai grádienssel ellentétes irányba szállítják a szelenátot a gyökérsejt belsejébe (2. ábra).



2. ábra: Szervetlen szelénformák felvétele magasabbrendű növények különböző részeiben sematikus növényi képen ábrázolva.

- A fehér szövegbuborékban látható a már bizonyított szelénformák felvétele és a felvétel módja is adott növényi részben.
- Kék szövegbuborék mutatja az igazoltan felvett szelénfomákat, de a felvétel módja még kérdéses.
- Sárga szövegbuborékban láthatóak azok a szelénformák melyek felvétele még nem ismert az adott növényi részben.

Arabidopsis thaliana-ban 14 gén kódolja ezt a szállítómolekulát, ehhez hasonló számban található más növényfajok genomjában is (Hawkesford et al., 2005). Szekvencia analízis kimutatta, hogy a transzport fehérje 12 transzmembrán domént tartalmazó viszonylag konzervatív szekvencia. Jellemző rá, hogy képes szelektálni a szulfát illetve szelenát molekula között (Galeas et al., 2007). A különböző növényfajból kivont fehérje nagyfokú homológiát mutat, de az állatok és a mikroorganizmusok fehérjéihez is hasonlít. A kinetikájuk és az expressziójuk alapján két típusukat lehet megkülönböztetni. A nagy affinitású SHST1 gén által kódolt fehérje főként a gyökérben

expresszálódik (K_m 7-10 μM). Ezzel szemben az alacsony affinitású SHST3 gén által kódolt transzporter molekula a hajtásban és gyökérben egyaránt megtalálható (K_m 100). A SHST3 transzporter fehérje részt vesz a belső intercelluláris transzportban is (Terry *et al.*, 2000).

Kimutatták, hogy szulfát sókkal jelentősen lehet csökkenteni a növények szelenát felvételét (Bell *et al.*, 1992). Különbség van azonban a gátló hatás mértékében a szelén akkumuláló, ill. nem-akkumuláló fajok között. Megnövelt szulfátsó jelenléte a nem-szelénakkumuláló búza, árpa stb. fajok szelenát felvételét szignifikánsan gátolta. Ezzel szemben a szelénakkumuláló *Astragalus bisulcatus* valamint *Brassica juncea* előnyben részesíti a szelenátot, még emelt szulfátsó jelenlétében is.

A másik leggyakoribb szelénforma a szelénben gazdag területeken a szelenit, ami erősebben kötődik az ásványok felületéhez, ezáltal kevésbé hozzáférhető a növények számára, mint a szelenát (Hopper *et al.*, 1999). A szelenáttal szemben a szelenit felvételtől sokáig azt feltételezték, hogy passzív folyamat, melyet a foszfát gátolni képes (2. ábra). A felvételt követően könnyen redukálódik szerves formákba. Néhány faj képes a szelenitet visszaoxidálódni szelenáttá kis mennyiségben (Abrams *et al.*, 1990a; Shrift és Ulrich, 1969; Broyer *et al.*, 1972; Sors *et al.*, 2005a). Zhang *et al.* (2006) szerint a szelenit aquaporinokon keresztül jut be a gyökérsejtekbe. Az utóbbi években azonban kezd módosulni ez az álláspont. Kinetikai vizsgálatok alapján valószínűsíthető, hogy legalább részben foszfát transzporterekhez kötött a szelenit felvétel (Li *et al.*, 2008).

Úgy tűnik, hogy a kolloidális elemi szelén és a szelenid nem hozzáférhető a növények számára (White *et al.*, 2004; Hurd-Karrer, 1935; Peterson és Butler, 1966). Bár Gissel-Nielsen és Bisbjerg (1970) azt tapasztalták, hogy a lóhere, mustár, cukorrépa kis mértékben képes felvenni elemi szelént. A nanoméretű elemi szelén felvételéről azonban egyáltalán nem található információ a szakirodalomban.

A növények képesek szerves szelénformák felvételére, ilyen a szeleno-metionin (SeMet). Búzacsírákban a SeMet felvétel a Michaelis-Menten kinetikát mutatja, és anyagcseregátlókkal (dinitrofenol) illetve anaerob feltételek között gátolható (Abrams *et al.*, 1990b).

A szelén levélen keresztül történő felvétele is ismert (Zieve *et al.*, 1984). Smrkolj *et al.* (2006b) kísérletében virágzásban lévő zöldborsó levelét permeteztek be szelenát oldattal. Tapasztalatuk szerint a kontrolhoz képest szignifikánsan megnőtt a szelén tartalom a borsó szemtermésben illetve a következő generáció hajtásában. Sárgarépa

levelét permetezték be szelenit, ill. szelenát oldattal. Sárgarépa levélpermetezése is megemelte a levél teljes szelén tartalmát, hasonlóképpen a karógyökerét is, bár kisebb mértékben (*Kápolna et al., 2009*). Bab esetében szintén hatékonyak bizonyultak a levélen keresztül történő szelén felvétel. Összehasonlítva a szelenát oldatban előáztatott bab csoporttal, kb. négyszer magasabb teljes szelén tartalmat mértek a levélen keresztül kezeltekekhez képest (*Smrkolj et al. 2007*).

2.4.2. A szelén szállítása és eloszlása

A felvételhez hasonlóan a szelén növényen belüli szállítása és eloszlása is függ kémiai formájától.

A szelenát könnyebben szállítódik a gyökérből a hajtásba, mint a szelenit vagy a szerves szelénformák (*Shrift és Ulrich, 1969*). Így a szelenát jó része a leveles hajtásban akkumulálódik. A szelenit csekély mértékű áthelyeződése a hajtásba, azzal magyarázható, hogy gyorsan képes átalakulni szerves formába, amit a gyökér visszatart (*Zayed et al., 1998*).

A szelén megoszlása a különböző növényi részek között függ a fajtól, a fejlődési fázistól, illetve a fiziológiai állapottól. Úgy tűnik, hogy a szelénakkumuláló fajoknál (*Astragalus bisulcatus*) a szelenát a hajtásos rész idősebb leveleiben koncentrálódik a szulfáthoz hasonlóan, feltehetően vakuolumokban raktározva (*Pickering et al., 2000*). Ezzel szemben a szerves formák áthelyeződnek a fiatalabb levelekben és ott halmozódnak fel (*Pickering et al., 2003*). Korai tanulmányok azt mutatják, hogy a nem-szelénakkumuláló gabona-féléknél a szelén főként a gyökérben és a magban koncentrálódik, a hajtásban kevésbé (*Beath, 1937*).

A leveles hajtásba jutva a szelenát elsősorban a kloroplasztba szállítódik, és ott belép a kénasszimilációs útvonalba.

Első lépésként az ATP szulfuráz redukálja a szelenátot adenzin foszfoszelenáttá (APSe), mely tovább redukálódik szelenitté APS-reduktáz enzim segítségével (*Ellis et al., 2003*). Amennyiben a külső környezet szelenitben gazdag akkor főként szerves szelén halmozódik fel a növény szervezetében. Ha viszont szelenát a hozzáférhető külső szelén forrás, a növényben szerves SeVI forma marad meg túlnyomórészt. Ebből következően a szelenát szelenitté redukálása meghatározó lépés (3. ábra) (*Pilon-Smits et al., 2009*).

A szelenid a szelenocisztein szintézishez szükséges intermedier. A szelenocisztein cisztein-szintáz katalizálta reakcióban alakul ki szelenidből és O-acetilszerinből (Terry *et al.*, 2000). A szelenocisztein nagyon lényeges: részben mint köztes intermedier, több aminosav származék és illékony szelénforma kiindulási pontja. Ugyanakkor fehérjealkotó végtermék is (3. ábra).

Szelénakkumuláló fajokban a szelenocisztein metilációját egy specifikus enzim, a szelenocisztein-metiltranszferáz végzi. Ennek az enzimnek az expressziós szintje arányban áll a növény szelénakkumuláló képességével a különböző *Astragalus* fajokban (Freeman *et al.*, 2006). A képződő metilszelenocisztein és szelenometil-szelenocisztein, valamint konjugált származékuk, a γ -glutamil-szeleno-metilszelenocisztein nem fehérjeképző aminosav származékok, funkcionális fehérjéiket nem károsítják, voltaképpen ez okozza szelénnel szembeni toleranciájukat. A szelenometil-szelenocisztein egy köztes termék is az illékony dimetil-szelenidhez vezető úton (3. ábra). A szelenometionin szintézise is a szelenociszteinen keresztül történik. A szelenocisztein a citoszolba kijutva szelenocisztationná kondenzálódik foszfohomoszerinnel a cisztation- γ -szintáz katalizálta reakcióban, majd cisztation- β -liáz segítségével továbbalakul szeleno-homociszteinné. A szelenometionin a szelenohomociszteinből képződik metionin-szintáz közreműködésével. Metildonorként a metil-tetrahidro-folát szolgál (Terry *et al.*, 2000).

A szelenometionin, ill. a szelenocisztein könnyen képes beintegrálódni fehérjékbe nem specifikusan és elronthatja azok működését. Ennek következménye a szelén toxicitás, amely már kis koncentrációkban is kialakul nem-szelénakkumuláló növényeknél (Galeas *et al.*, 2007). Szelénakkumuláló fajoknál azonban csak nagyon kis mennyiségben tudtak kimutatni szelenometionint (Brunell, 1981).

2.4.3. A növények szelén eltávolítása, volatilizációja

A szelén tolerancia kialakulásában nagy jelentősége van a növények szelén eltávolító képességének volatilizáció révén.

Nem-szelénakkumuláló fajoknál a szelenometionin átalakulhat dimetil-szeleniddé, ami a legfontosabb illékony szelénforma. A szintézis lényeges lépése a szelenometionin metilációja Se-metil-szelenometioninná. E folyamatot L-metionin-S-metiltranszferáz enzim katalizálja (3. ábra). A Se-metil-szelenometionin továbbalakulását dimetil-szeleniddé valószínűleg a S-metilmetionin-hidroláz enzim katalizálja (Sors *et al.*, 2005b). Alternatív úton dimetil-szelenid képződhet a Se-metil-szelenometioninból

dimetil-szenenopropionáton keresztül is dimetil-szenenopropionát-liáz enzim segítségével (De Souza et al., 2000).

A dimetil-szenenid jellegzetes kellemetlen illatot biztosít az *Astragalus*nak, ami segít távol tartani a kártevőket, és 500-700-szor kevésbé toxikus, mint más, szerves szelenmódosulat (Pilon-Smits et al., 1998).

A szelenocisztein is átalakulhat illékony szelenmódosulattá, dimetil-diszeniddé: A folyamat első lépéseként szelenocisztein-metiltranszferáz katalizálja a szelenocisztein metilációját szeleno-metil-szenenociszteinné. A szeleno-metil-szenenocisztein tovább alakul Se-metil-szenenocisztein-szenen-oxidá, majd metán-szeneniollá. A reakciósorozat utolsó lépése a metán-szeneniol dimetil-diszeniddé alakulása (Sors et al., 2005b).

Feltételezik, hogy dimetil-diszenid közvetlenül is képződhet szeleno-metil-szenenociszteinekből tiopurin-metil-transzferáz enzim segítségével (Evens et al., 1968).

A növények szelén volatilizációja nemcsak önmaguk számára előnyös, hanem fitoremediáció szempontjából is fontos. A szelénrel szennyezett területeken nagy jelentőségűek a szeléntoleráló növény fajok, melyek a szelén jó részét képesek eltávolítani volatilizációval (Terry és Zayed, 1994; Hansen et al., 1998; Lin et al., 2000).

2.4.4. A növények szelén-toleranciája

Szelén tolerancia alapján a növények három csoportra sorolhatók. Az első csoportba a szelén-hiperakkumuláló, más néven elsődleges szelénakkumulálók tartoznak, ezek növekedésük során néhány ezer mg/kg (száraz tömegre vonatkoztatva) szelént képesek felhalmozni a szelénben gazdag talajból. Szelénmegoszlási koeficiensük: $DC_i = (Se/S)_{növény} / (Se/S)_{oldat}$ egynél nagyobb. Ebbe a csoportba sorolhatóak *Astragalus*, *Stanleya*, *Morinda*, *Neptunia*, *Oenopsis* és *Xylorhiza* fajok.

A második csoportba a másodlagos szelénakkumuláló, más néven indikátor fajok tartoznak. Az ide tartozó növények szelénmegoszlási koeficiense egynél kisebb, és a szöveteikben mérhető szelén mennyisége száz mg/kg nagyságrendben található, *Aster*, *Atriplex*, *Melilotus* és *Brassica* fajok találhatóak ebben a csoportban (Ellis és Salt, 2003).

A harmadik csoportot a nem-szelénakkumulálók képezik. A növények zöme ide tartozik, többek között gabona-, és fűfélék. E fajokban a szöveti szelén koncentráció 0,01-1,0 mg/kg tartományban mozog.

Az akumuláló és nem-akkumuláló növények szelén metabolizmusa lényeges eltérést mutat. Azok, melyek szelént nem halmoznak fel, a talajból felvett szelenitet, ill. szelenátot szelenometioninná redukálják szelenid és szelenocisztein intermediereken keresztül. A szelenometionin proteinekben, a metionin helyére épül be. Kisebb mennyiségben egyéb szeleno-komponens is előfordul a nem-szelénakkumuláló növényekben. Ezzel szemben a másodlagos szelénakkumuláló vagy szelén hiperakkumuláló fajokban a szelenocisztein kis, vízdékony nem protein komponensekbe alakul át (*Montes-Bayón et al., 2002*). A növények hatékonyabb szelenocisztein metiláló képessége előfeltétel ahhoz, hogy a magas szelén tartalmú talajban életben maradjanak, ill. szelént tudjanak akkumulálni. Ennek megfelelően a Se-metilszelenociszteint és annak származékait (γ -glutamil-Se-metilszelenocisztein) túlnyomórészt tipikus szelén akumuláló növényekben mutatták ki, mint például az *Astragalus bisulcatus* vagy *Stnaleyia pinnata* (*Freeman et al., 2006*).

2.4.5. A szelén hatása *in vitro* rendszerekben

A manapság a növényi *in vitro* munkákhoz használt komplex táptalajok mikroelem összetevői között nem szerepel a szelén. Ami kevés mennyiség a növényekbe bekerül, az kontamináció révén valósul meg.

A különböző szelénformák növényekre gyakorolt biológiai és kémiai hatásának vizsgálatára főként intakt növényeken kerül sor. *In vitro* szövettenyészetekben nagyon kevés eredmény látott napvilágot a szelén hatásáról. Az ismert, hogy a nem-szelénakkumuláló *Astragalus* kallusz tenyészeteknél hasonló koncentrációnál jelenik meg a toxikus hatás, mint az intakt növényeknél. Ugyanakkor a szelén-hiperakkumuláló *Astragalus* fajok kallusztenyésztetei is, az intakt növényhez hasonlóan tolerálják a különböző szelénformákat. Az akumuláló, illetve nem-akkumuláló *Astragalus* fajok kallusztenyésztetei egyaránt nem tesznek különbséget a szelenát illetve szelenit forma felvétele között (*Ziebur et al., 1971*).

Saspáfrány gyökereiből származó kallusz tenyészetben a nátrium-szelenit serkentő hatása volt kimutatható alacsony, szűk tartományban, ellenben nagyobb koncentrációnál erőteljes gátló hatást tapasztaltak (*Elmore et al., 1989*).

2.5. Stressz hatás és stresszválasz növényekben

A stressz az az élettani állapot, amelyben a növények növekedése, fejlődése és szaporodása a fokozott környezeti terhelés miatt a genomban meghatározott lehetőségek

alatt marad (Osmond *et al.*, 1987). A stresszt kiváltó faktorok lehetnek természetes eredetű abiotikus, illetve biotikus stressztényezők, vagy antropogén eredetűek. A különböző abiotikus stresszek reaktív oxigénfajták (ROS) túltermelődését idézik elő növényekben. A ROS nagyon reaktívak és sérüléseket okozhatnak a fehérjékben, lipidekben, szénhidrátokban illetve DNS-ben, ami végülis oxidatív stressz állapotot eredményez (Gill és Tuteja, 2010). A stressz hatással szemben az antioxidáns védelmi rendszer biztosítja a védelmet. Az antioxidáns védelmi rendszer részét képezi számos enzim, köztük a kataláz, szuperoxid-diszmutáz, glutation-proxidázok, lipid-peroxidázok, aszkorbátperoxidáz stb. Az enzimek mellett vannak nem enzimatis k kémiai komponensek, mint glutation, tokoferolok, fenolos komponensek, flavonoidok és egyebek (Gill és Tuteja, 2010). Az antioxidáns rendszer állapotának vizsgálatával mélyebb betekintést kaphatunk a növényt ért stressz hatásba és válaszba. A szakirodalomban találhatóak olyan vizsgálatok, melyek átfogóan a növény teljes antioxidáns aktivitását vizsgálják (Kim *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2004; Apak *et al.*, 2007), de gyakran külön-külön mérik az egyes enzimek aktivitását és/vagy kémiai komponenseket (Hartikainen *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2007; Chu *et al.*, 2009). A piridin nukleotidok (NAD, NADP) enzim kofaktorok révén szintén kulcs jelentőségűek a prooxidáns és antioxidáns anyagcsere folyamatokban, homeosztázis fenntartásában (Noctor *et al.*, 2006). Újraképződésük a salvage-cikluson át történik, melyben a nikotinamid és nikotinsav központi metabolitok (4. ábra) (Zheng *et al.*, 2004).

2007). A szelenát lipidperoxidációt gátló hatását is kimutatták 0-10 mg/kg koncentrációtartományban, e felett azonban prooxidánsként megnövelte a lipidperoxidációt perjében, amit TBARS mérésen keresztül követtek nyomon (*Cartes et al., 2005*).

A szelén antioxidáns, védő hatását oxidatív stressz körülmények között nevelt burgonyában is igazolták (*Seppanen et al., 2003*). A szelénnel kezelt növények toleránsabbak voltak a paraquat stresszel szemben a fotoszintézist illetve membránintegritást vizsgálva.

Külön említendő a szenescencia jelensége, ami a növények természetes élettani sajátossága szoros összefüggésben az oxidatív stresszel. A szenescencia nem egyszerűen degeneratív folyamat, hanem újrahasznosító, mely során a tápanyagok átrendeződnek az idősebb, szenescens levelekből a fiatalabb levelekbe, fejlődő magvakba, raktározó szövetekbe (*Gan és Amasino, 1997*). Úgy tűnik, a szelén kis koncentrációban késlelteti a szenescencia megjelenését, azáltal, hogy növeli az antioxidáns rendszer kapacitását (*Xue et al., 2001; Djanaguiraman et al., 2005*).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Szervetlen szelénformák növénybiológiai hatásának *in vitro* modellezése

3.1.1. Dohány szövettenyésztése

Szilárd, hormonmentes MS (Murashige és Skoog, 1962) táptalajon neveltem dohány (*Nicotiana tabacum* cv. Ottawa Petit Havanna) donornövényeket (1. táblázat).

A kifejlett egyedekről levágott leveleket ér mentén kb. 7x7 mm-es szegmensekre daraboltam fel. Ezeket átoltottam szilárd kalluszosító táptalajra (1. táblázat), Petricsészénként 10-10 darabot, 5 ismételtsben.

Az ötödik héten az indirekt organogenezissel képződött új mikrohajtásokat levágtam steril és szilárd hormonmentes MS regeneráló táptalajra tettem át 100 ml-es tenyésztő flaskába (1. táblázat).

A tizedik héten a gyökérrel rendelkező regenerált növényeket felszámoltam.

Tenyésztési feltételek:

A növénynevelést 10/14 órás fotoperiódusú, állandó hőmérsékleten, 23 °C-on tenyésztőszobában végeztem 41 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foton flux megvilágítás mellett.

1. táblázat: Szövettenyésztéshez használt táptalajok összetétele

Táptalaj donor növény neveléshez	Táptalaj indirekt organogenezishez	Táptalaj növényregeneráláshoz
4,4 g/l MS komplex (Duchefa, Haarlem, Hollandia)	4,4 g/l MS komplex	4,4 g/l MS komplex
2 % Szacharóz (Spektrum 3D, Debrecen, Magyarország)	2 % Szacharóz	1,5 % Szacharóz
6 g/l Plant agar (Duchefa, Haarlem, Hollandia)	6 g/l Plant agar	6 g/l Plant agar
	2 mg/l Zeatin (Duchefa, Haarlem, Hollandia)	
	0,01 mg/l NAA (Duchefa, Haarlem, Hollandia)	
pH 5,75	pH 5,75	pH 5,75

Az alkalmazott szelénformák és koncentrációk:

- 100 mg/l nátrium-szelenát törzsoldatból (Sigma Chemical Co., Németország) 0,1; 1; 10; 50; 100 mg/l koncentrációjú oldatokat hígítottam.
- 100 mg/l nanoszelén törzsszuszpenzióból (Bionanoferm Kft, Debrecen, Hungary) 0,1; 1; 10; 50; 100 mg/l szuszpenziókat hígítottam.

3.1.2. Nanoszelén szuszpenzió előállítása

A vörös elemi nanoszelén *Lactobacillus acidophilus* baktériumtörzs segítségével lett előállítva. Egy redukciós lépésben a *Lactobacillus acidophilus* baktérium 20mg/l koncentrációjú szelenitből 37 C°-on pH 6,2 MRS komplex tápoldatban (*de Man et al.*, 1960) 24 óra alatt 200 ± 20 nm nagyságú vörös elemi szelén nanogömböket tartalmazó szuszpenziót produkált, melyből a tiszta nanoszelén sósavas roncsolással lett feltárva (*Prokisch és Zommara, 2008; Prokisch et al., 2008*).

3.1.3. Dohány szövettenyészetből elvégzett mérések

MORFOGENETIKAI ÉS TÖMEGMÉRÉSEK	BIOKÉMIAI ÉS ANALITIKAI MÉRÉSEK
Friss tömeg mérése	Összes Se tartalom AFS módszerrel
Száraz tömeg mérése	Nikotinsav tart. HPLC módszerrel
Gyökeresedési erély vizsgálat	Nikotinamid tart. HPLC módszerrel
	Trigonellin tart. HPLC módszerrel
	Klorofill A és B tartalom mérése spektrofotometriás módszerrel

3.2. Zöldségcsírák *in vitro* fortifikálása nátrium-szelenáttal

3.2.1. Kísérleti tenyészet beállítása

Retek (*Raphanus sativus* L. cv. Tavaszi piros) és paprika (*Capsicum annuum* L. cv. Láva) steril magvetését víztiszta polisztrén tenyészedényekben végeztem, edényenként 100-100 szem mag.

A magvak felületi fertőtlenítése 30 percig 30 %-os háztartási hypoban történt, utána kétszer 10 perc áztatás steril ion mentes (Arium 611DI, Sartorius, Németország) vízben.

Az alkalmazott szelénforma és koncentrációk:

Nátrium-szelenátból (Sigma Chemical Co., Németország) 0, 2, 10, 50, 100, 200 mg/l koncentrációjú oldat sort készítettem.

A táptalaj összetétele: nátrium-szelenát oldat + 6 g/l Plant agar (Duchefa, Biochemie B.V. Hollandia).

Tenyésztési feltételek:

A csíráztatás fényállványon $41 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foton flux megvilágítás mellett 8/16 órás fotoperiódus alatt történt 23 C° állandó hőmérsékleten.

3.2.2. Retek és paprika csíranövényekből elvégzett mérések

MORFOGENETIKAI ÉS TÖMEGMÉRÉSEK	BIOKÉMIAI ÉS ANALITIKAI MÉRÉSEK
Csírázási erély	Összes Se tartalom ICP-MS módszerrel
Friss tömeg mérése	

3.3. Zöldhagyma fortifikálása szelenáttal

3.3.1. Kísérleti tenyészet beállítása

Két vöröshagyma fajtát használtam a kísérletekhez (*Allium cepa* cv. 'Makói Lila' és 'Makói Bronz').

25 x 60 x 6,5 cm belső méretű műanyag szaporítótálcákat fekete fóliával béleltem ki az oldatvesztés elkerülése érdekében. Perlitet 3cm vastagságban egyenletesen terítettem el benne, majd egyenként belesüllyesztettem a kereskedelmi méretű hagymákat (tálcánként 18 darabot), kezelésenként 4-4 ismétlésben. Az egészet faforgáccsal betakartam.

A hajtás három hétig tartott. A kifejlődött zöldhagymákat az anyahagymától elválasztottam.

Az alkalmazott szelénforma és koncentrációk: nátrium-szelenát (Sigma Chemical Co., Németország) 0, 2, 5, 10, mg/l .

Tenyésztési feltételek: A hajtás üvegházban történt természetes fotoperiódus mellett. A fényerősség csökkentése érdekében a szaporító tálcák felett, az ablakokra Raschel-háló lett kifesztve.

3.3.2. A zöldhagymákból elvégzett mérések

TÖMEGMÉRÉSEK	BIOKÉMIAI ÉS ANALITIKAI MÉRÉSEK
Hosszúság mérése	Összes Se tartalom AFS módszerrel
	Szelénmódosulatok meghatározása HPLC-ICP módszerrel
Friss tömeg mérése	Vízoldékony antioxidáns sűrűség mérése kemiluminometriás módszerrel
	Zsíroidékony antioxidáns sűrűség mérése kemiluminometriás módszerrel
	Klorofill A és B tartalom mérése
	Glutation-peroxidáz aktivitás mérése

3.4. Morfogenetikai és tömegmérések részletes leírása

3.4.1. Friss tömeg mérése

Dohányszövettenyészet esetében a friss tömeget mértem a mikrohajtásokat tartalmazó kalluszokból (MTK), illetve regenerálódó növényekből hajtás és gyökér részre szétválasztva (RH és RGY).

Csíránövények friss tömeg mérésénél különválasztottam a csírák hajtás, illetve gyökér részét. Zöldhagyma friss tömeg mérésekor pedig az anyahagymától elválasztott zöldhagymákat egyben mértem meg.

A méréseket analitikai vagy táramérlegen végeztem, legalább 10-10 ismételtsben.

3.4.2. Szárazanyag tartalom mérése

A növényi mintákat Alpha 1-4 LSC (Christ, Németország) liofilezőben fagyaszttva szárítással rögzítettem. Visszamértem a száraz tömeget, s friss tömeg ismeretében meghatároztam a szárazanyag tartalmat.

3.4.3. Hosszúság mérése

A növényi mintákat lefotóztam, majd fotók alapján COLIM színes képosztályozó és mérő számítógépes programmal megmértem hosszúságukat, egyedenként legalább 10-10 ismételtsben.

3.4.4. Csírázási erély vizsgálat

A magvak csírázását bizonyos napokon felvételeztem az eltérő zöldségfajok csírázásához igazodva, s ezek alapján számoltam csírázási százalékot. A felvételezések időpontjai a két faj esetében: reteknel a 2., 3., 4., 5., 7. napon, paprikánál pedig a 6., 9., 13, 15., 17., 19. napon.

3.4.5. Gyökeresedési erély vizsgálata

Gyökeresedési erélyt dohányszövettenyészet esetében vizsgáltam. A regeneráló táptalajra átoltt mikrohajtások gyökeresedését két időpontban felvételeztem: 8. és 16. napon. Több időpontnak nem volt értelme, mert azok a növények, melyek a 16. napig nem képeztek gyökeret, azt követően sem tették. Tenyésztőlombikonként 4-4 darab növényt raktam le, öt ismételtsben. Összesen húsz egyed volt kezelésenként. Gyökeresedési indexet számoltam belőle.

$$\text{Gyökeresedési index \%} = \frac{\text{Gyökérrel rendelkező egyedek száma}}{\text{Összes egyed száma}} \times 100$$

3.5. Biokémiai mérések

3.5.1. Mintaelőkészítési módszerek biokémiai és analitikai mérésekhez

3.5.1.1. Mintaelőkészítés összes szeléntartalom méréshez

A liofilizált, porított mintából 0,2 g-ot emésztettem meg 2ml tömény salétromsavval 100 C°-on 30 percig roncsolóban, majd 1 ml tömény hidrogén-peroxidot adtam az

elegyhez, és 45 percig 120 °C-on emésztettem tovább. A teljesen roncsolt mintát 10 ml-re egécsítettem ki ioncserélt vízzel (Christ), majd redős szűrőpapíron átszűrtem.

3.5.1.2. Mintaelőkészítés szelénmódosulatanalitikai méréshez

A friss növényi mintákat elektromos présgéppel (Power juicer, Germany) homogenizáltam. A homogenizátumot 1,5 mM ftálsav + 1,38 mM Tris + 300 mM bórsav pH4 pufferrel extraháltam. A mintaoldatokat Ministart RC4 filterszűrőn (0,45 µm) átszűrtem.

3.5.1.3. Mintaelőkészítés nikotinsav, nikotinamid és trigonellin méréshez

A vizsgálatokhoz friss növényi mintát használtam. A zöld növényanyagot dörzsmozsárban pépesítettem kevés kvarchomokkal, majd 12000 rpm-en 10 percig centrifugáltam. A felülúszót Strata X-C szilárd fázisú extrakciós oszlopon (Phenomenex, Germany) tisztítottam tovább.

Az extrakció leírása:

- Az oszlopot 2 ml metanol (Spektrum 3D, Debrecen, Hungary) és 2 ml 1%-os hangyasavval (Spektrum 3D, Debrecen, Hungary) kondicionáltam.
- Az átszűrt növényi mintát azonos mennyiségű 1%-os hangyasavval összekevertem és az oszlopon átengedtem.
- 2 ml metanollal átmostam az oszlopot.
- Az eluálást, azaz a tisztított minta visszanyerését 2 ml 2%-os ammónium-hidroxid/metanol (50:50 %) elegyével végeztem el.

A tisztított mintát bepároltam Büchi R-210/215 vákuum bepárlóval (Büchi, Switzerland) 43 °C-on 50 mBar nyomáson. A bepárolt mintát 200 µl bidesztillált vízben vettem fel.

3.5.1.4. Mintaelőkészítés klorofill tartalom meghatározáshoz

2-3 g friss növényi mintát kevés kvarchomokkal eldörzsöltem dörzsmozsárban. 25 cm³-es mérőlombikban abszolút etanollal (Spektrum 3D, Debrecen, Magyarország) jelre töltöttem. 30 perc várakozási időt követően lecentrifugáltam 10000 rpm-en 5 percig. A méréshez a felülúszót használtam.

3.5.1.5. Mintaelőkészítés teljes antioxidáns sűrűség (ACW és ACL) meghatározáshoz

Liofilizált, porított mintából 25 mg-ot feloldottam 1 ml desztillált vízben folyamatos kevertetés közben 60 s-ig 25 °C-on. Ezt követően centrifugáltam 10000 rpm fordulatszámon 5 percig szobahőmérséklen. A felülúszót pipettával összegyűjtöttem, s a továbbiakban ezt használtam, szükség szerint hígítottam.

Az ACL méréséhez szükséges minták előkészítése azonos az ACW minta előkészítésével, azzal a különbséggel, hogy a liofilizált porított mintákat nem vízben, hanem 1 ml abs. metanolban (Spektrum 3D, Debrecen, Hungary) oldottam fel.

3.5.1.6. Mintaelőkészítés glutation-peroxidáz aktivitás meghatározáshoz

A friss növényi mintákat előhűtött dörzsmozsárban homogenizáltam, majd centrifugáltam 15000 rpm-en 10 percig 4 °C-on. A felülúszót elválasztottam és tízszeres hígításban használtam a mérésekhez.

3.5.2. Biokémiai és analitikai mérések módszertani leírása

3.5.2.1. Összes szeléntartalom meghatározása AFS módszerrel

Teljes szeléntartalom mérésére atomfluoreszcens spektroszkópia (AFS, Millenium System, P.S. Analytical Ltd., England) módszerét alkalmaztam. A szelén hidrid az áramlás injektálási rendszerben generálódik. Az AFS módszer kidolgozása (*Cabanero et al., 2004; Dernovics et al., 2002*) munkája alapján történt, azt módosítva dohány növényre.

Az öblítő gáz argon volt, 13 l min⁻¹ áramlási sebességgel. Redukáló reagensként 0,1M nátrium-hidroxidban oldott 1,4 (m/V)% (Spektrum 3D, Debrecen, Magyarország) nátrium-borohidrid (Spektrum 3D, Debrecen) szolgált. A hidrid reagens 3M sósav volt (Spektrum 3D, Debrecen), áramlási sebessége 1,5 ml min⁻¹, csakúgy, mint a redukáló reagenssé.

Az összes reagens analitikai tisztaságú volt.

3.5.2.2. Összes szeléntartalom meghatározása ICP-MS módszerrel

A zöldségcsírák *in vitro* fortifikálása során az összes szeléntartalom Thermo Elemental (Anglia) gyártmányú, X7 típusú Induktív Csatlósú Plazma-tömegspektrométerrel lett meghatározva. Ezek a mérések Dr. Kovács Béla egyetemi docens irányításával történtek a DE Élelmiszertudományi és Minőségbiztosítási Tanszéken.

A műszer vezérlőszoftvere: Plasmalab típusú 2.3.0., 161 verziószámú szoftver.

Mérési paraméterei az alábbi táblázatban vannak összefoglalva:

2. táblázat: ICP-MS készülék beállítási paraméterei

RF kicsatolt teljesítmény	1400W
Plazmagáz áramlási sebesség	14 l min ⁻¹
Porlasztógáz áramlási sebesség	0,8 l min ⁻¹
Segédgáz áramlási sebesség	0,95 l min ⁻¹
Minta áramlási sebesség	1 l min ⁻¹
Analóg detektor	2500 V
PC detektor	3850 V
Integrációs idő	0,1 sec
Stabilizációs idő	35 sec
Szelén izotópok	⁷⁷ Se, ⁷⁸ Se, ⁸⁰ Se, ⁸² Se

3.5.2.3. Szelénmódosulatok elválasztása HPLC-ICP-MS módszerrel

A mérés Nagyteljesítőképességű Folyadékkromatográffal összekötött Induktív Csatlósú Plazma Tömegspektrométeren (HPLC-ICP-MS) keresztül lett elvégezve.

Az alkalmazott ICP-MS egy Thermo Elemental X7 típusú, ütközési cellával rendelkező tömegspektrométer (Thermo Fisher Scientific, Németország). A készülék vezérlőszoftvere: Plasmalab típusú, 2.3.0. 161 verziószámú szoftver. Az eredmények feldolgozása Windows NT Office Excel programjában történt. A mérési paramétereket a 3. táblázat foglalja össze.

3. táblázat: ICP-MS készülék működési paraméterei

Kicsatolt plazma teljesítmény	1400W
Plazmagáz	14 min ⁻¹
Porlasztógáz	0,8 min ⁻¹
Segédgáz	0,95 min ⁻¹
Minta áramlási sebesség	1 min ⁻¹
Analóg detektor	2500 W
PC detektor	3850 W
CCT gáz áramlási sebesség (H ₂ :He) áramlási sebesség (H ₂ 7%; He 93%)	5,9 min ⁻¹
Integrációs idő	0,1 sec
Stabilizációs idő	35 sec
Monitorozott izotópok	⁷⁷ Se, ⁷⁸ Se, ⁸⁰ Se, ⁸² Se,
Mintaszállító pumpacső átmérője (Anachem, Ltd. Anglia)	1,02

A kalibrációhoz szükséges standard oldatok 1000 mg ml⁻¹ koncentrációjú atomabszorpciós, monoelemes, savas szelén oldatból (SeO₂ 0,5 M HNO₃ tartalommal, Fluka Chemie, Svájc) készültek.

A szelénmódosulatok meghatározása HPLC csatoláson keresztül valósult meg IC-AN1 típusú anioncserélő, szerves polimer alapú oszlopon (100 mm x 4,6 mm x 12 µm Polispher, Merck, Németország). Az anioncserélő kromatográfiás rendszer paramétereit részletesen a 4. táblázat mutatja be.

Az alkalmazott HPLC pumpa Merck Hitachi gyártmányú, L-6200A típusú intelligens pumpa (nyomás: 30 bar). A csatolást műanyag cső biztosította (65 cm hosszúság, 0,38 mm belső átmérő), ahol az oszlopról lejövő oldat egy teflon csövön keresztül lett átvezetve az ICP-MS porlasztójába.

4. táblázat: Anioncserélő kromatográfia –alkalmazott kromatográfiás paraméterek

Oszlop	IC-AN1 méret (100mm x 4,6mm x 12 μ m)
Eluens	A: 1,5 mM ftálsav (Fluka Chemie, Svájc) +1,38 mM Tris (Sigma –Aldrich, Svájc) + 300 mM Bórsav (Spektrum 3D, Magyarország) pH: 4,00
Elúció	izokratikus
Áramlási sebesség	1 mg ml ⁻¹
Injektált mintamennyiség	200 μ l
Alkalmazott standard vegyületek	L-szelén-cisztin (SeCys ₂ , Fluka Chemie, Svájc) DL-szelén-metionin (SeMet, Fluka Chemie, Svájc) SeIV (Na ₂ SeO ₃ .5H ₂ O Sigma –Aldrich, Svájc) SeVI (Na ₂ SeO ₄ Sigma –Aldrich, Svájc)

A mintaelőkészítést sajátkezűleg végeztem, de a mérés Dr. Prokisch József egyetemi docens vezetésével a DE ATC, MTK, Élelmiszertudományi és Minőségbiztosítási Tanszékén valósult meg.

3.5.2.4. Nikotinsav, nikotinamid és trigonellin tartalom meghatározása HPLC módszerrel

A három kémiai vegyületet a szakirodalomban leírt módszer alapján nem sikerült szétválasztani ezért új rendszert kellett kidolgozni (*Keung és Liuxán, 2007*).

Kémiai szerkezetük alapján a nikotinamidot, nikotinsavat és trigonellint együtt, fordított fázisú HPLC rendszerben, nagy biztonsággal el lehetett választani egymástól. A rendszer leírását az 5/A és 5/B táblázat mutatja részletesen.

5/A. táblázat: Nikotinsav, nikotinamid és trigonellin méréséhez alkalmazott fordított fázisú kromatográfiás rendszer paraméterei

Oszlop	150 x 4,6 mm x 3µm Phenomenex Luna C-18 (2)
Eluens	(A): 20mM-os Ammónium-acetát (B): Acetonitril
Elúció	Grádiens
Áramlási sebesség	1 mg ml ⁻¹
Injektált mintamennyiség	10 µl
Alkalmazott standard	Nikotinsav (Sigma Aldrich, Svájc) Nikotinamid (Sigma Aldrich, Svájc) Trigonellin (Sigma Aldrich, Svájc)

5/B. táblázat: A kromatográfiás rendszer gradiens profilja

Idő (min)	A %	B%	Áramlási sebesség (mg ml ⁻¹)
0-5	100	0	1,00
8,1-10	80	20	1,00
10,1-20	50	50	1,00

A mérésekhez használt HPLC készülék HPLA Hitachi LaChrom márkájú (Merck, Darmstadt, Germany): a pumpa: L-7100, autosampler: L-7250, Interface D-7000. Dioda array detektort használtam, 220 nm hullámhosszon 25 C°-on kontrollált labor körülmények között.

3.5.2.5. Klorofill tartalom meghatározása

A klorofill tartalom meghatározását *Hendry és Price (1993)* módszere szerint végeztem. A mintaelőkészítés során összegyűjtött felülúszót használtam fel a spektrofotometriás mérésekhez. Klorofill A esetében 663, míg klorofill B esetében 645nm-en mértem meg az abszorbanciát (Amersham Biosciences Ultrospec 2100 Pro UV/Visible). A megfelelő képletbe behelyettesítve kiszámoltam a klorofill A és B értékeket.

3.5.2.6. Csírák teljes antioxidáns tartalmának mérése kemiluminometriás módszerrel

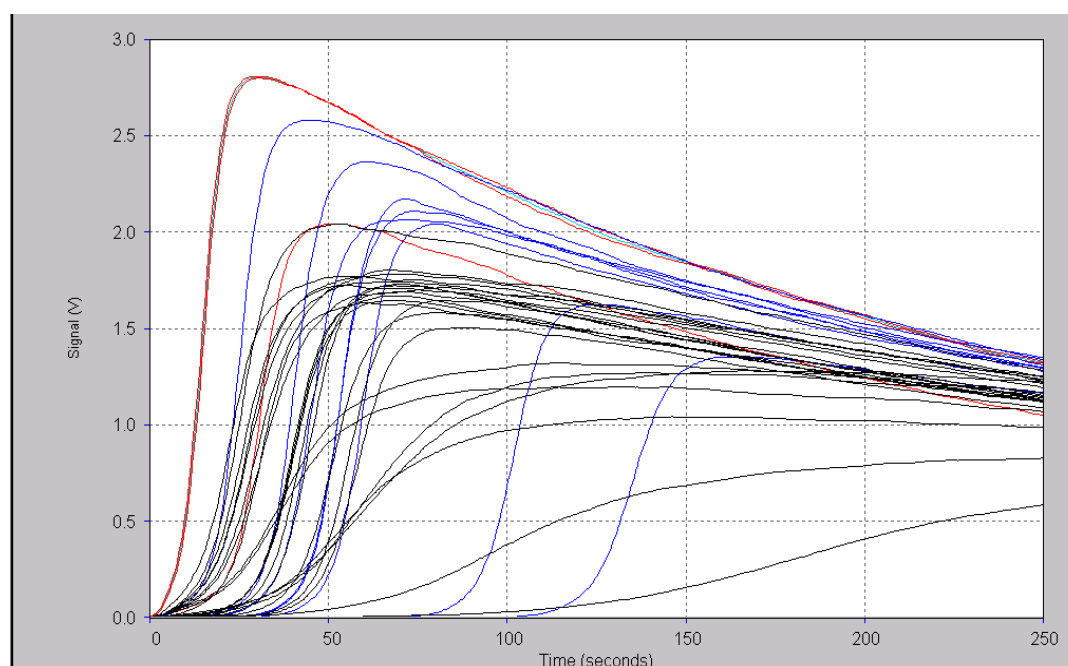
Vízben oldódó összes antioxidáns sűrűség (ACW) módszertani leírása

Az előkészített mintákat állandó összetételű, gyárilag előre elkészített kit segítségével mértem meg Photochem mérőműszeren (Photochem, Analytik Jena AG, Németország). Az ACW kit a vízben oldódó összes antioxidáns kapacitás mérésére alkalmas C vitaminra vonatkoztatva.

Ez a technika újszerű, ezért részletes leírását fontosnak tartom.

A mérési módszer a fotokemilumineszcencia elvén alapszik (*Popov és Lewin, 1999*): A reakcióelegyben lévő standard térfogatú fotoérzékeny anyagból optikai gerjesztéssel szuperoxid anionok generálódnak. Ezek meghatározott mennyisége eliminálódik a minta antioxidáns anyagaival reagálva. A maradék szabad gyök ($O_2^{\cdot -}$) reagál a luminollal. A reakció során kibocsátott kemilumineszcenciát érzékeli a detektor. A folyamat során generált mérőszignál regisztrálódik. A kapott görbe első deriváltja által meghatározott inflexiós ponthoz húzott érintő x tengely metszete adja a minta antioxidánsainak mennyiségét.

Az ACW meghatározás során 0, 0,2 0,5, 0,8 1,0, 2,0 3,0 nm koncentrációjú L-askorbinsav standardokat használtam és ezek alapján kalibrációs görbét készítettem, amit a számoláskor használtam.



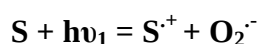
ACW mérési görbék (detektorjel/idő függvény)

A mérési idő 250 sec szobahőmérsékleten. A nmol-ban kapott értékeket µg/mg aszkorbinsav ekvivalenciában kaptam meg, ami a mintában mért antioxidáns kapacitás standard ekvivalencia egységében van kifejezve.

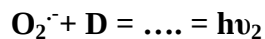
Zsírban oldódó összes antioxidáns sűrűség (ACL) módszertani leírása

Az elkészített minták mérésére szintén gyárilag előkészített kitet használtam, a mérést Photochem mérőműszeren (Photochem, Analytik Jena AG, Németország) végeztem, troloxra vonatkoztatva. Ez a módszer is a fotokemilumineszcencia elvén alapul, melynek alapvető jellemzője, hogy a molekulák fotokémiai reakció útján gerjesztődnek.

A módszer alapelve, egy fotoérzékenyítő anyag és megfelelő $h\nu$ hullámhosszú, energiájú fotonok reakciója, mely során szuperoxid anion szabadgyökök képződnek:



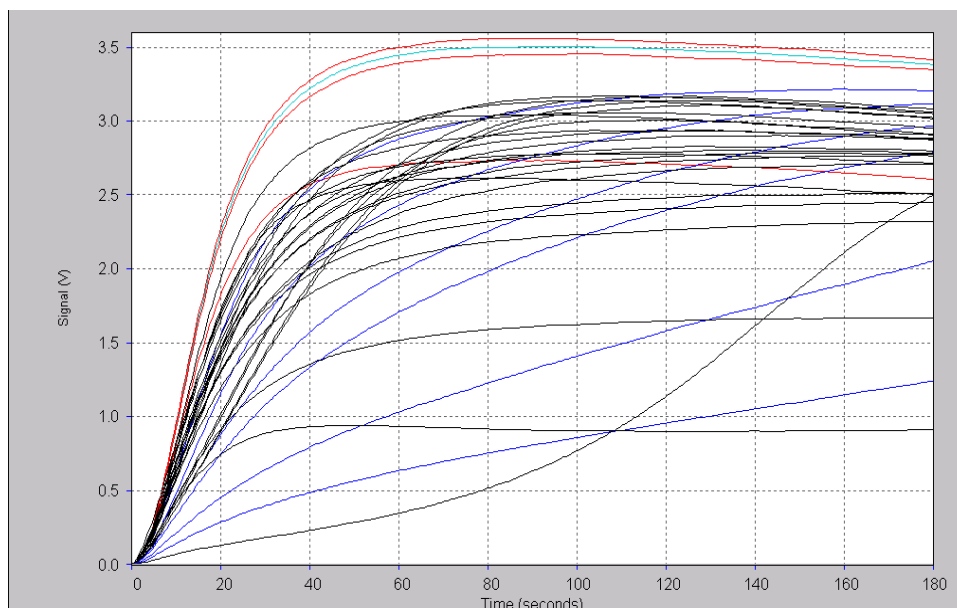
Ezek reagálnak a mintában lévő antioxidáns típusú anyagokkal, az el nem reagált vagy feleslegben maradt anion szabadgyökök a luminollal (detektor) lépnek reakcióba lumineszcenciát hozva létre.



A lumineszcencia mérésével mérem a mintában lévő antioxidáns vegyületek mennyiségét.

A folyamat során generált mérőszignál 1-5 percig regisztrálódik. A kapott görbe alatti terület integráltja adja meg a minta zsíroldékony antioxidáns koncentrációját trolox ekvivalenciában.

Az ACL meghatározás során 0, 0,2 0,5, 0,8 1,0, 2,0 3,0 nm koncentrációjú tokoferol standardot használtam, és ezek alapján kalibrációs görbét készítettem, amit a számoláskor használtam.



ACL mérési görbék (detektorjel/idő függvény)

A mérési idő 150 sec szobahőmérsékleten. A nmol-ban kapott értékeket $\mu\text{g}/\text{mg}$ trolox ekvivalenciában kaptam meg, ami a mintában mért antioxidáns kapacitás a standard ekvivalencia egységében van kifejezve.

3.5.2.7. Glutation-peroxidáz (GSH-px) aktivitás mérése

A mérési módszert *Chiu et al.*, (1976) munkájából adaptáltam. A GSH-px aktivitást közvetve, a GSH-reduktáz aktivitásán keresztül mértem.

A reakcióelegy összeállítása:

120 μl NADPH + 250 μl GSH + 20 μl GR + 20 μl cumene hidroperoxide + 100 μl minta
340 nm-en 1 percig mértem az abszorbancia változást, mellyel nyomon követtem, hogy hány mol NADPH fogyott a GSH-reduktáz katalizálta reakció során, ebből pedig a GSH-px aktivitásra következtettem, illetve kiszámoltam. A számoláshoz szükséges volt meghatározni a minta összes fehérje tartalmát.

GSH-px aktivitás kiszámítása:

$$\frac{\text{Abs érték}}{6300 \times X} \times \frac{10^6}{60} = \text{mkat/kg}$$

$$X = F \cdot V$$

V = a küvettába mért minta térfogata (ml)

F = a minta fehérje tartalma 10x hígítást követően (mg/ml)

$$6300 = E_{\text{NADPH}}$$

3.6. Statisztikai elemzés

Vizsgálataim során a tömeg és hosszméréseket legalább 10 ismétlésben, a biokémiai és analitikai mérések legalább 3 ismétlésben végeztem el és ebből számoltam átlagot és a hozzá tartozó standard errorrt ($\pm$ SE).

A statisztikai elemzéseket SPSS 14.0 verziójú programban végeztem. A kezelések összehasonításához variancaanalízist alkalmaztam ($p < 0,05$) szignifikancia szint mellett. Ahol szignifikáns különbséget kaptam további statisztikai elemzésként a Games-Howell tesztet használtam a szórások inhomogenitása miatt.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Szervetlen szelénformák növénybiológiai hatásának *in vitro* értékelése dohány szövettenyésztésben

4.1.1. Tömeg- és morfológiai változások dohány szövettenyésztésben

Vizsgálataim során az egyik legjelentősebb morfológiai különbséget az organogenezis indukcióban tapasztaltam a két szelénformát összehasonlítva. Magas (50-100 mg/l) nanoSe kezelés alkalmazása mellett sem tapasztaltam toxikus tüneteket a kalluszon át képződő mikrohajtások (MTK) képzésben (5/A. ábra).



5/A ábra: Dohány kalluszképződés 100 mg/l nanoSe tartalmú táptalajon



5/B ábra: Jól-differenciált, szabályos dohány mikrohajtások 100 mg/l nanoSe táptalajon.

Sőt a kalluszok organogénebbnek bizonyultak, mint a kontrol tenyészetekben, ugyanis a kalluszok felszínén rövid időn belül nagy tömegben képződtek a jól-differenciált, szabályos alakú mikrohajtások (5/B. ábra). A vitrifikálódás, a szövetek vizenyősödése egyáltalán nem volt tapasztalható, ellentétben a kontrol növényekkel, ahol a képződött kalluszban nagyobb volt a differenciálatlan sejtek aránya. Az újonnan létrejövő mikrohajtások jelentős része vitrifikálódott, leveleik gyakran abnormális formájúak voltak, áttetszőek, vizenyős, szivacsos szerkezetűek (5/C, D. ábra).



5/C ábra: Dohány kalluszképződés kontroll táptalajon



5/D ábra: Vitrifikált, abnormális dohány mikrohajtások kontroll táptalajon.

A hosszú ideig zárt, *in vitro* környezet a növények számára oxidatív stresszforrást jelenthet, mely fajtól, ill. a táptalaj összetételétől, légtértől függően eltérő módon érinti őket, s gyakran vitrifikálódás megjelenéséhez vezet (Lin *et al.*, 2004). Ez okozhatta a kontrol MTK tenyészetekben az általam is tapasztalt abnormális növekedésű, sok esetben vizenyős mikrohajtások megjelenését.

A morfológiai változásokhoz hasonlóan a MTK tömegváltozását vizsgálva sem tapasztaltam a nanoSe toxikus hatását az alkalmazott kezelés tartományban, sőt 10 mg/l még szignifikánsan meg is növelte a frisstömeget (6. táblázat).

6. táblázat: Dohány kallusz (MTK), regenerált növény hajtás és gyökér részének (RH, RGY) egyedi átlag tömege nátrium-szelenát, ill. nanoszelen tartalmú táptalajokon a koncentráció függvényében ($p < 0,05$)

kezelés	MTK (g)		RH (g)		RGY (g)	
	szelenát	nanoSe	szelenát	nanoSe	szelenát	nanoSe
0 mg/l	1.85 ± 0.14	1.87 ± 0.31	1.54 ± 0.15	1.57 ± 0.33	0.36 ± 0.06	0.4 ± 0.08
0,1 mg/l	2.18 ± 0.32	2.07 ± 0.56	1.54 ± 0.43	1.47 ± 0.41	0.34 ± 0.1	0.45 ± 0.08
1,0 mg/l	2.79 ± 0.43	2.61 ± 0.21	1.81 ± 0.56	2.05 ± 0.54	0.41 ± 0.09	0.52 ± 0.1
10mg/l	2.15 ± 0.48	2.81 ± 0.36	1.3 ± 0.46	2.00 ± 0.48	0.22 ± 0.06	0.6 ± 0.11
50 mg/l		1.82 ± 0.47		1.76 ± 0.44		0.65 ± 0.1
100 mg/l		$1,75 \pm 0,28$		$1,54 \pm 0,3$		$0,68 \pm 0,12$

Ziebur és Shrift (1971) kísérleteiben 12,5-250 μM koncentrációtartományban tapasztalták a szelenát, ill. szelenit gátló hatását nem szelénakkumuláló *Astragalus* fajok

kallusztényészeiben. Saját kísérleteimben a szelenát ≥ 50 mg/l koncentrációtartományban gátolta az organogenezist (5/E, F. ábra).



5/E ábra: Dohány kalluszképződés 50 mg/l szelenát tartalmú táptalajon

5/F ábra: Dohány kalluszképződés teljes elmaradása 100 mg/l szelenát tartalmú táptalajon.

50 mg/l-nél ($265 \mu\text{M}$) a vizsgált időintervallumban minimális mértékben kezdtek el kalluszosodni a letett levélszegmensek, az eredmények kiértékelhetetlenek voltak (5/E. ábra). 100mg/l szelenát teljesen meggátolta a kalluszképződést, a lerakott levélszegmensek teljesen kifehéredtek (5/F. ábra). Alacsony koncentrációban (1 mg/l) azonban szignifikáns növekedést tapasztaltam a MTK tömeggyarapodásban szelenát kezelés hatására (6. táblázat). A szelenát, koncentrációtól függő kettős hatását megfigyelték angolperje esetében is biomasszaprodukciót vizsgálva két betakarítás során (Hartikainen *et al.*, 2000).

A nanoSe stimuláló hatása nemcsak MTK-ban volt megfigyelhető, de a gyökér regenerációban is. Alacsony (0,1 – 1,0 mg/l) nanoSe nem befolyásolta szignifikánsan a regenerálódó növény gyökér részének (RGY) biomassza képződését, viszont 10-100 mg/l tartományban szignifikánsan magasabb gyökértömeget mértem (6. táblázat, 6/A, B ábra).



6/A ábra: Regenerált dohány gyökere 100 mg/l nanoSe kezelés mellett, kontrollal összevetve



6/B ábra: Regenerált dohány gyökér része 0-100 mg/l nanoszelénes táptalaj sorozaton

Ezzel szemben 10 mg/l szelenátnál szignifikánsan lecsökkent a friss RGY tömege, 50-100 mg/l szelenát pedig teljesen meggátolta a gyökeresedést. *Arabidopsis thaliana* *in vitro* tenyésztésében azt mutatták, hogy már 3 μ M szelenát gátló hatású volt a gyökérképződésre (Van Hoewyk *et al.*, 2008). A morfológiai tapasztalatokat molekuláris biológiai módszerekkel vizsgálva (transzkriptom analízis) arra jutottak, hogy a szelenát kezelés hatására közel 2900 gén válaszadóképessége módosult gyökérben, míg hajtásban csak ~900 géné. Egyebek mellett a sejtfalszintézisben, ill. az auxin szintézisben résztvevő gének alultermelésével magyarázták a csökevényes gyökérfejlődést.

A regenerálódó növények hajtás részét (RH) vizsgálva nem tapasztaltam szignifikáns eltérést a kontrollhoz képest az alkalmazott nanoszelén kezelések mellett figyelembe véve a szórásokat (6/C, D ábra).



6/C ábra: Regenerált dohány kontrol hajtása és 100 mg/l nanoSe táptalajon

6/D ábra: Dohány kalluszképződés teljes elmaradása 100 mg/l szelenát tartalmú táptalajon.

Szelenát esetében 0,1 - 10 mg/l koncentráció tartományban szintén nem volt látható szignifikáns eltérés a friss tömeget tekintve, de 50 - 100 mg/l teljesen meggátolta a RH fejlődését. Ami a morfológiai vizsgálatokat illeti regenerált növényekben lényeges eltéréseket nem vettem észre a kontroll, ill. az egyes szelén kezelések között a leveles hajtások formáját illetve szöveti szerkezetét tekintve sem nanoSe, sem szelenát módosulat esetében.

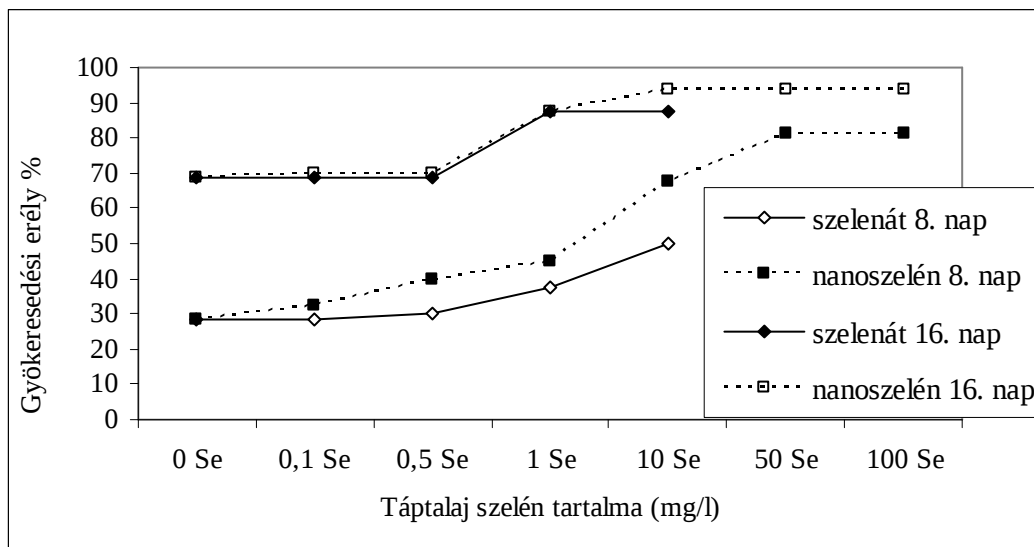
4.1.2. Szárazanyagtartalom-változások dohány szövettenyésztésben

A szárazanyagtartalom vizsgálata során a kalluszokban nem találtam jelentős különbséget a szárazanyag beépülésben a kontroll illetve az egyes kezelések között sem szelenát sem nanoszelen esetében. Hajtásokban 8-18% növekedést tapasztaltam a kontrollhoz képest, a gyökérben viszont 1-21% csökkenés volt kimutatható a szeléntartalom növekedésével fordítottan arányosan nanoSe kezelésnél. Szelenáttal kezelt regenerált növényekben a nanoSe kezelésekhez hasonló tendenciát láttam: hajtásokban max. 13% emelkedést, míg gyökérben max. 19% csökkenést realizáltam.

4.1.3. Regenerálódó dohány gyökeresedési erélye

A 7. ábra alapján jól látható, hogy a táptalaj növekvő nanoSe tartalma serkentette a gyökérképződést. A 8. napon a kontrol hajtásoknak mindössze 28%-nál láttam némi gyökéreredést, míg 10-100 mg/l nanoSe kezelés mellett a regenerálódó dohányok 40-73%-nál megjelentek apró gyökerek. A 16. napon történő felvételezés még

nyilvánvalóbbá tette, hogy a nanoszelén részecskék nagy mennyiségben pozitívan befolyásolják a gyökeresedést, a növények több mint 90% -a kigyökeresedett. A két szelénforma között szignifikáns eltérés 50 - 100 mg/l kezeléseknél volt látható, ahol a szelenát teljesen meggátolta a gyökérképződést.



7. ábra: A regenerálódó növények gyökeresedése két időpontban felvételezve

A szelenáttal ellentétesen a magas nanoSe kezelés hatására bekövetkezett intenzív gyökeresedés arra utal, hogy a nanoSe más gének ki- ill- bekapcsolásán, vagy ugyanazon gének más irányú módosításán keresztül fejtik ki hatásukat. Foreman et al., (2003) szerint a reaktív oxigén gyökök (bizonyos koncentráció tartományban) stimulálják a plazmamembrán hiperpolarizáció-aktivált Ca^{2+} csatornáit. A Ca^{2+} influx a gyökérsejtek megnyúlásához vezet, s ezáltal a hajszálgyökerek és főgyökér intenzív növekedéséhez. Ez magyarázhatja, legalábbbbis részben, az általam tapasztalt intenzív gyökérfejlődést magasabb nanoSe koncentráció mellett.

4.1.4. AFS módszerrel mért teljes szeléntartalom szövettenyészetben

Szelén felhalmozódást ki tudtam mérni nanoSe-nel kezelt MTK, RH és RGY-ben egyaránt (7. táblázat), bár a szakirodalom szerint az elemi szelén nem felvehető forma a növények számára (White et al., 2004). A táptalajban lévő nanoSe hatására szignifikánsan megnőtt a teljes szelén tartalom MTK-ban (7. táblázat). Valószínűleg az elemi nanoszelén gömbök (Se^0) bediffundáltak a növényi szövetekbe (apoplaszt) a vágott felületek mentén és/vagy a nyitott gázcserenyílásokon át. A növényi szövetekben, mint vizes közegben a megnövekedett felületű nanogömbök felszínéről lassan, de

folyamatosan szelenit és szelenid ionok szabadultak fel, ezáltal egy nagyon alacsony szintű egyensúlyi, ún. steady state állapot jött létre. A MTK-ban tapasztalt pozitív morfológiai hatásokkal összevetve látható, hogy a szelénionoknak ez az alacsony, folyamatos koncentrációjú jelenléte előnyös a növény számára.

A nanoSe-hez hasonlóan a táptalaj szelenát koncentrációjának növekedése is szignifikánsan megnövelte a MTK teljes szelén tartalmát. A két szelénformát összehasonlítva azt tapasztaltam, hogy szelenát alkalmazásával 2-3-szor nagyobbak voltak az értékek ugyanazon koncentrációnál, mint nanoSe-nél. Ez magyarázható azzal, hogy a szelenát ionos forma (Se^{6+}), a növények számára könnyen felvehető, nagyobb mennyiségben azonban toxikus, visszafogja a fejlődést (*Van Hoewyk et al., 2008*). A szelén toxicitása annak köszönhető, hogy prooxidánsként, képes katalizálni a tiolok oxidációját és emellett szuperoxid gyököket generál, melyek károsítják a sejteket (*Wang et al., 2007*).

A szelenát felvétel feltételezhetően részben aktívan, SHST3 transzporterek segítségével történt, részben pedig a vágások mentén, ill. nyitott gázcsere nyílásokon át passzívan bediffundálódott. Az SHST3 fehérjék alacsony affinitású transzporter molekulák, melyek a hajtás illetve a gyökérsejtek membrájában egyaránt előfordulnak (*Terry et al., 2000*). A felhalmozódott szelén nagy része szelenátként maradt meg, csak kis mennyiségben volt detektálható szelenometionin, ill. szelenometil-cisztein (még nem közölt adatok). Eredményeimhez hasonlóan búzában is azt találták, hogy a felvett szelenát csak kis mértékben alakul át szerves formákba, nagyobb része változatlan formában halmozódik fel (*Li et al., 2008*). A nanoSe-től eltérően a közvetlen szelenát kezelés hatására hirtelen nő meg a szövetekben a Se ion koncentrációja nagyrészt elfedve a szelén előnyös hatását. Szelenát forma alkalmazásával nem lehet olyan finoman szabályozni a növények által felvett szelén ionok mennyiségét. Amennyiben a táptalajban alacsony koncentrációban van jelen szelenát, úgy a növényben vagy nincs eltérés a kontrolhoz képest, vagy nagyon szűk intervallumban látható a serkentő hatás. E serkentő hatás azzal magyarázható, hogy alacsony (szubtoxikus) koncentrációban a szelenit megnöveli a reaktív oxigén gyökök mennyiségét, ami maga után vonja az etilén és jázminsav bioszintézis fokozódását (*Tamaoki et al., 2008*). E két fitohormon szint megemelkedése kulcsjelentőségű a növények általános védekezési stratégiájában. Arra következtettek, hogy a védekezési rendszer fokozott működése segít a szelénrezisztencia kialakításában. Így végső soron az alacsony szelenit koncentráció stimuláló hatásként nyilvánul meg a tömeggyarapodást vizsgálva. A táptalaj nagyobb

szelenát koncentrációjának hatására a növényi szövetekbe hirtelen beáramló nagy mennyiségű ionos forma prooxidáns hatású, tönkretelheti a sejteket, megakadályozva a növény fejlődését. Ezzel magyarázható a tapasztalt kalluszképződés hiánya 50-100 mg/l koncentrációtartományban.

7. táblázat: Dohány kallusz (MTK) illetve regenerált növény hajtás és gyökér részének (RH, RGY) teljes szeléntartalma

Kezelés	MTK (mg/kg)		RH (mg/kg)		RGY (mg/kg)	
	selenate	nanoSe	selenate	nanoSe	selenate	nanoSe
0 mg/l	0.23 ± 0.1	0.23 ± 0.1	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.02 ± 0.002	0.02 ± 0.002
0,1 mg/l	3.8 ± 0.32	0.71 ± 0.4	4.19 ± 0.4	1.05 ± 0.2	1.60 ± 0.07	4.83 ± 0.58
1,0 mg/l	16.0 ± 0.4	3.05 ± 0.3	53.2 ± 3.0	2.7 ± 0.3	15.3 ± 0.13	24.4 ± 4.0
10mg/l	300 ± 11	40.9 ± 1.9	318 ± 13	20.3 ± 2.2	74.8 ± 14.6	269 ± 11
50 mg/l		164 ± 16		35.2 ± 3.8		1237 ± 42
100mg/l		391 ± 31		84,9 ± 9,8		2947 ± 99

Regenerált növényekben a kalluszkhoz hasonló tendenciát figyeltem meg a szelénakkumuláció tekintetében: a táptalaj szeléntartalmával egyenes arányban nőtt a teljes szelén tartalom RH-ban és RGY-ben egyaránt, mindkét szelénforma esetében.

Nagy különbséget tapasztaltam azonban a regenerálódott növény hajtás, ill. gyökér részeinek szelén eloszlásában a két szelén módosulat használatakor. A RH-t vizsgálva a MTK-hoz hasonlóan többszörös érték volt mérhető a szelenáttal kezelt növényeknek, mint a nanoszelén kezelések esetében azonos koncentrációnál (7. táblázat). A szelenát mobilis a xylemben, és a leoltott hajtások vágott felületein át rövid időn belül nagy mennyiségben diffundálódott be ezzel magyarázható a kapott eredmény.

Ellenben RGY-ben fordított volt a helyzet. Szignifikánsan nagyobb szelén értékeket kaptam nanoszelénnel kiegészített táptalajon nevelt növények gyökereiben, mint a szelenáttal kezelt egyedek esetében azonos kezelés mellett. 50-100 mg/l nanoSe alkalmazása mellett extrém magas 1237-2947 mg/kg összes szelén értékeket mértem száraz tömegre vonatkoztatva, (ilyen magas értékeket szelén-hiperakkumuláló növényekben mérnek általában). A kapott eredmények még érdekesebbek, ha

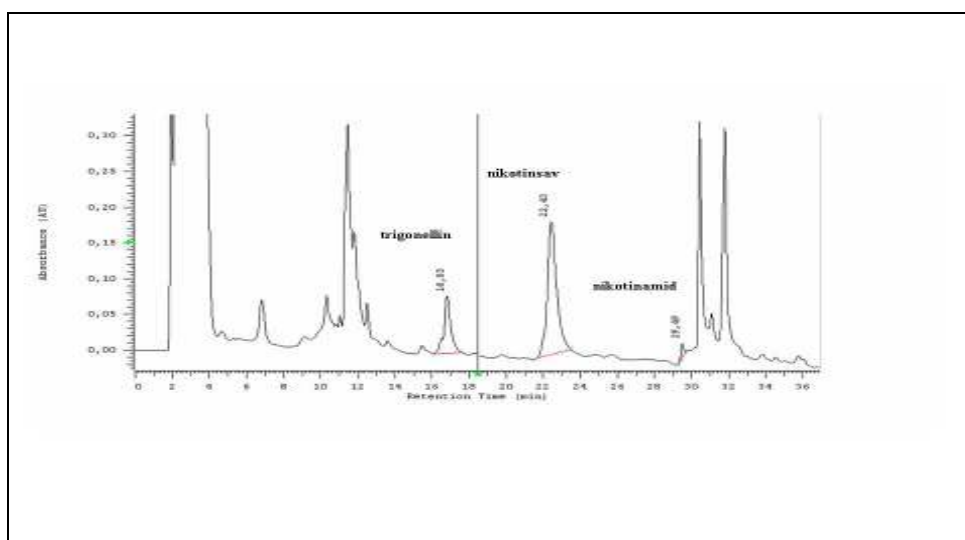
összevetjük azzal, hogy itt volt leggyorsabb és legintenzívebb a gyökérképződés (6. és 7. táblázat; 7. ábra).

Ezek az eredmények tovább erősítik azt a feltételezést, miszerint a felvett elemi nanoSe önmagában indifferens a növény számára, magát a serkentő hatást az elemi szeléngömbök felszínéről folyamatosan felszabaduló szelénionok állandó, alacsony koncentrációja okozta közvetlen és/vagy közvetett módon.

A felszabadult ionok interferálhatnak növényi hormonok szignál útvonalaival, különösen az etilén útvonallal. Az etilén szignálút első komponense az etilénkötő receptor, amelynek réz kofaktora van (Kendrick és Chan, 2008). A szelénion megváltoztathatja vagy interferálhat a rézzel így meggátolja az etilén receptorhoz kötődését, ezáltal az egész út legátlódik. A gátolt etilén szignáltranszdukciós út pedig magyarázhatja az intenzív gyökérképződést.

4.1.5. Trigonellin, nikotinsav és nikotinamid tartalom szövettényészetben

Kémiai szerkezetükből adódóan sikerült egy kromatográfiás rendszerben elválasztani a trigonellint, nikotinsavat és a nikotinamidot (8. ábra).

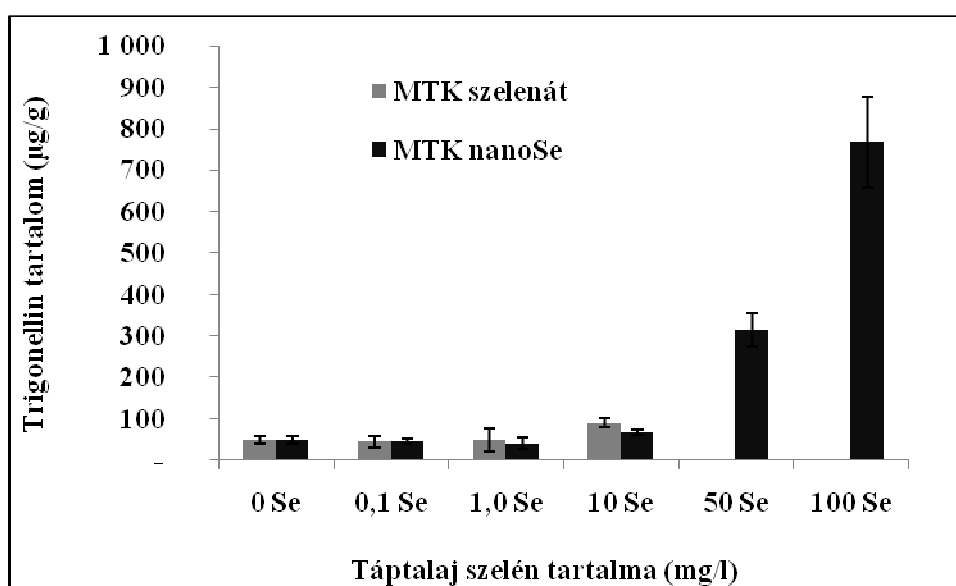


8. ábra: Trigonellin, nikotinsav és nikotinamid kromatogramja egy kromatográfiás rendszerben

4.1.5.1. Trigonellin tartalom dohány szövettényészetben

A trigonellin a nikotinsav metilezett származéka, s feltételezik róla, hogy a nikotinsav, és közvetetten a NAD tartalék alkotója (Noctor et al., 2006).

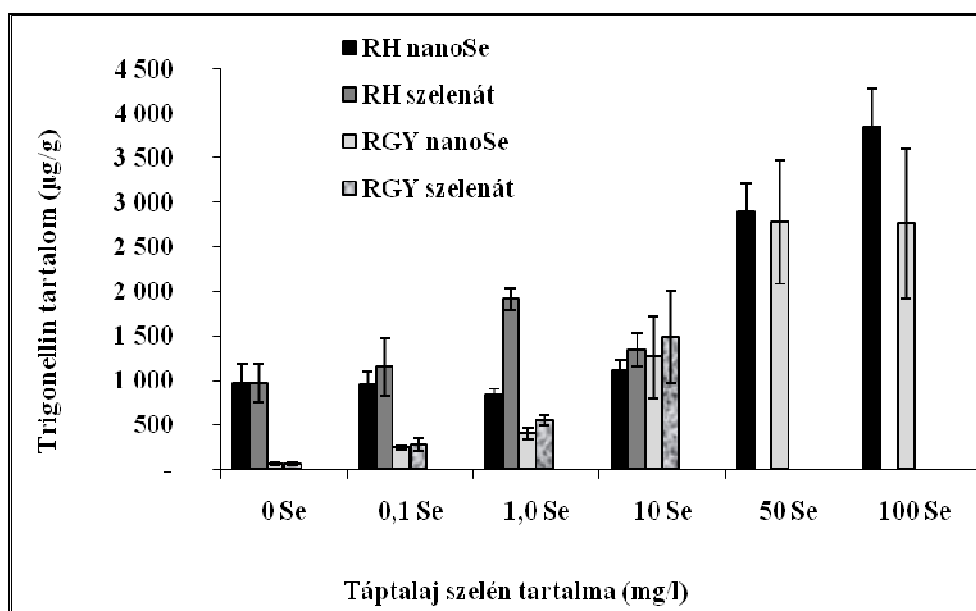
A 9/A. ábra alapján jól látható, hogy alacsony koncentrációtartományban (0,1-1,0 mg/l) egyik szelénforma sem befolyásolja jelentősen a MTK trigonellin koncentrációját (~ 41-49 µg/g). Viszont $10 \leq$ mg/l szelenát illetve nanoszelén szignifikáns emelkedést idézett elő a trigonellin tartalomban. Különösen 50-100 mg/l nanoSe esetében mértem kiemelkedő értékeket (314-767 µg/g trigonellin). A nikotinamid és metabolitjai, úgymint nikotinsav, trigonellin jelátvivőként részt vehetnek az oxidatív stressz folyamatokban, és szerepet játszhatnak a növényi védekezésben (Berglund et al., 1996; Minorsky, 2002). Ez alapján a MTK-ban megemelkedett trigonellin koncentráció arra utal, hogy a nanoSe is hasonlóan a többi szelén formához stresszt indukál növényekben nagyobb koncentrációban.



9/A ábra: Dohány kallusz (MTK) trigonellin tartalma nátrium-szelenát, ill. nanoszelén tartalmú táptalajon ($p < 0,05$) (+/-SE)

A regenerálódó növényekben sokkal magasabb trigonellin értékeket mértem, mint MTK esetében. A nanoSe-nel kezelt regenerálódó növények hajtás részében (RH) mért trigonellin tartalom hasonló tendenciát mutatott, a MTKban mértékhez: Alacsony koncentrációban nem láttam szignifikáns eltérést a kontrolhoz képest (837 – 968 µg/g), $50 \leq$ mg/l azonban 2906 – 3848 µg/g trigonellin koncentrációkat mértem (9/B ábra).

Regenerálódó növények gyökérzetének trigonellin koncentrációja még érzékenyebben reagált a táptalaj nanoSe tartalmára, mint a hajtás, ugyanis ott már 1,0 mg /l nanoSe szignifikáns növekedést eredményezett (9/B. ábra).

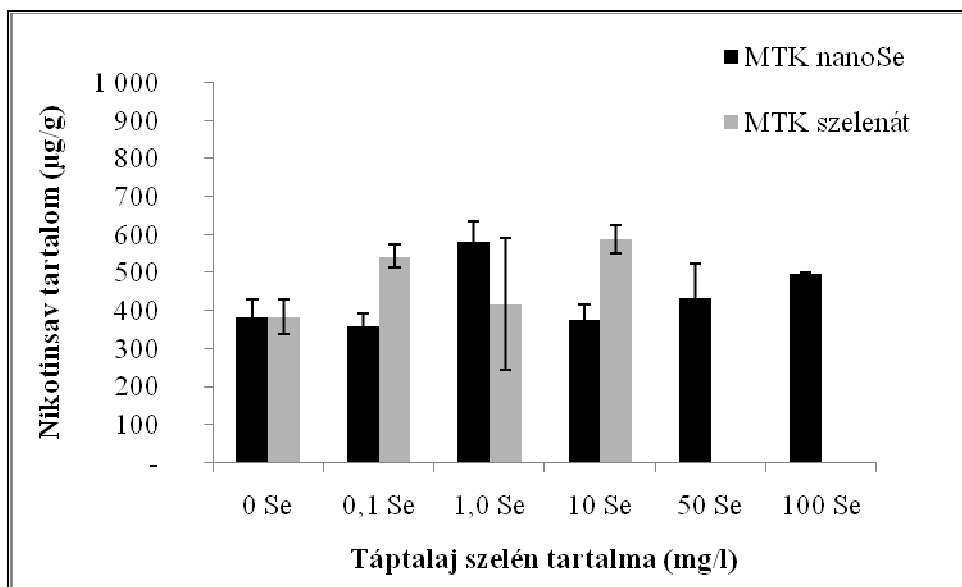


9/B ábra: Regenerált növény hajtás és gyökér részének (RH, RGY) trigonellin tartalma nátrium-szelenát, ill. nanoszelen tartalmú táptalajon ($p < 0,05$) (+/-SE)

Ugyanakkor az alkalmazott szelenát koncentrációk is növekedést eredményeztek mind a RH, mind a RGY trigonellin koncentrációjában a kontrolhoz képest. Lényeges eltérés volt azonban a koncentrációsoron belül. Míg a növekvő nanoSe koncentrációval arányosan nőtt a trigonellin tartalom, addig a szelenát kezelés hatására 10 mg/l-nél visszaesést realizáltunk 1 mg/l koncentrációnál kapott értékekhez képest RH és RGY esetében egyaránt (9/B. ábra).

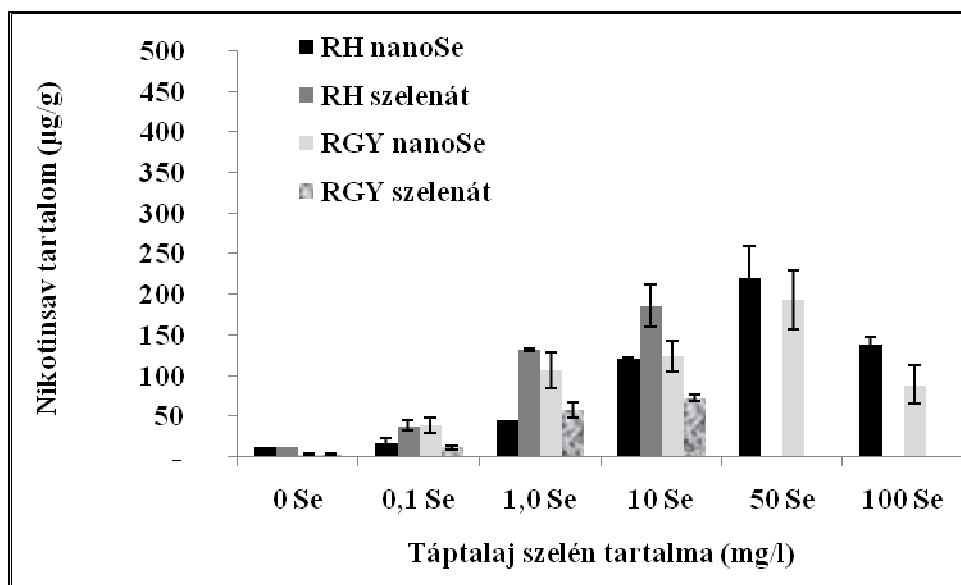
4.1.5.2. Nikotinsav tartalom dohány szövettényezetben

MTK-ban nanoSe kezelés hatására megemelkedett a nikotinsav mennyisége, de csak 1,0 és 100 mg/l koncentrációnál mértem szignifikánsan nagyobb értéket (10/A ábra). A szelenát forma is emelkedést idézett elő a nikotinsav tartalomban (10/A. ábra).



10/A ábra: Dohány kallusz (MTK) nikotinsav tartalma nátrium-szelenát, ill. nanoszelen tartalmú táptalajon ($p < 0,05$) (+/-SE)

Regenerált növények hajtás részében (RH) a kalluszokhoz hasonló tendenciát figyeltem meg, azaz mindkét szelénforma megemelte a nikotinsav mennyiséget. Ezen belül szignifikáns növekedést nanoSe esetében 10 - 100 mg/l koncentráció tartományban, míg szelenát esetében 1 – 10 mg/l tartományban mértem (10/B. ábra).



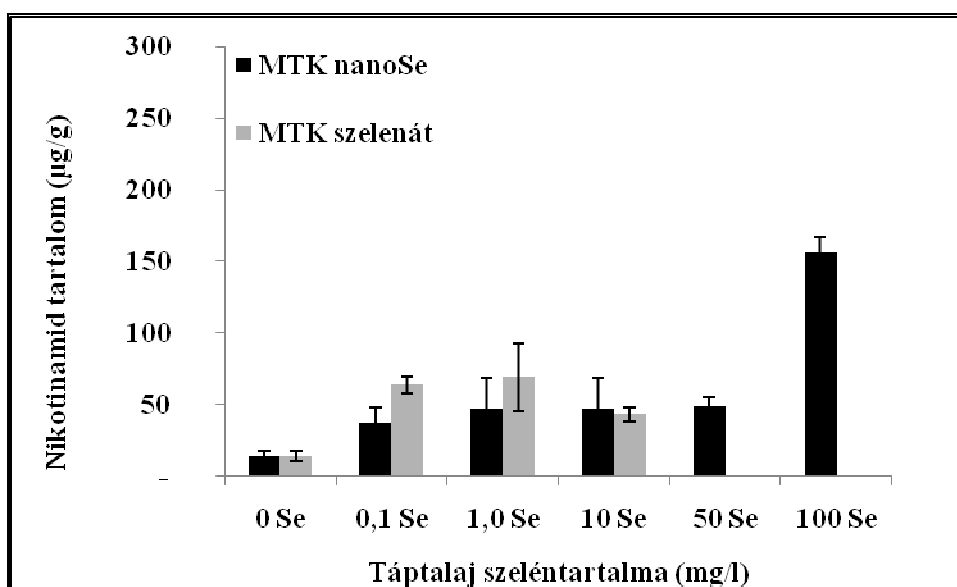
10/B ábra: Regenerált dohány hajtás és gyökér részének (RH, RGY) nikotinsav tartalma nátrium-szelenát, ill. nanoszelen tartalmú táptalajon ($p < 0,05$) (+/-SE)

A nikotinsav központi intermedier a NAD recycling-ban ugyanakkor (ahogy korábban írtam) átalakulhat trigonellinné is, és e formában raktározódik, amíg szükségessé nem

válk a NAD szintézishez (Ashihara, 2006). A megemelkedett nikotinsav tartalom összefüggésben van a trigonellin mérésekor kapott eredményeimmel, és erősíti azokat. Ezek alapján is látható, hogy a nanoSe is stresszt vált ki dohányban, de magasabb koncentrációban, mint a szelenát. Azaz a szelenát forma erősebb stresszindukáló hatású. A kontrol növények gyökérben nagyon alacsony volt a nikotinsav tartalom (3,67 µg/g). Szelén kezelések szignifikáns növekedést okoztak mind szelenát, mind nanoszelen esetében az alkalmazott koncentrációtartományban (10/B. ábra).

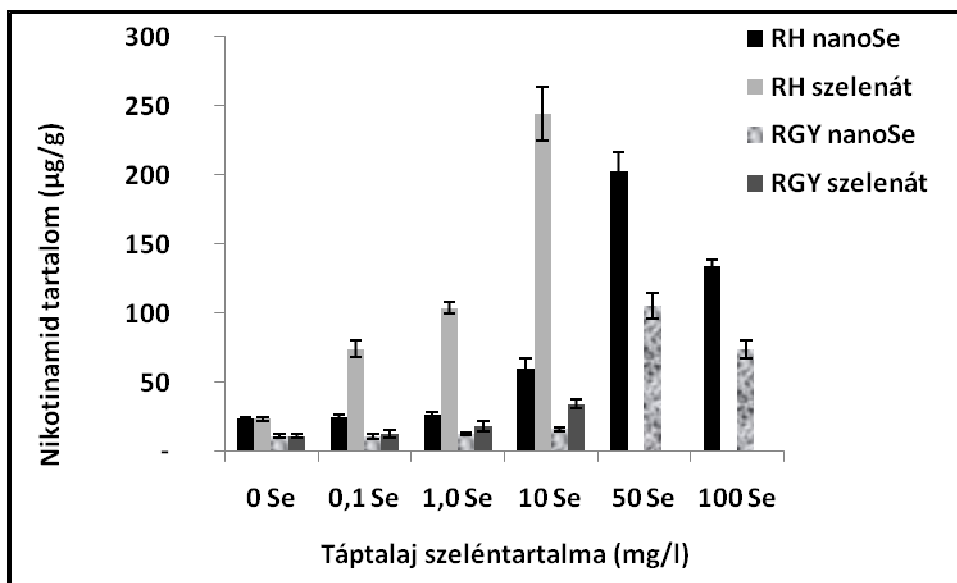
4.1.5.3. Nikotinamid tartalom dohány szövettenyészetben

Mindkét szelénforma az alkalmazott koncentrációtartományban szignifikánsan megnövelte a MTK nikotinamid koncentrációját. Legnagyobb értéket 100 mg/l nanoSe-es kezelésnél kaptam (155,6 µg/g), ami több mint tízszerese a kontrolnál mért, 13,2 µg/g eredménynek (11/A. ábra).



11/A ábra: Dohány kallusz (MTK) nikotinamid tartalma nátrium-szelenát, ill. nanoszelen tartalmú táptalajon ($p < 0,05$) (+/-SE)

RH esetében kapott eredmények tovább erősítették feltételezésemet, miszerint a szelenát erősebb stresszindukáló, mint a nanoSe. Ez látható abból, hogy már 0,1 mg/l szelenát kezelésnél (74,43 µg/g) szignifikánsan nagyobb értéket kaptam a kontrolhoz (23,64 µg/g) képest. Ezzel szemben a nanoSe szignifikáns hatása csak $10 \leq$ mg/l-nél érvényesült, ahol 60,24 - 202 µg/g értékeket kaptam (11/B. ábra).



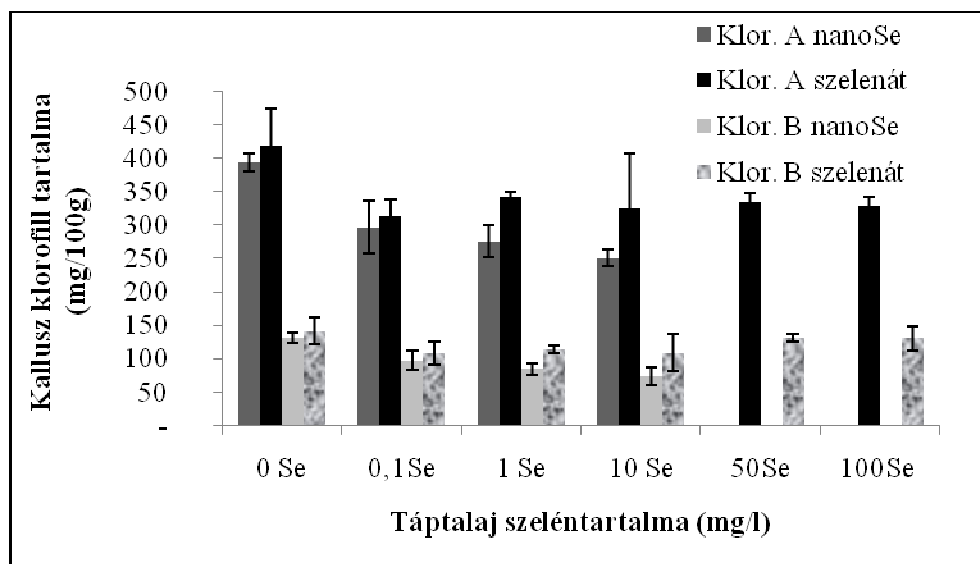
11/B ábra: Regenerált növény hajtás és gyökér részének (RH, RGY) nikotinamid tartalma nátrium-szelenát, ill. nanoszelen tartalmú táptalajon ($p < 0,05$) (+/-SE)

RGY nikotinamid tartalmát egyik szelénforma sem befolyásolta jelentősen alacsony koncentrációtartományban. $50 \leq \text{mg/l}$ nanoSe kezeléseknél szignifikánsan nagyobb értékeket kaptam, bár 100 mg/l-nél már visszaesés volt látható RH és RGY esetében egyaránt (11/A, B. ábra).

4.1.6. Klorofilltartalom szövettényészetben

A kallusz részben differenciált, részben differenciálatlan sejttömeg, ahol nem tökéletesek a szabályozó mechanizmusok, az asszimiláció. A regenerált, hajtással és gyökérrel rendelkező dohánynövény azonban a kallusztól eltérő szöveti rendszer, tökéletesebben működő anyagcsere folyamatokkal. A klorofill szintézis jól mutatja az elétéréseket: míg kalluszokban 250-420 mg/100g max. klorofill A értéket mértem, addig a regenerált növények hajtás részében 1500-2700 mg/100g értékeket is elérte.

Ami a két alkalmazott szelénforma hatását illeti MTK esetében azt tapasztaltam, hogy a nanoSe (0,1 – 100 mg/l koncentráció tartományban) kis mértékben (nem statisztikailag igazolhatóan) csökkentette a klorofill A és B tartalmat (12. ábra). Ezzel szemben szelenáttal kiegészített táptalajon már 0,1mg/l koncentráció is szignifikáns csökkenést okozott a klorofill A és B mennyiségében (12. ábra).



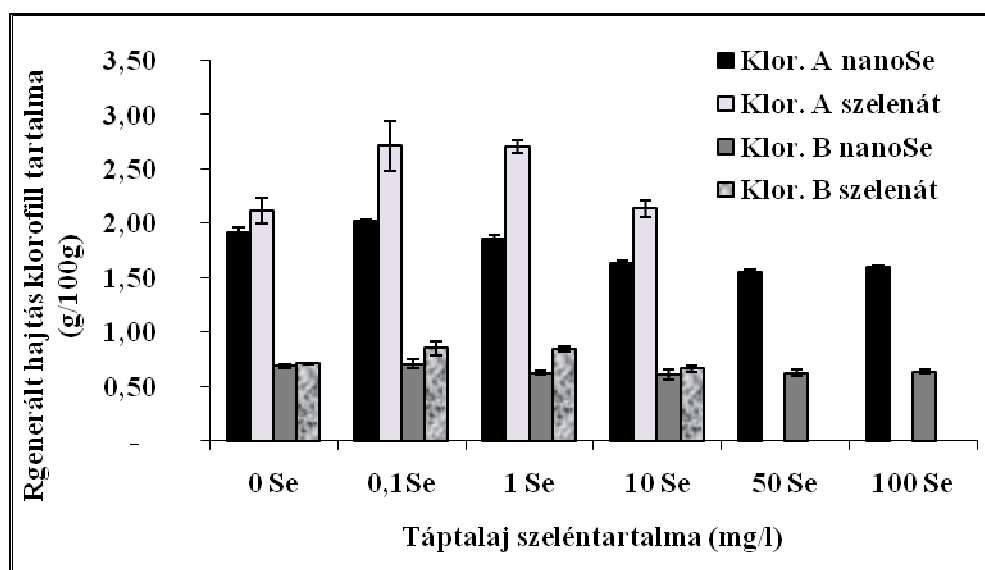
12. ábra: Klorofill A és B tartalom dohány kalluszbán nátrium-szelenát, ill. nanoszelen tartalmú táptalajon ($p < 0,05$) (+/-SE)

Az eredményekből arra lehet következtetni, hogy a klorofill bioszintézis érzékenyebben reagál a szelenát hatására, mint a növekedést és fejlődést befolyásoló anyagcsere-folyamatok, hiszen 0,1 – 10 mg/l koncentrációtartományban nem volt látható gátló hatás a friss tömegben. Valójában a szövettenyészetben nem nagy jelentősége van a klorofilltermelésnek, hiszen a növény heterotróf táplálkozású, a táptalajból készen veszi fel a cukrokat, így nincs közvetlen összefüggésben a növekedéssel. Clairmont et al., (1986) is hasonló hatást tapasztalt dohány kallusztenyészetben közepes mennyiségű mangánkezelés hatására. Ők is azt találták, hogy az alkalmazott mangánkezelés szignifikánsan csökkentette a klorofill tartalmat, anélkül, hogy a kalluszok növekedését befolyásolta volna.

A nanoSe nem szignifikáns mértékű klorofillszintézis gátló hatása alátámasztja a korábbi feltételezést, miszerint a nanoszelen partikulumokról apránként felszabaduló ionok szétoszlanak a szöveteken belül nagyon alacsony koncentrációt fenntartva s ezáltal nem okoz olyan stresszt, mint az egylépcsőben felvételre kerülő szelenát.

RH esetében a két szelénforma hatását vizsgálva azt találtam, hogy a nanoSe alacsony koncentrációban serkentőleg hat a klorofill A szintézisre: 0,1- 0,5 mg/l koncentrációknál 17-23%-os emelkedést mértem. Filek et al. (2010) is azt tapasztalta, hogy alacsony szelenát kezelés segíti a kloroplasztok normális fejlődését és működését a benne zajló asszimilációs folyamatokkal együtt, valamint képes kompenzálni (legalábbis részben) a kadmium okozta stresszhatást intakt növényekben.

Magasabb nanoSe tartományban (10 - 100 mg/l) szignifikáns csökkenést tapasztaltam klorofill A esetében. Klorofill B értékekben nem volt szignifikáns különbség az alkalmazott koncentráció tartományban (13. ábra).



13. ábra: Klorofill A és B tartalom regenerált dohány hajtás részében nátrium-szelenát, ill. nanoszelen tartalmú táptalajokon ($p < 0,05$) (+/-SE)

A szelenát forma statisztikailag igazolható módon nem befolyásolta a regenerált hajtások klorofill A és B értékeit, bár a 13. ábrán kis mértékű emelkedés látható alacsonyabb koncentráció tartományban.

4.2. Növények fortifikálási lehetősége, nátrium-szelenát biológiai hatásvizsgálata

4.2.1. Nátrium-szelenát összehasonlító biológiai vizsgálata szelénakkumuláló és nemakkumuláló zöldségcsírákban

4.2.1.1. Fortifikálási háttér szeléntartalma

A teljes szeléntartalom mérések alapján elmondható, hogy az átlagos fotoautotróf rendszer szelén tartalma 3,91 mg/kg (8. táblázat). 1liter kész MS táptalajra vonatkoztatva 0,0184 mg, DW táptalaj esetében pedig 0,0047g szelén számolható. Ez a kis mennyiség szennyeződésként kerülhet a rendszerbe, ugyanis sem a plant agar, sem a MS komplex összetételben nincs feltüntetve szelén komponens. Emellett az alkalmazott növényi inokulum eredendő szelén tartalma járul még hozzá plusszban a rendszer összes szelén mennyiségéhez, ami fajoktól függően eltérő mennyiség. A kísérletemben szereplő

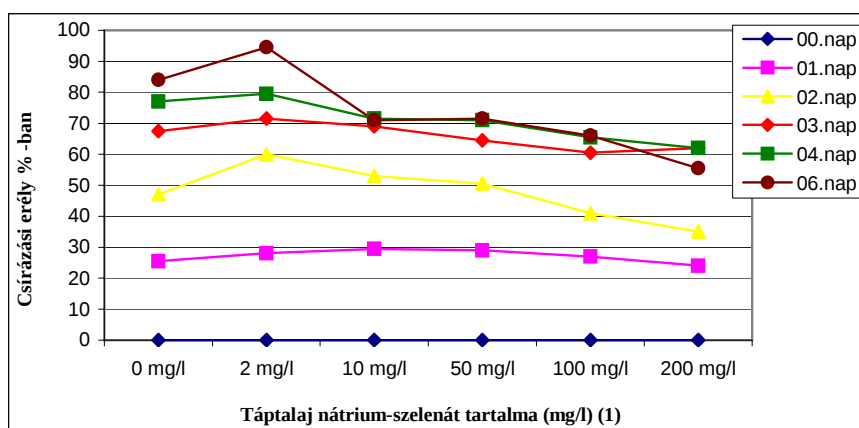
retekmag 0,498 mg/kg, míg paprikamag 0,015 mg/kg összes szelén tartalommal rendelkezik.

8. táblázat: Teljes szeléntartalom mérés általános szövettenyésztési körülmények között

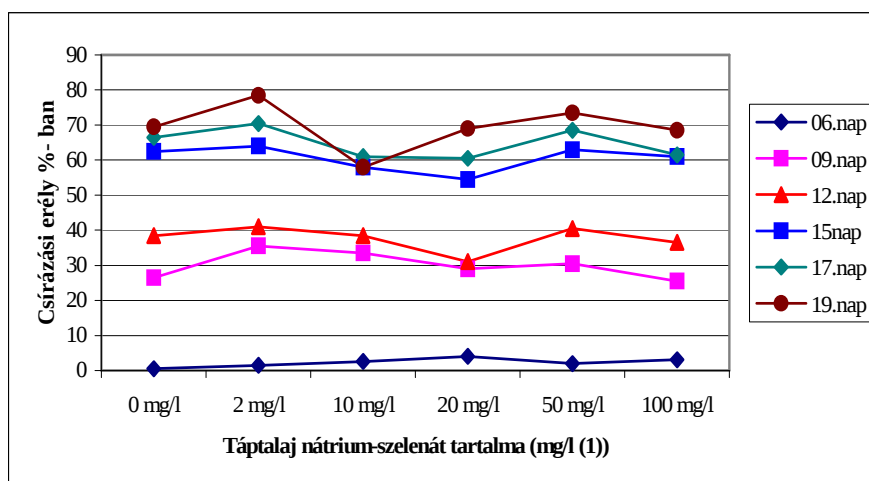
mintanév	Se mg/kg	megjegyzés
reték mag	0,498	szelén akkumuláló zöldségnövény
paprika mag	0,015	nem szelén akkumuláló zöldségnövény
MS komplex médium Duchefa, Biochemie B.V.	3,13	
Plant agar Duchefa, Biochemie B.V.	0,778	
Desztillált víz	kimutatási határ alatt	

4.1.2.2. Zöldségcsírák csírázási erélye

A két zöldségfaj csírázása eltérő gyorsaságú volt. A retek rövid nappalos, gyors tenyészidejű faj lévén már a magvetést követő napon megindult a csírák kipattanása. Ellenben a paprika hosszúnappalos, lényegesen hosszabb tenyészidejű, csírázása csak a 6. napon kezdődött el (14. és 15. ábra).



14. ábra: Retek csírázási erély



15. ábra: Paprika csírázási erély

Ugyanakor a két zöldségfaj szelénakkumuláló képességében rejlő különbség is láthatóvá vált már a csírázás során: Alacsony koncentrációban nem tapasztaltam különbséget. 2 mg/l szelenát mindkét faj csírázását serkenetette (14., 15. ábra). Ezzel szemben 200 mg/l koncentráció teljesen gátolta a paprika magvak csírázását, míg a retek esetében nem volt érzékelhető a gátló hatás. Retek esetében a csíráztatást a 7. napon fejeztem be, ekkor tapasztaltam a legnagyobb különbségeket az egyes szelenát koncentrációk között (16. ábra).



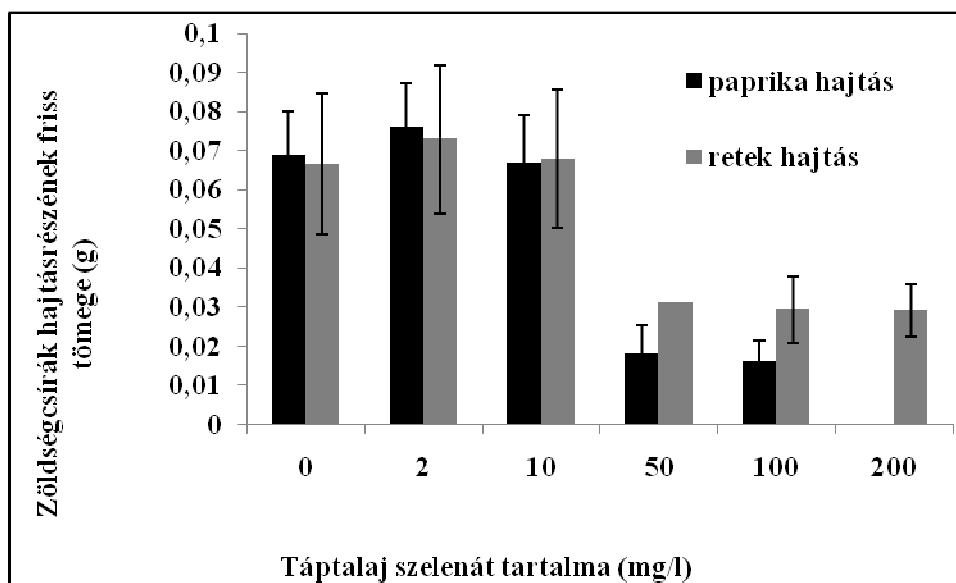
16. ábra: Retek csírázása nátrium-szelenát tartalmú táptalajokon: Balról - jobbra haladva, alsó sor: kontroll, 50, 100 mg/l, felső sor: 2, 10, 200 mg/l szelenát kezelés

Paprika esetében 2 mg/l nátrium-szelenát serkentető hatása szembetűnőbb volt a magvak csírázási erélyét vizsgálva végig a csírázás folyamán a kontrollhoz képest (15. ábra). 10-100mg/l koncentráció tartományban (bár nem szignifikáns mértékű) visszaesést tapasztaltam a csírázás intenzitását illetően. A kikelt csírák fejlődése visszamaradt a magas szelenát tartalom mellett (15. ábra). 200 mg/l szelenát koncentrációjú táptalajon a magvak egyáltalán nem csíráztak ki, ezért nem ábrázoltam.

4.1.2.3. Zöldségcsírák tömegeredményei

A retek és paprika Na_2SeO_4 iránti toleranciája nyomon követhető volt a csíranövények biomasszaprodukciójában is.

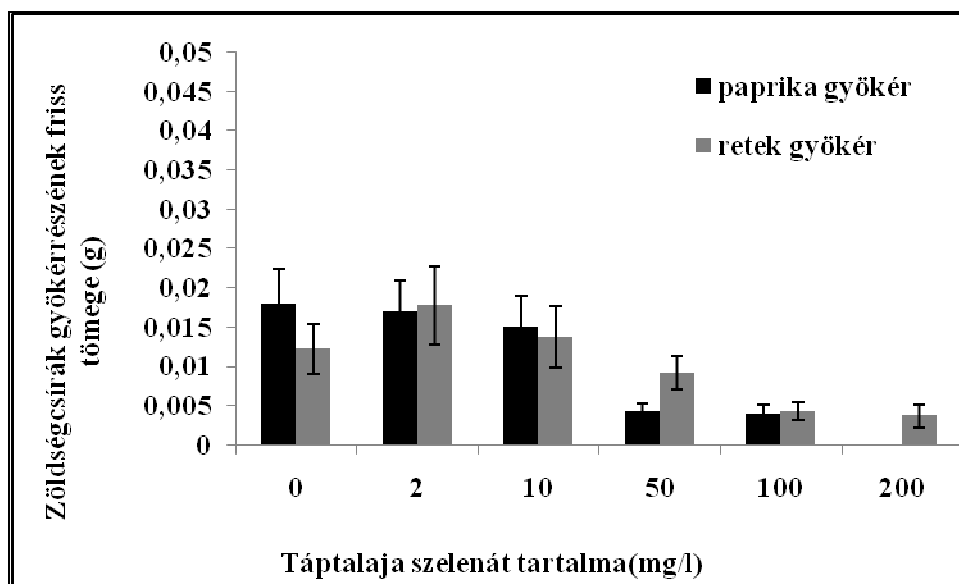
2 mg/l nem befolyásolta szignifikánsan a retek (~7%-os átlag tömegnövekedés egyedenként), hajtás részének biomasszaprodukcióját (17. ábra). Carlson et al. (1989) vizsgálataiban sem találtak olyan koncentrációt, amely serkentőleg hatott volna retek, káposzta, saláta vagy búza növények tömeggyarapodására. Ugyanakkor angol perjében 0,1-1,0 mg/l szelenát szignifikánsan megnövelte a friss tömeget (Hartikainen et al., 2000).



17. ábra: Paprika és retek csíranövények hajtásrészének egyedi átlagtömege (g) a táptalaj szelenát tartalmának függvényében ($p < 0,05$) ($\pm$ SE)

10mg/l koncentrációnál a kontrollhoz hasonló értékeket kaptam mindkét zöldségfaj esetében. 50-200 mg/l koncentráció tartományban a szemmel jól látható toxikus hatás statisztikailag is alátámasztható volt a lecsökkent hajtás tömegértékek alapján (17. ábra).

A retekhez hasonlóan paprika esetében is csak kismértékű (nem szignifikáns) növekedést figyelhettem meg 2 mg/l szelenát kezelés mellett a friss tömeget vizsgálva. Ugyanakkor a szelenát toxikus hatása alacsonyabb koncentrációnál jelentkezett, mint reteknel, ami szelén toleranciájukkal hozható összefüggésbe (Birringer *et al.*, 2002; Dhillon és Dhillon, 2009). A nem szelénakkumuláló paprika növekedése fokozottan visszamaradt a retek csíranövényekhez képest az emelkedő szelenát koncentráció mellett.



18. ábra: Paprika és retek csíranövények gyökérrészének egyedi átlagtömege (g) a táptalaj szelenát tartalmának függvényében ($p < 0,05$) (+/-SE)

A gyökerek tömegbeli változása némi eltérést mutatott a hajtásrészekhez képest. Retek esetében 2 mg/l szelenát kiegészítés szignifikánsan megemelte a gyökér biomassza produkciót, ellentétben a paprikával, ahol ugyanezen koncentráció kis mértékben csökkentette a friss gyökér tömeget (18. ábra). 50-200 mg/l koncentráció tartomány szignifikánsan csökkentette a gyökérfejlődést retek és paprika esetében egyaránt (18. ábra).

4.1.2.4. Zöldségcsírák szelén tartalma

A szelenát jól felvehető szelénforma a növények számára (Zayed *et al.*, 1998; Lintschinger *et al.*, 2000), amit a teljes szeléntartalom során mért eredményeim jól alátámasztottak. Ugyanakkor a két faj eltérő szelénakkumuláló képességét már a magvak szeléntartalmának mérésével tudtam bizonyítani, hiszen a szelénakkumuláló retek magban nagyságrenddel nagyobb értéket kaptam, mint paprika esetében.

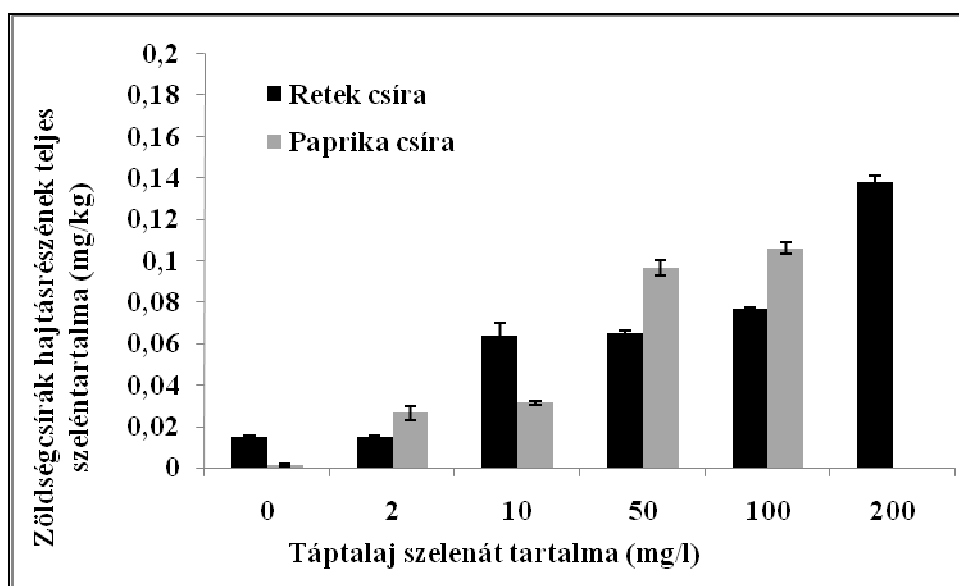
A csíranövények mérése során már a kontrol egyedek összehasonlítása is informatív volt. A kontroll növények eredményei jól mutatták a különbséget a két zöldségféle eltérő szelénakkumuláló képességéről, hiszen az itt mért értékek arra mutatnak, hogy mennyi szelén szabadul fel a magvakból. Retekben egy nagyságrenddel magasabb volt a teljes szelén tartalom, mint paprikában, akár a hajtás (reték hajtás: 0,0152 g/kg ↔ paprika hajtás: 0,0011g/kg) akár a gyökeret (reték gyökér: 0,123 g/kg ↔ paprika gyökér: 0,0034 g/kg) vettem figyelembe.

A *Brassicaceae* családba tartozó növények, köztük a retek, képes a felvett szerezetlen szelénformákat részben átalakítani szelenoaminosav származékokká, melyek nem befolyásolják anyagcsere folyamatait, emiatt nagyobb koncentrációban tolerálják azt (Terry *et al.*, 2000; Mounicou *et al.*, 2006; Ellis és Salt, 2003; Freeman *et al.*, 2000). Ellenben a nem-szelénakkumuláló növényekben, a felvett szelén jó része szelenometioninba épül be elrontva ezzel több funkcionális fehérjét is (Mounicou *et al.*, 2006), aminek következtében már alacsonyabb szelenát koncentráció mellett jeletkeznek a toxikus tünetek: ezt alátámasztotta kísérletem is, miszerint paprika esetében 200mg/l szelenát teljesen megakadályozta a magvak csírázását, míg a retekcsíra bár visszafogottan, de fejlődött. A szelenát toxicitást okozhatja még, a korábban már említett prooxidáns hatás, miszerint a szelénionok (Se^{6+}) képesek katalizálni a tiolok oxidációját, és szabadgyököket generálni, hozzájárulva ezzel a növény fejlődésének gátlásához (Wang *et al.*, 2007).

A szeléntolerancia, összefüggésben a szelénakkumuláló képesség eltérő volt a két faj esetében. Szembetűnő különbség, hogy 200 mg/l koncentrációnál a paprika (nem szelénakkumuláló) csírázásnak sem indult, ellenben a retek csírák hajtás és gyökér része egyaránt növekvő mennyiségben akkumulálta a szelenátot, bár a biomasszaprodukció csökkenésében érzékelhető volt a gátló hatás. A táptalaj szelenát tartalmának emelkedése maga után vonta a gyökér és a hajtás teljes szelén tartalmának növekedését mindkét csíranövény esetében (19. és 20. ábra).

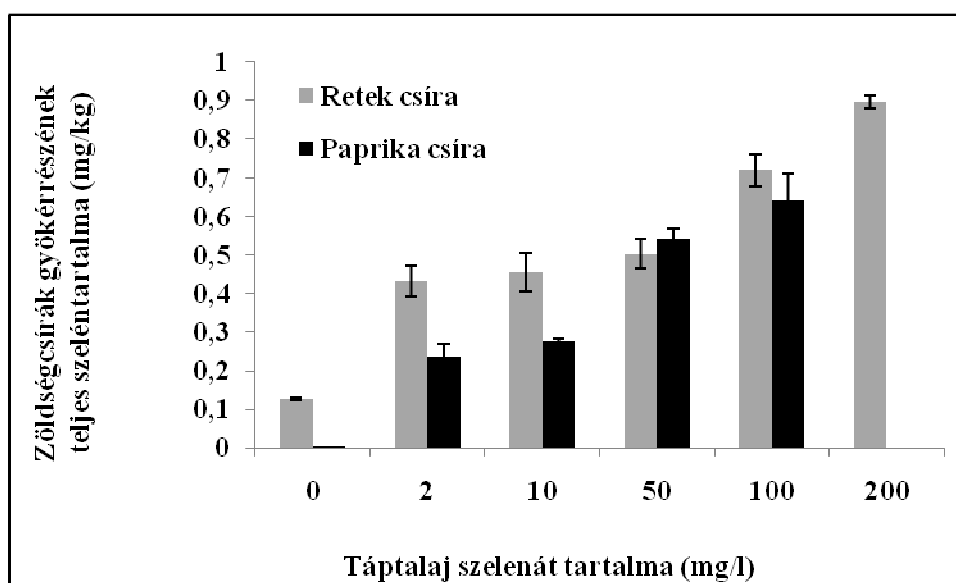
Ugyanakkor az is jól látható volt, hogy a gyökérben szignifikánsan magasabb értékeket kaptam, mint a hajtásrészben, ellentmondva a szakirodalomban leírtaknak (Hopper és Parker, 1999; Li *et al.*, 2008; Zayed *et al.*, 1998). Méréseik során ők a hajtás részben tapasztalták a szelén nagyobb akkumulációját.

Paprika hajtás részének teljes szeléntartalma 2 mg/l szelenát tartalmú táptalajon már szignifikánsan megnőtt, ellenben retek esetében csak 10 mg/l koncentrációtól tapasztaltunk szignifikáns emelkedést (19. ábra).



19. ábra: Zöldségcsírák hajtásrészének teljes szelén tartalma a táptalaj szelenát tartalmának függvényében ($p < 0,05$) (+/-SE)

A gyökér teljes szeléntartalma 2 mg/l szelenát koncentrációtól szignifikánsan megemelkedett retek és paprika esetében egyaránt (20. ábra).



20. ábra: Zöldségcsírák gyökér részének teljes szelén tartalma a táptalaj szelenát tartalmának függvényében ($p < 0,05$) (+/-SE)

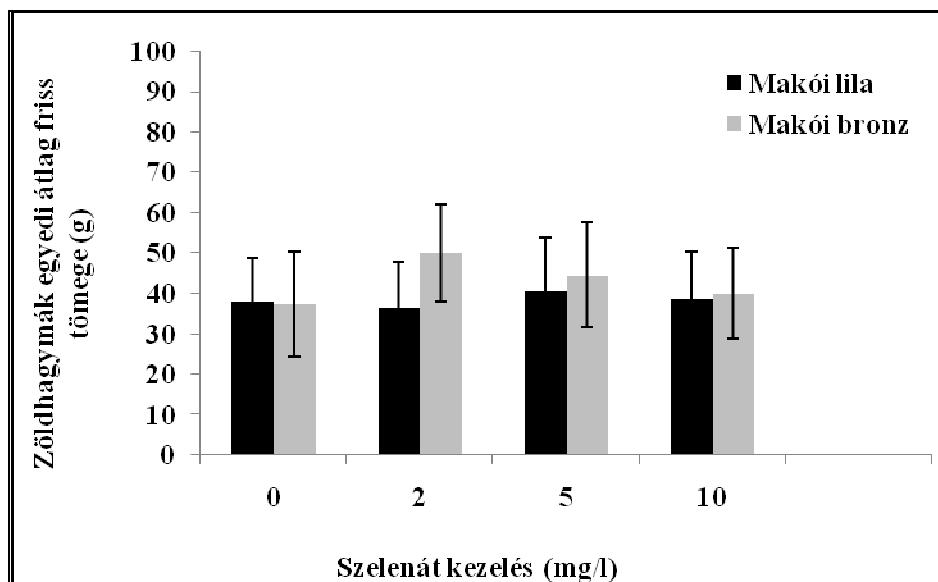
Az eredmények alapján úgy tűnik, hogy a gyökérben a szelenát jobban akkumulálódik, mint a hajtásban. Ennek magyarázata lehet, hogy a gyökérsejtekben lévő transzporter molekulák segítségével felvett szelenát csak részben szállítódik a hajtásba, jelentős hányadot azonban a gyökér visszatart és változatlan (Se VI) formában raktároz (*Pedrero*

et al., 2006). Ezek az eredmények látszólag ellentmondásban vannak a dohány szövettenyészetben tapasztaltakkal, ahol a hajtásrészben kaptam magasabb teljes szelén értékeket a gyökérhez viszonyítva. A két kísérlet között azonban lényeges különbség van: dohány esetében a levágott mikrohajtásokat oltottam át regeneráló táptalajra. A vágási felszínen lévő sérült sejteken át passzív diffúzióval hirtelen nagy mennyiségű szelénát képes volt bejutni, s mire a gyökérképződés beindult (több, mint egy hét) addigra a hajtásban már sok szelén akkumulálódott. Ezzel szemben a magról vetett csíranövényekbe csak a fejlődő gyökereken át juthatott be szelénát ion.

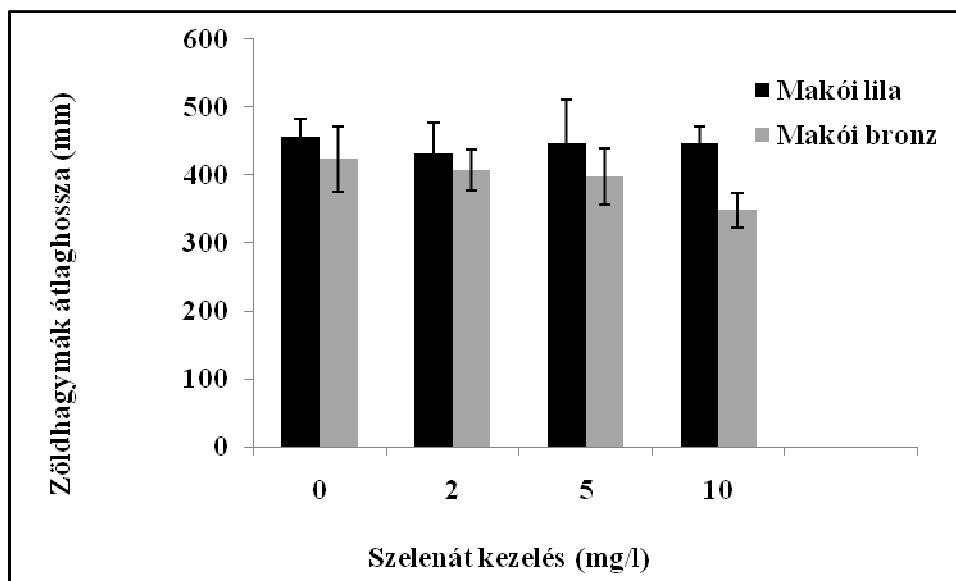
4.2.2. Nátrium-szelenát összehasonlító biológiai vizsgálata Makói bronz és Makói lila zöldhagyma fajtákban

4.2.2.1. Szelenizált zöldhagyma tömegeredményei

A hagymafélék (*Allium tricoccum*, *Allium cepa*, *Allium sativum*) képesek a szelént nagyobb mennyiségben akkumulálni anélkül, hogy negatívan befolyásolná biomassza produkciójukat (Kopsell, 1997; Shah et al., 2004; Whanger, 2000; Montes-Bayon, 2006; Yadav, 2007). Vizsgálataim során azt tapasztaltam, hogy hidrokultúrák körülmények között hajtatott zöldhagymák fejlődését az alkalmazott nátrium-szelenát koncentrációk szignifikáns mértékben nem befolyásolták a Makói Lila fajta esetében tömeggyarapodását, illetve a hosszanti növekedését illetően (21. és 22. ábra).



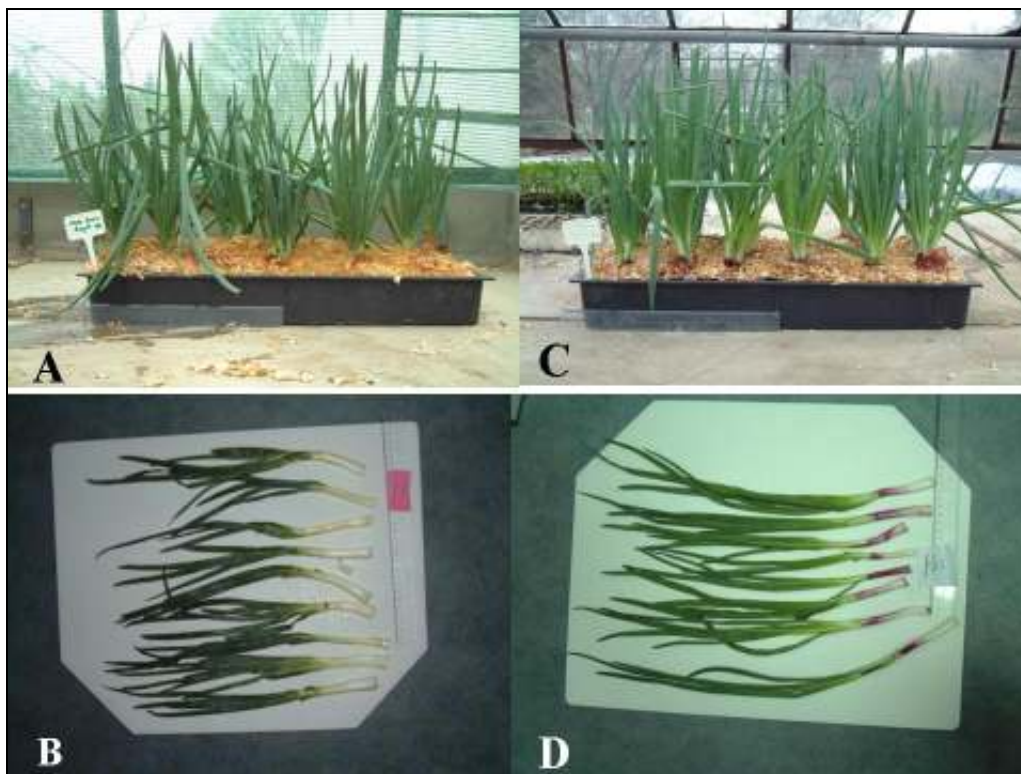
21. ábra: Zöldhagymák egyedi átlag tömege szelenát kezelés függvényében ($p < 0,05$) (+/-SE)



22. ábra: Zöldhagymák egyedi átlag hossza szelenát kezelés függvényében ($p < 0,05$) (+/-SE)

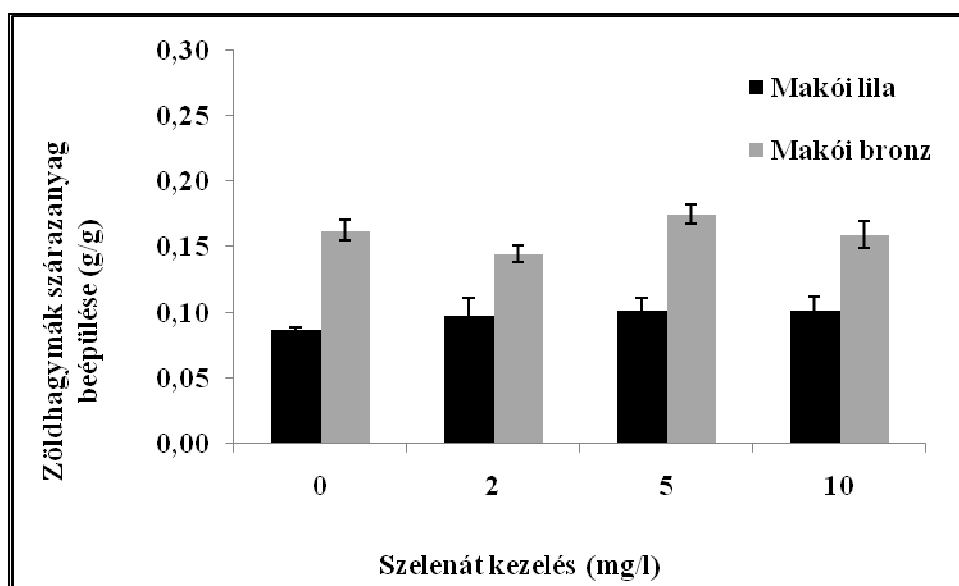
Makói bronz fajtánál sem tapasztaltam szignifikáns eltérést 2-5 mg/l koncentrációknál (21. és 22. ábra). 10 mg/l azonban szignifikáns mértékű csökkenést idézett elő a hossznövekedésben.

A kapott eredményeket tükrözték a vizuális tapasztalataimat is: a kezelt zöldhagymák alacsonyabbak, de vastkosabbak voltak a kontrollhoz viszonyítva (23./A,B,C,D ábra).



23. ábra: A és B: Makói bronz fajta 10 mg/l szelenát kezelés mellett; C és D: Makói lila fajta 10 mg/l szelenát kezelés mellett.

A szárazanyag tartalmat vizsgálva azt találtam, hogy a nátrium-szelenát, az alkalmazott koncentrációkban nem befolyásolta szignifikánsan a szárazanyag beépülést, sokkal inkább a fajtahasítás érvényesült (24. ábra).

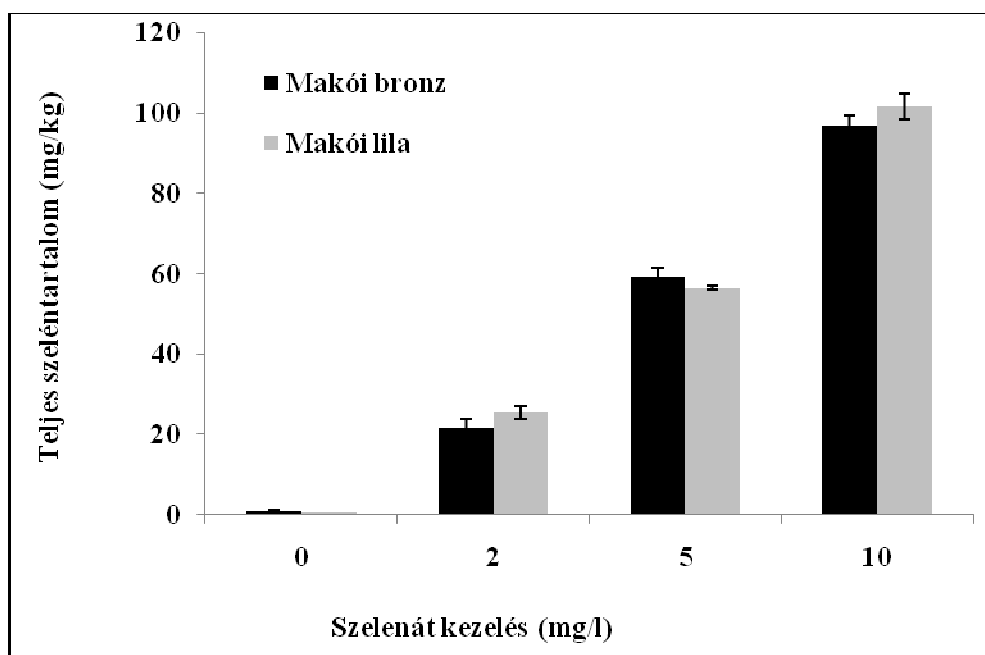


24. ábra: Zöldhagyma szárazanyag beépülése (g/g) szelenát kezelés függvényében (mg/l) ($p < 0,05$) (+/-SE)

Makói bronz fajta esetében szignifikánsan magasabb a szárazanyag értékeket mértem (0,145 - 0,175 g/g), mint a Makói lila fajtánál (0,087 – 0,101 g/g).

4.2.2.2. Szelenizált zöldhagyma szeléntartalma

A zöldhagymák összes szeléntartalma az alkalmazott szelenát koncentrációk növekedésével arányosan szignifikáns mértékben emelkedett a kontrollhoz képest, és az egyes kezelések között egyaránt (25. ábra).



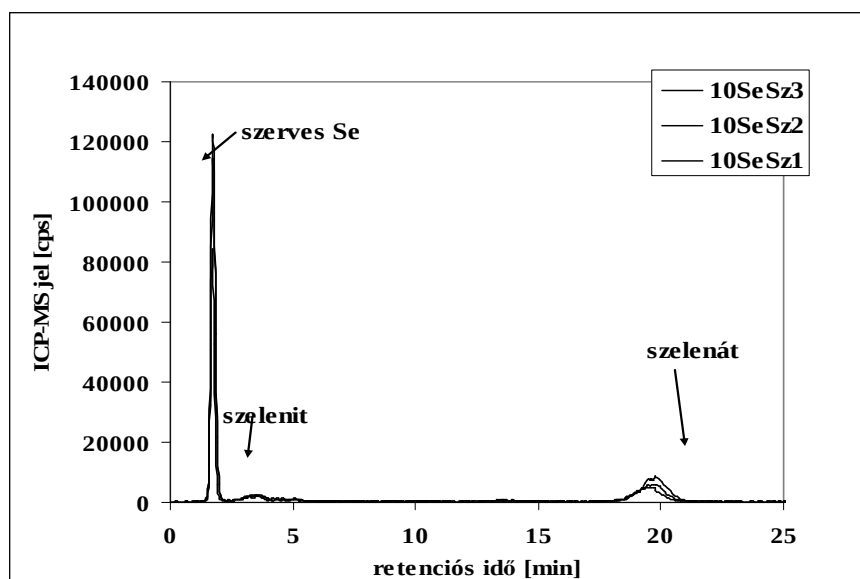
25. ábra. Zöldhagymák összes szeléntartalma szelenát kezelések függvényében ($p < 0,05$) (+/-SE)

A két hagyma fajtát egymással összehasonlítva nem találtam jelentős eltéréseket szelénfelhalmozó képességük között.

4.2.2.3. Szelénmódosulatok eloszlása szelenizált zöldhagymában

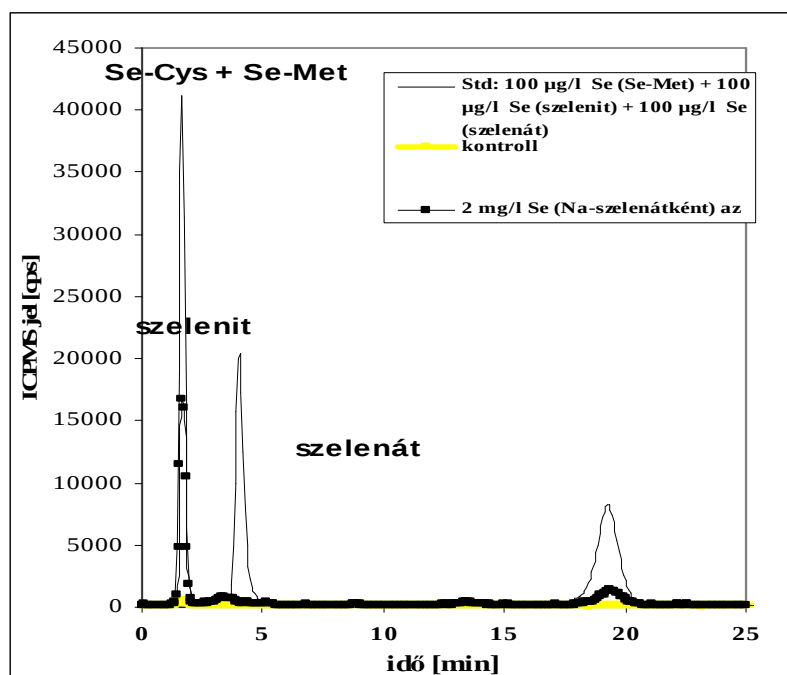
A friss növényi mintákból készült módosulatanalitikai vizsgálatok során elválasztott szelénformák kromatogramját mutatja be a 26. ábra Makói lila hagymából 3 ismételtsében. Anioncserélőoszlopot használva a szervetlen szelénformákat lehetett elválasztani egymástól nagy biztonsággal: a szelenit (SeIV) 5 perc, míg a szelenát (SeVI) 20 perc retenciós időnél volt detektálható (26. ábra). A hozzáférhető standardok alapján szerves szelénformák közül a szeleno-metionin és szeleno-cisztin jelenléte volt azonosítható. Az alkalmazott oszlopon e két vegyület teljesen megegyező retenciós

idővel (3 perc) detektálható (26. ábra). Így a továbbiakban csak szerves formaként látható.

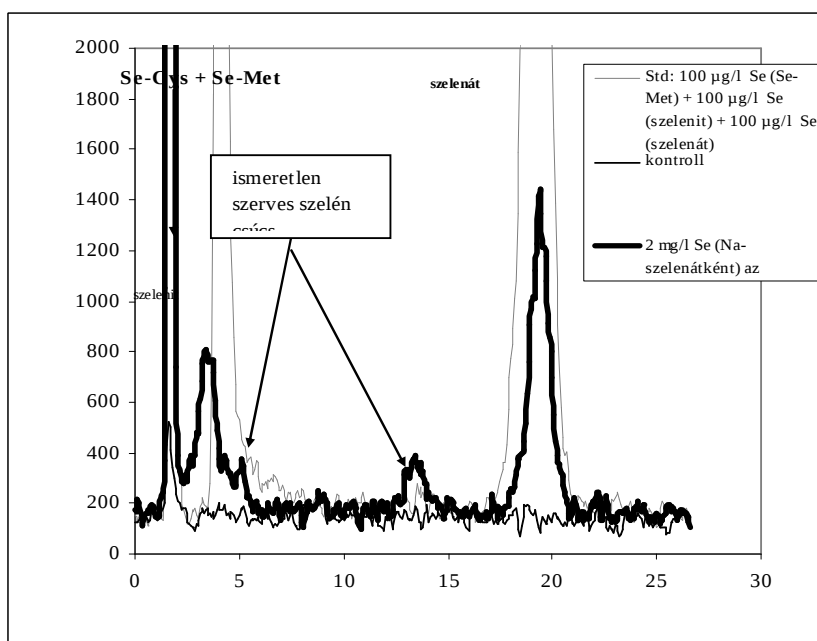


26. ábra: Szelénformák elválasztásának kromatogramja Makói lila hagyma mintából 3 ismételtsben

A 27. A-B. ábra a 2 mg/l nátrium-szelenáttal kezelt Makói bronz fajta kromatogramját mutatja be, összehasonlítva a kontrollal és a standard mintával. Az ICP-MS jelet szűkebb skálán ábrázolva, két ismeretlen szerves szelén forma csúcsa rajzolódott ki a kromatogramon, melyek a hibahatáron kívül esnek, vagyis a háttér zajtól egyértelműen elkülöníthetők. Ezek a csúcsok az 5 és 10 mg/l koncentrációjú nátrium-szelenátos kezelések esetén is, minden ismételtsben megjelentek, de csak a Makói bronz fajtában. Ezek az ismételten megjelenő szelén származékok úgy tűnik Makói bronz esetében fajta jelleget képviselnek. Egyéb standard hiányában pontosabban nem lehetett meghatározni.



27/A. ábra: Makói bronz hagymafajta kromatogramja kontroll és 2mg/l szelenát kezelés mellett, standard mix-szel összehasonlítva

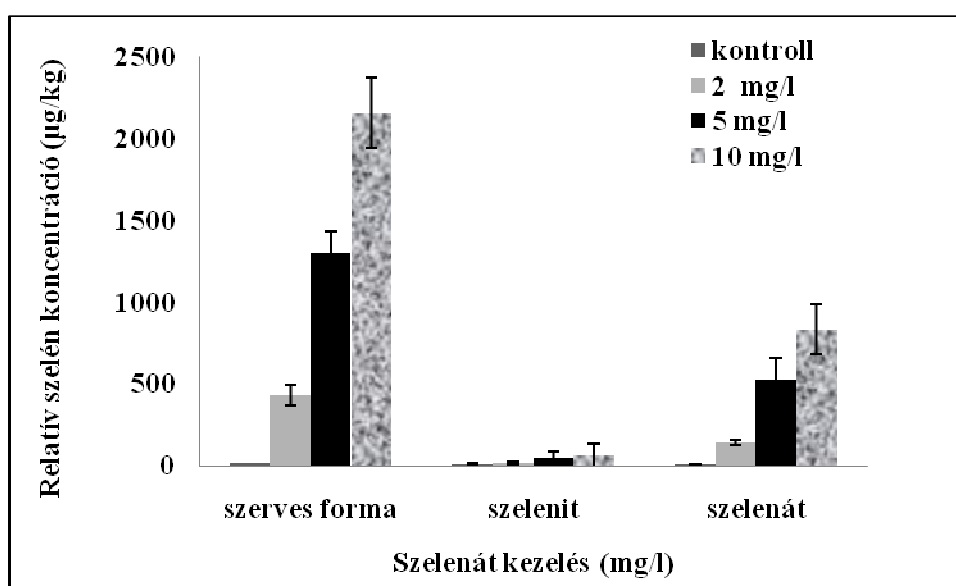


27/B. ábra: Makói bronz hagymafajta kromatogramja kontroll és 2mg/l szelenát kezelés mellett, a két ismeretlen szelénforma felnagyítva.

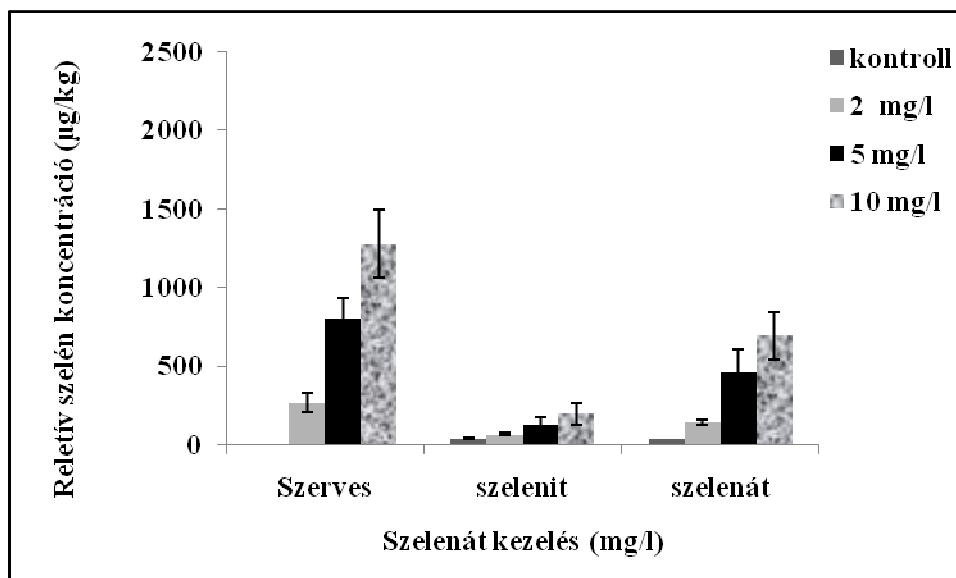
A zöldhagymák összes szeléntartalmát és az egyes módosulatok koncentrációját összevetve nagy koncentrációbeli különbség látható. A hiányzó mennyiség részben azzal magyarázható, hogy csak három módosulat volt elválasztható egymástól a

standardok miatt. A magyarázat másik, lényegesebb fele abban rejlik, hogy a szelénmódosulatok meghatározásához a zöldhagymák feltárása nem volt teljes. Mintaelőkészítéshez a friss növények kipréselt levét használtam, enzimes (vagy egyéb fajta) emésztés nélkül. Az összes szeléntartalma azonban a teljes zöldhagymák liofilizált, porított mintáiból lett meghatározva.

Az elválasztott szelén formák relatív koncentrációit összehasonlítva azt tapasztaltam, hogy Makói bronz fajta a felvett szelenátot nagyobb mértékben építette be szerves formákba, mint a Makói lila zöldhagymák a vízoldható frakciót figyelembe véve. A kezelések dózisainak emelkedésével arányosan mindkét fajtában a szerves szelénformák mennyisége nőtt meg nagyobb mértékben (28. és 29. ábra).



28. ábra: Szelén formák és relatív koncentrációjuk nátrium-szelenát kezelés hatására Makói bronz fajtába ($p < 0,05$) (+/-SE)



29. ábra: Szelén formák és relatív koncentrációjuk nátrium-szelenát kezelés hatására Makói lila fajtában ($p < 0,05$) ($\pm$ SE)

A fajtákat egymással összehasonlítva azt találtam, hogy a Makói bronz zöldhagymában a szerves szelén beépülése kb. 1,5-szerese Makói lila zöldhagymáénak (9. táblázat).

A felvett szerves szelenát nagy része szerves formába épült be, ami emberi fogyasztás szempontjából előnyös (Ip et al., 1994a; Ip et al., 1994b; Ip et al., 1995). A szelenoaminosav származékokat ugyanis szervezetünk könnyebben hasznosítja és a daganatos elváltozások megakadályozásában is ezek bizonyultak hatékonyabbnak a szerves formákhoz képest (Ip et al., 2000; Spallholz et al., 2001). Vannak azonban ennek ellentmondó, gyomor-bélrendszer működését modellező kísérletek (Fairweather-Tait et al., 2010), melyekben szelénrel dúsított hagymafélék emésztését is vizsgálták (Kápolna, 2006). A tapasztalat az volt, hogy a szelenáttal dúsított hagymafélékben a szelén 90%-a szelenát módosulat maradt, melyet biológiailag hozzáférhetőnek találtak. A szelenittel, ill. szelenometioninnal kezelt növényekben a szerves forma dominált, amely viszont kis mértékben hasznosult.

Saját kísérleteimben a vizsgált módosulatok közül szelenit fordult elő legkisebb mennyiségben mindkét zöldhagyma esetében. Különösen Makói bronz fajtában mértem nagyon alacsony értékeket, s a kezelés dózisainak emelésével sem tapasztaltam szignifikáns növekedést a mintákban. A szelenit köztes intermedier a szelenát $\rightarrow$ szelenoaminosav átalakulásban. Az eredmények arra utalnak, hogy gyorsan végbemegy ez a beépülési folyamat, mivel a szerves formák koncentrációja szignifikánsan nő, a szelenité azonban nem.

A felvett, és változatlan formában felhalmozódó szelenát mennyisége a kezelések dózisaival arányosan emelkedett, akárcsak a szerves szelénformáké. A relatív koncentrációjukat mérve azonban fele akkora, sőt Makói lila esetében még kisebb értékeket kaptam, mint a szelenometionint és szelenocisztint együtt vizsgálva (28. és 29. ábra).

9. táblázat: Makói bronz és Makói lila hagymafajták egyes szelénmódosulatainak relatív koncentrációja és összes szeléntartalma

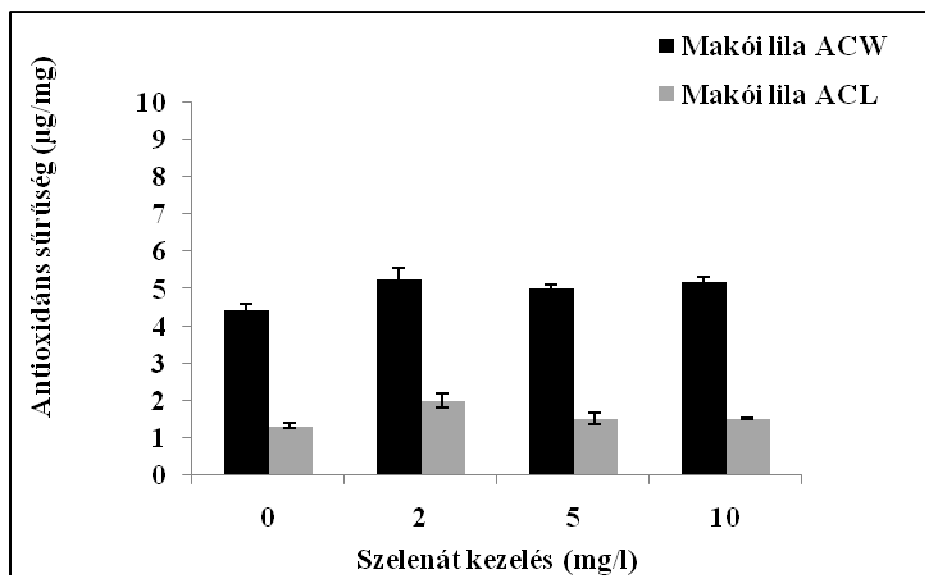
Makói lila				
Szelenát kezelés (mg/l)				
	0	2	5	10
Se-Met+ Se-Cys (µg/kg)	10	272	803	1279
Szelenit (µg/kg)	42	69	134	196
Szelenát (µg/kg)	37	146	467	694
Összes szelén tart. (mg/kg)	0,949	21,57	59,29	96,92
Makói bronz				
Szelenát kezelés (mg/l)				
	0	2	5	10
Se-Met+ Se-Cys (µg/kg)	15,48	431,13	1304,37	2156,91
Szelenit (µg/kg)	6,56	15,25	45,93	60,39
Szelenát (µg/kg)	4,77	143,71	522,57	833,33
Összes szelén tart. (mg/kg)	0,53	25,36	56,41	101,56

4.2.2.4. Szelenizált zöldhagyma teljes antioxidáns sűrűsége

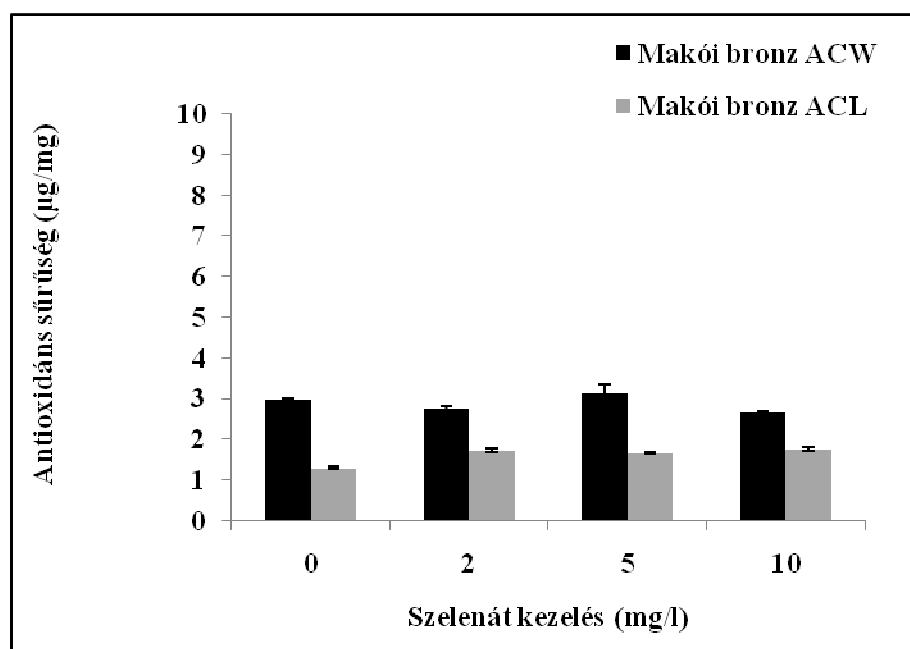
Hartikainen et al. (2000) lipid-peroxidáció, szuperoxid-diszmutáz, glutation-peroxidáz és tokoferol mérésével tanulmányozták a szelenát kettős hatását (antioxidáns/prooxidáns) angol perjében. Kísérleteimben elsősorban a teljes vízben, ill. zsírban oldódó antioxidáns sűrűség mérését alkalmaztam, mert ez előbbre mutató

fogalom, mint egy-egy konkrét biokémiai folyamat változásának specifikus nyomonkövetése. A módszer ugyanis alkalmas arra, hogy több, hasonló viselkedésű vegyület (vízben vagy zsírban oldódóak) változását mutassa be egyidőben, ezáltal általánosabb összefüggések vonhatók le (Kim *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2004; Apak *et al.*, 2007). Teljes antioxidáns-sűrűség vizsgálata során Photochem mérőműszer segítségével lehetővé vált a zsíroldékony, ill. a vízoldékony antioxidáns tulajdonsággal bíró vegyületek aktivitásának külön mérése.

A növények antioxidáns sűrűsége fajfüggő paraméter, nagy eltérések lehetnek azonban az egyes növényfajokon belül is a fajták között (Pellegrini *et al.*, 2003), ahogy saját kísérleteimben tapasztaltam is. A Makói lila fajta vízoldható antioxidáns sűrűsége lényegesen magasabb volt, mint a Makói bronz fajtáé, ugyanis a Makói lila ACW értékei 4,4 – 5,2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ között mozogtak, míg a Makói bronz fajta esetében 2,66 – 3,15 $\mu\text{g}/\text{mg}$ volt realizálható (30. és 31. ábra). Ennek oka valószínűleg a Makói lila színét biztosító, magas antocianin tartalomban kereshető, ugyanis e vegyületcsoport egyúttal magas antioxidáns aktivitással is bír, s a Makói bronz fajtából hiányzik. Emellett a lilahagymákban szintén anitoxidáns tulajdonságokkal bíró flavonoidok mennyisége is lényegesen magasabb, mint a vöröshagymában (Lugasi *et al.*, 2003).



30. ábra: Makói lila zöldhagyma antioxidáns sűrűsége szelenát kezelések függvényében ($p < 0,05$) ($\pm$ SE)



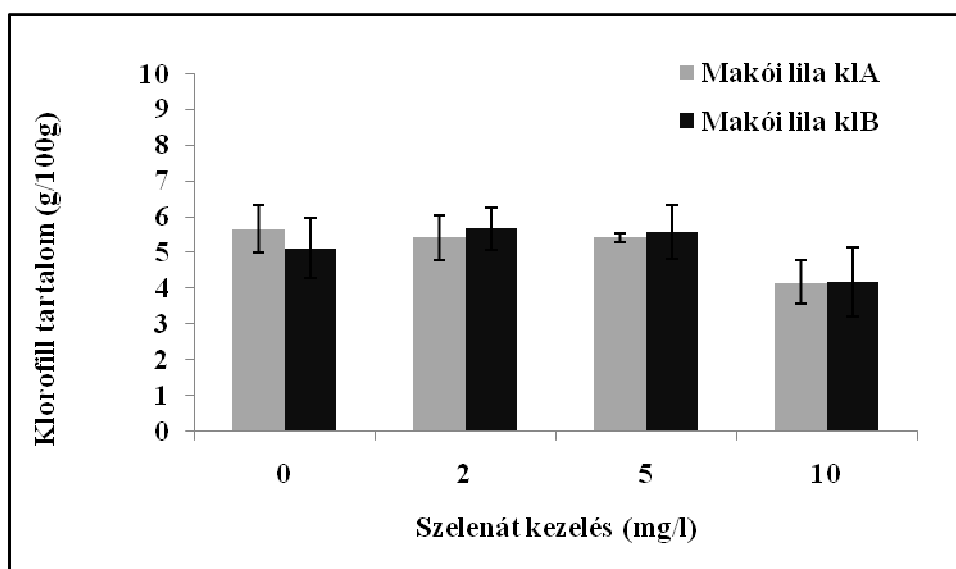
31. ábra: Makói bronz zöldhagyma antioxidáns sűrűsége szelenát kezelések függvényében ($p < 0,05$) (+/-SE)

A zsírban oldódó antioxidánsok mennyiségében azonban nem volt szignifikáns eltérés a két fajtát összehasonlítva.

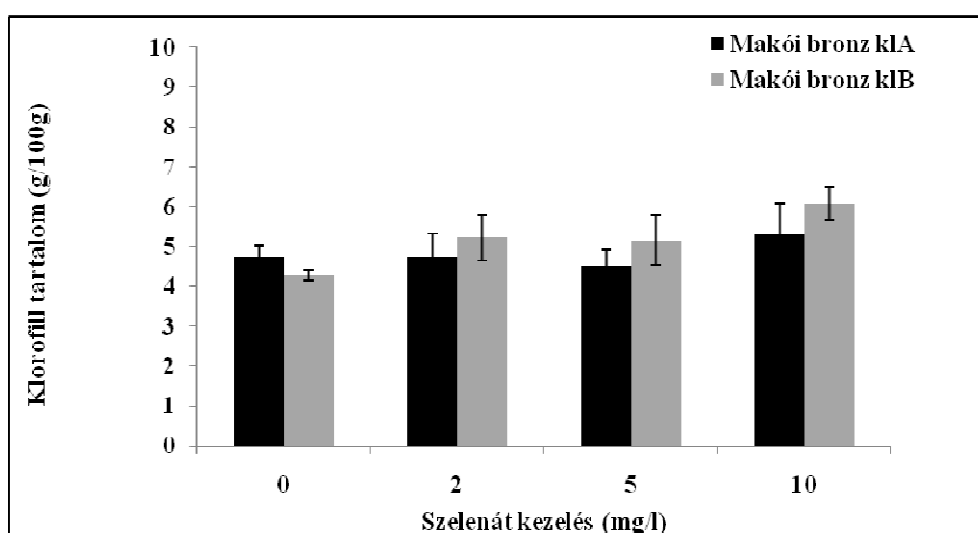
Makói lila ACW, ill. ACL tartalmát az alkalmazott szelenát kezelések statisztikailag igazolható módon nem befolyásolták (30. és 31. ábra). Ezzel szemben Makói bronz zöldhagymában 10 mg/l szelenát koncentrációnál szignifikánsan kisebb ACW értéket mértem a kontrollhoz viszonyítva. Ugyanakkor az ACL értékek szignifikánsan megemelkedtek 5-10 mg/l koncentrációknál Makói bronz fajtánál (30. és 31. ábra).

4.2.2.5. Szelenizált zöldhagyma klorofill tartalma

A zöldhagymák karotin tartalma szignifikánsan alacsonyabb volt (0,01 - 0,03 mg/g) (nincs ábrázolva), mint a klorofill A és B értékek (4 - 6 g/100g). Ugyanakkor a két hagymafajtát egymással, illetve a szelenát kezelésekkel összevetve sem tapasztaltam szignifikáns eltéréseket a karotin tartalmat illetően. Ezzel szemben a szelenát kezelés hatására a klorofill A és B tartalom változásában jelentős eltéréseket tapasztaltam a két hagymafajta között (32. és 33. ábra).



32. ábra: Makói lila klorofill A és B tartalma szelenát kezelések függvényében ($p < 0,05$) (+/-SE)



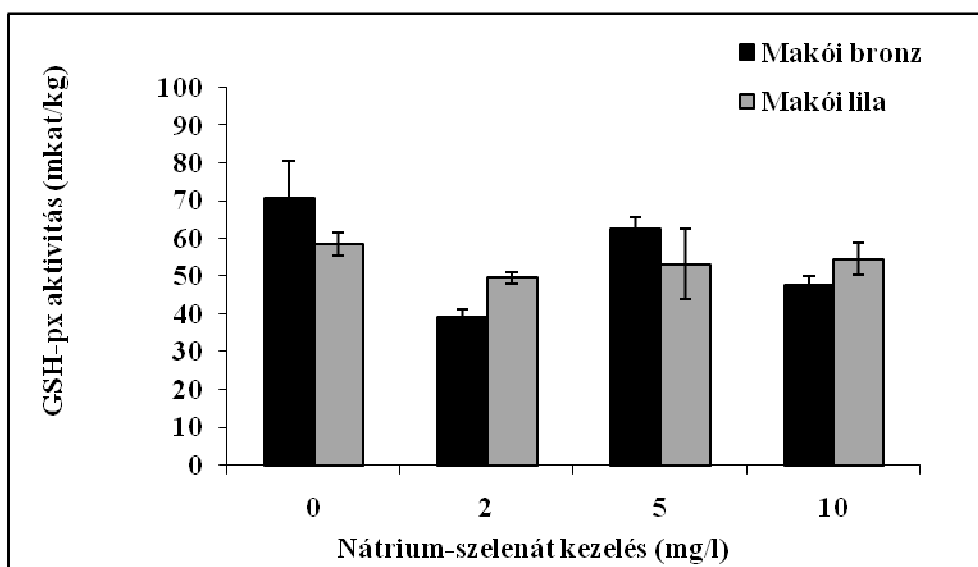
33. ábra: Makói bronz klorofill A és B tartalma szelenát kezelések függvényében ($p < 0,05$) (+/-SE)

Makói lila fajta klorofill A szitnéziséét az alacsonyabb (2 - 5 mg/l) szelenát koncentráció nem befolyásolta, ám a 10 mg/l-nél szignifikáns csökkenést realizáltam. Regenerálódó dohányban nanoSe alkalmazása mellett figyeltem meg klorofill tartalomban csökkenést ≥ 10 mg/l-től. Árpában már 2 ppm felett kimutatható volt a csökkenés, amit a klorofill szintézis gátlásával magyaráztak (Akbulut és Cakir, 2010). Hasonló tendenciát követett a klorofill B tartalom is, de ott szignifikáns eltérés nem volt kimutatható (32. ábra). Makói bronz esetében a klorofill A és B tartalom a szelenát kezelések hatására

emelkedett, bár statisztikailag igazolható különbséget csak 10mg/l koncentrációnál kaptam klorofill B estében (33. ábra).

4.2.2.6. Glutation-peroxidáz aktivitás szelenizált zöldhagymában

Glutation-peroxidáz, mint antioxidáns enzim különösen nagy jelentőségű, ha a növényt stressz éri, ezért az aktivitás változásából következtetni lehet a megváltozott állapotra. A glutathion-peroxidáz aktivitás mérése során Makói lila fajtában nem tapasztaltam szignifikáns eltérést sem a kontrolhoz viszonyítva, sem az egyes kezelések között (34. ábra). Ezzel szemben Makói bronz fajta GSH-px aktivitását az alkalmazott szelenát koncentrációk szignifikánsan csökkentették (34. ábra) ellentmondva a szakirodalmi leírásoknak, miszerint a GSH-px aktivitás megnövekedett a szelenát kezelés hatására (*Hartikainen et al., 1997; Hartikainen et al., 2000*).



34. ábra: Zöld hagymák glutathion-peroxidáz aktivitása szelenát kezelések függvényében ($p < 0,05$) ($\pm$ SE)

4.2.2.7. Szelenizált zöldhagyma, mint funkcionális termék

A zöldhagyma szelenizálási munka kettős céllal terveztük tanszékünkön a 2004 – 2008 között futó Genomnanotech Egyetemi Tudásközpont Program Agrbiotech program keretében. Egyrészt a szelenát biológiai, biokémiai hatását tanulmányozni fajtösszehasonlító kísérletben, ahogy ezt az előző alfejezetekben részletesen taglaltam. Ezen túlmenően azonban a kapott tudásra alapozva a közvetlen gyakorlati hasznosítás, innováció is részét képezte a munkának. Ehhez először is magát a fortifikációs rendszert kellett kidolgozni. Legfontosabb szempont volt, hogy jól kontrollálható, zárt rendszer legyen, mely könnyen átültethető ipari léptékűvé. A hagymahajtás több szempontból is jó választásnak tűnt. Először is a hagyma ismert szelénakkumuláló zöldségnövény. Másodsor mag a hajtás gazdaságosan megvalósítható, hiszen viszonylag kis helyen, rövid idő alatt nagy mennyiségben előállítható. Nem igényel tápanyagutánpótlást ugyanakkor környezetkímélő megoldás is.

A kísérletes munka során kapott eredményeket használtam fel a második lépcsőhöz, azaz a termékfejlesztéshez. A biomasszaprodukció eredményeket összevetve a teljes szeléntartalommal és a módosulatanalitikai eredményekkel arra jutottam, hogy 10 mg/l szelenát az optimális koncentráció. Így 10 mg/l szelenát kezelést alkalmazva állítottam elő nagyobb mennyiségben zöldhagymákat (a kísérletes munkában alkalmazott fortifikációs rendszerben) mely közvetlen friss fogyasztásra alkalmas volt.



35. ábra: Szerves szelént tartalmazó hajatott zöldhagyma

A kifejlett zöldhagymákat betakarítottam, majd vákuum alatt fagyaszttvaszárítással, azaz liofilizálással rögzítettem. A liofilizálás a legkíméletesebb szárítási eljárás, mely lehetővé teszi, hogy a növények beltartalmi értékei legkevésbé sérüljenek. Ez nagyon lényeges, mert amellet, hogy a szelénnel kezelt zöldhagymákban feldúsult a szerves szelén, ugyanakkor a növény önmaga is, mint természetes mátrix egészségvédő hatású.

A liofilizálást követően a porított mintákat a Dr. Aliment Kft kapszulázta és tanszékünkkel együttműködve létrejött a SelenAl, étrendkiegészítő termék. A SelenAl-t, mint „Szerves szelént tartalmazó, hagymából készített étrendkiegészítő kapszulát” az OÉTI engedélyezte (35. ábra). Notifikációs száma: 1859/2007.



36. ábra: Selenal, szerves szelént tartalmazó, hagymából készített étrendkiegészítő kapszula

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

5.1. Vörös elemi nanoszelén biológiai hatása dohány szövettanában szelenáttal összehasonlítva

Vörös elemi nanoszelénnel eddig csak emlősökben végeztek kísérleteket, amelyek azt mutatták, hogy akut körülmények között kevésbé toxikus, mint a szelenit vagy szelenometionin (Zhang *et al.*, 2001; Whang *et al.*, 2007). Magasabbrendű növényekben azonban eddig nem végeztek kísérletet a nanoszelén hatását illetően sem *in situ*, sem *in vitro*.

A nanoSe biológiai hatásának vizsgálatához összehasonlításképpen szelenátot alkalmaztam, mivel a növények számára könnyen felvehető szelénforma, és a szakirodalomban legismertebb.

Eredményeim azt mutatták, hogy a nanoSe-t a dohány képes felvenni és felhalmozni szövettanában.

Ami a felvételt illeti vélhetően passzívan bediffundált a vágások mentén, ill. nyitott gázcserenyílásokon át a növényi szövetekbe s ott felhalmozódott. Ugyanakkor vannak előzetes, eddig nem közölt mérési adataim intakt növényekre vonatkozólag is, melyek azt bizonyítják, hogy magvetésből származó dohány és lucerna intakt növények is képesek a nanoSe-t felvenni és felhalmozni.

A nanoSe az általam használt tartományban (0 – 100 mg/l) nem gátolta az indirekt organogenezist. Sőt nagyobb mennyiségben (50 - 100 mg/l) kifejezetten jótékony hatásának bizonyult a kontrolhoz képest, mivel gátolta a tenyészet vitrifikálódását. A nanoSe vitrifikálódást gátló hatása nagyon előnyös lehet szövettanászok számára, akiknek komoly problémát okoz a tenyészetek vizenyősödése. A jelentősége azért nagy, mivel az esetek többségében a vitrifikáció visszafordíthatatlan, s így módon a kutató veszteséget könyvelhet el. A szelenát hatása jelentősen eltért a nanoSe-től, ugyanis 50-100 mg/l koncentrációtartományban a kalluszképződés teljes hiányát tapasztaltam. A különbségek hátterében a két szelénforma eltérő kémiai sajátosságai állhatnak. A szelenát ionként könnyen bejut a szövetekbe és ott felhalmozódva toxikussá válik. A nanoS elemi formában bediffundálva közömbös a növénynek, ellenben a nanogömbök felszínéről folyamatosan alacsony koncentrációban válhatnak le vélhetően szelenit illetve szelenid ionok az egyensúlyi állapot beállásáig. Így valójában a nanoSe nem összehasonlítható a szelenáttal, vagy más ionos formával, mivel alapvetően más a viselkedésük. Amíg az ionos forma esetében lépcsőszerű a hatásmechanizmus, addig az

elemi nanoSe használatakor időben elnyújtott hatás tapasztalható a kalluszképzésben. Ennek a hipotézisnek a bizonyítása azonban jelenleg még folyamatban van.

A nagy nanoSe koncentráció a táptalajban serkentőleg hatott a gyökérképződésre is, ellenben a szelenát teljesen megakadályozta a gyökérképződést magas koncentrációtartományban. A háttérben valószínűleg, a kalluszképzéshez hasonlóan, a nanoSe-ből felszabaduló Se ionok folyamatos, alacsony koncentrációja húzódik meg. Ez a folyamat önszabályozó, mesterségesen nem reprodukálható. Amennyiben bizonyítani tudom, hogy a nanoSe pozitív hatása a gyökérképződésre általánosan jellemző a növényekre, akkor nagy jelentőséggel bírna a nehezen regenerálható fajok esetében.

Biokémiai vizsgálataim során mért trigonellinről, nikotinsavról és nikotinamidról általánosságban elmondható, hogy a nagy nanoSe koncentráció hatására emelkedett meg jelentősen koncentrációjuk. Ez azért nagy jelentőségű, mert kulcs szerepet játszanak a piridin nukleotid recyclingben. A piridin nukleotidokról ismert, hogy koncentrációjuk erős szabályozás alatt áll, mivel folyamatosan biztosítani kell a NAD pool feltöltését a NAD kofaktort igénylő reakciókhoz. A NAD pool beállítása lényeges szerepet játszhat a környezet indukálta „dinamikus” jelátvitelben, melyben a NAD és/vagy prekursorainak vagy metabolitjainak koncentrációváltozásával regálnak (*Zhang et al., 2002*). Ugyanakkor a nikotinamidról és metabolitjairól feltételezik, hogy jelátvivőként szerepet játszanak oxidatív stressz folyamatokban is (*Minorsky, 2002*).

Méréseim során különösen érdekesnek bizonyultak a MTK-ban és RGY-ben mért kimagasló trigonellin értékek 50 - 100 mg/l nanoSe tartományban, melyek összefüggésben lehetnek a vitrifikáció gátlásával és/vagy az intenzív gyökérképződéssel e két szövetkörnyezetben, mivel a trigonellin fitohormonként is ismert, bár ez a feltételezett hatás még bizonyításra szorul.

Magasabb nanoszelen és szelenát hatására egyaránt megemelkedő nikotinsav mennyisége dohány kalluszosokban és regenerált növényekben arra utal, hogy mindkét szelenforma serkenti a NAD újra termelését szintézisét, így közvetetten anyagcsere folyamatokat és a védekező rendszer működését is befolyásolja.

A nikotinamid és a nikotinsav mellett, hogy intermedier a salvage ciklusban, B3 vitaminként (niacin) ismert a szakirodalomban. Így felvetődik a lehetőség, hogy amennyiben nanoSe-nel vagy szelenáttal gazdagított funkcionális zöldséget akarnánk előállítani, azzal egyben a zöldség B3 vitamin tartalmát is növelhetnénk.

A csökkent klorofill tartalom illetve a megnövekedett nikotinsav, nikotinamid és trigonellin értékek együttesen arra mutatnak, hogy a nanoSe is beindítja a stresszválaszt biokémiai szinten, de morfológiai szinten jelentős eltéréseket mutat a szelenát által kiváltott hatásoktól.

5.2. Nátrium-szelenát biológiai hatása *in vitro* nevelt zöldségcsírákra

Zöldségnövények csíráztatásával nátrium-szelenátos közegben kettős célom volt. Egyrészt növelt szeléntartalmú, csíranövények létrehozása *in vitro* azért, hogy a módszer továbbfejlesztve használható legyen kis- és/vagy nagyüzemi körülmények között is. A szelénben gazdag zöldségcsírák kemopreventív hatását ugyanis már bizonyították (Yamanoshita, *et al.*, 2007, Abdulah *et al.*, 2009). A csírák további előnye, hogy termesztésük zárt rendszerben megvalósítható, ezáltal környezetkímélő megoldást jelenthet.

Másik célom a szelenát biológiai hatásának vizsgálata volt csíranövényekben, különös figyelmet fordítva a szelénakkumuláló és nem-akkumuláló fajok közötti különbségek összehasonlítására. Eredményeim alapján arra következtettem, hogy a nem-szelénakkumuláló fajok (úgy mint paprika) is alkalmasak szelénfelvételre, csak a toxikus tünetek alacsonyabb koncentrációban jelentkeznek, mint a szelénakkumuláló fajoknál. Mindkét csíranövény esetében enyhe stimuláló hatást tapasztaltam alacsony koncentrációban a csírázási erély illetve a biomassa produkcióban. Az ehhez társult megemelkedett antioxidáns kapacitással (nem közölt adat) együtt megerősíthető a szakirodalomban leírt szubtoxikus stimuláló hatás érvényesülése (Tamaoki *et al.*, 2008). Az eredményeket összevetve úgy tűnik, hogy 2 mg/l optimális koncentráció funkcionális zöldségcsíra előállításra szelénakkumuláló és nem-akkumuláló fajok esetében egyaránt, mivel elegendő szelén épül be a növényekbe anélkül, hogy azok fejlődését negatívan befolyásolná.

5.3. Összehasonlító biológiai hatásvizsgálat és fortifikáció lehetősége szelenáttal két zöldhagyma fajtában

E témakörben feladatom volt zárt, fortifikációs rendszer kidolgozása üvegházi körülmények között zöldségnövények szelenizálására. Ehhez a hajtattott zöldhagymát találtam alkalmasnak két okból kifolyólag. Egyrészt a hagyma közismerten szelénakkumuláló (Kopsell és Randle, 1997), másrészt a zöldhagyma hajtattása viszonylag rövid időt vesz igénybe (kb. 3 hét). A talaj nélküli perlites rendszer

megfelelőnek bizonyult, mivel így ki tudtam küszöbölni a talaj sajátosságából adódó zavaró tényezőket. Ugyanakkor zárt rendszer révén a környezet szelénszennyezése csökkenthető.

Növénybiológiai szempontból elsősorban azt vizsgáltam van-e különbség a szelenát toleranciában, ill. a biológiai hatásban egy fajon belül az egyes fajták között. Saját eredményeim azt bizonyították, hogy van, hiszen Makói lila hagymában nem okoztak szignifikáns változást az alkalmazott szelenát kezelések (0 - 10 mg/l) a tömeggyarapodást és növekedést vizsgálva. Ezzel szemben Makói bronz fajta érzékenyebben reagált a szelenát kezelésre. A 10 mg/l ugyan nem csökkentette szignifikánsan a tömeggyarapodást, de a hosszirányú növekedést igen, így a zöldhagymák vastkosabbak lettek. A morfológiai szinten tapasztalt eltéréseket biokémiai méréseim közötti különbségek tovább erősítették. Makói lila esetében ugyanis sem az ACW-ben sem az ACL-ben nem tapasztaltam szignifikáns eltérést, vagyis nem volt kimutatható mértékű stresszhatás, amit láthattam volna az antioxidáns sűrűség változásában. Ezen eredményeimet erősíti a külön mért glutation-peroxidáz adatok is, hiszen ott sem volt szignifikáns különbség az egyes kezelések között. Csak a klorofill tartalomban volt mérhető csökkenés 10 mg/l kezelésnél, aminek oka az lehet, hogy a növények klorofill mennyiségbeli változása az első jelek közé tartozik, ha a növényt stresszhatás éri. Így valószínűleg ≥ 10 mg/l szelenát kezelésnél már látható lenne a gátló hatás mind külső megjelenésben, mind biokémiai szinten. Makói lilával szemben Makói bronz fajtában az ACW-t szignifikánsan csökkenette 10 mg/l kezelés, a glutation-peroxidáz enzimrendszer pedig még érzékenyebben reagált, hiszen ott már 2 mg/l is szignifikáns visszaesést eredményezett az aktivitásban. Ezzel szemben a zsíroldékony összes antioxidáns sűrűségre serkentő hatással volt 5 - 10mg/l szelenát. E koncentrációtartományban jelentősen megnőtt a klorofill A és B tartalom is. Mivel a klorofill is zsíroldékony vegyületcsoport így feltételezhető, hogy részben nekik köszönhető a magasabb ACL értékek.

A módosulatanalitikai vizsgálatokban is lényeges eltéréseket láttam. Makói bronz esetében nagyobb arányban alakult át a szelenát szerves formákba, mint Makói lila esetében. Ráadásul Makói bronz zöldhagymában megjelent két olyan, egyelőre ismeretlen csúcs is, amely a Makói lilában egyáltalán nem. Így elmondható, hogy a szelenát más szelénvegyületekké átalakulása nemcsak fajoknál mutat eltérést, de fajon belül fajtánként is.

Összességében látható, hogy a szelenátra adott válaszban lényeges különbségek tapasztalhatóak biológiai-; fiziológiai-; biokémiai-; kémiai szinten egyaránt nemcsak az egyes fajok között, de azon belül, a fajták között is. Ez lényeges ismeret lehet amennyiben zöldségnövények szeléndúsítása a cél.

6. ÚJ ÉS ÚJSZERŰ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

6.1. A vörös elemi nanoszelén biológiai hatását elsőként vizsgáltam magasabbrendű növényekben.

- A kísérlet során megállapítottam, hogy a nátrium-szelenáttól eltérően a vörös elemi nanoszelén partikulumok nagyobb koncentrációban (50 - 100 mg/l) *in vitro* szövettenyészetbe bejutva organogenezist serkentő hatásúak és gátolják a vitrifikáció kialakulását, dohány modellen.
- Biokémiai vizsgálatokkal (klorofill A és B tartalom, nikotinsav, nikotinamid, trigonellin koncentrációváltozás) igazoltam, hogy a nanoSe is stresszindukáló hatású, hasonlóan a szelenáthoz, de enyhébb védekező reakciókat vált ki, ami morfológiai szinten organogenezis, ill. gyökérképződés stimuláló hatásban manifesztálódik.

6.2. *In vitro* nevelt zöldségcsírák vizsgálata megerősítette a szakirodalmi leírásokat, miszerint a szelénakkumuláló növények mellett a nem-szelénakkumuláló fajok (úgy mint paprika) is alkalmasak szelénfelvételre, csak a toxikus tünetek alacsonyabb szelénát koncentrációnál jelentkeznek, mint a szelénakkumuláló fajoknál.

6.3. Zöldhagyma fajtákkal végzett összehasonlító kísérlet során szeléndúsításra alkalmas zárt, fortifikációs rendszert dolgoztam ki üvegházi körülmények között.

- Makói bronz és Makói lila fajtákat összehasonlítva kiderült, hogy szeléntoleranciát tekintve nemcsak az egyes fajok között, de azon belül, a fajták között is lényeges eltérések lehetnek. Makói bronz érzékenyebbnek bizonyult a szelenáttal szemben, mint a Makói lila. Ez nyomon követhető volt morfológiai szinten a növekedés gátlásában (10 mg/l-nél), míg biokémiai szinten a klorofill tartalom, glutation-peroxidáz aktivitás, és teljes antioxidáns sűrűség változásában egyaránt.
- Makói bronzban nagyobb arányban alakult át a szelénát szerves formákba, mint Makói lila esetében. Ráadásul Makói bronz zöldhagymában megjelent két ismeretlen szelénforma, amely a Makói lilában egyáltalán nem, így azok fajta jelleget képviseltek.
- Kísérletes munkám eredményeit hasznosítva 10 mg/l szelenáttal kezelt zöldhagymából a Dr. Aliment Kft-vel együttműködve „Szerves szelént tartalmazó, hagymából készített étrendkiegészítő kapszulát” hoztunk létre, SelenAl néven, amit az OÉTI engedélyezett. Notifikációs száma: 1859/2007.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A szelén a legintenzívebben kutatott mikroelemek közé tartozik napjainkban. A nagy érdeklődés annak köszönhető, hogy bebizonyosodott esszenciális volta magassabbrendű állatokban, és az emberben is. Magasabbrendű növényekben azonban eddig nem bizonyították létfontosságú szerepét, bár pozitív hatását sok esetben tapasztalták alacsony koncentrációtartományban módosulatoktól függően.

Az emberi szervezet szelénszükségletét elsősorban táplálékból fedezi. Napjainkban azonban számos országban küzdenek az alacsony szelénbevitellel a változó táplálkozási szokások, illetve a természetes növényi és állati táplálékforrások csökkenő szelén tartalma miatt. Emiatt a megfelelő szelénpótlás kihívást jelent. Ugyanakkor a Föld más területein a talajok, vizek magas szeléntartalma jelenti a problémát.

Ezen tényekhez igazodva munkahipotézisemet két szemszögből közelítettem meg. Növényi aspektusból közelítve kísérletes munkám középpontjában a szelén (szelenát illetve elemi nanoszelén formákat alkalmazva) biológiai hatásának vizsgálata állt dohánymodell-, illetve zöldségnövények bevonásával, különös tekintettel a szövettényeszetrekre. Humán szempontból közelítve fortifikációs rendszer kidolgozása volt a célom szelénrel dúsított, funkcionális zöldségnövények előállítására tartózkodva a környezet túlzott szelénszennyezésétől.

A szelén biológiai hatását vizsgálva egy, növényekben eddig nem vizsgált szelénformára, a vörös elemi nanoszelénre fókuszáltam szövettényeszeten. A kísérleteket dohány kallusztényeszeten és a mikrohajtásokból regenerálódó növényekben végeztem. Összehasonlításként nátrium-szelenátot alkalmaztam. Eredményeim alapján megállapítottam, hogy a vörös elemi nanoszelén partikulumok képesek bejutni a dohányba *in vitro* szövettényeszeten. A nanoSe túlnyomó része változatlan formában halmozódott fel a kalluszban. Regenerálódó növényekben főként a gyökérrészben akkumulálódott, ahol extrém magas értékeket tudtam kimutatni. Ezzel szemben a hajtásrészben szelenát fokozott felhalmozódását tapasztaltam. A kalluszon át indirekt organogenezissel képződő mikrohajtások fejlődését a táptalajban lévő nagy mennyiségű nanoSe (50-100 mg/l) serkentette. A képződő mikrohajtások jellemzően szabályos formájúak voltak normál szöveti szerkezettel, vitrifikáció megjelenése nélkül. Ellenben kontrol táptalajon az újonnan fejlődő mikrohajtások jó része abnormális alakú volt, vizenyős áttetsző szöveti szerkezetük vitrifikációra utalt. A nanoSe-nel ellentétben 50-100 mg/l szelenát már meggátolta a kalluszképződést. Az átoltott

hajtástenyészetekre is jellemző volt ez a tendencia: ≥ 50 mg/l szelenát teljesen megakadályozta a gyökérképződést, a hajtások egy ideig vegetáltak, majd elpusztultak. Ezzel szemben a magas nanoSe tartalom (50-100 mg/l) kifejezetten segítette a gyökérképződés megindulását és a biomasszaprodukciót is. A szelenát és a nanoSe közötti biológiai hatásban tapasztalt különbség a két szelénforma kémiai természetéből adódhat. A nanoSe gömbök bediffundálva az apoplastba, ott elemi formában indifferensek maradtak a növény számára. A vizes közegben azonban nagyon lassan ionok válhatnak le felszínükről folyamatos alacsony koncentrációt biztosítva. Ezt közvetlen ionos szelénforma, jelen esetben szelenát alkalmazásával nem lehet megvalósítani. A szelenát koncentrációja ugyanis adott a táptalajban, amit a növény egy lépésben (ami természetesen nem egy időpillanatot jelent) vesz fel. Így a magas (50-100 mg/l) szelenát koncentrációjú táptalajból hirtelen felvett ionok nagy mennyisége toxikus volt a növénynek.

Azt, hogy a nanoSe felszínéről leváló szelénionok alacsony folyamatos koncentrációja váltotta ki a pozitív hatásokat dohány szövettenyészetben alátámasztotta az is, hogy a szelenáthoz hasonlóan a nanoSe is stresszválaszt indukált. A trigonellin, nikotinsav, nikotinamid ismertek, mint szignál molekulák oxidatív stresszválaszban, ezért megnövekedett mennyiségükből következtettem a stresszhatás kiváltására. A két szelénforma által kiváltott stresszválaszt kalluszban mért klorofilltartalom csökkenések is igazolták, hiszen közismert, hogy a kloroplasztokban zajló klorofillsszintézis érzékenyen reagál a növényt ért stresszhatásokra.

A morfogenetikai és a biokémiai változásokat összevetve úgy tűnik, hogy a nanoSe ún. **eustresszt**, azaz a növények számára gyenge, stimulatív hatású stresszt idéz elő még akkor is ha nagy mennyiségben van a tápközegben. Ezzel szemben a szelenát magas koncentrációtartományban ún. **distresszt**, azaz gátló hatású stresszt vált ki.

Zöldségnövényeken végzett vizsgálataim kéttős célt szolgáltak, ahogy korábban már említettem. Egyrészt a szelenát növényekre gyakorolt biológiai hatását tanulmányoztam. Másrészt a fortifikáció lehetőségét kerestem szelénnel dúsított funkcionális zöldségnövények előállítására zárt rendszerekben.

A zöldségcsírák, mint zárt rendszerben nevelt zöldségnövények elsősorban kínálkoztak fortifikációs lehetőségként. Retek illetve paprikacsírákon végzett kísérleteim megerősítették a szakirodalomban leírt szelénakkumuláló és nemakkumuláló növényfajok közötti különbségek létezését. A szelénakkumuláló retekmagban nagyságrenddel nagyobb szeléntartalmat lehetett mérni, mint paprikamagban. Tovább

erősítette ezt a tényt, hogy csírázás során 200 mg/l szelenát teljesen meggátolta a paprika csírázását. A retek magvak azonban ugyanezen koncentrációnál kicsíráztak, bár a toxikus hatás nyomon követhető volt a kontrolhoz képest visszafogott növekedésükkel és az antociánosodás megjelenésével. A csíranövények biomasszaprodukciójában is érzékelhető volt a két faj szelénakkumulóképeségbeli különbsége. A retek csíranövények tömegét szignifikánsan növelte a 2 mg/l szelenát koncentráció, a paprika esetében azonban csak kis mértékű növekedést realizáltunk. Ezzel együtt a táptalaj növekvő koncentrációja a paprika fejlődését fokozottabban visszafogta, mint retekét. A két faj közötti eltérések mellett hasonlóságot is találtam: mind a retek-, mind a paprikacsíra felvette a táptalajból a szelenátot és azt nagyobb részt a gyökérben, kisebb részt a hajtásban halmozták fel.

A szelenát növényekre gyakorolt biológiai hatását tanulmányoztam Makói bronz és Makói lila zöldhagyma fajtákon is üvegházi körülmények között. Talaj nélküli, zárt fortifikációs rendszert próbáltam meg kidolgozni, mely jól kontrollálható. Az itt felnevelt zöldhagymák vizsgálataival megerősítettem azt a tényt, hogy a többi szelénakkumuláló hagymaféléhez hasonlóan, a Makói bronz és Makói lila fajtákból nevelt zöldhagymák is jól tolerálják a tápközeg megnövelt szeléntartalmát. A felvett szelenát kis részét beépítették szerves formákba, jelentős mennyiség maradt meg azonban változatlan formában. A zöldhagymák a megnövekedett szelénáttal szembeni válasza morfológiai, s ezzel együtt biokémiai szinten, egy fajon belül fajtánként is lényeges eltéréseket mutattak. Az alkalmazott szelénformával szemben Makói bronz érzékenyebbnek bizonyult, mint a Makói lila fajta: 10 mg/l szelenát visszafogta a Makói bronz hossznövekedést, csakúgy, mint a vízőldékony antioxidánsok mennyiségét és a glutation-peroxidáz aktivitást. Ugyanakkor ez a koncentráció (már 5mg/l is) megnövelte a zsíróldékony antioxidánsok, valamint a klorofill A és B mennyiségét.

Három részkísérletemet együttesen vizsgálva elmondható, hogy a szelénnel kapcsolatos vizsgálatokban növényi vonatkozásban nagyon fontos az alkalmazott szelénmódosulat, ill. a növények beazonosítása faj alatti szinteken is, hiszen nagy különbségeket lehetnek.

8. SUMMARY

Selenium is an essential element for humans, animals and some species of microorganisms. Biological function of selenium shows dual characteristics because of content range between toxic and deficient concentration is very narrow. Against of animals, the essentiality of selenium hasn't been demonstrated in Higher plants yet, however it was shown positive biological effect of the low concentration in some cases. Nowadays, the low selenium supply is serious problem in many countries which ensues from the changing dietary habits and/or the decreasing selenium content of food sources. On the other hand, there are vast parts of the World where the toxic levels of selenium in soils or waters cause troubles.

Basis of these facts the purpose was dual: from plant aspect the aim was to study the biological effect of selenium (used by selenate and red elemental nanoselenium species) in tobacco model and vegetable plants, particularly to tissue cultures. From human aspect the main goal was to elaborate environmentally fortification system to produce selenium-enriched vegetables.

In first part of the experimental work was focused the biological effect of red nano-size elemental selenium (nanoSe) which has not been tested in higher plants so far.

The uptake, accumulation and biological effect of red nano-sized elemental selenium (nanoSe) were investigated in comparison with selenate in tobacco tissue culture. The experimental datas clearly indicated that red nanoSe could get into callus cultures and into rooted regenerated tobacco plantlets. The roots of regenerated plantlets accumulated the selenium in extremely high amount (1237 ± 42 mg/kg and 2947 ± 99 mg/kg) using by 50 and 100 mg l⁻¹ nanoSe in the medium. The biological effects of nanoSe were different from that of ionic forms of selenium in plant tissue culture. NanoSe (50-100 mg l⁻¹) stimulated the organogenesis and the growth of root system significantly while the selenate did not show these effects in any of its concentrations, but inhibited both of callus growth and root regeneration in higher concentrations (50-100 mg l⁻¹). The differences between biological effects of two selenium forms come from their chemical nature. Determining the intracellular availability of ionic selenium, the evenly distributed elemental nanoSe particles gradually released ions to provide steady very low concentration of ionic Se in tissues. Whereas, when the biological active ionic form was added stepwise, the steady state low concentration levels could not be generated, because Se-aminoacids formed in the plant which depleted the free

selenate, which in this case was not replaced by the gradual release of ionic selenium from the particles. This stepwise addition therefore did not allow the manifestation of long-term low-level ionic selenium effects, only the toxicity of higher concentrations covering up the low concentration effects.

The trigonelline, nicotinamide and nicotinic acid are signal molecules in oxidative stress response, therefore the increasing amount of them in treated (both by nanoSe or selenate) tissue cultures referred to presence of stress. Furthermore, the decreasing of chlorophyll content in calli proved the effect of stress in each applied selenium forms.

In the second part of experimental work, the vegetable sprouts were examined as a good fortification possibility. At the same time it was investigated the difference between selenium accumulator and nonaccumulator plant species. As expected, it was found that the selenium accumulator radish seedling more tolerant the increasing selenate concentrations in the medium than the nonaccumulator pepper seedling. However, both of them are suitable to produce selenium-enriched sprouts using 2 mg/l selenate in the medium. This concentration increased the total selenium amount in sprouts without any toxic symptoms.

The main goal of third part of experimental work was to elaborate closed, environmentally friendly fortification system in greenhouse environment to compare the selenium tolerance of two onion cultivars. The advantage of this fortification system is that perlite was used instead of soil to eliminate the distractions which come from soil characteristics. To produce spring onion from mother onion is quite simply method and it requires just short time. The results could be proven that there are differences in selenium tolerance not only between plant species but also within species between cultivars. Makói bronz was more sensitive because 10 mg/l selenate inhibited the shoot elongation significantly, at the same time this concentration didn't cause any toxic symptoms in Makói lila.

The ACW, ACL and glutathione-peroxidase activity measurement confirmed the morphological experiences, ≤ 10 mg/l selenate didn't influence these biochemical parameters of Makói lila. However, ACW and glutathione-peroxidase activity were decreased in case of Makói bronz and the ACL as well as chlorophyll content were influenced positively.

The speciation analytics measurements also showed differences between onion cultivars. The rate of organic selenium forms was higher in Makói bronz than Makói

lila. Moreover, there were two unknown selenium species only in Makói bronz. It seemed these as characteristics of this cultivar.

To utilize the experimental results it was developed a diet supplement product. The SelenAl is a capsule from spring onion which contains organic selenium species.

9. SZAKIRODALMI JEGYZÉK

1. Abdulah, R., Farjed, A., Kobayashi, K., Yamazaki, C., Suradi, E.W., Ito, K., Suzuki, K., Murakami., Kuwano, H., Koyama, H.: 2009. Selenium enrichment of broccoli sprout extract increases chemosensitivity and apoptosis of LNCaP prostate cancer cells *BMC Cancer* 9: 414-426
2. Abrams, M.M., Burau, R.G., Zazoski, R.J.: 1990a. Organic selenium distribution in selected california soils. *Soil Sci. Soc. Am. J* 54: 979-982
3. Abrams, M.M., Shennan, C., Zazoski, J., Burau, R.G.: 1990b. Selenomethionine uptake by wheat seedlings. *Agron. J.* 82:1127-1130
4. Akbulut, M., Cakir, S.: 2010. The effect of Se phytotoxicity on the antioxidant systems of leaf tissues in barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings *Plant Physiol. Biochem.* 48: 160-166
5. Apak, R., Güclü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Celik, S.E., Bektasoglu, B., Berker, K.I., Özyurt, D.: 2007. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay *Molecules* 12: 1496-1547
6. Aro, A., Kumpulainen, J., Alfthan G., Voshchenko, A.V., Ivanov, V.N.: (1994): Factors affecting the selenium intake of people in transbaikalian *Russian Biol. Trace Element Res.* 40: 277–285.
7. Arthur, J.R., Nicol, F., Beckett, J.: 1990. Hepatic iodothyronine deiodinase: the role of selenium. *Biochem. J.* 272: 537-540
8. Ashfield-Watt, P.A.L., Moat, S.J., Doshi, S.N., McDowell, I.F.W.: 2001. Folate homocysteine, endothelial function and cardiovascular disease. What is the link?. *Biomed Pharmacother* 55: 425–433
9. Ashihara, H.: 2006. Metabolism of alkaloids in coffee plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18, 1-8.
10. Banuelos, G.S., Lin, Z.Q.: 2005. Phytoremediation management of selenium-laden drainage sediments in the San Luis Drain: a greenhouse feasibility study. *Ecotox. Environ. Safet.* 62: 309-316
11. Batárióvá, A., Cerná, M., Speacková, V., Cejchanová, B.B., Smíd.J.: 2005. Whole blood selenium content in healthy adults in the Czech Republic *Sci. Tot. Env.* 338: 183-188

12. Baum, M.K., Shor-Posner, G., Lai, S., Zhang, G., Lai, H., Fletcher, M.A., Sauberlich, H., Page, J.B.: 1997. High risk of HIV-related mortality is associated with selenium deficiency. *J. Acq. Imm. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 15:370-374
13. Beath, O.A.: 1937. The occurrence of selenium and seleniferous vegetation in Wyoming. II. Seleniferous vegetation. *Wyoming Agric.Exper.Stn.Bull.* 221:29-64
14. Beck, M. Shi, Q. Morris, V. Levander, O.: 1995. Rapid genomic evolution of a non-virulent Cocksackie virus B3 in selenium deficient mice results in selection of identical isolates. *Nature.* 1: 433–441.
15. Behne, D., Kyriakopoulos. A., Kalcklosch, M., Weiss-Nowak, C., Pfeifer, H., Gessner, H. and Hammel, C.: 1997. Two new selenoproteins found in the prostatic glandular epithelium and in the spermatid nuclei. *Biomed. Environ. Sci.* 10: 340-345
16. Behne, D., Kyriakopoulos, A., Scheid, S., Gessner, H.: 1991. Effects of chemical form and dosage on the incorporation of selenium into tissue proteins in rats. *Journal of Nutrition*, 121(6), 806-814.
17. Bell, G.J., Cowey, C.B.: 1989. Digestibility and bioavailability of dietary selenium from fishmeal, selenite, selenomethionine and selenocystine in Atlantic salmon (*Salmo salar*) *Aquaculture* 81: 61-68
18. Bell, P.F., Parker, D.R., Page, A.L.: 1992. Contrasting selenate sulfate interactions in selenium-accumulating and nonaccumulating plant species. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 56: 1818-1824
19. Berglund, T., Kalbin, G., Strid, A., Rydtröm, J., Ohlsson, A.B.: 1996. UV-B and oxidative stress-induced increase in nicotinamide and trigonelline and inhibition of defensive metabolism induction by poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor in plant tissue. *FEBS Letters* 380: 188-193
20. Berry, M.J., Banu, L., Larsen, P.R.: 1991. Type I. iodothyronine deiodonase is a selenocysteine-containing enzyme. *Nature* 349: 438 - 440
21. Birringer, M., Pilawa, S. Flohé, L.: 2002. Trends in selenium biochemistry. *Nat. Prod. Rep.*, 19, 693-718
22. Bombik, T., Bombik, E., Górsik, k., Rymuza, K., Saba, L.: 2010. selenium content in feed and cows' blood serum in the Central-Eastern Poland Bull. *Vet Inst. Pulawy* 54: 273-276
23. Bratakos, M.S., Ioannou, P.V.: 1989. The regional distribution of selenium in Greek cereals. *Sci. Tot. Environ.* 84: 237-247

24. Brody, T.: 1994. *Nutrit. Biochem. Academic Press, Inc.* New York, NY
25. Brown, K.M., Arthur, J.R.: 2001. Selenium, selenoproteins and human health: review *Public Health Nutr.* 4: 593-599
26. Broyer, T.C., Huston, R.P., Johnson, C.M.: 1972. Selenium and nutrition of *Astragalus* 1. Effect of selenite or selenate supply on growth and selenium content. *Plant Soil* 36: 635-649
27. Brunell, J.N.: 1981. Selenium metabolism in *Neptunia amplexicaulis*. *Plant Physiol.* 67: 316-324
28. Burk, R.F. and Hill, K.A.E.: 1994. Selenoprotein P. a selenium-rich extracellular Glycoprotein1 *J. Nutr.* 124: 1891-1897
29. Cabanero, A.I., Madrid, Y., Camara, C.: 2004. Selenium and mercury bioaccessibility in fish samples: an in vitro digestion method *Analytica Chimica Acta* 526: 51-61
30. Carlson, C.L., Kaplan, D.I., Adriano, D.C.: 1989. Effects of selenium on germination and radicle elongation of selected agronomic species *Environ. Experiment. Bot.* 29: 493-498
31. Cartes, P., Gianfreda, L., Mora, M.L.: 2005. Uptake of selenium and its antioxidant activity in ryegrass when applied as selenate and selenite forms *Plant and Soil* 276: 359-367
32. Chanonine, J.P., Compagnone, N.A., Wong, A.C., Mellon, S.H.: 2001. Modulation of steroidogenesis by selenium in a novel adrenal cell line developed using targeted tumorigenesis *Biofactors* 14: 229-238
33. Chern, C.L., Huang, R..F.S., Chen, J.T., Cheng, T.Z.L.: 2001. Folate deficiency induced oxidative stress and apoptosis are mediated via homocysteine-dependent overproduction of hydrogen peroxide and enhanced activation of NF- κ B in human Hep G2 cells. *Biomed. Pharmacother.* 55: 434-442.
34. Chiu, D.T.Y., Stults, F.H., Tappel, A.L.: 1976. Purification and properties of rat lung soluble glutathione peroxidase. *Biochem. Biophys. Acta* 445: 558-566
35. Chu, J., Yao, X., Zhang, Z.: 2009. Responses of wheat seedlings to exogenous selenium supply under cold stress *Biol.Trace El. Res.* 136: 355-363
36. Clairmont, K.B., Hagar, W.G., Davis, E.A.: 1986. Manganese toxicity to chlorophyll synthesis in tobacco callus. *Plant Physiology*, 80, 291-293.
37. Cong, L., Xiaolin, N., Xiangke, M., Jin, W.: 2011. Is selenium deficiency really the cause of Keshan disease? *Enviroment. Geochem. Health* 33: 183-188

38. Cuvardic, M.S.: 2003. Selenium in soil. *Proceed. Natur. Sci.* 104: 23-37
39. Cser, Á., Sziklai-László, I.: 1998. A szelén szerepe a humán medicinában. A Szelén Szerepe A Környezetben És Egészségvédelemben Konferencia, Budapest, Hungary. 33-43
40. De Man, J.D., Rogosa, M., Sharpe, M.E.. 1960. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bact.* 23: 130-135
41. Dernovics, M., Stefánka, Zs., Fodor, P. (2002). Improving selenium extraction by sequential enzymatic processes for Se-speciation of selenium-enriched *Agaricus bisporus*. *Anal. Bioanal. Chem.* 372 : 473-480
42. De Souza, M.P., Lytle, C.M., Mulholland, M.M., Otte, M.L., Terry, N.: 2000. Selenium assimilation and volatilization from dimethylselenoniopropionate by Indian mustard. *Plant Physiol.* 122:1281-1288
43. Dhillon, K.S. - Dhillon, S.K.: 2009. Accumulation and distribution of selenium in some vegetable crops grown in selenate-Se treated clay loam soil. *Front. Agric. China.* 3: 366 - 373
44. Dhillon, K.S.- Dhillon, S.K.: 1991. Selenium toxicity in soils, plants and animals in some parts of Punjab, India. *Inter. J. Env. Stud.* 37: 15-24
45. Djanaguiraman, M., Durga Devi, D., Shanker, A.K., Sheeba, A., Bangarusamy, U.: 2005. Selenium – an antioxidative protectant in soybean during senescence *Plant Soil* 272: 77-86
46. Duffield, A.J., Thomson, C.D., Hill, K.E., Williams, S.. 1999. An estimation of selenium requirements for New Zealanders *Am. J. Clin. Nutr.* 70: 896-903
47. Dumont, E., Vanhaecke, F., Cornelis, R.: 2006. Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review *Anal. Bioanal. Chem.* 385: 1304-1323
48. Edens, F.W.: 2001. Involvement of Sel-Plex in Physiological stability and performance of broiler chickens. *Science and Technology in the Feed Industry Proceeding's of Alltech's 17th Annual Symposium* pp.349-376
49. Elless, M.P., Blaylock, M. J., Huang, J.W., Gussman, C.D.: 2000. Plants as a natural source of concentrated mineral nutritional supplements *Food Chemistry* 71:181-188
50. Ellis, D.R. - Salt, D.E.: 2003. Plants, selenium and human health *Current Opinion in Plant Biology* 6:273-279
51. Elmore, H.W., Webb, D., Ripley, B., White, A.R.: 1989. Effects of sodium-selenite on the growth of bracken fern root callus *Annals of Bot.* 64: 289-291

52. Eshdat, Y., Holland, D., Faltin, Z., Ben-Hayyim, G.: 1997. Plant glutathione peroxidases *Physiol. Plant.* 100: 234-240
53. Evens, C.D., Asher, A.J., Johnson, C.M.: 1968. Isolation of dimethyldiselenide and other volatile selenium compounds from *Astragalus racemosus* *Aust. J. Biol. Sci.* 21: 13-20
54. Fairweather-Tait, S.J.: 1997. Bioavailability of selenium *Eur. J. Clin. Nutr.* 51: 20-23
55. Fairweather-Tait, S.J., Collings, R., Hurst, R.: 2010. Selenium bioavailability: current and future research requirements *Am. J. Clin. Nutr.* 91: 1484-1491
56. FDA.: 2000. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. In, National Academy of Sciences, www.fda.gov/fdac/special/foodlabel/rditabl.html.
57. Fekete, S.: 1998. A szelén és E vitamin élettani és kórtani szerepe az állattenyésztésben és egészségügyben *Magyar Állatorvosok Lapja* 3: 165-169
58. Filek, M., Gzyl-Malcher, B., Zembala, M., Bednarska, E., Laggner, P., Kriechbaum, M.: 2010. Effect of selenium on characteristics of rape chloroplasts modified by cadmium *J. Plant Physiol.* 167: 28-33
59. Finkel, T. - Holbrook, N.J.: 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 408: 239–247
60. Finley J. W., Ip C., Lisk D. J., Davis C. D., Hintze K., Whanger P. D.: 2001. Investigations on the cancer protective properties of high selenium broccoli. *J. Agric. Food Chem.* 49: 2679-2683
61. Fisinin, V.I., Papazyan, T.T., Surai, P.F.: 2008. Producing specialist poultry products to meet human nutrition requirements: Selenium enriched eggs. *World's Poultry Sci. J.* 64: 85-98
62. Fleming, G.A.: 1962. Selenium in Irish soils and plant. *Soil Science* 91: 28-35
63. Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J.H.F., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M.A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J.D.G., Davies, J.M., Dolan, L.: 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell *Nature* 422: 442-446
64. Freeman, J.L., Hong Zang, L., Marcus, M.A., Fakra, S., McGrath, S.P., Pilon-Smith, E.A.H.: 2006. Spatial imaging, speciation, and quantification of selenium in the hyperaccumulator plants *Astragalus bisulcatus* and *Stanleya pinnata*. *Plant Physiol.* 142:124-134

65. Freeman, J.L., Lindblom, S.D., Quin, C.F., Fakra, S., Marcus, M.A., Pilon-Smits, E.A.H.: 2007. Selenium accumulation protects plants from herbivory by Orthoptera via toxicity and deterrence *New Phytol.* 175: 490-500
66. Galeas, M.L., Zhang, L.H., Freeman, J.L., Wegner, M., Pilon-Smith, E.A.H.: 2007. Seasonal fluctuations of selenium and sulphur accumulation in selenium hyperaccumulators and related nonaccumulators. *New Phytol.* 173: 517-525
67. Gan, S. és Amasino, R. M.: 1997. Making sense of senescence *Plant Physiol.* 113: 313-319
68. Ganther, H.E.: 1986. Pathways of selenium metabolism including respiratory excretory products. *J. Am. Coll. Toxicol.* 5: 1-5
69. Garbisu, C., Gonzalez, S., Yang, W.H., Yee, B.C., Carlson, D.L., Yee, A., Smith, N.R., Otero, R., Buchanan, B.B., Leighton, T.: 1995. Physiological mechanisms regulating the conversion of selenite to elemental selenium by *Bacillus subtilis* *Biofactors* 5: 29-37
70. Gattow, G., and G. Heinrich.: 1964. Thermochemistry of selenium. II. Conversions of crystalline selenium modifications. III. Conversion of amorphous selenium modifications. *Z. Anorg. Allg. Chem.* 331: 256-288
71. Geering, H. R., Cary, E. E.; Jones, L. H. P.; Allaway, W. H.: 1968. Solubility and redox criteria for the possible forms of selenium in soils. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 32: 35-40.
72. Gergely V.: 2006. Fehérje-elválasztási módszerek bevezetése a szelén módosulatanalitikába *PhD disszertáció* 22.
73. Gill, S.S., Tuteja, N.: 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Phys. Biochem.* 48: 909-930
74. Girling, C.A.: 1984. Selenium in agriculture and the environment *Argic. Ecosys. Environ.* 11: 37-65
75. Gissel-Nielsen, G., Bisbjerg, B.: 1970. The uptake of applied selenium by agricultural plants *Plant Soil* 32: 382-396
76. Gladyshev, V.N., Hatfield, D.L.: 1999. Selenocysteine-containing proteins in mammals *J. Biomed. Sci.* 6: 151-160
77. Gladyshev, V.N., Jeang, K.T., Wootton, J.C. and Hatfield, D.L.: 1998. A new human selenium-containing protein: Purification, characterisation and cDNA sequence. *J. Biol. Chem.* 273: 8910-8915

78. Gomes-Junior, R.A., Gratao, P.L., Gaziola, S.A., Mazzafera, P., Lea, P.J., Azevedo, R.A.: 2007. Selenium-induced oxidative stress in coffee cell suspension cultures *Funct. Plant Biol.* 34: 449-456
79. Gronbaek, H., Thorlacius-Ussing, O.: 1992. Selenium in the central nervous system of rats exposed to 75-Se selenomethionine and sodium selenite. *Biol. Trace Elem. Res.* 35: 119-127
80. Hama, H., Yamanoshita, O., Chiba, M., Takeda, I., Nakajima, T.: 2008. Selenium-enriched Japanese radish sprouts influence glutathione- peroxidase and glutathione S-transferase in a n organ-specific manner in rats *J. Occup. Health* 50: 147-154
81. Hansen, D., Duda, P., Zayed, A.M., Terry, N. (1998): Selenium removal by constructed wetlands: role of biological volatilization. *Enviromental Science and Tecnology* 32:591-597
82. Hanson, B., Garifullina, G.F., Lindblom, S.D., Wangeline, A., Ackley, A., Kramer, K., Norton, A.P., Lwarence, C.B., Pilon-Smits, E.A.H.: 2003. Selenium accumulation protects Brassica juncea from intervertebrate herbivory and fungal infection *New Phytologist* 159: 461-469
83. Hanson, B., Lindblom, S.D., Loeffler, M.L., Pilon-Smits, E.A.H.: 2004. Selenium protects plants from phloem-feeding aphids due to both deterrence and toxicity *New Phytologist* 162: 655-662
84. Hartikainen, H., Ekholm, P., Piironen, V., Xue, T., Koivu, T., Yli-Halla, M.: 1997. Quality of ryegrass and lettuce yields as affected by selenium fertilization. *Agric. Food Sci. Finland.* 6. 381-387
85. Hartikinen, H., Xue, T., Piironen, V.: 2000. Selenium as an antioxidant and pro-oxidant in ryegrass *Plant and Soil* 225: 193-200
86. Hartill, M.: 2004. Geographic distribution of geologically bioavailable selenium: correlations with health and disease *Denver Annual Meeting.* 46
87. Hartman, T.J., Albanes, D., Pietinen, P., Hartman, A.M., Rauthalahti, M.U., Tangrea, J.A.: 1998. The association between baseline vitamine E, selenium and prostate cancer in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study. *Canc. Epidem. Biomark. Prevent.* 7: 335 - 340
88. Hatfield, D.L., Choi, I.S., Mischek, S., Owens, L.D.: 1992. Selenocysteine-tRNAs recognize UGA in *Beta vulgaris*, a higher plant and in *Gilocladium virens*, a filamentous fungus *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184: 254-259

89. Haug, A. Graham, R.D., Christophersen, O.A., Lyons, G.H.: 2007. How to use the world's scarce selenium resources efficiently to increase the selenium concentration in food. *Microb. Ecol. Health Dis.* 19: 209-228
90. Hawkesford, M.J.: 2005. Sulphur. In: Broadly M.R., White P.J. eds. *Plant nutritional genomics*. Oxford: Blackwell, 87-111
91. Hendry, G.A.F. - Price, A.H.: 1993. Stress Indicators: Chlorophylls and carotenoids. In: *Methods in Comparative Plant Ecology*, Hendry, G.A.F. and Grime, J.P. (Eds.). Chapman and Hall, UK., 148-152
92. Hogue, D.E., Proctor, J.F., Warner, R.G. and Loosli, J.K.: 1962. Relation of selenium, vitamin E and an unidentified factor to muscular dystrophy (stiff-lamb or white muscle disease) in the lamb *J. Anim. Sci.* 21:25-29
93. Hopper, J.L., Parker, D.: 1999. Plant availability of selenite and selenate as influenced by the competing ions phosphate and sulfate. *Plant Soil.* 210:199-207
94. Huang, B., Zhang, J., Hou, J., Chen, C.: 2003. Free radical scavenging efficiency of nano-Se *in vitro* *Free Rad. Biol. Med.* 35: 805-813
95. Hurd-Karrer, A.M.: 1935. Factors affecting the absorption of selenium from soils by plants *J. Agr. Res.* 50: 413-427
96. Ip, C. - Lisk, D.J.: 1994a. Characterization of tissue selenium profiles and anticarcinogenic responses in rats fed natural sources of selenium-rich products. *Carcinogenesis* 15: 573-576
97. Ip, C. - Lisk, D.J.: 1994b. Enrichment of selenium in allium vegetables for cancer prevention *Carcinogenesis* 15: 1881-1885
98. Ip, C. - Lisk, D.J.: 1995. Efficiency of cancer prevention by high selenium garlic is primarily dependent on the action of selenium *Carcinogenesis* 16: 2649-2652
99. IP, C., Birringer, M., Block, E., Kotrebai, M., Tyson, J.F., Uden, P.C., Lisk, D.J.: 2000. Chemical Speciation Influences Comparative Activity of Selenium-Enriched Garlic and Yeast in Mammary Cancer Prevention *J. Agric. Food Chem.* 48: 2062-2070
100. Ip, C., Dong, Y., Ganther, H.E.: 2002. New concepts in selenium chemoprevention *Cancer Metast. Rev.* 21: 281-289
101. Kádár, I.: 1998. Szélén forgalma a talaj-növény rendszerben *A szélén szerepe a környezetben és egészségvédelemben Konferencia proceedings*. Budapest, Hungary 6-19

102. Kadrabova, J., Madaric, A., Ginter, E.: 1997. The selenium content of selected food from the Slovak Republic *Food Chem.* 58: 29-32
103. Kápolna, E.: 2006. Mérési eljárások kidolgozása és alkalmazása szeléntartalmú élelmiszerek és étrend-kiegészítők módosulatanalitikai vizsgálatára *Doktori értekezés* 122-123
104. Kápolna, E., Hillestrom, P.R., Laursen, K.H., Husted, S., Laursen, E.H.: 2009. Effect of foliar application of selenium on its uptake and speciation in carrot *Food chemistry* 115: 1357-1363
105. Kendrick, M. D. - Chang, C.: 2008. Ethylen signaling: new levels of complexity and regulation *Current Opinion in Plant Biology* 11: 479-485
106. Kessi, J., Ramuz, M., Wehrli, E., Spycher, M., Bachofen, R.: 1999. Reduction of selenite and detoxification of elemental selenium by the phototropic bacterium *Rhodospirillum rubrum* *App. Envir. Microbiol.* 65: 4734-4740
107. Keung, T.P., Lixuan, Z.: 2007. Quantitative analysis of nicotinic acid, nicotinamide and 3-cyanopyridine in industrial effluent by high performance liquid chromatography *Front. Chem. China* 2: 270-273
108. Kim, D-O., Lee, K.W., Lee, H.J., Lee, C.Y.: 2002. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals *J.Agric. Food Chem.* 50: 3713-3717
109. Kleene, K.C.: 1994. The mitochondrial capsule selenoprotein a structural protein in the mitochondrial capsule of mammalian sperm. *In: Selenium in Biology and Human Health by Springer Verlag, New York*, 133 – 149
110. Kopsell, D.A. - Randle, W.M.: 1997. Selenate concentration affects selenium and sulfur uptake and accumulation by „Granex 33” onions *J. Am. Soc.Hort. Sci* 122: 721-726
111. Kopsell, D.A. - Randle, W.M.: 1999. Selenium Accumulation in a rapid-cycling *Brassica oleracea* population responds to increasing sodium-selenate concentrations *J. Plant Nutr.* 22: 927-937
112. Kumar, A. - Krishnaswamy, K.: 1997. Selenium content of common Indian cereals, pulses and spices *J. Agr. Food Chem.* 45: 2565-2568
113. Kyriakopoulos, A., Behne, D.: 2002. Selenium-containing proteins in mammals and other forms of life. *Rev Physiol. Biochem. Pharmacol.* 145: 1-46

114. Levander O. A. - Burk R. F.: 1996. "Selenium." In *Present Knowledge in Nutrition*, edited by Ziegler E. E. and Filer L. J., 320-324. Washington DC: ILSI Press,
115. Levander, O.A.: 1991. Scientific rationale for the 1989 recommended dietary allowance for selenium. *J. Am. Diet Assoc.* 91: 1572-1576
116. Li, H.F., McGrath, S.P., Zhao, F.J.: 2008. Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite *New Phytol.* 178: 92-102
117. Li, S., Li, W., Hu, X., Yang, L., Xirao, R.: 2009. Soil selenium concentration and Kashin-Beck disease prevalence in Tibet, China. *Front. Environ. Sci. Engin. China* 3: 62-68
118. Li, S., Shen, Y., Xie, A., Yu, X., Zhang, X., Yang, L., Li, C.: 2007. Rapid, room-temperature synthesis of amorphous selenium/protein composites using *Capsicum annum* L extract. *Nanotech.* 18: 136-141
119. Li, S., Zhang, Z., Lin, Y., Liu, W., Guo, H., Zhang, W., Chong, Z.: 2004. Comparative study on antioxidative system in normal and vitrified shoots of *Populus suaveolens* in tissue culture *Forest. Stud. China* 6: 1-8
120. Lin, Z. Q., Schemenauer, R. S., Cervinka, V., Zayed, A., Lee, A., Terry, N.: 2000. Selenium volatilization from a soil-plant system for the remediation of contaminated water and soil in the San Joaquin Valley. *Journal of Environmental Quality*, 29(4), 1048-1056
121. Lintschinger, J., Fuchs, N., Moser, J., Kuehnelt, D., Goessler, W.: 2000. Selenium-enriched sprouts. A raw material for fortified cereal-based diets *J. Agric. Food Chem.* 48: 5362-5368
122. Lobanov, A.V., Hatfield, D.L., Gladyshev, V.N.: 2009. Eukaryotic selenoproteins and selenoproteomes *Biochim. Biophys. Acta* 1790: 1424-1428
123. Look, M.P., Rockstroh, J.K., Rao, G.S., Kreuzer, K.A., Spengler U., Sauerbruch, T.: 1997. Serum selenium versus lymphocyte subsets and markers of disease progression and inflammatory response in human immunodeficiency virus-1 infection. *Biol. Trace Elem. Res.* 56 31-41.
124. Losi, M.E., Frankenberger, W.T.: 1997. Reduction of selenium oxyanions by enterobacter cloacae SLD1a-1: Isolation and growth of the bacterium and expulsion of selenium particles *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3079-3084
125. Lugasi, A., Hóvári, J., Sági, K.V., Bíró, L.: 2003. The role of antioxidant phytonutrients of diseases *Acta Biol. Szegediens.* 47: 119-125

126. Luz Mora, M., Pinilla, L., Rosas, A., Cartes, P.: 2008. Selenium uptake and its influence on the antioxidative system of white clover as affected by lime and phosphorus fertilization. *Plant Soil* 303: 139-149
127. Lü, J. - Jiang, C.: 2005. Selenium and cancer chemoprevention: hypotheses integrating the actions of selenoproteins and selenium metabolites in epithelial and non-epithelial target cells. *Antioxid. Redox. Signal* 7: 1715-1727
128. Lyons T.P. - Jacques, K.A.: 2001. Science and Technology in the Feed Industry *Proceedings of Alltech' 17th Annual Symposium* press by Nottingham University, Nottingham 178-183
129. Lyons, G.H., Genc, Y., Soole, K., Stangoulis, J.C.R., Liu, F., Graham, R.D.: 2009. Selenium increases seed production in *Brassica*. *Plant Soil* 318: 73-80
130. Lyons, T.P.: 1996. A truly global science-based company that responds rapidly to emerging issues. In: *Biotechnology in the Feed Industry. Proc. 12th Annual Symposium* Nottingham University Press, Nottingham, UK, 1-20.
131. Maiorino, M., Aumann, K.D., Brigelius-Flohe, R., Doria, D., van den Heuvel, J., McCharty, J., Roveri, A., Ursini, F., Flohe, L.: 1995. Probing the presumed catalytic triad of selenium-containing peroxidases by mutational analysis of phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 376: 651-660
132. Maiorino, M., Gregolin, C., Ursini, F.: 1990. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase *Methods Enzymol.* 186: 448-457
133. Mayland, H.F.: 1986. Selenium in soils and plants. In: *Selenium Responsive Diseases in Food Animals. Proceedings, Western States Veterinary Conference*, Schering Corporation, Kenilworth, NJ. 5-10
134. McKenzie, R.C., Beckett, G.J., Arthur, J.R.: 2006. Effect of selenium in immunity and aging in: *Selenium Its molecular biology and role of human health* Second edition, Springer US, chapter 27. 311-322
135. Minorsky, P.V.: 2002. Trigonelline: a diverse regulator in plants *Plant Phys.* 128: 7-8
136. Miyamoto, H., Araya, Y., Ito, M., Isobe, H., Dosaka, H., Shimizu T., Kishi, F., Yamamoto, I., Honma, H., Kawakami, Y.: 1987. Serum selenium and vitamin E concentrations in families of lung cancer patients. *Cancer* 60: 1159-1162.

137. Molnárová, M., Fargasová, A.: 2009. Se(IV) phytotoxicity for monocotyledonae cereals (*Hordeum vulgare* L., *Triticum aestivum* L.) and dicotyledonae crops (*Sinapsis alba* L., *Brassica napus* L.) *J. Hazard. Mat.* 172: 854-861
138. Montes-Bayón, M., Diaz Molet, M.J., Blanco Gonzalez, E., Sanz-Mendel, A.: 2006. Evaluation of different sample extraction strategies for selenium determination in selenium-enriched plants (*Allium sativum* and *Brassica juncea*) and Se speciation by HPLC-ICP-MS *Talanta* 68: 1287-1293
139. Montes-Bayón, M., Grant, T.D., Meija, J., Caruso, J.A.: 2002. Selenium in plants by mass spectrometric techniques: developments in bio-analytical methods *J. Anal. At. Spektrom.* 17: 1015-1023
140. Mounicou, S., Vonderheide, A.P., Shann, J.R., Caruso, J.A.: 2006. Comparing a selenium accumulator plant (*Brassica juncea*) to a nonaccumulator plant (*Helianthus annuus*) to investigate selenium-containing proteins *Anal. Bioanal. Chem.* 386: 1367-1378
141. Murashige, T., Skoog, F.: 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures *Plant Physiol.* 15: 126-146
142. Muth, O.H.: 1963. White muscle disease, a selenium responsive myopathy *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 142: 272-277
143. Navarro-Alarcón, M., López-Ga de la Serrana, H., Pérez-Valero, V., López-Martínez, M.C.: 2002. Selenium concentrations in serum of individuals with liver diseases (cirrhosis or hepatitis): relationship with some nutritional and biochemical markers *Sci. Tot. Environ.* 291: 135-141
144. Neve, J.: 1996. Selenium as a risk factor for cardiovascular diseases. *J. Cardiovascular Risk* 3: 42-47
145. Noctor, G., Queval, G. and Gakiere, B.: 2006. NAD(P) synthesis and pyridine nucleotide cycling in plants and their potential importance in stress conditions. *J. Exp. Bot.*, 57, 1603-1620.
146. Nriagu, J. O., Pacyna, J. M.: 1988. Quantitative Assessment of Worldwide Contamination of Air, Water and Soils by Trace-Metals. *Nature*, 333 (6169), 134-139.
147. Oremland, R.S., Blum, J.S., Culbertson, C.W., Visscher, P.T., Miller, L.G., Dowdle, P., Strohmaier, F.E.: 1994. Isolation, growth, and metabolism of an obligately anaerobic, selenate-respiring bacterium, strain SES-3 *Appl. Environ. Microbiol.* 60(8): 3011-3019

148. Oremland, R.S., Herbel, M.J., Blum, J.S., Langley, S., Beveridge, T.J., Ajayan, P.M., Sutto, T., Ellis, A.V., Curran, S.: 2004. Structural and spectral features of selenium nanospheres produced by Se-respiring bacteria *App. Env. Micr.* 70: 52-60
149. Osmond, C.B., Austin, M.P., Berry, J.A., Billings, W.D., Boeyr, J.S., Dacey, J.W.H., Nobel, P.S., Smith, S.D., Winner, W.E.: 1987. Stress physiology and distribution of plants. *Bioscience* 37: 33-47
150. Ozer, N.K., Boscoboinik, D., Azzi, A.: 1995. New roles of low density lipoproteins and vitamin E in the pathogenesis of atherosclerosis. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 35:117-124
151. Pais, I. :1997. A szelén és az antioxidánsok. *Természet világa.* 128: 422-423
152. Palmer, I. S., Herr, A., Nelson, T. :1982. Toxicity of selenium in brazil nuts to rats *J. Food Sci.* 47: 1595-1597
153. Pedrero, Z., Madrid, Y, Camara, C.: 2006. Selenium species bioaccessibility in enriched radish (*Raphanus sativus*): A potential dietary source of selenium *J.Agric.Food.Chem.* 54: 2412-2417
154. Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., Brighenti, F.: 2003. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages, and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays *J. Nutr.* 133: 2812-2819
155. Peterson, P.J. - Buttler, G.W.: 1966. Colloidal selenium availability to three pasture species in pot culture. *Nature* 212: 961-962
156. Pfeifer, H., Conrad, M., Roethlein, D., Kyriakopoulos, A., Brielmeier, M., Bornkmann, G.W., Behne, D.: 2001. Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol crosslinking during sperm maturation *FASEB J.* 15: 1236 – 1238
157. Pickering, I.J., Prince, R.C., Salt, D.E., George, G.N.: 2000. Quantitative, chemically specific imaging of selenium transformation in plants. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 97: 10717-10722
158. Pickering, I.J., Wright, C., Bubner, B., Ellis, D.R., Persans, M.W., Yu, E.Y., George, G.N., Prince, R.C., Salt, D.E.: 2003. Chemical form and distribution of selenium and sulphur in the selenium hyperaccumulator *Astragalus bisulcatus*. *Plant Physiol.* 131: 1-8

159. Pilon-Smits, E.A.H., de Souza, M.P., Lytle, C.M., Shang, C., Lugo, T., Terry, N.:1998. Selenium volatilization and assimilation by hybrid poplar (*Populus tremula x alba*) *J. Exp. Bot.* 49:1889-1892
160. Pilon-Smits, E.A.H., LeDuc, D.L.: 2009. Phytoremediation of selenium using transgenic plants *Current Opinion in Biotechnology* 20:1-6
161. Pinsent, J.: 1954. The need for selenite and molybdate in the formation of dehydrogenase by members of the coliaerogenes group of bacteria *Biochem. J.* 57,10
162. Plessi, M., Bertelli, D., Monzani, A.: 2001. Mercury and selenium content in selected seafood *J. Food Comp. Anal.* 14: 461-467
163. Połatajko A., Sliwka-Kaszynska M., Dernovics M., Ruzik R., Ruiz Encinar J., Szpunar J.: 2004. A systematic approach to selenium speciation in selenized yeast. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 19: 114-120.
164. Polhammer E., Kajdi, F., Csicsor, J.: 1997. Eljárás szelénrel dúsított, élelmiszeripari célra termesztett növények előállítására *Szabadalom ügyiratszám: P9403427, Lajstromszám: 213552*
165. Popov, I., Lewin, G.: 1999. Characterisation by means of chemiluminescent technique. In: Methods in enzymology vol. 300, Oxidants and antioxidants Part B ed. Lester Packer, *Academic press* 437-456
166. Prokisch J., (50%) Zommara M.: PROCESS FOR PRODUCING ELEMENTAL SELENIUM NANOSPHERES PCT/IB2008/052838 Date of Receipt: 15 July 2008 Receiving Office: International Bureau of the World Intellectual Property Organization Your Reference: P104315
167. Prokisch J., Széles É., Kovács B., Daróczy L., Zommara, M.: 2008. Formation of metal selenium nanospheres in bacteria: Is it a possible detoxification mechanism? *Cer. Res. Comm.* 36: 947-951
168. Rayman, M. P.: 2000. The importance of selenium to human health *The Lancet* 356: 233-241
169. Rayman, M.P., Infante, H.G., Sargent, M.: 2008. Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation *Brit. J. Nutr.* 100: 238-253
170. Reilly, C.: 1996. Selenium in food and health *published by Springer* p. 7-8
171. Reilly, C.: 2001. Selenium in food and health in: *Selenium in food and health second edition chapter 2.4.4*: 30-32

172. Ríos, J.J., Blasco, B., Cervilla, L.M., Rosales, M.A., Sanchez-Rodriguez, E., Romero, L., Ruiz, J.M.: 2008. Production and detoxification of H₂O₂ in lettuce plants exposed to selenium *Ann. Appl. Biol.* 154: 107-116
173. Rodtruck, T., Pope, A.H., Ganther, H.E., Swanson, A.B. Hafeman, D.G. and Hoekstra, W.G.: 1973. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase *Science* 179:588-590
174. Ryssen, J.B.J.: 2001. Geographical distribution of the selenium status of herbivores in South Africa. *South Afr. J. Anim. Sci.* 31: 1-8
175. Schwartz, K., Foltz, C.M.: 1957. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degradation *J. Am. Chem. Soc.* 79: 3292-3293
176. Seppanen, M., Turakainen, M., Hartikainen, H.: 2003. Selenium effects on oxidative stress in potato *Plant Science* 165: 311-319
177. Severi, A.: 2001. Toxicity of selenium to *Lemna minor* in relation to sulfate concentration *Physiol. Plant.* 113: 523-532
178. Shah M., Kannamkumarath S. S., Wuilloud J. C. A., Wuilloud R. G., Caruso J. A.: 2004. Identification and characterization of selenium species in enriched green onion (*Allium fistulosum*) by HPLC-ICP-MS and ESI-ITMS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 19: 381-386
179. Shrift, A., Ulrich, J.: 1969. Transport of selenate and selenite into *Astragalus* roots. *Plant Physiol.* 44: 893-896
180. Skinner C. P.: 1999. Environmental Chemistry of Selenium. *Soil Sci. Soc. Amer. J.*, 164: 70-72
181. Smrkolj, P., Germ, M., Kreft, I., Stibilj, V.: 2006a. Respiratory potential and Se compounds in pea (*Pisum sativum* L.) plants grown from Se-enriched seeds *J. Exp. Bot.* 57: 3595-3600
182. Smrkolj, P., Osvald, M., Osvald, J., Stibilj, V.: 2007. Selenium uptake and species distribution in selenium-enriched bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds obtained by two different cultivations *Eur. Food Res. Technol.* 225: 233-237
183. Smrkolj, p., Stibilj, V., Kreft, I., Germ, M.: 2006b. Selenium species in buckwheat cultivated with foliar addition of Se (VI) and various levels of UV-B radiation. *Food Chemistry* 96: 675-681
184. Sors, T.G., Ellis, D.R., Na, G.N., Lahner, B., Lee, S., Leustek, T., Pickering, I.J., Salt, D.E.: 2005a. Role of sulfur assimilating enzymes in selenate reduction, tolerance and accumulation in *Astragalus*. *Plant J.* 42: 785-792

185. Sors, T.G., Ellis, D.R., Salt, D.E.: 2005b. Selenium uptake, translocation, assimilation and metabolic fate in plants *Photosynthesis Research* 86:373-389
186. Spallholz, J.E., Shirver, B.J., Reid, T.W.: 2001. Dimethyldiselenide and methylseleninic acid generate superoxide in an in vitro chemiluminescence assay in the presence of glutathione: implications for the anticarcinogenic activity of L-selenomethionine and L-Se-methylselenocysteine. *Nutr. Cancer* 40: 34-41
187. Stadtman, T. C.: 1996. Selenocysteine. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 83-100
188. Stadtman, T.C.: 1990. Selenium biochemistry. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 111-127
189. Suzuki, K. T., Ogra, Y.: 2002. Metabolic pathway for selenium in the body: speciation by HPLC-ICP MS with enriched Se. *Food Additives And Contaminants*, 19(10), 974-983.
190. Széles, É., Táth, Á., Nagy, A., Prokisch, J., Kovács, B., Győri, Z.: 2007. A szelén jelentősége az élővilágban és a kutatásban *Agrártudományi Közlemények* 26: 278-286
191. Tamaoki, M., Freeman, J.L., Marques, L., Pilon-Smits, E.A.H.: 2008. New insights into the roles of ethylene and jasmonic acid in the acquisition of selenium resistance in plants *plant Signaling & Behavior* 3: 865-867
192. Tamura, T., Standtman, T.C.: 1996. A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: Purification, properties and thioredoxin reductase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 1006-1011
193. Tapiero, H., Townsend, D.M., Tew, K.D.: 2003. The antioxidant role of selenium and selenocompounds *Biomed. Pharmacotherapy* 57: 134-144
194. Terry, N., Zayed, A.M.: 1994. Selenium volatilization by plants. In: Frankenberger Jr, W.T., Benson, S. eds. *Selenium in the environment* New York: Marcel Dekker, 343-369
195. Terry, N., Zayed, A.M., Souza, M.P., Tarun, A.S.: 2000. Selenium in higher plants. *Annu. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.* 51: 401-432
196. Tin Win, D.: 1991. Selenium: Atomic number 34, Mass Number 78,96 *Au. J. T.* 7: 1-7
197. Tomei, F.A., Barton L.L., Lemanski, C.L., Zocco, T.G., Fink, N.H., Sillerud, L.O. : 1995. Transformation of selenate and selenite to elemental selenium by *Desulfovibrio desulfuricans* *J. Ind. Micr. Biotech.* 14: 329-336
198. Umysová, D., Vitová, M., Dousková, I., Bisová, K., Hlavová, M., Žizková, M., Machát, J., Doucha, J., Zachleder, V.: 2009. Bioaccumulation and toxicity of

- selenium compounds in the green alga *Scenedesmus quadricauda* *BMC Plant Biol.* 58: 1471-1487
199. Ursini, F., Maiorino, M., Brigeliusflohe, R., Aumann, K.D., Roveri, A., Schomburg, D. and Flohe, L.: 1995. Diversity of glutathione peroxidases. *Meth. Enzymol.* 252:38-53
 200. Uthus, E.O., Yokoi, K., Davis, C.D.: 2002. Selenium deficiency in Fisher-344 rats decreases plasma and tissue homocysteine concentrations and alters plasma homocysteine and cysteine redox status. *J. Nutr.* 132: 1122–1128.
 201. Van Hoewyk, D., Takahashi, H., Inoue, E., Hess, A., Tamaoki, M., Pilon-Smits, E.A.H.: 2008. Transcriptome analyses give insights into selenium-stress responses and selenium tolerance mechanisms in *Arabidopsis* *Physiologia Plantarum* 132: 236-253
 202. Vanderpas, J.B. Contempre, B. Duale N.L., Deckx, H., Bebe, N., Longombé, A.O., Thilly, C.H., Diplock, A.T., Dumont, J.: 1993. Selenium deficiency mitigates hypothyroxinemia in iodine-deficient subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 57: 271S–275S.
 203. Vanderpas, J.B. Contempre, B. Duale N.L., Goossens, W., Bebe, N., Thorpe, R., Ntambue, K., Dumont, J., Thilly, C.H., Diplock, A.T.: 1990. Iodine and selenium deficiencies associated with cretinism in northern Zaïre. *Am J Clin Nutr* 52: 1087–1093
 204. Varo, P., Alfthan, G., Ekholm, P., Aro, A., Koivistoinen, P.: 1988. Selenium intake and serum selenium in Finland: effect of soil fertilisation with selenium. *Am. J. Clin. Nutr.* 48: 324-329
 205. Vendeland, S.C., Beilstein, M.A., Chen, C.L., Jensen, O.N., Barofsky, E., Whanger, P.D.: 1993. Purification and properties of selenoprotein W from rat muscle *J. Bio. Chem.* 268: 17103 – 17107
 206. Wachowicz, B., Zbikowska, H.M. and Nowak, P.: 2001. Selenium compounds in environment; their effect on human health *Cell. Mol. Biol. Let.* 6. 375-379
 207. Wang, H., Zhang, J., Yu, H.: 2007. Elemental selenium at nano size possesses lower toxicity without compromising the fundamental effect on selenoenzymes: Comparison with selenomethionine in mice *Free Rad. Biol Med.* 42: 1524-1533
 208. Welsh, S.O., Holden, W., Wolf, W.R., Levander, O.A.: 1981. Selenium intake of Maryland residents consuming self-selected diets. *J. Am. Diet Assoc.* 79: 277-285

209. Whanger, P.D.: 2002. Selenocompounds in plants and animals and their biological significance *J. Am. Coll. Nutr.* 21: 223-232
210. Whanger, P.D., Ip, C., Polan, C.E., Uden, P.C. and Welbaum, G.: 2000. Tumorigenesis, metabolism, speciation, bioavailability and tissue deposition of selenium in selenium-enriched ramps (*Allium tricoccum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, pp. 5723–5730.
211. Whanger, P.D., Vendeland, S.C., Gu, Q.P., Beilstein, M.A. and Ream, L.W.: 1997. Selenoprotein W cDNAs from five species of animals. *Biomed. Environ. Sci.* 10: 190-197
212. White, P.J., Bowen, H.C., Parmaguru, P., Fritz, M., Spracklen, W.P., Spiby, R.E., Meacham, M.C., Mead, A., Harriman, M., Trueman, L.J., Smith, B.M., Thomas, B., Broadley, M.R.: 2004. Interactions between selenium and sulphur nutrition in *Arabidopsis thaliana* *J.Exp.Bot.* 55: 1927-1937
213. WHO.: 1996. Trace elements in human nutrition and health. (Prepared in collaboration with the Food and Agricultural Organization of the United Nations and with the International Atomic Energy Agency). 1-343 pp.
214. Wu, X., Gu, L., Holden, J., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E., Beechen, G., Prior, R. : 2004. Development of a database for total antioxidant capacity in foods: preliminary study *J. Food Comp. Anal.* 17: 407-422
215. Xiao-Zhang, Y., Ji-Dong, G.: 2008. Differences in uptake and translocation of selenate and selenite by the weeping willow and hybrid willow *Environ. Sci. Pollut. Res.* 15: 499-508
216. Xu, J., Yang, F., Chen, L., Hu, Y., Hu, Q.: 2003. Effect of selenium on increasing the antioxidant activity of tea leaves harvested during the early spring tea producing season *J. Agric. Food Chem.* 51: 1081-1084
217. Xue, T., Hartikainen, H., Pioren, V.: 2001. Antioxidative and growth-promoting effect of selenium on senescing lettuce *Plant and Soil* 237: 55-61
218. Yadav, S., Gupta, S., Prakash, R., Spallholz, J., Prakash, N.T.: 2007. Selenium uptake by *Allium cepa* grown in Se-spiked soils. *Am-Euras. J.Agric. Environ. Sci.* 2: 80-84
219. Yang, C., Niu, C. Bodo M., Gabriel, E., Nothbohm, H., Wolf, E., Müller, P.K. : 1993. Fulvic acid supplementation and selenium deficiency disturb the structural integrity of mouse skeletal tissue. An animal model to study the molecular defects of Kashin–Beck disease. *Biochem J.* 289: 829–835.

220. Yao, X., Chu, J., Ba, C.: 2009. Antioxidant responses of wheat seedlings to exogenous selenium supply under enhanced ultraviolet-B *Biol.Trace El. Res.* Online version
221. Yu, F., Sheng, J., Xu, J., An, X., Hu, Q.: 2007. Antioxidant activities of crude tea polyphenols, polysaccharides and proteins of selenium-enriched tea and regular green tea *Eur. Food Res. Technol.* 225: 843-848
222. Zayed, A., Lytle, C.M., Terry, N.: 1998. Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants. *Planta* 206: 284-292
223. Zhang, J.S., Gao, X.Y., Zhang, L.D., Bao, Y.P.: 2001. Biological effects of a nano red elemental selenium. *Biofactors* 15: 27-38
224. Zhang, L.H., Shi, W.M., Wang, X.C.: 2006. Difference in selenite absorption between high- and low-selenium rice cultivars and its mechanism. *Plant Soil* 282: 183-193
225. Zhang, Q., Pston, D.W., Goodman, R.H.: 2002. Regulation of corepressor function by nuclear. NADH *Science* 295: 1895-1897
226. Zheng, XQ., Nagai, C., Ashihara, H.: 2004. Pyridine nucleotide cycle and trigonelline (N-methylnicotinic acid) synthesis in developing leaves and fruits of *Coffea arabica*. *Physiol. Plant.* 122: 404-411
227. Ziebur, N.K., Shrift, A.: 1971. Response to selenium by callus cultures derived from *Astragalus* species *Plant Physiol.* 47: 545-550
228. Zieve, R., Peterson, P.J.: 1984. The accumulation and assimilation of dimethylselenide by plant species *Planta* 160: 180-184

10. PUBLIKÁCIÓK AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN

Tudományos közlemény idegen nyelvű, lektorált nemzetközi folyóiratban:

- **Domokos-Szabolcsy Éva** - Veres Zsuzsanna - Kovács Béla - Prokisch József - Holb Imre - Fári Miklós (2006): Impact of sodium-selenate on the growth of radish seedlings *in vitro*. Acta Horticulturae. ISSN: 0567-7572 725. 181-185.
- Mészáros Annamária - Kálai Krisztián - Halász Katalin - **Domokos-Szabolcsy Éva** - Fári Miklós (2006): An efficient micropropagation system: 3R Bioreactor. Acta Horticulturae. ISSN: 0567-7572 725. 621-624.

Tudományos közlemény idegen nyelvű, hazai lektorált folyóiratban:

- **Domokos-Szabolcsy Éva** - Holb Imre - Prokisch József - Kovács Béla - Veres Zsuzsanna - Fári Miklós (2005): Impact of sodium-selenate on the growth of radish (*Raphanus sativus* L.) seedlings *in vitro*. International Journal of Horticultural Science ISSN: 1585-0404. 11.2. 113-117.
- **Domokos-Szabolcsy Éva** – Prokisch József – Sztrik Attila – Barnócki Attila – Fári Miklós (2011): Variation in selenium tolerance among two cultivars in closed fortification system. International Journal of Horticultural Science in press

Tudományos közlemény magyar nyelvű lektorált folyóiratban:

- **Domokos-Szabolcsy Éva** (2005): Zöldségcsírák jelentősége, biológiai értéke Hajtatás, korai termesztés 36.3. 13-15.
- **Domokos-Szabolcsy Éva** - Veres Zsuzsanna - Holb Imre - Kovács Béla - Fári Miklós (2005): Nátrium-szelenát hatása retek és paprika *in vitro* fejlődésére szövettenyészetekben Acta Agraria Debreceniensis Agrártudományi Közlemények ISSN: 1587-1282. 16. 149-155.

Tudományos közlemény magyar nyelvű nem lektorált folyóiratban:

- **Domokos-Szabolcsy Éva** (2005): Csírázó csírákészítés Mezőgazdasági Tanácsok. ISSN: 1216-1314. 14. 20.
- **Domokos-Szabolcsy Éva** (2007): Megnövelt makro- és mikroelem-tartalmú zöldségnövények jelentősége. Agroinform. ISSN: 1786 6219 16. 8. 18-19.
- **Domokos-Szabolcsy Éva** (2008): A funkcionális ételkészítés fogalma és előállításának gyakorlata Agrofórum. ISSN: 1788-5884 19. 8. 72-73.
- **Domokos-Szabolcsy Éva** (2011): A zöldségnövények fortifikálásának (elemzésítésének) lehetőségei Agrofórum 22. 6. 66-68.

Idegennyelvű lektorált konferencia kiadvány:

- **Domokos-Szabolcsy Éva** - Prokisch József - Kovács Béla - Marosi Sándor - Holb Imre - Fári Miklós (2006): Enhancing the selenium content of green onion made from bulb hydroponic culture International Symposium on Trace Elements in the Food Chain Budapest, ISBN: 963 7067 132. 51-56.
- **Domokos-Szabolcsy Éva** - Miskei Márton - Remenyik Judit - Prokisch József - Fári Miklós (2009): Effect of nanoselenium in in vitro plant tissue culture 3. Trace elements in the food chain Congress Budapest, ISBN: 978 963 7067-198. 447-451.

Idegennyelvű nem lektorált konferencia kiadvány:

- Prokisch József - Széles Éva - Kovács Béla - Hovánszki Dóra - **Domokos-Szabolcsy Éva** - Fári Miklós (2005): Selenium speciation and its application in the production of functional foods International Scientific Conference of the Innovation and Utility in the Visegrád fours, Nyíregyháza, ISBN: 963 86918 24. 473-476.
- **Domokos-Szabolcsy Éva** - Veres Zsuzsanna - Kovács Béla - Prokisch József - Holb Imre - Fári Miklós (2005): Effect of selenium on the in vitro growth and development of vegetables. Sustainable Agriculture Across Borders in Europe. Debrecen, ISBN: 963 9274 85 2. 136.
- **Domokos-Szabolcsy Éva** - Kovács Béla - Holb Imre - Fári Miklós (2005): Effect of sodium-selenate on the *in vitro* growth and development of selenium

accumulator and non accumulator species Recent Advances in Plant Biotechnology from Laboratory to Business. Ceske Budejovice, 36.

- **Domokos-Szabolcsy Éva** - Kovács Béla - Prokisch József - Remenyik Judit - Holb Imre - Fári Miklós (2006): Effect of Selenium Supplementation on the *in vitro* Seedling Germination. 11th IAPTC&B Congress. Beijing, China, 58.
- **Domokos-Szabolcsy Éva** - Remenyik Judit - Prokisch József - Hüse Csaba - Sztrik Attila - Babka Beáta - Miskei Márton - Fári Miklós (2010): Impact of red elemental nano-selenium on biosynthesis of nicotinic acid of tobacco *in vitro* tissue cultures 28th IHC Congress. Lisboa, Portugal, 280.

Magyar nyelvű nem lektorált konferencia kiadvány:

- **Domokos-Szabolcsy Éva** - Holb Imre - Prokisch József - Kovács Béla - Veres Zsuzsanna - Marosi Sándor - Fári Miklós (2005): Szerves szelénszint növelésének lehetőségei kertészeti növényekben: nátrium-szelenát hatása retekcsírák *in vitro* fejlődésére IV. Kárpát-medencei Biológiai Szimpózium ISBN: 963 219 3334. 255-257.
- **Domokos-Szabolcsy Éva** - Kovács Béla - Veres Zsuzsanna - Dudás László - Koroknai Judit - Zsila-André Anikó - Holb Imre - Fári Miklós (2004): Kísérletek zöldségnövények szelenizálására VI. Nemzetközi Élelmiszertudományi Konferencia, Szeged, 275-276.
- **Domokos-Szabolcsy Éva** - Kovács Béla - Veres Zsuzsanna - Dudás László - Szarvas Pál - Koroknai Judit - Zsiláné André Anikó - Holb Imre - Fári Miklós Gábor (2004): Nátrium-szelenát hatása zöldségnövények *in vitro* csírázására foto-autotróf tenyészetekben „Szelén az élettelen és élő természetben” Kerekasztal konferencia Gödöllő, 10.
- **Domokos-Szabolcsy Éva** - Kovács Béla - Fári Miklós (2005): Szelénnel kiegészített zöldségcsírák növekedésének és fejlődésének vizsgálata foto-autotróf tenyészetekben Tavaszi szél konferencia, Debrecen, ISBN: 963 218 368 1. 441.
- **Domokos-Szabolcsy Éva** - Kovács Béla - Veres Zsuzsanna - Holb Imre - Fári Miklós (2005): Zöldségcsírák dúsítása szelénnel *in vitro* körülmények között Botanikai közlemények 92(1-2). 211-212.

- **Domokos-Szabolcsy Éva** - Prokisch József - Kovács Béla - Veres Zsuzsanna - Marosi Sándor - Holb Imre - Fári Miklós (2005): Szelén hatása a növények *in vitro* tenyészeire Termékpálya, Élelmiszer- és Környezetbiztonság az Agráriumban Gödöllő, 29.
- **Domokos-Szabolcsy Éva** - Miskei Márton - Fári Miklós - Sztrik Attila - Babka Beáta - Prokisch József (2010): Vörös nanoszelén és nátrium-szelenát összehasonlító vizsgálata dohány *in vitro* szövettenyészetben XVI. Növénynemesítési Tudományos napok, 66
- **Domokos-Szabolcsy Éva** - Sztrik Attila - Babka Beáta - Prokisch József - Hüse Csaba - Fári Miklós (2011): Vörös nanoszelén biológiai aktivitásának tanulmányozása növényi szövettenyészetekben XVII. Növénynemesítési Tudományos napok, 162.

A kutatási témához közvetlenül nem kapcsolódó publikációk:

Tudományos közlemény idegen nyelvű, nemzetközi folyóiratban:

- Veres Zsuzsanna - **Domokos-Szabolcsy Éva** - Dudás László - Koroknai Judit - Zsila-André Anikó - Holb Imre - Fári Miklós (2006): Effect of culture vessels on the biomass production and total antioxidant capacity in pea seedlings germinated under pam-system. Acta Horticulturae. ISSN: 0567-7572 **725**: 517-521.

Tudományos közlemény idegen nyelvű, hazai lektorált folyóiratban:

- Veres Zsuzsanna - **Domokos-Szabolcsy Éva** - Nyéki József - Fári Miklós (2003): Antioxidants in functional Hungaricum fruits and vegetables products. A review. International Journal of Horticultural Science ISSN: 1585-0404. **9.1**.13-21.
- **Domokos-Szabolcsy Éva** - Veres Zsuzsanna - Bisztray György - Fári Miklós (2004): Actual state of research concerning vitamin C as reflected in the literature A review. International Journal of Horticultural Science ISSN: 1585-0404. **10. 1**. 7-15.

Idegennyelvű lektorált konferencia kiadvány:

- Alshaal Tarek - **Domokos-Szabolcsy Éva** - Kátai János - Márton László - Fári Miklós (2011): Evaluation of soil quality indicators for soil contaminated with red sludge in the Kolontar area Agrisafe Final Conference Budapest, ISBN: 978-963-8351-37-1 p. 283-286

Idegennyelvű nem lektorált konferencia kiadvány:

- **Domokos-Szabolcsy Éva** - Veres Zsuzsanna - Fári Miklós (2003): Attempts to reconstruct of the pioneer *in vitro* plant organ differentiation and callus culture system developed by O. Orsós in 1938. 5th Symposium "Recent Advances in

Plant Biotechnology” Plant Biotechnology: Progress and Developments. Nitra, Slovak Republic, 23.

- Veres Zsuzsanna - **Domokos-Szabolcsy Éva** - Salamon Pál - Fári Miklós (2003): Characterisation of the *in vitro* direct organogenetic capacity of some solanaceous genera by means of decapitation of seedlings. 5th Symposium “Recent Advances in Plant Biotechnology” Plant Biotechnology: Progress and Developments. Nitra, Slovak Republic, 25.
- Veres Zsuzsanna - Szabó Tibor - **Domokos-Szabolcsy Éva** - Holb Imre - Glant Zoltán - Szabó Zoltán - Fári Miklós (2004): Data on the fruit quality parameters of sourcherry clones originated from home-gardens and cultivars effecting human health and industrial processing. 2nd Central European Congress of Food: Budapest, 129.
- Veres Zsuzsanna - **Domokos-Szabolcsy Éva** - Remenyik Judit - Holb Imre - Fári Miklós (2005): Rapid measurement of the total antioxidant activities in temperate climate fruits and vegetables: a case study of the sour cherry. Sustainable agriculture Across Borders in Europe. Debrecen, 282.
- Alshaal Tarek – **Domokos-Szabolcsy Éva** – Márton László – Fári Miklós- Kátai János (2011): Phytoremediation potential of *Arundo Donax* L „syn-plants” growth in heavy metals contaminated soils Pannon Plant Biotechnology Workshop IFA-Tulln, Ausztria, 30.

Magyar nyelvű nem lektorált konferencia kiadvány:

- **Domokos-Szabolcsy Éva** - Nemes Katalin - Marosi Sándor - Fári Miklós Gábor (2006): Kávia és pritamin paprika dihaploidok (DH) előállítása portok kultúrában XII. Növénynevelési Tudományos Napok, Budapest, 85.

- **Domokos-Szabolcsy Éva** - Veres Zsuzsanna - Bisztray György - Fári Miklós (2003): A C-vitamin bioszintézis útvai magasabb rendű növényekben. V. Magyar Genetikai Kongresszus, Siófok, 47.

- **Domokos-Szabolcsy Éva** - Veres Zsuzsanna - Bisztray György - Fári Miklós (2003): A Haberlandt-Orsós modell reprodukálása: I. Karalábé gumókockák *in vitro* organogenezise. Lippai János – Ormos Imre – Vas Károly Tudományos Ülésszak, Budapest, 74-75.

- Veres Zsuzsanna - **Domokos-Szabolcsy Éva** - Somogyi Nóra - Glant Zoltán - Kovács János - Nyéki József - Fári Miklós (2003): Adatok a népi szelekcióból származó Bosnyák meggyek (*Prunus cerasus*) egészséggel és ipari feldolgozással összefüggő gyümölcs-minőségi jellemzőiről. Lippai János – Ormos Imre – Vas Károly Tudományos Ülésszak, Budapest, 209-210.

- Alshaal Tarek - **Domokos-Szabolcsy Éva** - Márton László - Fári Miklós - Kátai János (2011): Microbiological and chemical status of Devecser-Kolontár red sludge samples XVII. Növénynevelési Tudományos napok, 170.

INNOVÁCIÓS EREDMÉNYEK AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN

Termék fejlesztés:

- Szerves szelénben gazdag hajtatott zöldhagyma
- SelenAl, „Szerves szelént tartalmazó, hagymából készített étrendkiegészítő kapszula” OÉTI által engedélyezett. Notifikációs száma: 1859/2007

Szabadalom:

- Dr. Prokisch József, Dr. Fári Miklós, Dr. Győri Zoltán, **Domokos-Szabolcsy Éva**, Veres Zsuzsanna, Dr. Kovács Béla: Magas biológiai értékű gyümölcsök és eljárás előállításukra P0501073 Magyar Szabadalmi Hivatal, 2005 Szabadalom

ÁBRA ÉS TÁBLÁZATJEGYZÉK

1. ábra: A szelenoprotein transzlációja (*Gergely, 2006* nyomán)
2. ábra: Szervetlen szelénformák felvétele magasabbrendű növények különböző részeiben sematikus növényi képen ábrázolva
3. ábra: Szelén metabolizmusa magasabb rendű növényekben
4. ábra: Piridin recycling és NAD *de novo* szintézise
- 5/A ábra: Dohány kalluszképződés 100 mg/l nanoSe tartalmú táptalajon
- 5/B ábra: Jól-differenciált, szabályos dohány mikrohajtások 100 mg/l nanoSe táptalajon
- 5/C ábra: Dohány kalluszképződés kontroll táptalajon
- 5/D ábra: Vitrifikált, abnormális dohány mikrohajtások kontroll táptalajon
- 5/E ábra: Dohány kalluszképződés 50 mg/l szelenát tartalmú táptalajon
- 5/F ábra: Dohány kalluszképződés teljes elmaradása 100 mg/l szelenát tartalmú táptalajon.
- 6/A ábra: Regenerált dohány gyökere 100 mg/l nanoSe kezelés mellett, kontrollal összevetve
- 6/B ábra: Regenerált dohány gyökér része 0-100 mg/l nanoszelénos táptalaj sorozaton
- 6/C ábra: Regenerált dohány kontrol hajtása és 100 mg/l nanoSe táptalajon
- 6/D ábra: Dohány kalluszképződés teljes elmaradása 100 mg/l szelenát tartalmú táptalajon
7. ábra: A regenerálódó növények gyökeresedése két időpontban felvételezve
8. ábra: Trigonellin, nikotinsav és nikotinamid kromatogramja egy kromatográfiás rendszerben
- 9/A ábra: Dohány kallusz (MTK) trigonellin tartalma nátrium-szelenát, ill. nanoszelén tartalmú táptalajon ($p < 0,05$) (+/-SE)
- 9/B ábra: Regenerált növény hajtás és gyökér részének (RH, RGY) trigonellin tartalma nátrium-szelenát, ill. nanoszelén tartalmú táptalajon ($p < 0,05$) (+/-SE)
- 10/A ábra: Dohány kallusz (MTK) nikotinsav tartalma nátrium-szelenát, ill. nanoszelén tartalmú táptalajon ($p < 0,05$) (+/-SE)

- 10/B ábra: Regenerált dohány hajtás és gyökér részének (RH, RGY) nikotinsav tartalma nátrium-szelenát, ill. nanoszelen tartalmú táptalajon ($p < 0,05$) ($\pm$ -SE)
- 11/A ábra: Dohány kallusz (MTK) nikotinamid tartalma nátrium-szelenát, ill. nanoszelen tartalmú táptalajon ($p < 0,05$) ($\pm$ -SE)
- 11/B ábra: Regenerált növény hajtás és gyökér részének (RH, RGY) nikotinamid tartalma nátrium-szelenát, ill. nanoszelen tartalmú táptalajon ($p < 0,05$) ($\pm$ -SE)
12. ábra: Klorofill A és B tartalom dohány kalluszban nátrium-szelenát, ill. nanoszelen tartalmú táptalajon ($p < 0,05$) ($\pm$ -SE)
13. ábra: Klorofill A és B tartalom regenerált dohány hajtás részében nátrium-szelenát, ill. nanoszelen tartalmú táptalajokon ($p < 0,05$) ($\pm$ -SE)
14. ábra: Retek csírázási erély
15. ábra: Paprika csírázási erély
16. ábra: Retek csírázása nátrium-szelenát tartalmú táptalajokon: Balról - jobbra haladva, alsó sor: kontroll, 50, 100 mg/l, felső sor: 2, 10, 200 mg/l szelenát kezelés
17. ábra: Parpika és retek csíranövények hajtásrészének egyedi átlagtömege (g) a táptalaj szelenát tartalmának függvényében ($p < 0,05$) ($\pm$ -SE)
18. ábra: Parpika és retek csíranövények gyökérrészének egyedi átlagtömege (g) a táptalaj szelenát tartalmának függvényében ($p < 0,05$) ($\pm$ -SE)
19. ábra: Zöldségcsírák hajtásrészének teljes szelén tartalma a táptalaj szelenát tartalmának függvényében ($p < 0,05$) ($\pm$ -SE)
20. ábra: Zöldségcsírák gyökérrészének teljes szelén tartalma a táptalaj szelenát tartalmának függvényében ($p < 0,05$) ($\pm$ -SE)
21. ábra: Zöldhagymák egyedi átlag tömege szelenát kezelés függvényében ($p < 0,05$) ($\pm$ -SE)
22. ábra: Zöldhagymák egyedi átlag hossza szelenát kezelés függvényében ($p < 0,05$) ($\pm$ -SE)
23. ábra: A és B: Makói bronz fajta 10 mg/l szelenát kezelés mellett; C és D: Makói lila fajta 10 mg/l szelenát kezelés mellett.
24. ábra: Zöldhagyma szárazanyag beépülése (g/g) szelenát kezelés függvényében (mg/l) ($p < 0,05$) ($\pm$ -SE)

25. ábra. Zöldhagymák összes szelén tartalma szelenát kezelések függvényében ($p < 0,05$) (+/-SE)
26. ábra: Szelénformák elválasztásának kromatogramja Makói lila hagyma mintából 3 ismételtsben
- 27/A. ábra: Makói bronz hagymafajta kromatogramja kontrol és 2mg/l szelenát kezelés mellett, standard mix-szel összehasonlítva
- 27/B. ábra: Makói bronz hagymafajta kromatogramja kontrol és 2mg/l szelenát kezelés mellett, a két ismeretlen szelénforma felnagyítva
28. ábra: Szelén formák és relatív koncentrációjuk nátrium-szelenát kezelés hatására Makói bronz fajtába ($p < 0,05$) (+/-SE)
29. ábra: Szelén formák és relatív koncentrációjuk nátrium-szelenát kezelés hatására Makói lila fajtában ($p < 0,05$) (+/-SE)
30. ábra: Makói lila zöldhagyma antioxidáns sűrűsége szelenát kezelések függvényében ($p < 0,05$) (+/-SE)
31. ábra: Makói bronz zöldhagyma antioxidáns sűrűsége szelenát kezelések függvényében ($p < 0,05$) (+/-SE)
32. ábra: Makói lila klorofill A és B tartalma szelenát kezelések függvényében ($p < 0,05$) (+/-SE)
33. ábra: Makói bronz klorofill A és B tartalma szelenát kezelések függvényében ($p < 0,05$) (+/-SE)
34. ábra: Zöld hagymák glutation-peroxidáz aktivitása szelenát kezelések függvényében ($p < 0,05$) (+/-SE)
35. ábra: Szerves szelént tartalmazó hajtattott zöldhagyma
36. ábra: Selenal, szerves szelént tartalmazó, hagymából készített étrendkiegészítő kapszula
-
1. táblázat: Szövettenyésztéshez használt táptalajok összetétele
2. táblázat: Összes szeléntartalom meghatározáshoz használt ICP-MS készülék beállítási paraméterei
3. táblázat: Az egyes szelénmódosulatok mennyiségi meghatározásához használt ICP-MS készülék működési paraméterei
4. táblázat: Szelénmódosulatok elválasztásához használt anioncserélő kromatográfia paraméterei

- 5/A. táblázat: Nikotinsav, nikoitnamid és trigonellin méréséhez alkalmazott fordított fázisú kromatográfiás rendszer paraméterei
- 5/B. táblázat: Nikotinsav, nikoitnamid és trigonellin méréséhez alkalmazott kromatográfiás rendszer gradiens profilja
6. táblázat: Dohány kallusz (MTK), regenerált növény hajtás és gyökér részének (RH, RGY) egyedi átlag tömege nátrium-szelenát, ill. nanoszelen tartalmú táptalajokon a koncentráció függvényében ($p < 0,05$)
7. táblázat: Dohány kallusz (MTK) illetve regenerált növény hajtás és gyökér részének (RH, RGY) teljes szeléntartalma
8. táblázat: Teljes szeléntartalom mérés általános szövettenyésztési körülmények között
9. táblázat: Makói bronz és Makói lila hagymafajták egyes szelénmódosulatainak relatív koncentrációja és összes szeléntartalma

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni mindazoknak, akik segítségemre voltak doktori munkám során.

Mindenekelőtt Istennek tartozom hálával, hogy erővel és egészséggel megáldott a doktori munkám végzésében és a dolgozatom megírásában.

Köszönettel tartozom elsősorban témavezetőmnek, **Prof. Fári Miklósnak**, aki szakmai útmutatásával, kitartó türelmével és az anyagi feltételek biztosításával segítette munkámat.

Külön köszönettel tartozom **Prof. Holb Imrének**, aki sokáig társtémavezetőként hasznos tanácsokkal és anyagi segítséggel is támogatta munkámat.

Szeretném megköszönni a tanszék minden egykori és jelenlegi dolgozójának, elsősorban **Dr. Dudás Lászlónak, Dr. Miskei Mártonnak, Dr. Remenyik Juditnak, Bíróné Molnár Piroskának, Koroknai Juditnak, Szakadát Gyulának, Tóth Csabának és Zsiláné André Anikónak**, hogy segítségemre voltak munkám során.

Köszönöm egykori és jelenlegi doktorandusztársaimnak, **Homoki Juditnak, Nemes Andreának, Hüse Csabának, Oláh Juditnak, Szarvas Pálnak és Veres Zsuzsának** a közös munka során szerzett tapasztalatokat.

Külön köszönőettel tartozom **Dr. Prokisch Józsefnek, Dr. Kovács Bélának és munkatársaiknak** az analitikai kémiai munkákban nyújtott segítségükért.

Végül, de nem utolsó sorban nagyon hálás vagyok **családomnak, elsősorban férjemnek, kisfiamnak és szüleimnek**, hogy bátorítottak, támogattak minden téren és türelmesek voltak mindvégig.

NYILATKOZAT

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Agrártudományi Centrum Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Karán a Kerpely Kálmán Növénytermesztési, Kertészeti és Regionális Tudományok Doktori Iskola keretében készítettem el a Debreceni Egyetem AGTC MÉK doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 20.....

a jelölt aláírása

NYILATKOZAT

Tanúsítom, hogydoktorjelölt 20..... - 20..... között a fenn megnevezett Doktori Iskola keretében irányításommal – irányításunkkal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult, az értekezés a jelölt önálló munkája. Az értekezés elfogadását javaslom – javasoljuk.

Debrecen, 20.....

a témavezető(k) aláírása)