



INTÉZMÉNYI TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI KONFERENCIA

2023. november 22.

**ELTÉRŐ CINK TRÁGYÁZÁS KUKORICA (*ZEА MAYS L.*)
NÖVÉNYEK KORAI FEJLŐDÉSÉRE GYAKOROLT
HATÁSÁNAK BIOLUMINESZCENCIA-ALAPÚ
VIZSGÁLATA**

**Bioluminescence-based study of the effect of differential zinc fertilization on
the early development of maize (*Zea mays L.*) plants**

Készítette:

Hallgató neve: Csima Ferenc

Neptun kód: SZVRYP

Szak neve, képzési szint: Agrármérnök osztatlan
képzés

Tagozat: nappali

Campus neve: Kaposvári Campus

Témavezető: Dr. Jócsák Ildikó, egyetemi adjunktus,
Növénytermesztési-tudományok Intézet, Agronómia Tanszék

Lehetséges OTDK szekció: „Agrártudományi szekció”

Kaposvár

Tartalom

1. Bevezetés.....	3
1.1. Célkitűzések	3
2. Szakirodalmi áttekintés	4
2.1 A kukorica	4
2.2 Cink tápanyag kijuttatási módszerek.....	4
2.3 Esszenciális és toxikus nehézfémek hatása a növényi szervezetre	5
2.4 A cink	6
2.4.1 A cink előfordulása	6
2.4.2 A növények cink felvétele és felhalmozása	7
2.4.3 A cink jelentősége növényekben	7
2.4.4 A cinkstressz hatásai növényekben: hatása a növekedésre, fotoszintézisre, oxidatív stressz	8
2.5 A kadmium	9
2.5.1 A kadmium előfordulása	9
2.5.2 A növények kadmium felvétele és felhalmozása	10
2.5.3 A kadmiumstressz hatásai növényekben	10
2.6 Nehézfémstressz kimutatására alkalmas nem-invazív metodikák: gyors műszeres mérések és biofoton emisszió alapuló képalkotás	12
2.6.1 Klorofill tartalom becslés	12
2.6.2 Normalizált vegetációs index (Normalised difference vegetation index-NDVI).....	13
2.6.3 Fluoreszcencia indukció	13
2.6.4 Biofoton emisszió mérés	13
2.7 Nehézfémstressz nyomonkövetésére alkalmas egyes analitikai és molekuláris biológiai vizsgálatok.....	14
2.7.1 Lipidoxidáció mérés	14
2.7.2 Vasredukáló képességen alapuló teljes antioxidáns kapacitás mérés	15
2.8 Génexpressziós vizsgálatok.....	15
2.8.1 Glutation reduktáz (GR) és a glutation—s-transzferáz (GST) hatásmechanizmusa.....	15
2.8.2 Lipoxigenáz (LOX) hatásmechanizmus	16
3. Anyagok és módszerek.....	17
3.1 Növénynevelés	17
3.2 Kezelések	17
3.3 Fenológiai paraméterek mérése.....	18
3.4 Elemtartalom mérése.....	18
3.5 Gyors, műszeres nem-invazív vizsgálatok	18

3.5.1 Relatív klorofill tartalom becslés	18
3.5.2 Normalizált vegetációs index-NDVI.....	18
3.5.3 Fluoreszcencia indukció mérés	19
3.6 Biofoton emisszió mérés	19
3.7 Lipidoxidáció mérés	20
3.8 Vasredukáló képességen alapuló teljes antioxidáns kapacitás mérés	21
3.9 Génexpressziós vizsgálatok.....	22
3.10 Statisztikai elemzés	22
4. Eredmények és értékelésük	23
4.1 Elemtartalom vizsgálat	23
4.2 Fenológiai vizsgálatok eredményei	24
4.2.1 Növények magassága	24
4.2.2 Növények tömege.....	24
4.3 Fotszintézissel kapcsolatos vizsgálatok eredményei	25
4.3.1 Klorofill tartalom becslés eredmények.....	25
4.3.2 Normalizált vegetációs index NDVI	25
4.3.3 Fluoreszcencia indukciós eredmények.....	26
4.3.4 Késleltetett fluoreszcencia eredmények	27
4.4 Az oxidatív folyamatokkal összefüggő vizsgálatok eredményei	30
4.4.1 Az ultragyenge biolumineszcencia változásának eredményei	30
4.4.2 Lipidoxidáció mérés	31
4.4.3 Lipoxigenáz (LOX) génexpressziós vizsgálatok eredményei	32
4.5 Antioxidatív rendszer vizsgálatainak eredményei.....	32
4.5.1 Vasredukáló képességen alapuló teljes antioxidáns kapacitás mérés (FRAP).....	32
4.5.2 A glutation reduktáz (GR) és a glutation-S-transzferáz (GST) enzimek génexpressziójának változásai.....	33
4.5 Statisztikai összegzés	35
5. Következtetések és javaslatok	37
6. Összegzés	38
6.1 Köszönetnyilvánítás	38
7. Felhasznált Irodalom	39
7.1 Internetes források.....	48

1. Bevezetés

A kukorica korai fejlődését alapvetően meghatározzák a nehézfémek, amelyek a talajokba könnyen és gyorsan bejutva, típusuktól függően, hatással vannak a növényi anyagcserére. Ezen hatások az esszenciális fémek esetében, mikroelem mivoltukból adódóan pozitív, az egészséges növényi működéshez elengedhetetlen hatással bírnak. Ezzel szemben a nem-esszenciális nehézfémek nem vesznek részt genetikailag meghatározott szükséges alkotóként a növény életében, azonban az esszenciális elemek ioncsatornáin keresztül a növényekbe jutva kizárólag negatív folyamatokat indítanak el.

Az in-vivo elvégezhető innovatív megközelítés, a biofoton emisszió mérése lehetővé teszi a stressz kialakulás dinamikájának új megközelítésben történő meghatározását és annak megállapítását, hogy hogyan változik a kukorica biofoton emissziója a nehézfémek jelenlétében. Ezen információk segítségével fény derülhet a fémfelvétel eltérő jellegére, az akkumuláció és az indukált védekezési mechanizmusok intenzitására.

1.1. Célkitűzések

A kutatás célja annak vizsgálata, hogy a különböző mennyiségben kijuttatott cink utánpótlás milyen hatással van a kukorica fejlődésére, valamint egy nem-esszenciális elemmel (kadmium) összehasonlítva milyen működésbeli különbségek mutatkoznak meg a növény juvenilis stádiumában. A cink esetében továbbá meg kívánjuk vizsgálni az átmenetet a mikroelem funkcióból a toxikus tartományba. A vizsgálati metodika újszerű a mikroelem kutatásban, mivel az in-vivo elvégezhető biofoton emisszió mérésen alapul. A képalkotó eljárás során kapott eredményeket fenológiai elemzésekkel, gyors műszeres mérésekkel, valamint analitikai, és molekuláris biológiai vizsgálatokkal is alá kívánjuk támasztani, abban a reményben, hogy ezen komplex megközelítés segítséget nyújt a tápanyag utánpótlás egyik lényes kérdésének, a megfelelően magas dózisú, korai fejlődést támogató cink kijuttatásának meghatározásában.

2. Szakirodalmi áttekintés

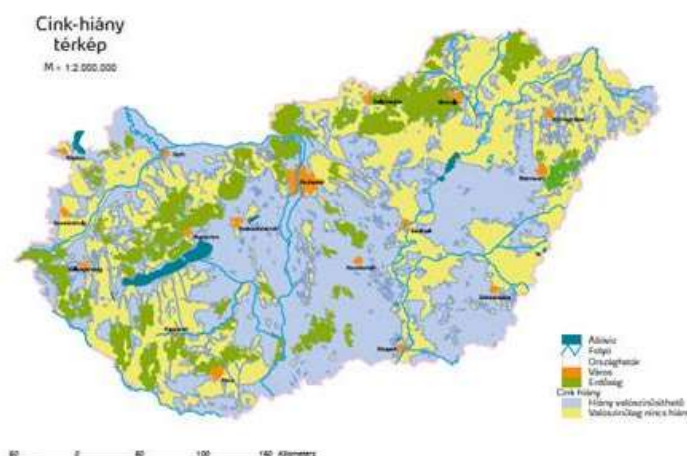
2.1 A kukorica

A kukoricát (*Zea mays* L.) a világ mérsékelt és trópusi övében mindenütt termesztik, ahol elegendő csapadék vagy öntözővíz áll rendelkezésre. A kukorica az egyszikűek (*Monocotyledones*) osztályába, a pelyvások (*Poales*) rendjébe és a pázsifűfélék (*Poaceae*) családjába tartozó növényfaj. Gécenctruma Közép- és Dél-Amerika, és itt is honosították először 7000-10000 évvel ezelőtt. A növény már ekkor is jelentős változáson ment át az emberi tevékenység hatására, feltehetőleg nem volt képes önállóan szaporodni, hacsak az ember el nem ültette és ápolta. A kukorica gyors terjedésnek indult az amerikai kontinensen, majd annak felfedezését követően Európában és az egész világon (Radics, 2012).

Felhasználása igen sokoldalú, kiemelkedő szerepe van az állatok takarmányozásában elsősorban abraktakarmányként, továbbá hasznosítható még zölden és silózva etetve. Ipari felhasználásra a finomszeszgyártás alapanyagaként valósul meg. Emberi fogyasztása főként csemege kukorica, kukorica liszt és dara, illetve pattogatni való kukorica formájában történik. A legnagyobb területen az USA, Brazília és Kína termeszt kukoricát. Magyarországon a vetésterülete általában 1 millió hektár körül mozog, termésátlaga az elmúlt évtized alapján 6,8 t/ha (Radics, 2012). A kukorica tápanyagellátásának számos fontos területe van, amelyek közül mind a kezdeti fejlődést, mind a termésképzés időszakában meghatározó mikroelem a cink.

2.2 Cink tápanyag kijuttatási módszerek

A cinkműtrágyák használatának története 1934-ig nyúlik vissza, amikor kukorica levélklorózis kezelésére, cink-szulfátot használtak Floridában. A cinkhiányt, amely komoly termés- és minőségromlást okozhat, általában cinkvegyületek talajban történő alkalmazásával pótolják.



1. ábra: Cink hiányos talajok Magyarországon. (Szerző: Gruiz Katalin)

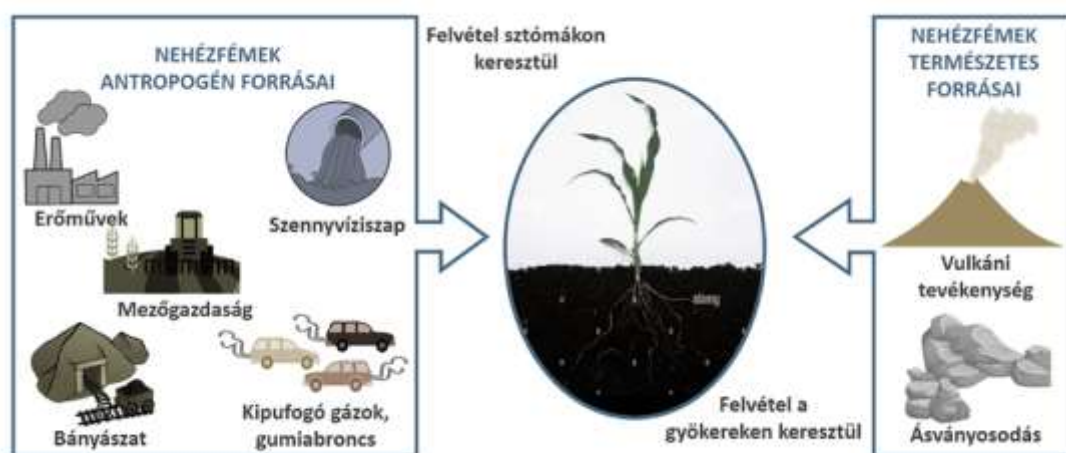
A magyarországi talajokban a cinkhiány gyakori jelenség (1. ábra), ami fontos tápanyagutánpótlási feladatokat ró a termesztőkre. A cink kijuttatása a talajba a cinkhiány

mértékétől, a talaj típusától és a fajtától, vagy hibridtől függ. Általában 4,5-34 kg/ha mennyiségben használnak cink-szulfátot, és ezt vagy szórják a magágyba, vagy permetezik vizes oldat formájában. A cinkhiányra érzékeny növények, például a kukorica esetében, gyakran szükséges nagyobb cinkadagokat alkalmazni, és ezeket az határozza meg, hogy a növényt lúgos és/vagy meszes talajon termesztik-e, szemben a nem meszes talajokkal (Martens – Westermann, 1991).

A kukorica esetében a cink műtrágya kijuttatása önmagában vagy makrotápanyag-trágyákkal keverve 4-22 kg Zn/ha között lehet, de leggyakrabban 4-9 kg Zn/ha között van. Ha a talajba kelátképző cinkforrásokat juttatnak, az adagok általában 0,5-2,2 kg Zn/ha tartományba esnek (Alloway, 2008).

2.3 Esszenciális és toxikus nehézfémek hatása a növényi szervezetre

A nehézfémek csoportjába olyan fémek és metalloidek tartoznak, amelyek atomsűrűsége nagyobb, mint 4 g/cm³, azaz legalább ötször nagyobb, mint a vízé. Ezen csoportba tartozó elemek például a réz (Cu), mangán (Mn), ólom (Pb), kadmium (Cd), nikkel (Ni), kobalt (Co), vas (Fe), cink (Zn), króm (Cr), arzén (As) és az ezüst (Ag) (Asati et al., 2016).



2. ábra: Nehézfémek antropogén és természetes forrásai, Jócsák és munkatársai (2022a) alapján

A nehézfémek természetes elemek, melyek a talajban is előfordulnak. Felhalmozódásuk az emberi tevékenység eredményeként károsíthatja az ökoszisztémákat (2. ábra). Kémiai formájuk a talajoldatban függ az adott fémelemtől, a pH-tól és más ionok jelenlététől. A nehézfémionok toxikus hatása alapvetően az enzimekre hat, ezért a talajban tartósan magas nehézfém koncentráció, annak enzimaktivitásának jelentős csökkenését eredményezheti (Tyler et al., 1989).

A felvett nehézfémek több típusba sorolhatók attól függően, hogy melyik növényi részben halmozódnak fel:

- jellemzően a hajtásban felhalmozódók (Ag, Cr, Pb, Al, Va, Sn)
- jellemzően a gyökérben felhalmozódók (Cd, Co, Cu, Fe, Mo)
- egyenletes eloszlásúak, (Ni, Mn és a Zn) (Greger, 2004).

2.4 A cink

A cink (Zn) a IIB. csoportba tartozó átmenetifém, amely fontos az immunrendszer és az agyműködés számára az emberi szervezetben, és mindemellett fontos szerepet játszik a növényekben zajló enzimatis reakciókban és anyagcsere tevékenységekben is (Subramanian et al., 2014; Ayyar – Appavoo 2017). A cinkre kis koncentrációban van szükség ahhoz, hogy számos kulcsfontosságú növényi élettani útvonal rendeltetésszerűen működjön. A cink enzimek és fehérjék alkotóelemeiként, illetve szabályozó kofaktoraként funkcionál, számos anyagcsere folyamat résztvevőjeként, úgymint például: szénhidrát-anyagcsere, fotoszintézis, cukrok keményítővé alakítása, fehérje és hormon anyagcsere, pollenképződés, biológiai membránok integritásának fenntartása, valamint kórokozókkal szembeni ellenállás (Sadeghzadeh, 2013). Az Egészségügyi Világszervezet 2002-ben közzétett jelentése szerint a cink hiánya az ötödik helyen áll az alultápláltság vezető okai között a fejlődő országokban élő emberek körében (Balakrishnan, 2011; Balakrishnan – Subramanian, 2012).

A nehézfém-szennyezés származhat természetes és emberi tevékenységekből egyaránt. A bányászat, olvasztás és mezőgazdaság olyan tevékenységek, amelyek széles körben okoznak szennyezést, például Japánban, Indonéziában és Kínában, elsősorban olyan nehézfémekkel, mint a kadmium (Cd), réz (Cu) és cink (Zn) (Herawati et al., 2000).

2.4.1 A cink előfordulása

Minden nehézfém legfőbb természetes forrása a kőzetek és a föld felszíne. A talajképződés főként üledékes kőzetekből származik, de ez általában nem jelent nagy mennyiségű nehézfémforrást. Azonban számos magmás kőzet, például olivin, augit, bazalt és pala, jelentős mennyiségű mangánt (Mn), kobaltot (Co), nikkelt (Ni), rézet (Cu) és cinket (Zn) juttathat a talajba. A vulkánok nagy mennyiségű cinket és mérgező gázokat bocsáthatnak ki, és néhány nagyobb kitörésnek messzebbre ható hatásai vannak (Greger, 2004).

A cink mennyisége mezőgazdasági talajokban műtrágyák, állati eredetű szerves trágyák és szennyvíziszap által növekszik meg nagymértékben. A cink ipari forrásokból is kerülhet a környezetbe, mint például bányászat, olvasztás és fémfeldolgozás, valamint a fémek

újrahasznosítása. A bányászati műveletek, a bányászat típusától függően különböző nehézfémeket bocsátanak ki, köztük cinket is (Verkleji, 1993).

2.4.2 A növények cink felvétele és felhalmozása

A cink a növényekbe elsősorban a Zn^{2+} talajoldatból történő felszívódása révén kerül, a gyökéren keresztül. A felvétel a gyökérfelszínen lévő ionkoncentrációtól, a növényi igényektől és a gyökér felszívóképeségétől függ. A cink tömegáramlás, diffúzió és gyökérbefogási mechanizmusok révén jut el a növényi gyökérfelületre (Sadeghzadeh, 2013). A tömegáramlás a talajból a gyökerekbe történő passzív tápanyagszállítás, amelyet a transzspiráció hajt. Ha a talajon keresztül a gyökér felé áramló talajoldat viszonylag nagy koncentrációt tartalmaz, a tömegáramlás válik a domináns mechanizmussá, amely az elemet a gyökérfelszínre juttatja. Ha a cink-koncentráció alacsony, különösen olyan talajokban, amelyekben kevés a növény számára elérhető cink, a diffúzió fontos szerepet játszik a tápanyagok gyökérfelszínre szállításában, mivel a tömegáramlás a növények tápanyagigényét nem képes elszállítani. A tömegáramlással ellentétben a diffúzió csak a gyökeret közvetlenül körülvevő talajban működik. A gyenge gyökérbefogadás korlátozhatja a cink felvételét, különösen alacsony $ZnSO_4$ -kijuttatási arány esetén (Sadeghzadeh, 2013).

A gyökér cinkfelvételét követő gyökérből a hajtásba történő transzlokációt számos tényező befolyásolja (Xue et al., 2014). A cink felhalmozódása a szemekben a cink remobilizációjától függ a hajtásból és az elem folyamatos hajtásfelvételétől a szemképződés szakaszában (Impa et al., 2013; Waters et al., 2009). Remobilizációja kritikus fontosságú a szemekben való felhalmozódás szempontjából, mivel a hajtás cinkfelvételét a szemképződés során a talajstresszek korlátozhatják (Kutman et al., 2012). A talaj cink tápanyag-állapotának növekedése kedvez a kukorica fokozott cinkfelvételének (Ayyar – Appavoo, 2017). A gabonában lévő cinknek két forrása van az egyik közvetlenül (a gyökérből a hajtásban való köztes tárolás nélkül) a szemekbe kerül, a másik a hajtásban tárolt, és később kerül át (remobilizálódik) a szemekbe. Ha a talaj vagy az időjárási viszonyok miatt az ellátás korlátozott, a növények nehezen tudják felvenni a tápanyagot, és a szemekben lévő cink, többnyire a vegetatív részekből történő remobilizációjától függ (Xue et al., 2012; Liu et al., 2019).

2.4.3 A cink jelentősége növényekben

A cink elengedhetetlen a növények egészséges növekedéséhez és szaporodásához. Ez az elem kis mennyiségben szükséges számos kulcsfontosságú növényélettani folyamat normál működéséhez, valamint a membránok szerkezeti és funkcionális integritásának biztosításához

(Hafeez et al., 2013), így fontos szerepet játszik a növekedésszabályozásban, az enzimek aktiválásában, a génexpresszióban és -szabályozásban, a fitohormon-aktivitásban, a fehérjeszintézisben, a fotoszintézisben, a szénhidrát-anyagcserében, a magtermelésben és a betegségek elleni védekezésben (Marschner, 2012).

A cink az egyetlen olyan fém, amely mind a hat enzimosztályban (oxidoreduktázok, transzferázok, hidrolázok, liázok, izomerázok és ligázok) szükséges (Singh et al., 2005). Továbbá a cink szükséges a fehérje- és nukleinsav-anyagcserében részt vevő metalloenzimek aktivitásához. Nélkülözhetetlen a fehérjeanyagcserében, és a legfontosabb szerepe a fehérjeszintézisben, a genetikai anyag stabilitásában és működésében való részvétele (Singh et al., 2005). A cink nélkülözhetetlen a kromatin szerkezetében, a DNS/RNS anyagcserében és a génexpresszióban.

A cink hiánya a fehérjeszintézis csökkenését okozza (Marschner, 2012) az RNS degradáció (Cakmak et al., 1998), az RNS-polimeráz csökkent aktivitása, a riboszómák deformációja és a riboszómák számának csökkenése miatt (Sadeghzadeh, 2013).

A cinkhiány károsítja az említett élettani funkciókat, veszélyezteti a növények egészségét és életképességét, ami a növekedés súlyos csökkenéséhez, alacsonyabb terméshozamhoz (vagy akár termés kieséshez) és rossz minőségű növényi termékekhez vezet (Sadeghzadeh, 2013). Mindezek miatt cinkhiány esetén a fehérjék, szénhidrátok és az auxin metabolizmusa, valamint a szaporodási folyamatok hiány esetén akadályozottak (Romheld – Marschner, 1991).

2.4.4 A cinkstressz hatásai növényekben: hatása a növekedésre, fotoszintézisre, oxidatív stressz

Ha a növények optimálisnál nagyobb mennyiségű cinket vesznek fel, akkor toxikus hatást válthat ki, és ezek kihatnak a növekedésre is. A stresszhatásra a kukorica növények friss- és száraztömege, hajtáshossza és fejlődése csökken (3. ábra), amely főleg a gátolt sejtosztódásnak köszönhető (Tsonev – Cebola-Lidon, 2012; Abedi et al., 2022).

A fotoszintetikus apparátus molekuláris szintű gátlása, a klorofill szerkezetében és mennyiségében bekövetkező kritikus változásokkal jár együtt. A klorofill molekulákban lévő magnézium (Mg^{2+}) nehézfémekkel, például cinkkel helyettesíthető, ami károsítja a fénygyűjtő komplex (light-harvesting complex II- LHCII) működését (von Wettstein et al., 1995). A magas Zn^{2+} koncentrációk képesek csökkenteni a klorofill -a és -b mennyiségét, valamint az arányukat (Cherif et al., 2010; Ivanov et al., 2011). A Zn^{2+} negatívan befolyásolhatja az első és/vagy második fotokémiai rendszer hatékonyságát (Di Baccio et al., 2003).

A nehézfémek oxidatív stresszt okozhatnak, amely gátolja a növények alapvető élettani funkcióit (Szalontai et al., 1999; Maksymiec et al., 2008; Mahmood et al., 2009). Bár a redox-aktív fémek, például a vas (Fe) és réz (Cu), katalizálják a hidroxilgyökök képződését a Haber-Weiss reakciókon keresztül, ami gátolja a közvetlen oxidatív károsodást és antioxidáns válaszokat okoz (Schützendübel – Polle, 2002), a cink nem képes ilyen egyelektronos oxidoredukciós reakciókat végezni (López-Millán et al., 2005). A cinkstressz tehát oxidatív stresszt okoz, létrehozva reaktív oxigénformákat (reactive oxygen species-ROS), és ugyanakkor negatívan hat olyan metabolikus folyamatokra, mint az antioxidáns védelmi rendszer, vagy a fotoszintetikus elektrontranszport (Cakmak, 2000). Mindez azt jelenti, hogy a cink által kiváltott oxidatív stressz növeli a lipidperoxidációt és a membránpermeabilitást, valamint csökkenti a szulfidril-tartalmat (Tripathi – Gaur, 2004).

Az oxidatív stressz során a cink a lipidperoxidáció mellett serkenti a lipoxigenáz aktivitását is, amely a plazmamembrán NADPH-oxidáz aktiválásával társul, ami fokozott szuperoxid-anion termeléshez vezet (Weckx – Clijsters, 1997). Továbbá, a cink mennyiségétől függően aktiválódik az antioxidatív rendszer, ideértve a szuperoxid-dizmutáz, az aszcorbát-peroxidáz és a glutation-reduktáz enzimeket. Ezen kívül az aszcorbinsav és a teljes glutation tartalma is változhat a cink koncentráció függvényében (Ivanov et al., 2012).

2.5 A kadmium

A kadmium (Cd) a IIB. csoportba tartozó átmenetifém, amely viszonylag ritka a földkéregben, a 32. leggyakoribb elem (Wood – Wang, 1983). Főként a cink, réz és ólom elsődleges termékként történő kinyerése és finomítása során keletkezik, mint melléktermék. Mivel nagy mennyiségben kinyerhető és olcsó, gazdasági okokból kevés finomított kadmium került újrahasznosításra, ám a növekvő környezettudatosságnak köszönhetően egyre több ilyen célú törekvés van. Az újrahasznosítás hiánya, a kadmiumtartalmú termékek és tüzelőanyagok felhasználása révén történő eloszlás hozzájárul az általános talajszennyezéshez, elsősorban a légköri kihullás révén az elsődleges légszennyező források (bányászat és finomítás, hulladékégetők, fosszilis tüzelőanyagok égetése) és a technológiai hulladéklerakók közelében (Nriagu, 1980; Nriagu – Pacyna, 1988).

2.5.1 A kadmium előfordulása

A kadmium egy környezet-szennyező nehézfém, amely főleg emberi tevékenységeknek köszönhetően kerül a környezetbe. Nagy mennyiségben megtalálható szennyvíziszapokban és hulladékokban, emellett az ipari üzemek (erőmű, fémfeldolgozó, cement üzem), és a gépjárművek (gumiabroncs, kipufogógáz) üzemeltetésük és működésük során szennyezhetik a

levegőt, a vizeket és a talajokat (Pál et al., 2006). A kadmium nem esszenciális a növények számára, sőt az egyik legmérgezőbb nehézfém a környezetben, mivel jól transzlokálódik, és alacsony koncentrációban is hajlamos mérgezést okozni a szervezetekben, ezért érdemes figyelmet fordítani rá, különösen olyan területeken, ahol jelentős az antropogén nyomás (Sanchez-Martin – Sanchez-Camazano, 1993; Das et al., 1997). Wagner (1993) becslése szerint a 0,32 és 1 μM közötti kadmium koncentrációjú talajoldatok mérsékelten szennyezettek, 0,32 μM Cd tartalom alatt nem tekinthető szennyezettnek. A 35 μM koncentrációt meghaladó talajoldatokban csak a Cd-hiperakkumulátor fajok képesek növekedésre. Kultúrnövények között ilyen a napraforgó és az őszi káposztarepce (Brown et al., 1994). A kadmium felhalmozódása valamennyi szervezetre veszélyes a talajban (Duxbury, 1985). A magas kadmium koncentrációk számos állatfaj esetében rákkeltőnek, mutagénnek és teratogénnek bizonyultak (Degraeve, 1981).

2.5.2 A növények kadmium felvétele és felhalmozása

A növények esetében a talajoldat kadmium koncentrációjától és biológiai hozzáférhetőségétől függ a felvett kadmium mennyisége. A biológiai hozzáférhetőséget elsősorban a talaj pH, a hőmérséklet és más elemek koncentrációja határozza meg. A kadmium ion felvétele, Ca^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} csatornákon keresztül történik (Clemens, 2006). A kadmium döntően a gyökérben akkumulálódik, de megnövelt koncentráció esetén fokozódik a transzlokáció, és a hajtásokban is felhalmozódhat (Wójcik – Tukiendorf, 2005). Florijn és van Beusichem (1993) beltenyésztett kukoricavonalakban vizsgálták a kadmium eloszlást, és két csoportot különítettek el. Az egyik csoportba olyan vonalak tartoznak, melyek hajtásában alacsony de gyökerében magas a kadmiumkoncentráció („shoot Cd excluder”), a másik csoportba pedig azok, melyek gyökér és kadmiumkoncentrációi nem mutatnak jelentős eltérést („non-shoot Cd excluder”). Bizonyították azt is, hogy a hajtásokban felhalmozott kadmium mennyiségekben észlelt genotípusos különbségek inkább az eltérő belső megoszlásnak, mint kadmium felvételnek köszönhetőek (Florijn – van Beusichem, 1993).

2.5.3 A kadmiumstressz hatásai növényekben

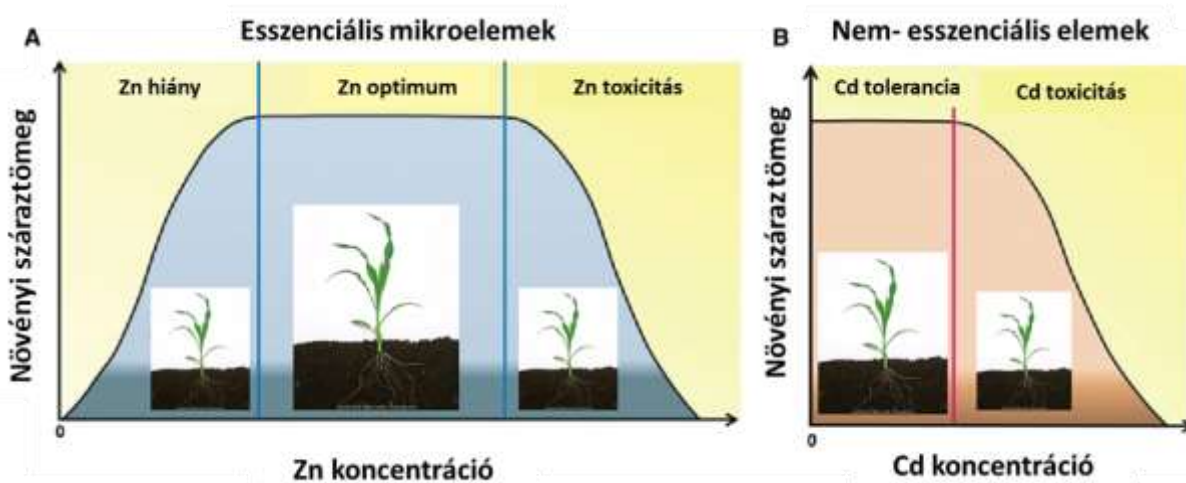
A nehézfémstressz szemmel látható tünete a növekedésgátlás. A kadmium negatívan befolyásolja a kukorica csíranövény fejlődését, és a csírázási folyamatokat (Rascio et al., 1993; Seregin – Kozhevnikova, 2005). A fejlődő növények gyökér- és hajtáshosszát, friss- és száraztömegét csökkenti (3. ábra), valamint kisebb termésmennyiséget eredményez (Dániel – Győri, 2000). Az ilyen jellegű elváltozások azonban nem feltétlen észlelhetők alacsony koncentrációk esetén (Lagriffoul et al., 1998). Több növényfajban is megfigyelték, hogy a

kadmiumstressz gátolja a mitózist, de még inkább a sejtek növekedését (Prasad, 1995). A kadmium felhalmozódás hatására a gyökérsejtek életképessége csökken, és ez visszaveti a gyökér fejlődését (Siroka et al., 2004). A nehézfémek, így a kadmium is, alacsony koncentrációban serkentheti a gyökérfejlődést különösen a toleráns növények esetében (Ernst et al., 1992; Wójcik – Tukendorf 1999). Klejdus (2004) vizsgálatai során 100 μM -os kadmiumkezelés stimulálta a kukoricaszemek csírázását. Azt a következtetést vonták le, hogy a kadmiumtoxicitást a növény nagy mennyiségű vízfelvétellel próbálja kompenzálni. Csírázásgátló hatást csak 1 mM-os koncentráció felett tudtak kimutatni (Klejdus et al., 2004). A kadmiumstressz visszaveti az oldalgöyökképződés intenzitását, a növény gyökerei megbarnulnak és csavarodottá válnak (Wójcik – Tukendorf, 1999; Nocito et al., 2002; Wang et al., 2007). A gyökérnövekedésre gyakorolt negatív hatást a részben a gátolt sejtosztódás és sejtfa alkotók szintézise, valamint a Golgi-apparátus károsodása eredményezi.

Alacsony kadmiumkoncentrációk (0,05 és 0,1 μM) akár klorofillszintézist és fotoszintetikus aktivitást növelő hatásúak is lehetnek (Nyitrai et al., 2003), de általánosságban elmondható, hogy a kadmium negatívan befolyásolja a fotoszintézist és a klorofill bioszintézist. Pál (2006) vizsgálatai során, egy hetes klorofilltartalom mérés utolsó napján 10, 25 és 50 μM Cd koncentrációval nevelt kukorica növények 11, 13 és 39 %-al kevesebb klorofillt tartalmaztak mint a kontrollnövények (Pál et al., 2006). A kadmiumstressz a kloroplasztiszok struktúrájának torzulását eredményezi, ami alakzavarokhoz és felfújtt tilakoidokhoz vezet (Najeeb et al., 2011). A kloroplasztiszok szerkezetének elváltozása részben a kloroplasztiszok számának és méretének, a keményítőszemcsék tartalmának és a plaztoglobulinok felhalmozódásának jelentős csökkenésében nyilvánul meg (Ying et al., 2010; Wang et al., 2011; Elhiti et al., 2012). A kloroplasztisz szerkezetének károsodása a membrán zsírsav- és lipidtartalmának fokozott peroxidációja miatt is bekövetkezhet, ami a fokozott lipoxigenáz (LOX) aktivitásnak köszönhető (Remans, 2010). A LOX közvetíti a többszörösen telítetlen zsírsavak oxidációját, beleértve a kloroplasztisz membránlipideket. A LOX aktivitás és a lipidperoxidáció között többen is pozitív korrelációt mutattak ki kadmiumstressz alatt (Maksymiec – Krupa 2006; Tamas et al., 2009).

A kadmium oxidatív stresszt okoz a növényekben. A membrándiffúzió megváltozik és ezt követően, szubcelluláris szintű ROS (reaktív oxigénformák) termeléssel összefüggő növekedési lemaradást eredményezhet (Mahmood et al., 2009). Mivel oxidatív jellegű, a kadmium stressz különböző ROS-ok képződéséhez vezet, mint például a szuperoxid-aniongyök (O_2^-) ami a molekuláris oxigénből egyelektronos redukcióval keletkezik. A szuperoxid-aniongyök elektronfelvétellel hidrogénperoxiddá (H_2O_2) alakulhat, ami membránkárosodást és

elektrolitszivárgást okoz (Edreva, 2005; Khan et al., 2007). A ROS-termelődés általában a membránfehérjék és lipidek nem specifikus oxidációjához vezet, ami egyidejűleg a sejtek pusztulásával jár (Cho – Seo 2005; Khaliq et al., 2015). A kadmiumstressz által indukált túlzott ROS termelődés csillapításáért az antioxidatív védelmi rendszer enzimei felelősek a növényekben. Ilyenek a szuperoxid-dizmutáz (SOD), peroxidáz (POD), kataláz (CAT), aszkorbát-peroxidáz (APX), valamint néhány nem enzimatis anyag, mint az aszkorbát (AsA), α -tokoferol, glutation (GSH) és karotinoidok (Pál et al., 2006). Számos vizsgálat eredményei mutatják, hogy a kadmium- és más nehézfémek lipidperoxidációt idéznek elő kukoricában (Pál et al., 2006; Xu et al., 2014; Anjum et al., 2015; 2016; Abbasi et al., 2016).



3. ábra: Esszenciális (Zn) és nem esszenciális (Cd) elemek hatásának összehasonlítása a növényi szárazanyagképzés tekintetében. Schulze és munkatársai (2019) alapján

2.6 Nehézfémstressz kimutatására alkalmas nem-invazív metodikák: gyors műszeres mérések és biofoton emisszió alapuló képalkotás

A növényi stresszvizsgálatok során kiemelt fontosságúak a roncsolásmentes, azaz nem-invazív technológiák, mivel segítségével ugyanazon növény több alkalommal is vizsgálható, emellett a stresszjelenségek háttérében álló alapvető fiziológiás folyamatok jól jellemezhetők anélkül, hogy a vizsgálni kívánt növényi szövet roncsolásnak lenne kitéve. A számos nem-invazív technológia közül legtöbb a fotoszintetikus apparátus - mint alapvető növényi állapotot meghatározó tényező - jellemzésére alkalmas készülékek.

2.6.1 Klorofill tartalom becslés

A növényi klorofill tartalom becslésére alkalmas készüléket (Plant Soil Analysis Development-SPAD) fejlesztése során elsődlegesen nitrogén ellátottság becslésére használták az üzemi növénytermesztés során. Mivel azonban a nitrogén tartalom és a klorofill tartalom szoros

összefüggésben állnak, ezért a SPAD index értéke jól jellemzi és általa becsülhető a növényi klorofill tartalom. A növények relatív klorofill tartalmának becslése többnyire a leveleken áteső fény mérésével történik. A mérések során mértékegység nélküli értékeket kapunk, amelyeknek köszönhetően rálátást nyerünk a növényi-tápanyag ellátottság szintjéről, valamint az esetleges stressz hatások fellépéséről. Ezen műszerekkel gyorsan és roncsolásmentesen lehet meghatározni a levelek nitrogénellátottságával jól korreláló klorofill tartalmat, amely paraméter meghatározása kulcsfontosságú a növényi tápanyagellátottsági vizsgálatokban. A készülék a 650 és 940 nm hullámhosszon képes mérni a növények intakt transzmisszióját, amely a becsült növényi klorofilltartalmat jól reprodukálhatóan szolgáltatja (Haripriya – Byju, 2008).

2.6.2 Normalizált vegetációs index (Normalised difference vegetation index-NDVI)

Az egészséges növény klorofill pigmentje a látható vörös fény nagy részét elnyeli, míg a növény sejtstruktúrája a közeli infravörös fény (Near infrared: NIR) nagy részét (>700 nm) visszaveri. Ez azt jelenti, hogy a magas fotoszintetikus aktivitás kevesebb visszaverődést eredményez a vörös sávban és nagyobb visszaverődést a közeli infravörös sávban. Az NDVI az élő, fotoszintetikusan aktív klorofill tartalommal rendelkező növények esetében jól meghatározott 0,6 érték fölötti, azonban tápanyagellátottságtól szenvedő növények esetében ez az érték alacsonyabb, ezáltal jól használható a növényi stresszreakciók meghatározása céljából is.

2.6.3 Fluoreszcencia indukció

A fluoreszcencia indukciós mérés lehetővé teszi, hogy információt gyűjtsünk a növények fotoszintetikus apparátusának állapotáról a kettes fotokémiai rendszer (PSII) fotoszintetikus hatékonyságán keresztül, nem-invazív módon. A gyors PSII fluoreszcencia tranzienst (OJIP) használva megfigyelhető a PSII fotoszintetikus aktivitása, a fotoszintetikus elektrontranszportlánc redoxállapota és a PSI/PSII sztöchiometria (Kalaji et al., 2014). A mérni kívánt felületet sötétadaptálni kell, ilyenkor nem zajlik aktív fotoszintézis (F_0), majd a maximális érték (F_m) meghatározásához egy rövid fényimpulzus szükséges ugyanazon területre. Az ilyenkor kibocsátott fluoreszcencia értékeket a PSII állapota befolyásolja. Az F_0 - F_m különbség a PSII változó fluoreszcenciája (F_v), és ebből számolható ki a PSII maximális kvantumhatékonysága (F_v/F_m) (Oláh, 2020; Lorenzo et al., 2022).

2.6.4 Biofoton emisszió mérés

Az in-vivo és nem-invazív vizsgálatok alkalmazása a növényi stressz észlelésében kiemelt fontosságú. A növényeken, az ilyen módszereket a fejlődésük során többször is alkalmazhatjuk, és megfigyelhetjük a bekövetkező változásokat, mindezt úgy, hogy a növényekben nem teszünk kárt. A biofoton emisszió mérése egy modern és újszerű, nem invazív vizualizációs

módszer, amely alkalmas a növényi stresszállapot detektálására. A biofoton emisszió mérési technika az elmúlt két évtizedben egyre növekvő érdeklődést váltott ki (Bodemer et al., 2000; Jócsák et al., 2020; Pónya et al., 2021). Ezzel a technikával vizsgálható a növényi sejtekben zajló fotoszintetikus és oxidatív biokémiai folyamatok során kibocsátott késleltetett fluoreszcencia (delayed fluorescence-DF) és ultragyenge biolumineszcencia (ultraweak-bioluminescence-UWLE), amelyek biofoton a emisszió formái. A korszerű biofoton emisszió mérésére alkalmas készülékek egy teljes fényzáró kamrában elhelyezett ultraérzékeny, mélyhűtött CCD (charge-coupled device) kamerával vannak felszerelve. Így lehetőség van egyetlen készülék használatával mérni egy mérési időtartam alatt több anyagcsere folyamat nyomonkövetése a késleltetett fluoreszcencia és az ultragyenge biolumineszcencia adatok alapján.

2.6.4.1 Késleltetett fluoreszcencia (delayed fluorescence-DF)

A növényekben zajló fotoszintetikus és biokémiai folyamatok fotonkibocsátással járnak. A fénytől elzárt növényekben a fotoszintetikus működés megszakad, és az elektrontranszportláncból a fel nem használt elektronok egy része visszaáramlik a reakcióközpontba. Az elektronok hatására a klorofill molekulák gerjesztett állapotba kerülnek és ez fotonkibocsátást eredményez, ami jól tükrözi a fotoszintetikus apparátus állapotát (Bodemer et al., 2000; Jócsák et al., 2020). Több kutatás bizonyította, hogy a DF mérése alkalmas az in-vivo stressz kimutatásra (Jócsák et al., 2020; Sánchez-Moreiras et al., 2020; Lukács et al., 2022).

2.6.4.2 Ultragyenge biolumineszcencia (ultraweak-bioluminescence-UWLE)

A növényi sejtekben zajló oxidatív anyagcsere folyamatokból származó fotonkibocsátás az ultragyenge biolumineszcencia (UWLE). A biofoton emisszió ezen formája a késleltetett DF-hez mérten rendkívül kis mértékű. Fotonkibocsátás történik a mitokondriumokban, a peroxisómákban, bizonyos enzimatis folyamatok és reaktív oxigénformák (ROS) képződése során (szabadgyökök képződése), amely általában a membránfehérjék és lipidek nem specifikus oxidációjához vezet. Ezt követően a kialakult lipidperoxidációs folyamatok az UWLE megemelkedését eredményezik (Jócsák et al., 2020).

2.7 Nehézfémstressz nyomonkövetésére alkalmas egyes analitikai és molekuláris biológiai vizsgálatok

2.7.1 Lipidoxidáció mérés

A nehézfémstressz súlyos következményekkel járhat, mivel a stresszreakciók során keletkezett szabadgyökök könnyen reakcióba lépnek a biológiai membránokkal membránkárosodást, ezáltal elektrolitszivárgást okozva (Edreva, 2005; Khan et al., 2007). A nehézfémek nagyobb

koncentrációja megnöveli az ROS-termelődést, ami általában a membránfehérjék és lipidek nem specifikus oxidációjához vezet, ami egyidejűleg a sejtek pusztulásával jár (Cho – Seo 2005; Khaliq et al., 2015). A malondialdehid (MDA) mérés egy gyakran alkalmazott módszer a lipioxidációs szint kimutatására és mérésére. A tiobarbitursavas reakció által végbement abszorbancia elváltozás mértékéből meghatározható a lipioxidáció szintje.

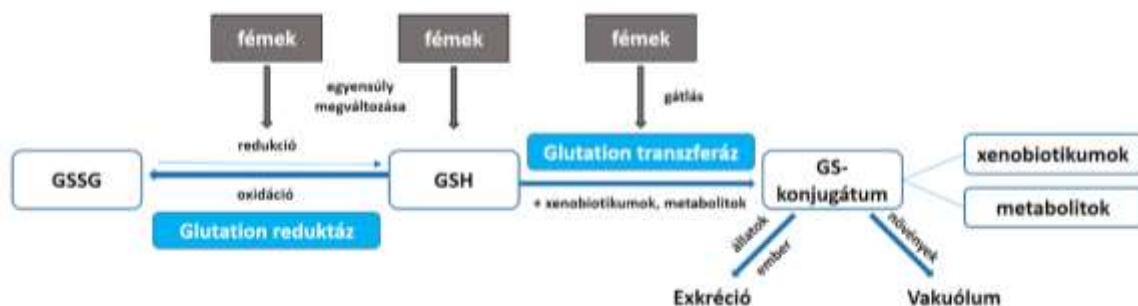
2.7.2 Vasredukáló képességen alapuló teljes antioxidáns kapacitás mérés

A reaktív oxigénformák túlzott termelődése által előidézett oxidatív stressz hatásait az antioxidáns rendszer feladata inaktiválni (Gutteridge, 1994). A vasredukáló képességen alapuló antioxidáns kapacitás (FRAP= ferric reducing ability of plasma) stresszanalitikai mérési módszerrel információt kaphatunk a növények nem-enzimatisz antioxidánsainak jelenlétéről. A mérésben használt vas-2,4,6-tripiridil-S-triazin (TPTZ) komplexben lévő Fe^{3+} ionokat az antioxidánsok redukálják Fe^{2+} ionokká, és a reakció kék színt és abszorbancia változást eredményez. Az abszorbanciát 593 nm-en spektrofotométerrel tudjuk mérni, minél több az adott mintában a vasredukáló képességű nem-enzimatisz antioxidáns, annál nagyobb mértékű az abszorbancia változás (Benzie – Strain, 1996).

2.8 Génexpressziós vizsgálatok

2.8.1 Glutation reduktáz (GR) és a glutation—s-transzferáz (GST) hatásmechanizmusa

A glutation-transzferázok (GST-k) enzimsaládja számos izoenzimből áll. Ezek az enzimek fontos szerepet játszanak a xenobiotikumok méregtelenítésében. Ez a folyamat a méreganyagok átalakítását és eltávolítását szolgálja. A GST-k katalizálják a szerves vegyületek összekapcsolását a glutation (GSH) nevű intracelluláris tiolvegyülettel (4. ábra). Ez a folyamat a vegyületeket hidrofilebbé és kevésbé toxikussá teszi, mivel hozzájárul a méreganyagok vízben való oldhatóságához és kiürítéséhez a szervezetből. Ezek az enzimek a növényi szervezetek mellett megtalálhatók a legtöbb organizmusokban, valamint emberi szervezetben is (Dixon et al., 2010; Cummins et al., 2011; Kumar – Trivedi, 2018).



4. ábra: a glutation reduktáz és a glutation—s-transzferáz enzimek hatásmechanizmusa Dobritzsch és munkatársai (2019) alapján

A glutation-transzferázok (GST) kulcsszerepet játszanak a szerves xenobiotikumok mellett az endobiotikus metabolitok méregtelenítésében is. Amikor nehézfémek kerülnek a szervezetbe, az oxidatív stressz és más káros hatások elleni védőmechanizmusok a GST-aktivitás növekedését is magukban foglalják, ami fontos védelmet nyújthat a növényeknek (Anjum et al., 2012). Mindemellett egyre többször kimutatják, hogy a fémek lehetnek közvetlen vagy közvetett gátlói a GST-k működésének, oly módon, hogy az enzimaktivitást gátolják, vagy csökkenthetik a redukált glutation (GSH) koncentrációt a sejtekben. Ez utóbbi a fémekkel szemben is védőszerepet játszik, mert hozzá tud kötődni a fémionokhoz, például a higany vagy a kadmium, illetve az általuk kiváltott oxidatív stressz hatását képes csökkenteni a GSH/GSSG egyensúly megváltoztatásával (Kalinina et al., 2014; Rubino, 2015).

2.8.2 Lipoxigenáz (LOX) hatásmechanizmus

A lipoxigenáz (LOX) enzimek olyan fontos enzimek, amelyek a többszörösen telítetlen zsírsavak oxigénnel való reakcióját katalizálják a növényi sejtekben (Hildebrand 1989; Brash 1999). A növényekben többféle LOX-izoforma létezik, amelyek eltérő időbeli és térbeli eloszlást mutatnak a növények fejlődése során (Fischer et al., 1999). Az LOX aktivitását különböző sejtfrakciókban is megfigyelték a növényekben (mitokondrium, kloroplasztisz, vakuólum), de a legnagyobb aktivitás az oldható-citoplazmatikus frakcióhoz köthető (Liavonchanka – Feussner 2006). A LOX enzimek az oxilipinek nevű vegyületek szintézisének első lépését katalizálják. Ezek az oxilipinek fontosak a növényi anyagcsere számos folyamatában, beleértve a növekedést, a stresszre adott válaszokat, a szenescenciát (öregedést) és a sejtek közötti jelátvitelt. A LOX enzimek kulcsszerepet játszanak a növények fejlődésében és különböző körülményekre adott válaszokban, például sebesülések, stresszhelyzetek vagy a sejtek közötti kommunikáció során. A kutatások ezen enzimek jobb megértése hozzájárulhat a növényi biológia és agronómia területén végzett munka fejlődéséhez (Feussner – Wasternack, 2002; Porta – Rocha-Sosa, 2002; Tamás et al., 2009).

A számos lipoxigenáz enzimet kódoló gén közül a LOX2 gén terméke szerepet játszik az abiotikus és biotikus stresszorok elleni védekezés kialakításában. Ezen gén kódolja a 9-lipoxigenáz enzimet, amely a stressztűrés növelésében szerepet játszó vegyület, az alfa-linolénsav egyik kettős kötését oxidálja (Oláh, 2020).

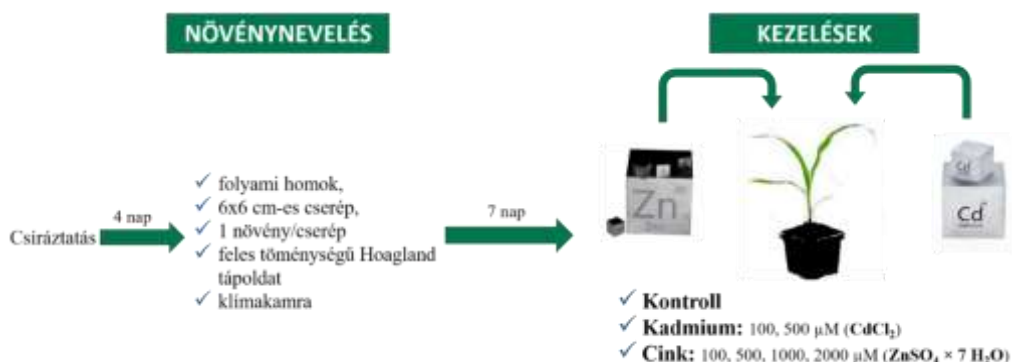
3. Anyagok és módszerek

3.1 Növénynevelés

A kukorica magokat szűrőpapírban előcsíráztattuk 4 napig. A magokat ráhelyeztük a szűrőpapírra, összetekertük és desztillált vízzel áztattuk. A csírázott magokat folyami homokkal feltöltött, 6×6 centiméteres műanyag cserépbe ültettük, úgy, hogy a hajtásból 1-2 centiméter ne legyen homokkal fedve. A növényeket Pol-Eco Apartura KK 1450 klímakamrába (POLEKO-APARATURA sp.j. ul. Kokoszycka172C 44-300 Wodzisław Śląski, Lengyelország) helyeztük 20 °C-on, $700 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitással 16 órán keresztül nappali, és 16 °C; $0 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitással 8 órán keresztül éjszakai körülmények között. Egy héten keresztül Hoagland munkaoldattal (4 × hígításban) (mikroelem-tartalom nélküli) öntözve neveltük a növényeket ilyen körülmények között (5. ábra). A nevelés alatt az összesen 80 növényből választottuk ki a látszólag legjobb állapotban lévő 56 darabot. Ezekből 35 darabot használtunk biofoton emissziós mérésekre és 21 darabot pedig egyéb nem-invazív vizsgálatokra.

3.2 Kezelések

A kiválasztott növényeket kezelésként 7 csoportra osztottuk, így minden kezelési koncentrációra 8 növényt használtunk. A nehézfémek kezeléseink cink esetében a kontroll csoport mellett 100 μM , 500 μM , 1000 μM és 2000 μM koncentrációjú cink-szulfát ($\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$) oldattal, kadmiumban pedig 100 μM és 500 μM koncentrációjú kadmium-klorid (CdCl_2) oldattal történt, a kétnaponta történő öntözéssel egyidejűleg, 10-10 mL mennyiségben kijuttatva (5. ábra). A kezelések különös óvatosságot igényelnek, a kadmium minden élő szervezetre veszélyes elem, ezért az oldatokat gumikesztyűben és pipettával juttattuk a növények alá. A növénynevelés következő szakaszában kétnaponta kezeltük a növényeket összesen háromszor: a kontroll növényeket feles töménységű Hoagland tápoldattal öntöztük, a víz- és tápanyagellátás érdekében, a kezelések pedig az említett koncentrációkkal végeztük.



5. ábra: A vizsgálat során alkalmazott cink (kontroll, 100, 500, 1000, 2000 μM) és kadmium (kontroll 100, 500 μM) kezelések

3.3 Fenológiai paraméterek mérése

A növények magasságát az egy hetes nevelés után az első kezeléstől számított hetedik napon mértük 30 centiméteres vonalzóval.

A kezelések befolyeztével analitikai mérlegen mértük meg a növények tömegét, és ezen a napon felszámoltuk az összes növényt. A levelek és gyökerek egyaránt fel lettek aprítva, majd kezelésként alufóliába kerültek 1 g az elemtartalom méréshez, 0,1-0,1 g az analitikai mérésekhez, és 0,03 g a génexpressziós vizsgálatokhoz. A növényi mintákat -20 °C-on, a génexpressziós vizsgálatokra szánt mintákat pedig -80 °C-on tároltuk.

3.4 Elemtartalom mérése

Az elemtartalom meghatározás száraz mintákból zajlott a MATE Kaposvári Campus Élettani és Takarmányozástani Intézet laboratóriumának szabványosított módszerei (MSZ08-1783-33:1985, MSZ-08-1783-17:1984 5.1) szerint. A méréseket az alábbi műszerekkel végeztük: Ohaus Adventurer Pro analitikai mérleg (OHAUS CORPORATION, 1.800.672.7722, 8 Campus Drive, Suite 105, Parsippany, NJ 07054, USA), Nabertherm LT24/11/P330 kemence (Nabertherm GmbH, Bahnhofstr. 20, 28865 Lilienthal, Németország), Memmert WNB 22 vízfürdő (Memmert GmbH + Co., KG Äußere Rittersbacher Straße 38 91126 Schwabach, Németország) és JY Ultima2 ICP-OES atomabszorpciós spektrofotométer (HORIBA Advanced Techno, Co., Ltd., Miyanonishi-cho, Kisshoin Minami-ku Kyoto 601-8306, Japán).

3.5 Gyors, műszeres nem-invazív vizsgálatok

3.5.1 Relatív klorofill tartalom becslés

A növények relatív klorofill tartalmát Minolta SPAD 502 (Konica Minolta, Europaallee 17 30855 Langenhagen Germany) készülékkel mértük. A 650 és 940 nm hullámhosszon képes mérni a növények intakt transzmisszióját. A klorofill tartalom és a SPAD index értéke szoros kölcsönhatásban állnak egymással, ezért a mérés eredménye egy mértékegység nélküli becsült klorofilltartalmat szolgáltat. A méréseket az első kezeléstől számított 168. órában végeztük. Ilyenkor kezelésként az erre szánt 3 növényen mértünk 30 SPAD indexet, vagyis minden növényről 10 értéket. A növényenkénti 10 SPAD indexet a levélfelület eltérő részein mértük meg, így a levelek nagyobb részéről kaphattunk adatokat, mintha csak 1-1 helyen vizsgáltuk volna.

3.5.2 Normalizált vegetációs index-NDVI

A normalizált vegetációs index-szel (Normalised difference vegetation index-NDVI) jellemezhető a növény zöld szín intenzitása, mivel az egészséges növény klorofill pigmentje a

látható vörös fény nagy részét elnyeli, míg a növény sejtstruktúrája a közeli infravörös fény nagy részét visszaveri. A mérés során használt műszer egy PolyPen RP 410 (PSI (Photon Systems Instruments) spol. s r.o., Průmyslová 470, 664 24 Drásov, Csehország) volt, amely mérőfelületére csíptetve a levelet a reflektancia mérés, majd az abból szofveresen számított vegetációs index értékek meghatározhatók. A klorofill taralom mérésével egy időben végeztük az NDVI vizsgálatokat is. A készülék tetején lévő csíptetővel befogtunk egy levelet, majd egy gombnyomással mérhettük az értékeket.

3.5.3 Fluoreszcencia indukció mérés

A fluoreszcencia indukciós méréssel megvizsgálhatjuk a növények fiziológiai állapotát kettes fotokémiai rendszer (PSII) fotoszintetikus aktivitásán keresztül. A használt műszer egy FluorPen FP 110/D (PSI (Photon Systems Instruments) spol. s r.o., Průmyslová 470, 664 24 Drásov, Csehország) volt. A levelekre helyezett levélkapcsok lezárva sötétadaptálják a mérni kívánt felületet 30 percig. Amikor a készüléket bele illesztjük a kapocsba akkor a fedelét elhúzzuk majd ezután elvégezhető a mérés, és meghatározható többek között az F_v/F_m érték, ami a PSII maximális kvantumhatékonyságát adja meg.

3.6 Biofoton emisszió mérés

A biofoton emisszió detektálását egy NightSHADE LB 985 In Vivo Plant Imaging System (Institute Berthold Technologies Bioanalytical Instruments, Calmbacher Strasse 22, D-75323 Bad Wildbad, Németország) segítségével végeztük (6. ábra), amely egy érzékeny, termoelektromosan hűtött, lassú letapogatású, $-68\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra hűtött NighOwlcam CCD-készülékkel rendelkezik. Az expozíciós idő 60 másodperc volt, 4×4 pixel binninggel, és mind a "háttérkorrekció", mind a "kozmosz elnyomás" opciót engedélyeztük, hogy biztosítsuk a potenciálisan kozmosz sugárzás által okozott nagy intenzitású pixelek eltávolítását. A késleltetett fluoreszcencia (DF) standardizált kiindulási értékének elérése érdekében a biofoton emisszió számszerűsítése előtt 5 másodperc időtartamra távoli vörös (730 nm), vörös (660 nm), zöld (565 nm) és kék (470 nm) fény maximális intenzitású LED paneleket alkalmaztunk. Ezután a LED-eket kikapcsoltuk, és a lumineszcenciát néhány percig figyeltük, a fotonszámlálást 60 másodpercenként gyűjtöttük és elemeztük az IndiGO™ 2.0.5.0. szoftver segítségével. Az így kapott másodpercenkénti számlálási értékeket (cps) ezután átváltottuk négyzetmilliméterenkénti másodpercenkénti számlálási értékekre (cps/mm^2), és kiigazítottuk a területet. A biofotonemisszióknak ez a formája alacsonyabb emissziós jelnél stresszállapotra utal, amelynél a növények fotoszintetikus apparátusa zavart. Az ultragyenge biolumineszcenciát (UWLE) is ezzel a műszerrel mértük. A végső DF-mérések után

kezelésként egy leválasztott levelet helyeztünk a műszerbe, és elszigeteltük a fényforrástól. Az 5 másodperces megvilágítást 60 perces sötétben töltött mérési időszak követte. Ebben az esetben az első 30 percet nem vettük figyelembe, mivel a DF jelenség körülbelül ennyi idő alatt megszűnik, majd következik az UWLE. Ez utóbbi nem fotoszintézishez kapcsolódó fotonemisszió, hanem a növények oxidatív anyagcsere-folyamataiból származik. A mérések során készült képeket az IndiGO™ 2.0.5.0. szoftver mentette el, és a biofoton emissziós sebességet másodpercenkénti számlálásban (cps) fejeztük ki. A képeken kiválasztott területek cps értékeit milliméteres egységekre osztottuk, hogy megkapjuk a növény által négyzetmilliméterenként kibocsátott fotonok számát (cps/mm²).

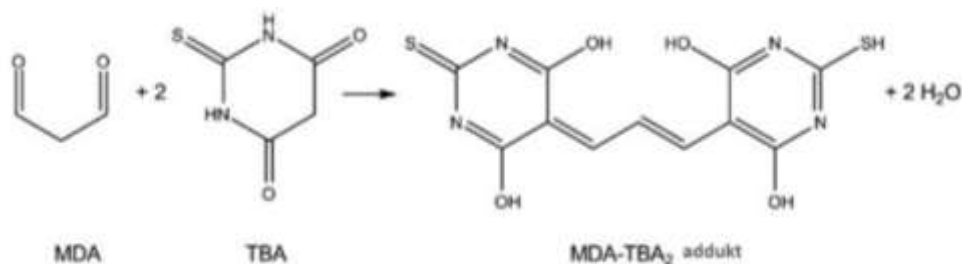


6. ábra: Biofoton emissziós mérések (Nightshade LB 985)

3.7 Lipidoxidáció mérés

A lipidoxidációs mérésünkhöz Heath és Packer (1968) által kidolgozott malondialdehides (MDA) módszert használtuk néhány változtatással (7. ábra).

A 0,1 grammos növényi mintákat fagyasztoóban hűtött dörzsmozsárban dörzsöltük el 1,5 mL 0,1 %-os triklórecetsav (TCA) oldattal, és helyeztük 2 mL-es Eppendorf csövekbe. A centrifugálás ebben a módszerben is 10 percig tart, 4 °C-on és 13000 fordulat/percen (Hettich, MIKRO 220R; Andreas Hettich GmbH&Co. KG Föhren str. 12, D-78532 Tuttlingen, Németország). A kivonatokból ezután 0,375 µL-t adtuk 1125 µL reagenshez, ami egy 20 %-os triklórecetsav (TCA) oldat amely 0,5 % tiobarbitursavat (TBA) tartalmaz. Mivel az inkubálás 30 percig tart 96 °C-on, a mintákat le kell hűteni az abszorbancia mérés előtt spektrofotométerrel. Az adatokat nM/g friss tömegre adjuk meg, három minta átlagában.



7. ábra: Malondialdehid (MDA) reakció 2 molekula 2-tiobarbitursavval (TBA). Weitner és munkatársai (2016) alapján

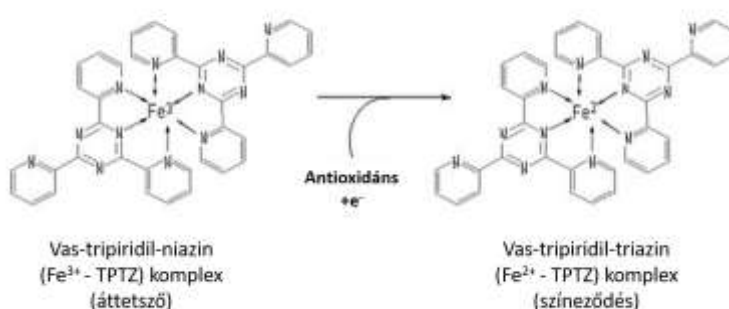
3.8 Vasredukáló képességen alapuló teljes antioxidáns kapacitás mérés

A vasredukáló képességen alapuló teljes antioxidáns kapacitást Benzie és Strain (1996) módszerével végeztük (8. ábra), az Estimation of total antioxidant activity című protokoll alapján, amely részletesen leírja a FRAP (ferric reducing ability of plasma) metodika lépéseit. Először a reagenst (munkaoldat) készítettük el, amelyhez három oldatot használtunk 10:1:1 arányban:

- Acetát-puffer: 300 mM, pH 3,6
- TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin) 10 mM 40 mM HCl-ban; 100 mL desztillált víz 330 μ L HCl-ban
- $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$: 20 mM

Az elkészült munkaoldat fényérzékeny, ezért szekrénybe helyeztük a felhasználásig.

A kezelésenkénti 0,1 gramm növényi mintákat fagyasztoóban hűtött dörzsmozsárban dörzsöltük el 1,5 mL 7,6 pH-jú foszfát pufferrel és mintánként azonos mennyiségű kvarchomokkal. Az eldörzsölt gyökereket és leveleket 2 mL-es eppendorf csövekbe raktuk, majd centrifugáltuk (Hettich, MIKRO 220R; Andreas Hettich GmbH&Co. KG Föhren str. 12, D-78532 Tuttlingen, Németország) 10 percen keresztül 4 °C-on 13000 fordulat/percen. Centrifugálás alatt szintén 2 ml-es eppendorfbokba 1950 μ L munkaoldatot tettünk, majd mikor a centrifuga program lejárt a felülúszóból 50 μ L-t adtunk a reagenshez. Ilyenkor fontos figyelni rá, hogy a kivonatot gyorsan pipettázzuk a reagensbe, mert a lejátszódó reakció gyorsan végbemegy, és ezért a kész mintákat egyből inkubáltuk 37 °C-on 15 percig. Az abszorbanciát spektrofotométerrel mértük meg 593 nm-en, és az értékeket μ g aszkorbinsav (AS) ekvivalens/g friss tömegben adtuk meg, három minta átlagában.



8. ábra: Fe(III) -TPTZ komplex redukciós reakciója Bhandari és munkatársai (2015) alapján

3.9 Génexpressziós vizsgálatok

A levél és a gyökér mintákból egyenként 30 mg-ot az RNeasy Tissue Mini Kit (Qiagen, 19300 Germantown Road, Germantown, MD 20874, USA) lízispufferében homogenizáltuk egy Tissuelyser II nagy áteresztőképességű mintahomogenizáló készülékben (Qiagen, 19300 Germantown Road, Germantown, MD 20874, USA). Az RNS lebomlásának elkerülése érdekében a homogenizátor adapterét -20 °C-ra hűtöttük. Az RNS extrakciót a gyártó utasításai szerint végeztük. Az RNS mennyiségét és minőségét Thermo Scientific™ NanoDrop™ OneC Microvolume UV-Vis spektrofotométerrel mértük (Thermo Scientific™ 840274200, 168 3rd Ave, Waltham, MA 02451, Massachusetts, USA). A cDNS-szintézist a QuantiTect Reverse Transcription Kit segítségével végeztük, 15 percig 42 °C-on (Qiagen, 19300 Germantown Road, Germantown, MD 20874, USA) a gyártó utasításai szerint, miután 2 percig 42 °C-on DNS-ázos emésztést végeztünk. A cDNS-szintézist követően a PCR-reakciót az alábbi primerekkel végeztük el (1. táblázat):

1. táblázat: génexpressziós vizsgálatokra használt primerek

Név	Szekvencia	Tapadási hőmérséklet (°C)	Forrás
MEP	F: TTCCTCATGTTCTTCGTGCC/ R: CAGTTCTCATTCCATCCGTG	61,3	Manoli, 2012
GST	F: GACCATCAACTTCGCCACC/ R: ATCTACAAGTCACCATCCTGC	62,7	Oláh, 2020
GR	F: GGAACCTACCAAACCAGATTA/ R: GGCAACGAAGACATCAACATC	60,4	Oláh, 2020
LOX	F: CCCAACAGCATTTCATCTG/ R: CCAATTACCACGCTTCTCATTC	62,3	Oláh, 2020

A következő feltételek mellett: kezdeti denaturálás 95 °C-on 15 percig; 40 PCR-ciklus, mindegyik 30 s 95 °C-on, 60 s 60 °C-on és 1 perc 72 °C-on. Az ampikonokat olvadáspont elemzéssel, kezelésként három minta feldolgozásával azonosítottuk, majd a küszöbciklus értékek alapján határoztuk meg a relatív génexpressziós szinteket a $2^{-\Delta\Delta CT}$ módszerrel (Livak – Schmittgen 2001). Emellett primerpáronként elvégeztük az ampikonok olvadáspont analízisét is, amely alátámasztja egy adott géntermék specifikus amplifikációját. Ennek a módszernek köszönhetően a génkifejeződési értékek összehasonlíthatóak az egyes gének és a kezelések között is.

3.10 Statisztikai elemzés

A kísérleti adatokat Microsoft Excel szoftver v16.0 segítségével táblázatban rendszereztük, átlagokat és szórást számoltunk, emellett az eredményeket egytényezős varianciaanalízissel

(one-way ANOVA, $p < 0,05$), valamint Duncan post hoc tesztel értékeltük az IBM SPSS 20.0 statisztikai program segítségével. Az adatok PCA-hoz való kezdeti előkészítése során a Min-Max normalizálási módszert alkalmaztuk az értékek nagyságrendi összehasonlíthatóságának elérése érdekében. Ez a módszer minden jellemzőt ugyanabban a tartományban (0-1) ír le, biztosítva az objektivitást és a pontosságot az értékelési folyamatban. Következő lépésként a főkomponens-elemzést (PCA) alkalmaztuk azon változók azonosítására, amelyek a legmagasabb szinten befolyásolták az adatállomány változásait. A PCA eredményeit és grafikonjait a "devtools" (Wickham et al., 2022) és "ggplot2" (Wickham, 2016) csomagok segítségével számítottuk ki és rajzoltuk meg az R-ben. Következő lépésként a változók közötti kapcsolat erősségét a Pearson-féle korreláció segítségével határoztuk meg. A Pearson-féle korrelációs együtthatókat hő térképekkel szemléltettük az R (R Core Team, 2023) segítségével.

4. Eredmények és értékelésük

4.1 Elemtartalom vizsgálat

Az elemtartalom vizsgálat igazolja fémek felvételét, amely mg/kg-ban történt kimutatásra (2. táblázat).

Az elemek felhalmozódási adatai azt mutatják, hogy mind a cink (Zn), mind a kadmium (Cd) a növény föld feletti részeiben volt megtalálható, és a felhalmozódás mértéke a fémkoncentráció növekedésével nőtt. A cink akkumuláció arányos volt az alkalmazott koncentrációkkal, és a 500, 1000, 2000 μM Zn kezelések növekedést eredményeztek (500 μM Zn: 23%; 1000 μM Zn: 60,7%; 2000 μM Zn: 113%) egyedül a 100 μM Zn kezelés eredményezte a kukorica levelek cink-tartalmának csökkenését a kontrollhoz képest. A kadmium kezelt növények cink-tartalma nem különbözött a kontroll növények cink-tartalmától. A kadmium-akkumuláció szintén arányos volt az alkalmazott koncentrációkkal, és a kontrollhoz képest a 100 μM Cd kezelés egy nagyságrenddel, míg az 500 μM Cd kezelés két nagyságrenddel növelte a kukorica levelek kadmium-tartalmát. A cinkkel kezelt növények kadmium-tartalma nem különbözött a kontroll növények kadmium-tartalmától.

Az elemfelhalmozódási eredmények azt mutatták, hogy mind a cink (Bokor et al., 2014), mind a kadmium (Pál et al., 2006) elérte a kukoricanövények föld feletti részeit. A cink egyenletesen eloszló nehézfém (Greger, 2004), és korábban igazolták, hogy a kadmium is a kijuttatott koncentrációkkal arányosan transzlokálódik felfelé a hajtásba (Florijn – van Beusichem, 1993). Ezért, ahogyan azt korábbi kutatások mind a cink (Liu et al., 2016; Stepić et al., 2022), mind a kadmium (Pál, 2006; Kovács et al., 2014; Jócsák et al., 2020) esetében igazolták, mivel a kísérleti körülmények standardizáltak voltak, a fotoszintetikus és oxidatív folyamatokban

bekövetkező változások a kukoricanövényekben a nehézfémkezelés által kiváltott élettani változásokat tükrözték.

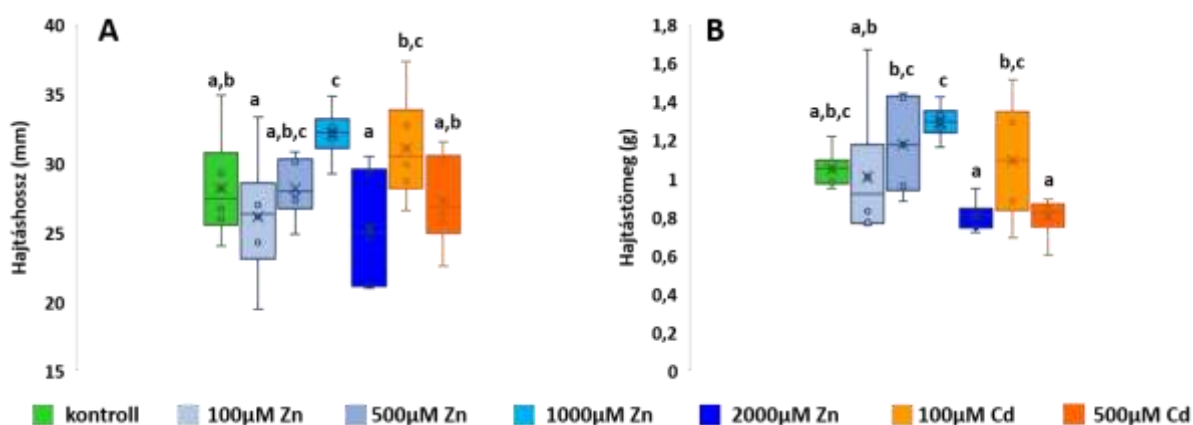
2. táblázat: A növények elemtartalma mg/kg száraz tömegben (Zn és Cd)

	kontroll	100µM Zn	500µM Zn	1000 µM Zn	2000 µM Zn	100 µM Cd	500 µM Cd
Zn	53,17±6,57	41,5±8,36	65,5±9,06	85,47±10,06	113,5±12,10	51,95±6	41,17±2,4
Cd	0,054±0,01	0,069±0,004	0,045±0,01	0,06±0,01	0,044±0,012	5,73±0,31	24,57±5,55

4.2 Fenológiai vizsgálatok eredményei

4.2.1 Növények magassága

A növények hajtáshosszát tekintve a kontroll csoport átlaga 28,18±1,88 cm, ezzel megegyező az 500 µM Zn kezelt csoport (28,18±1,05 cm). Átlag 26,12±2,23 cm volt a hosszúsága a 100 µM Zn-kel kezelt csoportnak ami 7,3%-al alacsonyabb a kontrollnál, és tápanyaghiány következménye is lehet. A 2000 µM Zn-kel kezelt csoport a legalacsonyabb, átlag 25,32±1,97 cm, az 1000 µM Zn kezelt pedig a legmagasabb 32,12±0,9 cm hosszúsággal. A kadmium kezelések közül az alacsonyabb dózis növekedést (31,04±1,85) váltott ki, a magasabb dózissal kezelt csoport pedig 3,2%-al volt alacsonyabb a kontrollnál (9/A ábra).



94. ábra: Hajtáshosszúság (A) és hajtástömeg (B) paraméterek eredményei

4.2.2 Növények tömege

A hajtások tömegében nem mutatkoztak nagyon eltérő eredmények a kontrolltól (1,05±0,05). A legnagyobb átlagos tömegű csoport az 1000 µM Zn 1,29±0,04-el, ami 22,86%-al nagyobb a kontrollnál. A legnagyobb koncentrációjú cink és kadmium kezelés átlaga (2000 µM Zn: 0,8±0,039; 500 µM Cd: 0,8±0,05) egyaránt 23,2%-al kisebb a kontrollnál (9/B ábra).

4.3 Fotoszintézissel kapcsolatos vizsgálatok eredményei

4.3.1 Klorofill tartalom becslés eredmények

A vizsgált növények összesített SPAD-indexeit szemlélteti a 10/A ábra. A kontroll értéke $40,08 \pm 0,9$, ehhez viszonyítva minden kezelés alacsonyabb átlagot eredményezett. A két legmagasabb koncentrációval ($500 \mu\text{M}$ Cd és $2000 \mu\text{M}$ Zn) kezelt növények esetében mértük a legalacsonyabb átlagos klorofill tartalmat, amely mindkét esetben 30,5 volt. Ez 24,1%-al alacsonyabb a kontroll átlagánál, és egyértelműen nehézfémstresszre utal. Szintén alacsonyabb átlaga volt a $100 \mu\text{M}$ Zn kezelt növényeknek ($34 \pm 1,27$), amely 15,2%-al alacsonyabb a kontrollnál, feltételezhetően tápanyaghiány miatt.

A klorofilltartalom-becslés korábban már bizonyítottan sikeresen alkalmazható jól körülhatárolható különbségek vagy hosszú távú élettani változások esetében, például a tápanyagellátás vagy az öregedési folyamatok eltéréseit mutató kezeléseknél (Wiedemuth et al., 2005), és a jelen munka $2000 \mu\text{M}$ Zn esetében a 100 és $500 \mu\text{M}$ Cd koncentrációknál is szignifikáns csökkenést jelzett 6 napos fémkezelést követően, azonban az alacsonyabb cink koncentrációk (100 , $500 \mu\text{M}$) nem különböztek a kontrolltól.

4.3.2 Normalizált vegetációs index NDVI

A növények átlagos normalizált vegetációs indexeit az 10/C ábra mutatja. Az NDVI mérések esetében szintén minden kezelés alacsonyabb átlagot eredményezett a kontrollnál ($0,61 \pm 0,015$), valamint tápanyaghiányra utaló átlagot mutattunk ki a legalacsonyabb cinkkezelésre nézve ($0,51 \pm 0,04$), ezúttal a kontrollnál 16,4%-al volt alacsonyabb. A magasabb cinkkezeléseknél az átlagokban megfigyelhető egy kisebb mértékű csökkenő tendencia: $500 \mu\text{M} = 0,584 \pm 0,018$; $1000 \mu\text{M} = 0,58 \pm 0,01$; $2000 \mu\text{M} = 0,57 \pm 0,008$. A legalacsonyabb NDVI értékeket a $100 \mu\text{M}$ kadmiummal kezelt növényeken mutattuk ki ($0,5 \pm 0,02$), amely 18,1%-al alacsonyabb a kontrollnál.

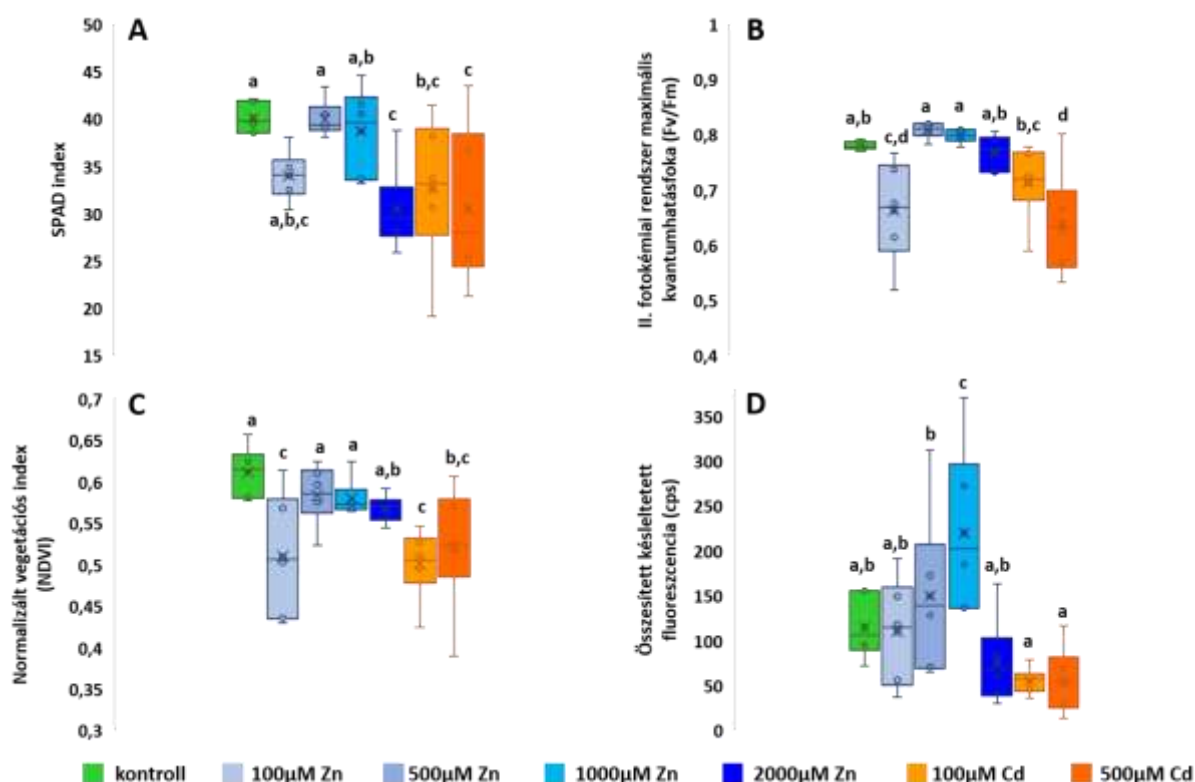
Az NDVI-mérések eredményeként kiderült, hogy mind a cink-, mind a kadmium-kezelés csökkentette az NDVI-t alacsonyabb koncentrációban, ami a cink esetében összhangban van a cinkre vonatkozó korábbi kísérleti eredményekkel (Schuerger, 2003), ahol a csökkenés a kukorica cink hiányának kialakulására utal. Ugyanez a csökkenés azonban a kadmium toxicitásának jele is lehet (Liu et al., 2010), csakúgy, mint ahogy azt Sridhar és munkatársai (2007) tapasztalták, akik a fitoremediációs folyamatokat vizsgálták úgy, hogy cink és kadmium stressz alatt olyan spektrális jeleket kerestek árpafélékben, amelyek a nehézfémek hatását jelzik. Eredményeik azonban nem tudták megkülönböztetni a különböző fémekkel kezelt

növényeket NDVI alapján. Jelen vizsgálatban azonban az NDVI eredmények alapján sikeresen megkülönböztettük a cink és a kadmium hatását.

4.3.3 Fluoreszcencia indukciós eredmények

A fluoreszcencia indukció mérés eredményeiben kimutattunk a kontrollnál ($0,78 \pm 0,007$) magasabb F_v/F_m értékeket is, többek között az 500 μM Zn ($0,8 \pm 0,014$) és az 1000 μM Zn ($0,8 \pm 0,006$) kezelt növények esetében (10/B ábra). Ez mutatja, hogy ezen mennyiséggel kijuttatott cink utánpótlás pozitívan hatott a fotoszintetikus aktivitásra. A legalacsonyabb átlagos F_v/F_m értékeket az 500 μM Cd kezelés esetében mértük ($0,6 \pm 0,09$), ami 23,1%-al alacsonyabb a kontrollnál. A legalacsonyabb koncentrációban kijuttatott cink (100 μM) szintén alacsonyabb, $0,66 \pm 0,09$ -es átlagot mutat ami 15,4%-al alacsonyabb a kontroll átlagánál. A kontrolltól legkisebb különbség a legmagasabb cinkkezelés (2000 μM) esetében mutattuk ki ($0,77 \pm 0,02$), ami csak 1,3%-os különbséget mutatott. Ezeknek megfelelően a fluoreszcencia indukció eredményeink alapján toxikus hatást csak kadmium kezelés váltott ki, a legalacsonyabb cink koncentrációval (100 μM) kezelt növények eredményei pedig valószínűleg tápanyaghiányra vezethetők vissza, csakúgy, mint a klorofill tartalom esetében.

A fluoreszcencia-indukcióban bekövetkező változásokat a klorofill-becslés eredményeivel összehasonlítva arra a következtetésre jutottunk, hogy ezek jobban jellemzik a vizsgált fémek kukoricára gyakorolt hatásait. A fluoreszcencia indukció F_v/F_m paraméterét számos növényfiziológiai vizsgálatban használták már (Jócsák et al., 2020; Abd El-Mageed et al., 2020; Alharby et al., 2021; Tang et al., 2023), és eredményeink ezt megerősítik, de hozzá kell tenni, hogy csak abban az esetben, ha a fém hatása eléggé kifejezett ahhoz, hogy toxikus legyen, mint például a kadmium esetében; vagy olyan cink kezelések esetében, amelyek feltehetően hiányreakciók eredményeként jelentkeztek (Oláh, 2020; Lorenzo et al., 2022).



10. ábra: A cink- és kadmiumkezelések hatása a klorofilltartalomra (A), a fluoreszcencia indukcióra (B), a normalizált vegetációs indexre (C) és a késleltetett fluoreszcenciára (D).

4.3.4 Késleltetett fluoreszcencia eredmények

Az összesített késleltetett fluoreszcencia (DF) eredmények a 10/D ábrán láthatók. A kontroll átlaga $114,79 \pm 17,1$, és a DF jel esetében is ennél valamivel alacsonyabb átlaga volt a legkisebb dózisú cinkkezelésnek ($110,36 \pm 28,9$). Két cinkkezelés, megemelkedett átlagos DF értékeket eredményezett. A kontrollhoz viszonyítva az $500 \mu\text{M}$ ($149,7 \pm 45,2$) tápoldatos kezelés esetében 30,4%-al, az $1000 \mu\text{M}$ ($219,9 \pm 45,1$) kezelésnél pedig 91,6%-al magasabb fotonkibocsátást mértünk. A legmagasabb cink dózissal kezelt ($2000 \mu\text{M}$) növényeken azonban csökkent DF értékeket mutattunk ki: $75,94 \pm 23,6$ ami 33,8%-al alacsonyabb a kontrollnál. Ebből egyértelműen látszik, hogy míg két cinkkezelés pozitívan befolyásolta a fotoszintetikus aktivitást, addig a legmagasabb alkalmazott kezelés már negatívan hatott a fotoszintézisre és a növények élettani állapotára. Utóbbihoz hasonlóan a kadmium kezelések is csökkent DF értékeket eredményeztek. Az $100 \mu\text{M}$ Cd kezelésnél ($55,5 \pm 7,98$) 51,7%-al, az $500 \mu\text{M}$ Cd kezelés esetében ($56,2 \pm 18$) pedig 51%-al alacsonyabb átlagértéket mértünk a kontrollhoz képest.

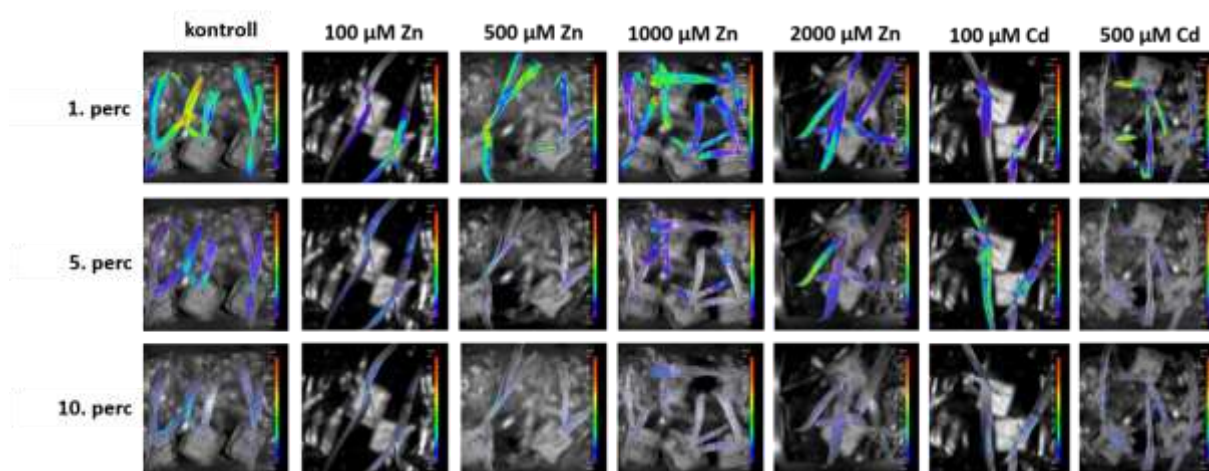
A DF csak a fotoszintetikus szövetekben van jelen (Sánchez-Moreiras et al., 2020; Jócsák et al., 2020; Pónya et al., 2021; Jócsák et al., 2022b; Keszthelyi et al., 2023) és a lecsengési ideje

milliszekundumtól percekig terjed, aminek a dinamikája a fotoszintetikus rendszer állapotát jelzi. E jelenség során sötét körülmények között a fotoszintetikus elektrontranszportlánc elektronjai visszatérnek a PSII reakcióközpontjába, ami gerjesztett klorofillmolekulákat eredményez, amelyek aztán visszatérnek alapállapotukba, és közben fotonokat szabadítanak fel. Vizsgálatok kimutatták, hogy a DF kezdeti értékei és lecsengési kinetikája felhasználható a növények homeosztatisztikus állapotának roncsolásmentes meghatározására és a stressz szintjének becslésére is (Bodemer et al., 2000; Lukács et al., 2022; Jócsák et al., 2024). Gerhardt és Bodemer (2000) munkájában a DF bomlási kinetikája volt jellemző egy stresszben lévő *Chlorella* spp. kultúrára a nem stresszben lévő kultúrához képest. Ez a lecsengési idő, hasonló volt ahhoz, amit Lukács és munkatársai (2022), valamint Jócsák és munkatársai (2024) is megfigyeltek, továbbá a stresszes növények bomlási kinetikája rövidebb volt a stresszmentes mintákhoz képest (Jócsák et al., 2024). Hasonló jelenséget figyeltünk meg jelen munkánkban is, amikor a legmagasabb (2000 μM) cink és mindkét kadmium koncentráció (100, 500 μM) csökkent kezdeti DF értékeket eredményezett, ami a fémek által kiváltott stressz következményeként alacsonyabb fotoszintetikus aktivitásra utal, ami a nem-esszenciális kadmium esetében nyilvánvaló, de az eredményeink szerint a 2000 μM -os Zn kezelés is beindított olyan stressz tüneteket, amelyeket azonosítani lehetett. Az 1000 μM -os koncentráció volt az, amely a legszembetűnőbb növekedést mutatta a DF értékekben, ami az aktívabb fotoszintetikus apparátus jele. Ez összhangban van korábbi eredményekkel, amikor a rövid ideig tartó emelkedett hőmérséklet (Jócsák et al., 2022b) és a metabolikusan stimuláló növényvédő szerek alkalmazása (Keszthelyi et al., 2023) magasabb kezdeti DF értékeket eredményeztek a jobb védekező mechanizmusokkal rendelkező, egészségesebb növényekben. Annak ellenére, hogy a két különböző fémtípus hatásait a SPAD, az NDVI és az F_v/F_m értékek alapján el lehetett különíteni, ezek a paraméterek nem bizonyultak elég érzékenynek az alacsonyabb cink koncentrációk által kiváltott fiziológiai változások nyomon követéséhez. Ezért a vizsgálat következő lépéseként a biofoton-emisszióval kapcsolatos elemzést céloztuk meg.

4.3.4.1. A késleltetett fluoreszcencia időbeli lefutása

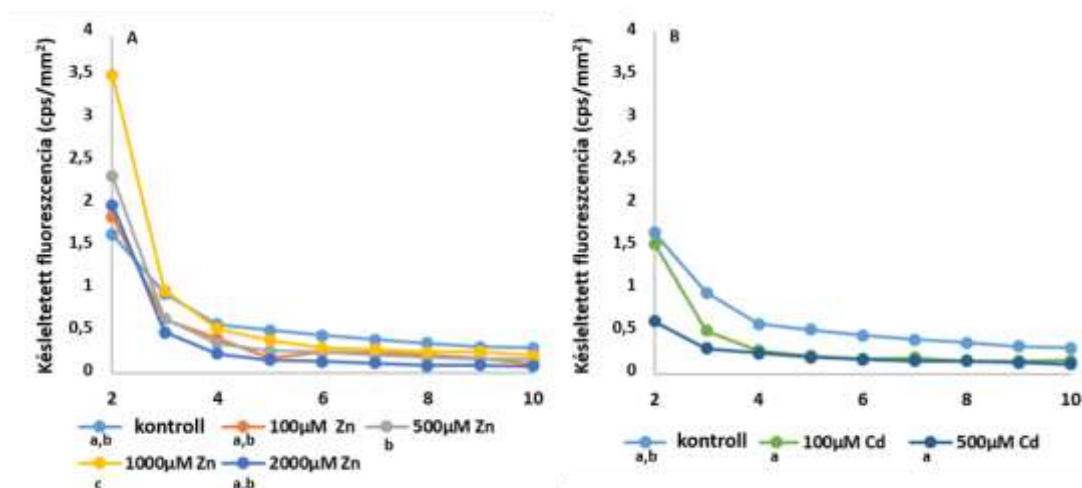
A képek (11. ábra) a mérés 1. 5. és 10. percében a DF értékek változását mutatják vizuálisan megfigyelhető változásainak szemléltetése érdekében a DF értékek. A színintenzitás a készülék által mért és az IndiGoTM 2.0.5.0 szoftver segítségével hozzárendelt pszeudocolor skála a biofoton kibocsátás jelerősséget jelzi. A vizualizációk kimeneteiből következtetni lehet a DF-értékek csökkenésére, valamint, hogy az egyes kezelések hatásai és a kukoricanövények kontroll jelintenzitásai között különbségek vannak. Minden képen a növények által kibocsátott

legnagyobb jelintenzitást a piros szín, a legalacsonyabbat pedig a lila szín jelzi, és az egyes pixel-színintenzitások maximális értékeit a képekhez rendelt skálán számszerűsítettük.



51. ábra: A késleltetett fluoreszcencia változása a mérés 1., 5. és 10. percében. A színintenzitás a berendezés által mért és az IndiGoTM 2.0.5.0 szoftverrel színintenzitás-skálára lefordított biofotonjel-erősséget jelzi.

A következő ábrák a DF-értékek változását és időbeli dinamikáját mutatják (12/A-B ábra). A kezdeti fluoreszcenciaértékek nagysága mellett azok lecsengési ideje is információt nyújt a fotoszintetikus rendszer állapotáról. Az ábra a kezdeti értékek és a bomlás differenciáinak elkülönülését mutatja. Bár a cinkkel kezelt növények az első percben magasabb értékeket mutattak, mint a kontroll, a 100 µM és 2000 µM Zn-kel kezelt növényeknél a lecsengés gyorsabb volt, illetve a teljes DF is alacsonyabb, mint a kontrollnál. A kadmiummal kezelt növényeknél alacsonyabb volt a fotonemisszió az első percben, mint a kontrollnál, amit gyorsabb lecsengés követett, ami összességében a legalacsonyabb teljes DF-et eredményezte.



12. ábra: A késleltetett fluoreszcencia időbeli lefolyása a mérés 2. percétől kezdve, másodpercenkénti (cps) értékekben kifejezve, mm²-enként. A fotonemissziós értékek változásai az első percben olyan nagyok, hogy elfedik a DF csökkenésének dinamikáját. Az ábrákon bemutatott értékek öt független mérés átlagai.

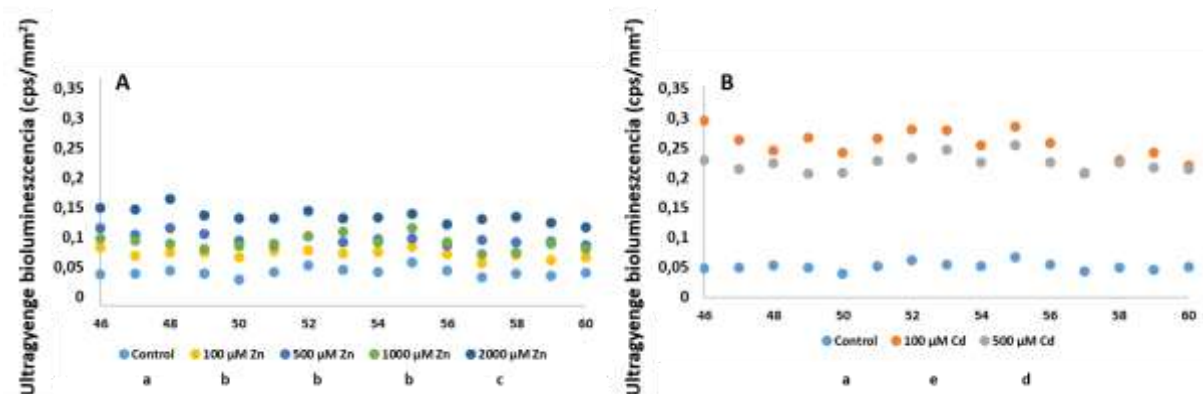
Mivel a DF egy olyan dinamikus paraméter, amely nemcsak a klorofilltartalmat mutatja, mint például a SPAD index, amely a teljes klorofilltartalmat jelzi, beleértve a működő és nem működő pigmenteket is, ez a paraméter kifejezetten a ténylegesen működő fotoszintetikus pigmentek jellemzőit tükrözi, ahogy azt Berden-Zrimec és munkatársai (2007) algapopuláció változásának dinamikájáról szóló munkájukban leírtak. Ez a stressz okozta alacsonyabb DF lecsengési dinamika nem csak a kezdeti DF értékekben volt megfigyelhető, hanem később, a tízperces mérés során a DF gyorsabb lecsengésében is a kontrollhoz képest az 1000 μM Zn kezelés esetén, és a toxikus kadmium esetében a 100 és 500 μM -os kezelések esetén is.

4.4 Az oxidatív folyamatokkal összefüggő vizsgálatok eredményei

4.4.1 Az ultragyenge biolumineszcencia változásának eredményei

Az oxidatív folyamatokból származó ultragyenge biolumineszcencia (UWLE) értékeket a sötétbe helyezést követő 46. perctől vettük figyelembe (13/A-B ábra). A nehézfémekkel kezelt növények UWLE értékei minden esetben magasabbak voltak, mint a kontroll átlaga ($1,98 \pm 0,09$) amint az a 14/A ábrán látható. A cink kezelések tekintetében végig megfigyelhető egy emelkedő tendencia a fotonkibocsátásban. Legkisebb mértékű növekedést a legalacsonyabb dóziszú kezelés eredményezte (60,6%), a legmagasabb pedig a legnagyobb koncentráció esetében (138,89%) volt detektálható. Ennél még sokkal magasabb értékeket mértünk a kadmiummal kezelt növényeken. A 100 μM -os kezelés $9,88 \pm 0,68$ -as, az 500 μM -os kezelés pedig $7,84 \pm 0,54$ -es átlagot mutat, ami 399,49%-os és 295,45%-os emelkedés. Ezen eredményekből látható, hogy minden kezelés megnövelte az oxidatív anyagcsere folyamatokat a növényekben, különösen a kadmium kezelések.

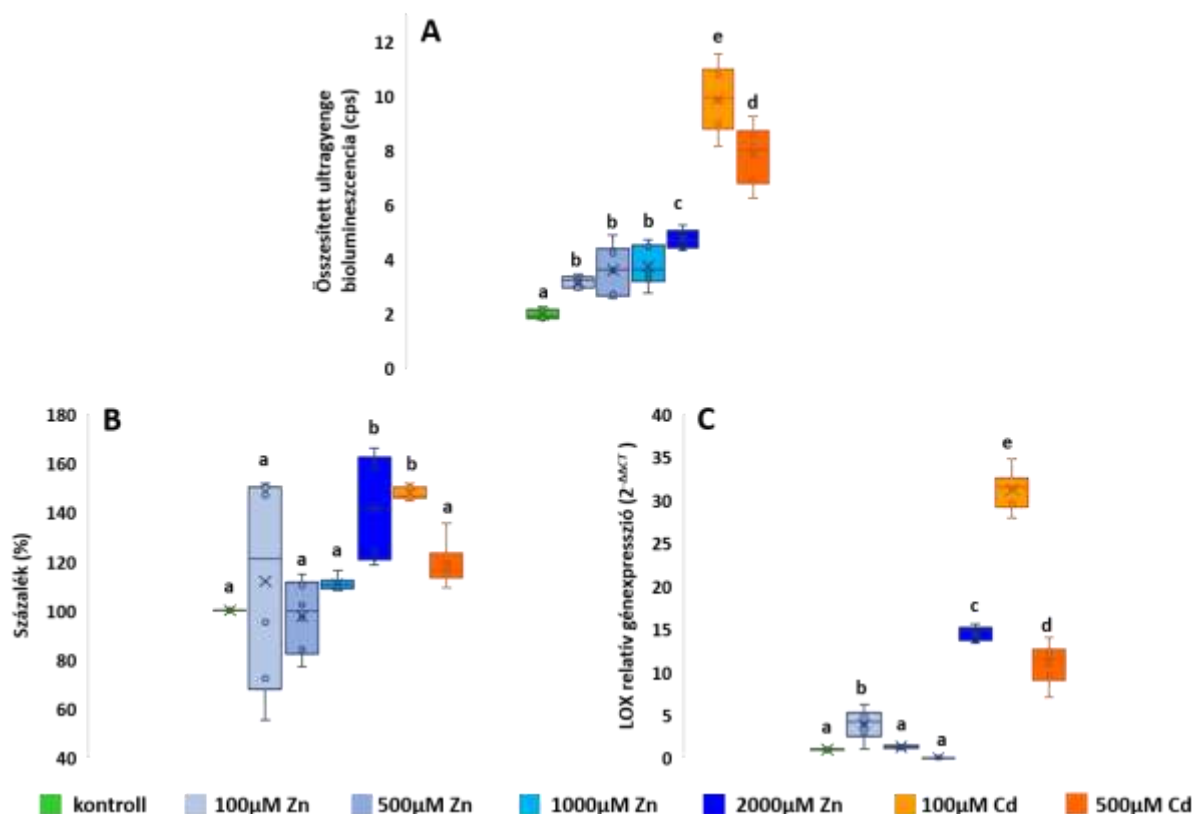
Az UWLE a növények biofoton-kibocsátásának általános jelenségének egy külön aspektusa. A sötétadaptáció során a fotoszintetikus folyamatok fokozatosan leállnak, ami után rendkívül alacsony intenzitású UWLE detektálható (13/A-B ábra), ami információt szolgáltat a kloroplasztiszból és a mitokondriumokban zajló oxidatív folyamatokról (Bodemer et al., 2000). A biolumineszcencia értékek korábban azt találták, hogy a növényekben a stresszállapotok kialakulása során növekednek (Birtic et al., 2011; Prasad et al., 2017; Lukács et al., 2022), amint azt kadmiumkezelés esetén is kimutatták, amikor a biolumineszcencia értékek körülbelül ötszöröse voltak a kontrollnak és kétszeresei a legnagyobb (2000 μM) cink koncentráció okozta UWLE-értékének. Ezeket az eredményeket további, oxidatív stresszel kapcsolatos eredmények is megerősítették.



13. ábra: Az ultragyenge biolumineszcencia változásainak időbeli alakulása a mérések 30 és 60 perce között, másodpercenkénti (cps) értékekben kifejezve mm²-enként. Az ábrákon bemutatott értékek öt független mérés átlagai.

4.4.2 Lipidoxidáció mérés

Az MDA eredményeket a kontroll százalékában megadva mutatjuk a 14/B ábrán. Az 500 µM Zn kezelés az egyetlen, amelynél a kontrollnál alacsonyabb értéket mutattunk ki ($97,66 \pm 7,32$). A cinkkezelések közül a legnagyobb különbség a 2000 µM kezelésnél mutatkozott ($141,7 \pm 11,15$). A két alkalmazott kadmium kezelés szintén emelkedést mutatott a lipidoxidáció értékeiben a kontrollhoz viszonyítva. Az UWLE eredményekhez hasonlóan a 100 µM Cd kezelésnél nagyobb mértékű emelkedést mutattunk ki ($147,55 \pm 1,33$), mint a magasabb 500 µM kadmium kezelés esetében ($118,48 \pm 4,49$).



14. ábra: A cink- és kadmiumkezelések hatása az ultragyenge biolumineszcenciára (A), a lipidoxidációra (B) és a LOX génexpresszióra (C).

4.4.3 Lipoxigenáz (LOX) génexpressziós vizsgálatok eredményei

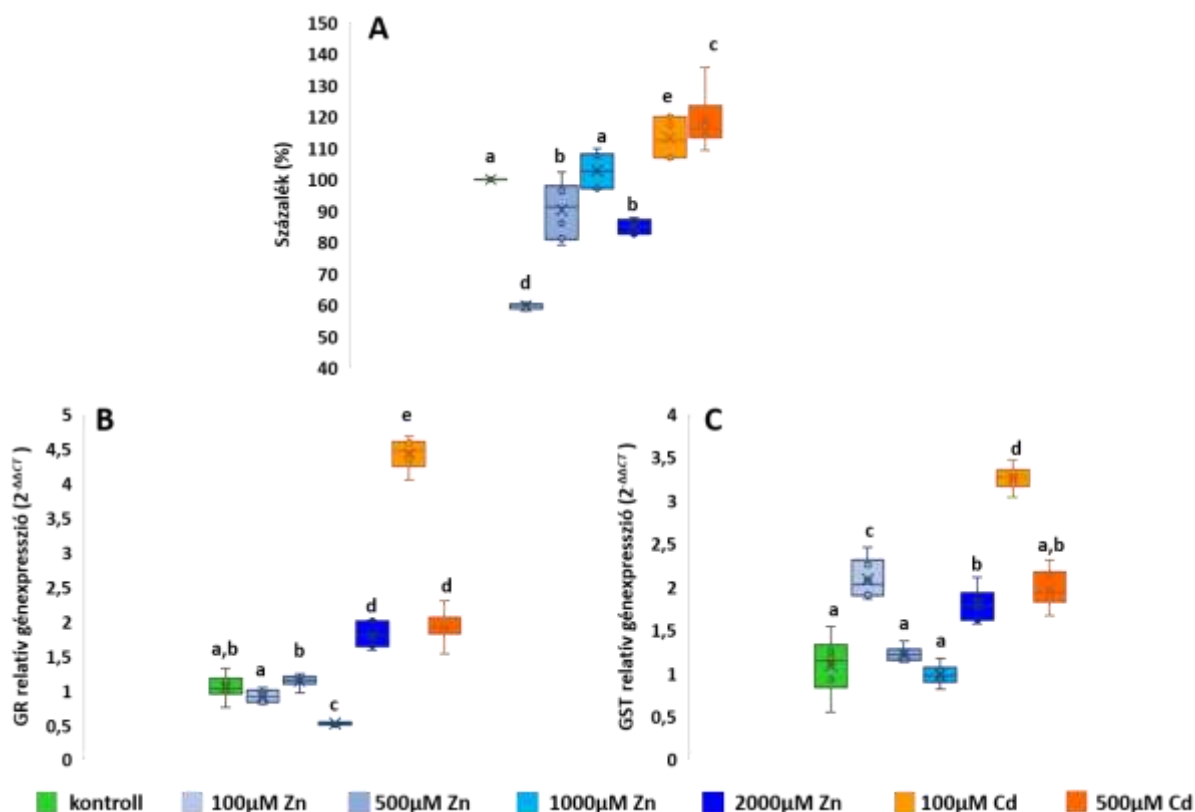
A LOX génexpressziós vizsgálatok eredményei az 14/C ábrán láthatók. A kontroll relatív génexpressziója $1,009 \pm 0,04$ volt. Ennél csak az $1000 \mu\text{M}$ Zn kezelés eredményezett alacsonyabb értékeket. Hasonlóan az UWLE és az MDA eredményekhez, a legalacsonyabb cink kezelés esetében a kontrollnál magasabb értékeket kaptunk LOX vizsgálatokban továbbá szignifikánsan magasabb relatív génexpressziót ($3,94 \pm 0,9$). Emellett jól kimutatják az eredmények a toxikus hatást is: a legmagasabb cink és a két kadmium kezelés egyaránt szignifikánsan magasabb relatív génexpressziót mutatottak a kontrollnál.

A LOX génexpresszió a lipoxidáció indikátora, amint azt Prasad és munkatársai (2017) bizonyították, akik az *Arabidopsis* LOX2 mutánsát vizsgálták, amelyből hiányzik a klorofill lipoxigenáz enzim, és azonosították, hogy ez az enzim a többszörösen telítetlen zsírsavak oxidációja során keletkező szinglet oxigén ($^1\text{O}_2$) és triplett karbonil ($3\text{L}=\text{O}^*$) csoportok elsődleges előidézője, ami a semlegesítési folyamatok során vezet UWLE kibocsátáshoz. Az UWLE és a LOX génexpresszió növekedése, az MDA értékekhez hasonlóan, $2000 \mu\text{M}$ Zn és 100 és $500 \mu\text{M}$ Cd koncentráció esetén az oxidatív stressz egyértelmű jele volt.

4.5 Antioxidatív rendszer vizsgálatainak eredményei

4.5.1 Vasredukáló képességen alapuló teljes antioxidáns kapacitás mérés (FRAP)

A FRAP mérések eredményeit a kontroll százalékában megadva szemléltetjük (15/A ábra). A cinkkezelések közül az $1000 \mu\text{M}$ volt csak magasabb az antioxidáns kapacitás ($102,7 \pm 3,08$), a többi cink tápoldatos koncentráció szignifikánsan alacsonyabb értékeket mutatott a kontrollhoz viszonyítva. A legkisebb cink kezelés esetében mutattuk ki a legalacsonyabb nem-enzimatisz antioxidáns mennyiséget, átlagosan $59,67 \pm 0,465$. A két legmagasabb érték a két kadmiummal kezelt csoportban mutatkozott, $100 \mu\text{M}$ -nál 13%-al, $500 \mu\text{M}$ -nál pedig 18,5%-al növekedett az antioxidáns kapacitás ami statisztikailag szignifikáns kontrollhoz képest. A FRAP-értékek 500 , 1000 és $2000 \mu\text{M}$ Zn-koncentráció esetén nőttek, ami arra utal, hogy a cink kezelés jótékony hatással van az antioxidáns rendszer működésére, amire már Feigl és munkatársai (2015) is következtettek. Ezzel szemben csak $100 \mu\text{M}$ Zn esetén figyeltek meg szignifikánsan alacsonyabb FRAP értéket, ami feltehetően a cink hiányt követő gátolt enzimaktivitás következménye (Romheld – Marschner, 1991; Weckx – Clijsters, 1997; Singh et al., 2005).



15. ábra: A cink- és kadmiumkezelések hatása az antioxidáns kapacitásra (A), a GR (B) és a GST génexpresszióra (C)

4.5.2 A glutation reduktáz (GR) és a glutation-S-transzferáz (GST) enzimek génexpressziójának változásai

A GR génexpressziós vizsgálatok eredményei az 15/B ábrán láthatók. A GR vizsgálatokban a kontroll relatív génexpressziója $1,04 \pm 0,09$. Az 1000 μM Zn kezelés eredményezte a legalacsonyabb relatív génexpressziót mindkét vizsgált gén expressziójára nézve: a GR esetében 50%-kal, a GST esetében pedig 10,1%-kal alacsonyabbat, mint a kontroll. A GR esetében jól kimutatható volt a nehézfémek toxikus hatása, mivel a 2000 μM Zn és a két kadmium kezelés eredményezte a legnagyobb növekedést a kontrollhoz képest. A legmagasabb cinkkezelés 73%-kal, a legmagasabb kadmium kezelés 84,6%-kal növelte a génexpressziót, ami mindkét esetben szignifikáns növekedést eredményezett a kontrollhoz képest. A 100 μM Cd kezelés mutatta összességében a legnagyobb relatív génexpressziót ($4,42 \pm 0,11$).

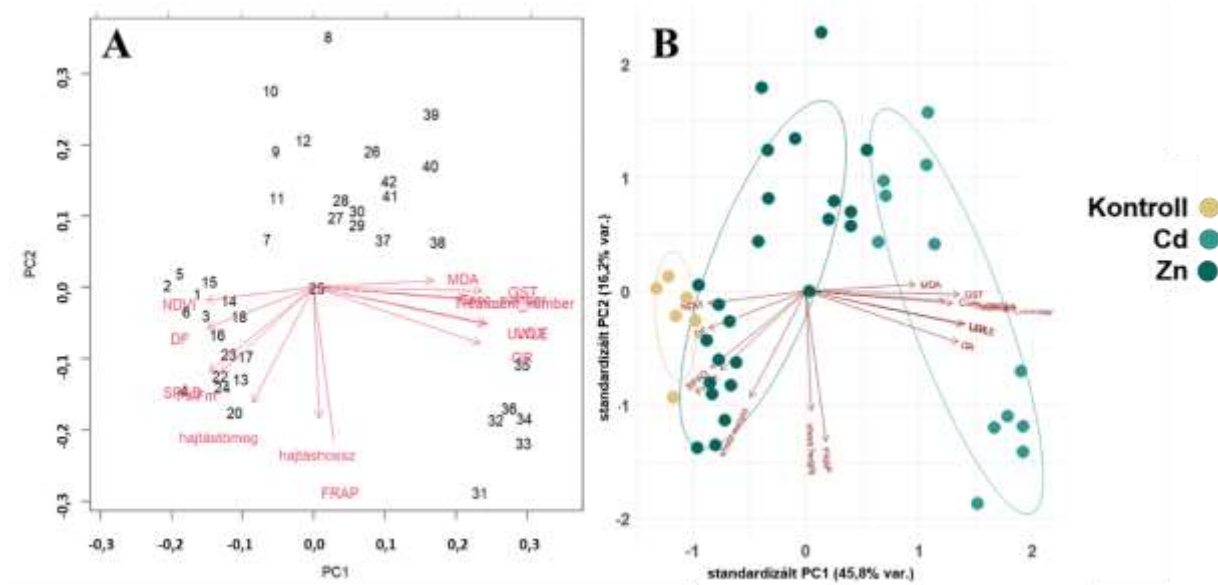
A GST esetében a kontroll átlaga $1,09 \pm 0,17$, ahogy az 15/C ábrán látható. Ennél alacsonyabb relatív génexpressziót csak a 1000 μM Zn kezelés mutatott ($0,98 \pm 0,06$). A 2000 μM Zn tápoldat 64,2%-os, a 100 μM Zn 91,3%-os, az 500 μM Cd kezelés pedig 80,73%-os emelkedést mutat, mind szignifikáns a kontrollhoz képest. Az MDA, az UWLE és a GR vizsgálatokhoz hasonlóan a legnagyobb mértékű oxidatív stresszre utaló értékek 100 μM Cd kezelésnél

mutatkoznak, ahol a kontrollhoz viszonyítva 199%-al emelkedett az átlagos relatív génexpresszió.

A 100 és 500 μM Cd-kezelések során egyaránt növekedés volt megfigyelhető a kontrollhoz képest, a GR és a GST gének esetében. A GR és a GST hasonló mintázatot mutatnak, azonban ezekben az esetekben is statisztikailag igazolt a kontrollhoz viszonyított túlterjedés. Ez a jelenség arra utal, hogy a kadmium stressz elég súlyos volt ahhoz, hogy a kadmium-stresszelt kukoricacsemetékben mind az enzimatis, mind a nem-enzimatis antioxidáns rendszert aktiválja (Jócsák et al., 2020). Mahmoud és munkatársai (2021) bebizonyították, hogy a kadmium-toxicitás mind a nem enzimatis antioxidánsok szintjét - amit esetükben a magasabb FRAP-értékek jeleztek -, mind az AtFeSOD génexpresszióját is megnövelte a különböző kadmium-toleranciájú kukoricavonalakban. Ugyanakkor 100 μM Zn esetén a GST expressziós szintje magasabb volt, mint a kontrollé, ami ebben az esetben olyan hiánytünetek kialakulására utal, amelyek az antioxidáns védekező mechanizmusokat is aktiválják. Ennek hátterében az áll, hogy a GST a xenobiotikumok glutationhoz való kapcsolását végzi, ami kevésbé toxikus formákat eredményez, annak érdekében, hogy kompenzálja a metabolikus egyensúly kibillenését és a csökkent növekedést (Sadeghzadeh, 2013) a cinkhiány okozta enzimfunkció elvesztése által (Romheld – Marschner, 1991; Weckx – Clijsters, 1997; Singh et al., 2005). Hänsch és Mendel (2009) áttekintő munkájában összefoglalták, hogy a cink nélkülözhetetlen a szénsav anhidrázhoz, a C4 növények CO_2 -fixálásának limitáló enziméhez, a Cu-Zn szuperoxid-dizmutázhoz és a D-ribulóz-5-foszfát 3-epimerázhoz (Jelakovic et al., 2003; Hänsch – Mendel, 2009), és ennek az esszenciális elemnek a hiánya súlyos működési zavarokat okozhat a fotoszintézisben, a DNS-átírásban, az RNS-feldolgozásban és a transzlációban (Jelakovic et al., 2003). Ezért a hiánytünetek leküzdése érdekében Tewari és munkatársai (2019) megállapították az antioxidatív enzimaktivitás növekedését, ami a GST megnövekedett arányában is tükröződött, nemcsak magas (toxikus) koncentráció esetén, hanem hiány esetén is. A nehézfémek gátolják a GST működését vagy csökkentik a glutation (GSH) koncentrációját, ami a GSH/GSSG egyensúly megváltoztatásával védi a növényeket (Kalinina et al., 2014; Rubino, 2015; Dobritsch et al., 2019). Moons (2003) azt találta, hogy a Cd, Co, Ni és Zn fokozza a GST gének *osgstu3* és *osgstu4* expresszióját, ami arra utal, hogy a GST kapcsolatban áll a fémek detoxifikációjával. Eredményeink tovább erősítik a nehézfémeknek ezt a szerepét a GST működésében és gátlásában.

4.5 Statisztikai összegzés

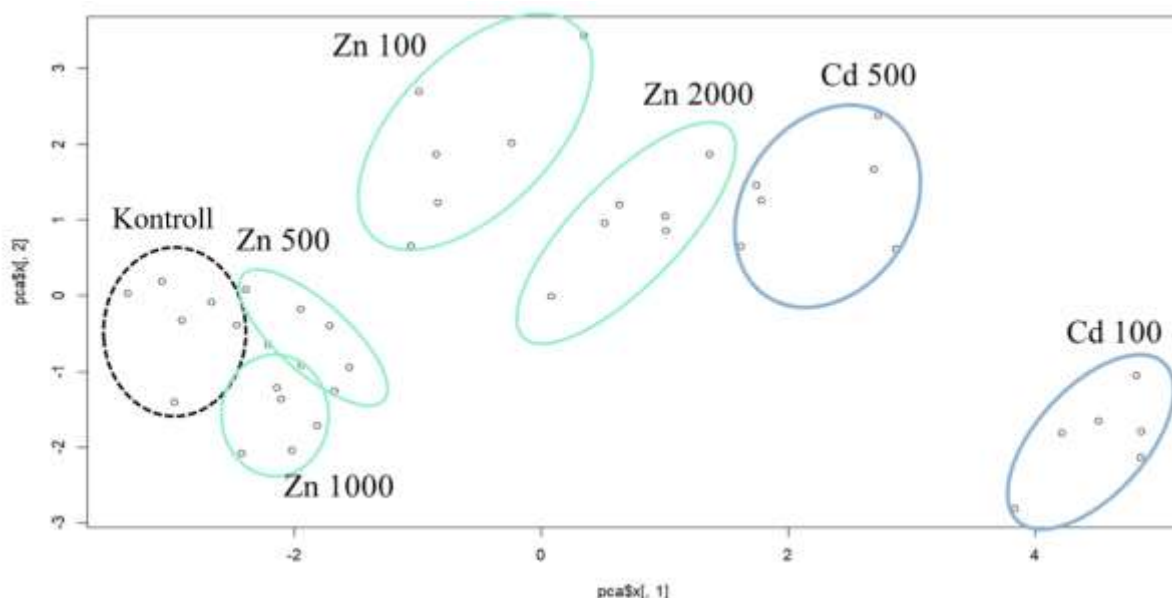
A főkomponens-elemzés (PCA) megvizsgálja az egyes paraméterek jelentőségét és egymáshoz való viszonyát. Ezeknek a paramétereknek a szerepét az első és második főkomponens által képviselt koordináta-rendszerben a 16/A ábra szemlélteti.



16. ábra: A PCA eredmények vizualizálása. (A) A vizsgált paraméterek szignifikanciája (a piros tömbök hossza) és korrelációi (a nyilak egymáshoz viszonyított helyzete) azt mutatják, hogy a koncentráció és a kezelés (kontroll, Zn, Cd) együtt változik a GST, UWLE, LOX, MDA és GR értékekkel az első főkomponens (PC1) mentén, míg a hajtás súlya és magassága, valamint a FRAP szoros kapcsolatban áll (B). A PCA eredmények klaszterezése a kezelés (színek és körök) szerint, mint a vizsgált változók közül a legjelentősebb tényező.

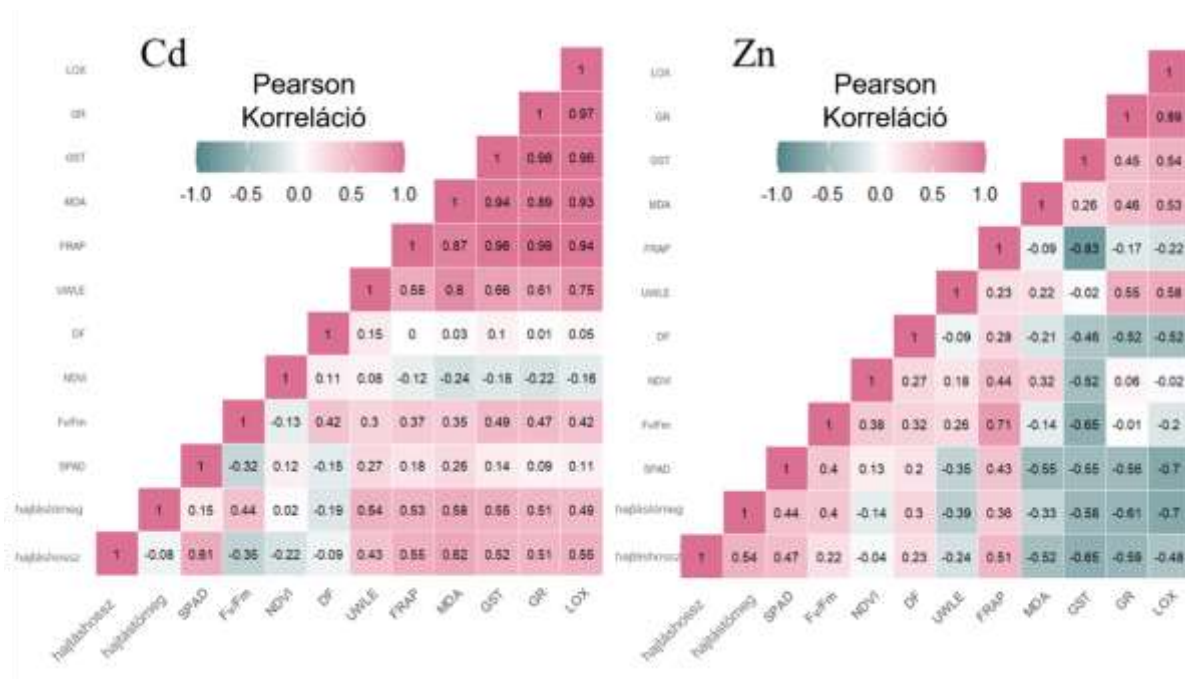
Az első főkomponens a koncentráció, a kezelés, a GST, az UWLE, a LOX és az MDA pontszámok növekedésével nő. A GR-nek kisebb súlya van a folyamatokra. Ez arra utal, hogy ez a hét kritérium együttesen változik. Ha az egyik növekszik, akkor a többi is növekszik. Ezzel szemben az NDVI, DF, SPAD és F_v/F_m paraméterek értékei a koncentráció csökkenésével nőnek. A második főkomponens azt mutatja, hogy a hajtástömeg, a hajtásmagasság és a FRAP együtt reagál; a hajtástömeg és a hajtásmagasság növekedésével a FRAP értékei is növekednek. A 16/B ábrán látható az értékek kezelés (kontroll, Cd, Zn) szerinti csoportosítása, mint a variancia egyik legjelentősebb tényezője. Az első és második komponens értékeit a koncentráció és a kezelés kölcsönös hatása szerint csoportosítjuk (17. ábra). A kontroll csoport helyzete átlagos hajtástömeggel és hajtásmagassággal, valamint a legmagasabb DF és NDVI értékekkel rendelkező kiindulási pontnak tekinthető. A kontroll csoporthoz legjobban hasonló csoportok az 500 μM Zn és az 1000 μM Zn. A 100 μM Zn körének elhelyezkedése azt mutatja, hogy a hajtástömeg, a hajtásmagasság és a FRAP értékek ebben a csoportban voltak a legalacsonyabbak. A 2000 μM Zn hasonló hatást fejtett ki, mint a 100 μM Zn, de a csökkenés mértéke kisebb volt. A 100 μM Cd csoport elkülönült az összes többi csoporttól. A PC1 értékek

a legmagasabbak, a PC2 értékek pedig a legalacsonyabbak, ami azt jelenti, hogy az MDA, GST, UWLE, LOX és GR értékek a legmagasabbak, a hajtástömeg, a hajtásmagasság és a FRAP értékekkel együtt. Összességében a PC1 értékei jelentősen eltérnek a különböző kezelési csoportok (kontroll, Zn, Cd) között, míg a koncentrációk összetettebb hatást gyakorolnak az eredményekre.



67. ábra: Az első és a második komponens értékei a koncentráció és a kezelés kölcsönös hatása alapján csoportosítva.

A hőtérképek a különböző paraméterek közötti kapcsolatot szemléltetik, amint azt a Pearson-féle korrelációs együtthatók mutatják (18. ábra). A korrelációs mátrixok esetében külön-külön vizsgáltuk a kadmium és a cink hatását, míg az előző szakaszban ezeket együttesen vizsgáltuk.



18. ábra: A változók közötti Pearson-féle korrelációs együtthatókkülön a kadmium (A) és külön a cink (B) esetén

A korrelációelemzés eredményeit a 18. ábra mutatja be, az egyes fémek hatásait külön-külön (18/A-B). A bemutatott paraméterek és a vizsgálati eredmények elemzése is korrelációt mutatott a fotoszintetikus és oxidatív folyamatok jelei között, ami matematikai összefüggés feltételezéséhez vezetett. A Pearson-féle korrelációs elemzés kimenetei alátámasztották ezt a következtetést. Az elemzés a korrelációs együtthatót 0,5-nél nagyobbak tekintette, hogy a mérsékelt (0,5-0,599), az erős (0,6-0,799) és a nagyon erős (0,8-1,00) kapcsolatokat is magában foglalja.

A kadmium tekintetében látható, hogy a legerősebb pozitív korreláció az oxidatív folyamatokat jellemző paraméterek között volt, a legtöbb esetben 0,9 feletti értékekkel (17/A ábra), valamint az is, hogy a hajtásmagasság és a hajtástömeg korrelációs együtthatói a legtöbb esetben 0,5-nél nagyobbak voltak. Ezzel szemben a cink esetében gyengébb korrelációs együtthatókat találtunk (17/B) ábra, és az oxidatív paraméterkombinációk közül a LOX-UWLE, GR-UWLE, LOX-MDA, LOX-GST és LOX-GR kombinációk 0,5-nél magasabb értékeket mutattak; a legerősebb pozitív korrelációt a LOX-GR génexpressziós változások között találtuk, a legerősebb negatív korrelációt pedig a GST-FRAP kölcsönhatásnál. A fotoszintetikus (NDVI, F_v/F_m , SPAD) és növekedési (hajtástömeg és -magasság) paraméterek 0,5-nél nagyobb vagy 0,5 közeli negatív kapcsolatot mutattak (a DF esetében), ami a SPAD, a hajtástömeg és -magasság, valamint az MDA, GST, GR és LOX kombinációk esetében is megfigyelhető volt. Ami az utóbbi paramétereket illeti, ki kell emelni, hogy a növényi részek, mint a hajtástömeg és a hajtásmagasság, valamint az oxidatív folyamatok, mint az MDA, GST, GR és LOX közötti korreláció a Cd esetben pozitív, mérsékelt összefüggést mutatott, ami a cink esetében negatív, mérsékelt vagy erős összefüggésre változott.

5. Következtetések és javaslatok

A jelen kutatás azt vizsgálta, hogy a különböző cink koncentrációk hogyan befolyásolják a növényi reakciókat, különös tekintettel a fotoszintetikus és oxidatív metabolikus tevékenységekre. A kísérlet célja a cink növényekre gyakorolt pozitív és negatív hatásainak megkülönböztetése volt, valamint ezen fontos mikrotápanyag esszenciális és toxikus funkcióinak elkülönítése a kukoricatermesztésben.

A legalacsonyabb cink koncentráció (100 μM) hiányt jelzett, míg az 1000 μM pozitív hatást mutatott a kukoricánövények működésére. 2000 μM Zn kezelés a kadmiumhoz hasonló toxikus tüneteket okozott, melyek az antioxidánsok a lipioxidáció, a késleltetett fluoreszcencia és az ultragyenge biolumineszcencia változásaiban mutatkoztak. Az esszenciális-toxikus átmenetek jobb megértéséhez fontos a cink-függő enzimek, például a CuZn-SOD enzimek működésének

vizsgálata, amelyek egységesen jelen vannak a citoplazmában és közvetlenül befolyásolja a növények cink ellátottsága. Az ebben a vizsgálatban használt cink koncentrációkat ki lehet terjeszteni 1000 és 2000 μM közötti köztes szintekre, ami lehetővé teszi a funkcionális átmenetek pontosabb értékelését. A cink tápanyag kijuttatás megfelelő koncentrációjának kiválasztása hozzájárul egy fenntarthatóbb és egyben költséghatékonyabb mikrotápanyag-kiegészítési technológia kifejlesztéséhez a sikeresebb kukoricatermesztés érdekében.

6. Összegzés

A kukorica korai növekedését nagyban befolyásolhatják a nehézfémek, amelyek könnyen és gyorsan bejutnak a talajba. Az esszenciális nehézfémek megfelelő mennyiségben pozitív hatással vannak a növényi anyagcserére, mivel elengedhetetlenek a növény egészséges fejlődéséhez. Ezzel szemben a nem-esszenciális nehézfémek negatív hatásokat válthatnak ki. Ezen okok miatt vizsgálataink arra irányultak, hogy kimutassuk a különböző cink koncentrációk hogyan befolyásolják a növényi reakciókat két fő anyagcsere területen. Mivel a kukorica számára fontos mikroelemről beszélünk, fontosnak tartottunk ezen elem pozitív és negatív hatásainak elkülönítését, és megfigyelni milyen mennyiségben számít toxikusnak a növény számára. Vizsgálatainkal igazoltuk, hogy a biofoton kibocsátáson alapuló képalkotó technika alkalmas a különböző mennyiségekben kijuttatott nehézfémek, illetve az esszenciális és nem esszenciális hatások elkülönítésére. A vizsgálati paraméterek közül az ultragyenge biolumineszcencia, illetve az antioxidatív enzimeket kódoló gének kifejeződésének egyöntetű megnövekedése jól jelezte a nem esszenciális kadmium negatív hatásait, amelyet a fiziológiás és az analitikai paraméterek, úgy mint lipidoxidációs és vasredukáló képességen alapuló antioxidáns kapacitás értékei is alátámasztottak. Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a vizsgálatok során alkalmazott legmagasabb (2000 μM) cink koncentráció által kiváltott változások már az esszenciális, mikroelem funkcióból ezen nehézfém toxikus tartományba történő átmenetét jelzik. Mindezen eredmények hozzájárulnak a megnövelt növénykondícióhoz, ezáltal takarékosabb és fenntartható vegyszerfelhasználáshoz.

6.1 Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Jócsák Ildikó egyetemi adjunktusnak kitartó munkájáért, segítőkészségéért és a vizsgálatok zavartalan összehangolásáért. Köszönöm továbbá Prof. Dr. Keszthelyi Sándor egyetemi tanárnak, hogy biztosította, hogy a MATE Növénytermesztési-tudományok Intézet Agronómia Tanszékének való vizsgálatok megvalósulását a Kaposvári Campuson. Szintén köszönöm Dr. Somfalvi-Tóth Katalin egyetemi adjunktus segítségét a statisztikai elemzések elvégzésében és értékelésében.

7. Felhasznált Irodalom

- Abbasi, G.H. – Ijaz, M. Akhtar, J. – Anwar-Ul-Haq, M. – Jamil, M. – Ali, S. – Ahmad, R. – Khan, H.N. (2016): Profiling of anti-oxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves of salt tolerant and salt sensitive maize hybrids under NaCl and Cd stress. *Sains Malaysiana*, 45(2), 177–184.
- Abd El-Mageed, T.A. – Abdurrahman, H.A. – Abd El-Mageed, S.A. (2020): Residual acidified biochar modulates growth, physiological responses, and water relations of maize (*Zea mays*) under heavy metal-contaminated irrigation water. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 22956–22966. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08847-5>
- Abedi, T. – Gavanji, S. – Mojiri, A. (2022): Lead and Zinc Uptake and Toxicity in Maize and Their Management. *Plants*, 11, 1922. <https://doi.org/10.3390/plants11151922>
- Alharby, H.F. – Al-Zahrani, H.S. – Hakeem, K.R. – Alsamadany, H. – Desoky, E.S.M. – Rady, M.M. (2021): Silymarin-enriched biostim-ulant foliar application minimizes the toxicity of cadmium in maize by suppressing oxidative stress and elevating antioxidant gene expression. *Biomolecules*, 11(3), 465. <https://doi.org/10.3390/biom11030465>
- Alloway, B.J. (szerk.) (2008): Fundamental Aspects of Zinc in Soils and Plants (Chap.2), In *Zinc in Soils and Crop Nutrition*, 2nd ed.: IZA and IFA: Brussels, Belgium and Paris, France, pp. 14–54.
- Anjum, N.A. – Ahmad, I. – Mohmood, I. – Pacheco, M. – Duarte, A.C. – Pereira, E. – Umar, S., Ahmad, A. – Khan, N.A. – Iqbal, M. – Prasad, M.N.V. (2012): Modulation of glutathione and its related enzymes in plants' responses to toxic metals and metalloids-a review. *Environmental and Experimental Botany*, 75, 307–324. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.07.002>
- Anjum, S.A. – Tanveer, M. – Hussain, S. – Bao, M. – Wang, L. – Khan, I. – Ullah, E. – Tung, S.A. – Samad, R.A. – Shahzad, B. (2015): Cadmium toxicity in Maize (*Zea mays* L.): consequences on antioxidative systems, reactive oxygen species and cadmium accumulation. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 17022–17030. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4882-z>
- Anjum, S.A. – Tanveer, M. – Hussain, S. – Shahzad, B. – Ashraf, U. – Fahad, S. – Hassan, W. – Jan, S. – Khan, I. – Saleem, M.F. – Bajwa, A.A. – Wang, L. – Mahmood, A. – Samad, R.A. – Tung, S.A. (2016): Osmoregulation and antioxidant production in maize under combined cadmium and arsenic stress. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 11864–11875. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6382-1>
- Asati, A. – Pichhode, M. – Nikhil, K. (2016): Effect of Heavy Metals on Plants: An Overview. *International Journal of Application or Innovation in Engineering Management*, 5(3), 56–66.
- Ayyar, S. – Appavoo, S. (2017): Effect of graded levels of Zn in combination with or without microbial inoculation on Zn transformation in soil, yield and nutrient uptake by maize for black soil. *Environment & Ecology*, 35(1), 172–76.
- Balakrishnan N. (2011): *Role of arbuscular mycorrhizal fungal (glomus intraradices Schenck and Smith) symbiosis in biofortification of micronutrients in maize (Zea mays L.) grain*. [PhD. értekezés], Coimbatore: Tamil Nadu Agricultural University.
- Balakrishnan, N. – Subramanian, K.S. (2012): Mycorrhizal symbiosis and bioavailability of micronutrients in maize grain. *Maydica*, 57, 129–38.

- Benzie, I.F. – Strain, J.J. (1996): The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Berden-Zrimec, M. – Drinovec, L. – Zrimec, A. – Tišler, T. (2007): Delayed fluorescence in algal growth inhibition tests. *Open Life Sciences*, 2(2), 169–181.
- Bhandari, K. – Singla, R.K. – De, B. – Ghosh, B.C. – Katakam, P. – Khushwaha, D.K. – Mitra, A. (2015): Chemometrics based extraction of polyphenolics from fresh tea leaves and processed tea showing in-silico docking and anti-oxidative theronostic dietary adjuvant in Alzheimer. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5(3): 171–191.
- Birtic, S. – Ksas, B. – Genty, B. – Mueller, M.J. – Triantaphylidès, C. – Havaux, M. (2011): Using spontaneous photon emission to image lipid oxidation patterns in plant tissues. *Plant Journal*, 67, 1103–1115. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04646.x
- Bodemer, U. – Gerhardt, V. – Yacobi, Y.Z. – Zohary, Z. – Friedrich, G. – Pohlmann, M. (2000): Phytoplankton abundance and composition of freshwaters systems determined by DF excitation spectroscopy and conventional methods. *Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Adv. Limnol.* 55, 101–120.
- Brown, S.L. – Chaney, R.L. – Angle, J.S. – Baker, A.J.M. (1994): Phytoremediation potential of *Thlaspi caerulescens* and bladder campion for zinc- and cadmiumcontaminated soils. *Journal of Environmental Quality* 23(6), 1151–1157. <https://doi.org/10.2134/jeq1994.00472425002300060004x>
- Cakmak I. (2000): Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. *New Phytologist*, 146(2), 185–205.
- Cakmak, I. – Torun, B. – Erenoğlu, B. – Öztürk, L. – Marschner, H. – Kalayci, M. – Ekiz, H. – Yilmaz, A. (1998) Morphological and physiological differences in the response of cereals to zinc deficiency. *Euphytica*, 100 (1/3), 349–357. DOI:10.1023/A:1018318005103
- Cherif, J. – Derbel, N. – Nakkach, M. – Von Bergmann, H. – Jemal, F. – Lakhdar, Z.B. (2010): Analysis of in vivo chlorophyll fluorescence spectra to monitor physiological state of tomato plants growing under zinc stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 101(3), 332–339. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.08.005>
- Cho, U.H. – Seo, N.H. (2005): Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Science*, 168(1), 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.07.021>
- Clemens S. (2006): Evolution and function of phytochelatin synthases. *Journal of Plant Physiology*, 163(3) 319–332.
- Cummins, I. – Dixon, D.P. – Freitag-Pohl, S. – Skipsey, M. – Edwards, R. (2011) Multiple roles for plant glutathione transferases in xenobiotic detoxification. *Drug Metabolism Reviews*, 43, 266–280. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.552910>
- Dániel, P. – Györi, Z. (2000): A kadmium hatása a kukoricánövény fejlődésére. *Növénytermelés*, 49 (4), 405–412.
- Das, P. – Samantaray, S. – Rout, G.R. (1997): Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environmental Pollution*, 98, 29–36. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(97\)0011-3](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(97)0011-3)
- Degraeve N. (1981): Carcinogenic, teratogenic and mutagenic effects of cadmium. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 86(1) 115–135. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(81\)90035-X](https://doi.org/10.1016/0165-1110(81)90035-X)

- Di Baccio, D. – Tognetti, R. – Sebastiani, L. – Vitagliano, C. (2003): Responses of *Populus deltoides* × *Populus nigra* (*Populus* × *euramericana*) clone I-214 to high zinc concentrations. *New Phytologist*, 159(2), 443–452. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00818.x>
- Dixon, D.P. – Skipsey, M. – Edwards, R. (2010): Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 71 (4), 338–350. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.12.012>
- Dobritzsch, D. – Grancharov, K. – Hermesen, C. – Krauss, G.J. – Schaumlöffel, D. (2020): Inhibitory effect of metals on animal and plant glutathione transferases. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 57, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.09.007>
- Duxbury T. (1985) Ecological aspects of heavy metal responses in microorganisms. In Marshall K.C. (szerk.): *Advances in Microbial Ecology*, Volume 8. Boston, MA: Springer US. pp. 185–235
- Edreva A. (2005): Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 106, 119–133. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2004.10.022>
- Elhiti, M. – Yang, C. – Chan, A. – Durnin, D.C. – Belmonte, M. – Ayele, B.T. – Tahir, M. – Stasolla, C. (2012): Altered seed oil and glucosinolate levels in transgenic plants over-expressing the *Brassica napus* SHOOTMERISTEMLESSGENE. *Journal of Experimental Botany*, 63, 4447–4461. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers125>
- Ernst, W.H.O. – Vekleij, J.A.C. – Schat, H. (1992): Metal tolerance in plants. *Acta botanica neerlandica*, 41, 229–248.
- Feigl, G. – Lehotai, N. – Molnár, A. – Ördög, A. – Rodríguez-Ruiz, M. – Palma, J.M. – Corpas, F.J. – Erdei, L. – Kolbert, Z. (2015): Zinc induces distinct changes in the metabolism of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS) in the roots of two *Brassica* species with different sensitivity to zinc stress. *Annals of botany*, 116(4), 613–625. DOI: 10.1093/aob/mcu246
- Feussner, I. – Wasternack, C. (2002): The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol*, 53, 275–297. DOI: 10.1146/annurev.arplant.53.100301.135248
- Fischer A.M. – Dubbs W.E. – Baker R.A. – Fuller M.A. – Stephenson L.C. – Grimes H.D. (1999): Protein dynamics, activity and cellular localization of soybean lipoxygenases indicate distinct functional roles for individual isoforms. *Plant Journal*, 19, 543–554. DOI: 10.1046/j.1365-313X.1999.00550.x
- Florijn, P.J. Van Beusichem, M.L. (1993): Cadmium distribution in maize inbred lines: effects of pH and level of Cd supply. *Plant and Soil*, 153, 79–84.
- Gerhardt, V. – Bodemer, U. (2000): Delayed fluorescence excitation spectroscopy: a method for determining phytoplankton composition. *ERGEBNISSE DER LIMNOLOGIE*, 55, 101–120.
- Greger M. (2004): Metal Availability, Uptake, Transport and Accumulation in Plants (Chap. 1). In Prasad, M.N.V. (szerk.): *Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems*, 2nd ed. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Germany, pp. 5–20.
- Gutteridge J.M.C. (1994): Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chemico-Biological Interactions*, 91, 133–140. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(94\)90033-7](https://doi.org/10.1016/0009-2797(94)90033-7)
- Hafeez, B. – Khanif, Y.M. – Saleem, M. (2013): Role of zinc in plant nutrition – a review. *American Journal of Experimental Agriculture*, 3(2):374–391. doi:10.9734/AJEA/2013/2746.

- Hänsch, R. – Mendel, R.R. (2009): Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current opinion in plant biology*, 12(3), 259–266. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.05.006>
- Haripriya, A.M. – Byju G. (2008): Chlorophyll meter and leaf colour chart to estimate chlorophyll content, leaf colour, and yield of cassava. *Photosynthetica*, 46(4), 511–516. <https://doi.org/10.1007/s11099-008-0087-8>
- Heath, R.L. – Packer, L. (1968): Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys*, 125, 189–198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
- Herawati, N. – Suzuki, S. – Hayashi, K. – Rivai, I.F. – Koyoma, H. (2000): Cadmium, copper and zinc levels in rice and soil of Japan, Indonesia and China by soil type. *Bull Environ Contam Toxicol*, 64, 33–39. DOI: 10.1007/s001289910006
- Impa, S.M. – Morete, M.J. – Ismail, A.M. – Schulin, R. – Johnson-Beebout, S.E. (2013): Zn uptake, translocation and grain Zn loading in rice (*Oryza sativa* L.) genotypes selected for Zn deficiency tolerance and high grain Zn. *Journal of Experimental Botany*, 64(10), 2739–2751. DOI:10.1093/jxb/ert118.
- Ivanov, Y.V. – Savochkin, Y.V. – Kuznetsov, V.V. (2011): Scots pine as a model plant for studying the mechanisms of conifers adaptation to heavy metal action: 1. Effects of continuous zinc presence on morphometric and physiological characteristics of developing pine seedlings. *Russian Journal of Plant Physiology*, 58(5), 871–878. <https://doi.org/10.1134/S1021443711050104>
- Ivanov, Y.V. – Savochkin, Y.V. – Kuznetsov, V.V. (2012): Scots pine as a model plant for studying the mechanisms of conifers adaptation to heavy metal action: 2. Functioning of antioxidant enzymes in pine seedlings under chronic zinc action. *Russian Journal of Plant Physiology*, 59, 50–58. <https://doi.org/10.1134/S1021443712010098>
- Jelakovic, S. – Kopriva, S. – Suss, K.H. – Schulz, G.E. (2003): Structure and catalytic mechanism of the cytosolic D-ribulose-5-phosphate 3-epimerase from rice. *J Mol Biol*, 326, 127–135. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)01374-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)01374-8)
- Jócsák, I. – Gyalog, H. – Hoffmann, R. – Somfalvi-Tóth, K. (2022b): In-Vivo Biophoton Emission, Physiological and Oxidative Responses of Biostimulant-Treated Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.) as Seed Priming Possibility, for Heat Stress Alleviation. *Plants*, 11(5), 640. <https://doi.org/10.3390/plants11050640>
- Jócsák, I. – Knolmayer, B. – Szarvas, M. – Rabnecz, G. – Pál-Fám, F. (2022a). Literature review on the effects of heavy metal stress and alleviating possibilities through exogenously applied agents in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plants*, 11(16), 2161. <https://doi.org/10.3390/plants11162161>
- Jócsák, I. – Lukács, H. – Varga-Visi, É. – Somfalvi-Tóth, K. – Keszthelyi, S. (2024): Identification and investigation of barley powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) infection in winter wheat with conventional stress reactions and non-invasive bio-photon emission parameters. *Journal of Biosciences*, 49(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s12038-023-00391-x>
- Jócsák, I. – Malgwi, I. – Rabnecz, G. – Szegő, A. – Varga-Visi, É. – Végvári, G. – Pónya, Z. (2020): Effect of cadmium stress on certain physiological parameters, antioxidative enzyme activities and biophoton emission of leaves in barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *PLoS One*, 15(11):e0240470. DOI: 10.1371/journal.pone.0240470
- Kalaji, H.M. – Schansker, G. – Ladle, R.J. – Goltsev, V. – Bosa, K. – Allakhverdiev, S.I. – Brestic, M. – Bussotti, F. – Calatayud, A. – Dąbrowski, P. – Elsheery, N.I. – Ferroni, L. – Guidi, L. – Hogewoning, S.W. – Jajoo, A. – Misra, A.N. – Nebauer, S.G.

- Pancaldi, S. – Penella, C. – Poli, D. – Pollastrini, M. – Romanowska-Duda, Z.B. – Rutkowska, B. – Serôdio, J. – Suresh, K. – Szulc, W. – Tambussi, E. – Yanniccari, M. – Zivcak, M. (2014). Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues. *Photosynthesis research*, 122, 121–158. <https://doi.org/10.1007/s11120-014-0024-6>
- Kalinina, E.V. – Chernov, N.N. – Novichkova, M.D. (2014): Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes. *Biochemistry (Moscow)*, 79, 1562–1583. <https://doi.org/10.1134/S0006297914130082>
 - Keszthelyi, S. – Gerbovits, B. – Jócsák, I. (2023): Impact analysis of different applications of cyantraniliprole on control of horse chestnut leaf miner (*Cameraria ohridella*) larvae supported by biophoton emission. *Biologia Futura*, 74, 209–219. <https://doi.org/10.1007/s42977-023-00169-0>
 - Khaliq, A. – Aslam, F. – Matloob, A. (2015) Seed Priming with Selenium. Consequences for Emergence, Seedling Growth, and Biochemical Attributes of Rice. *Biol Trace Elem Res*, 166, 236–244. <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0260-4>
 - Khan N.A. – Samiullah S.S. – Nazar R. (2007): Activities of antioxidative enzymes, sulphur assimilation, photosynthetic activity and growth of wheat (*Triticum aestivum*) cultivars differing in yield potential under cadmium stress. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 193, 435–444. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2007.00272.x>
 - Kleckerova, A. – Sobrova, P. – Krystofova, O. – Sochor, J. – Zitka, O. – Babula, P. – Adam, V. – Docekalova, H. – Kizek, R. (2011): Cadmium (II) and zinc (II) ions effects on maize plants revealed by spectroscopy and electrochemistry. *International Journal of Electrochemical Science*, 6(12), 6011–6031. [https://doi.org/10.1016/S1452-3981\(23\)19659-3](https://doi.org/10.1016/S1452-3981(23)19659-3)
 - Klejdus, B. – Zehnalek, J. – Adam, V. – Petrek, J. – Kizek, R. – Vacek, J. – Trnková, L. – Rozik, R. – Havel, L. – Kuban, V. (2004): Sub-picomole high-performance liquid chromatographic/mass spectrometric determination of glutathione in the maize (*Zea mays* L.) kernels exposed to cadmium. *Anal. Chim. Acta*, 520, 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.02.060>
 - Kovács, V. – Gondor, O.K. – Szalai, G. – Darkó, É. – Majláth, I. – Janda, T.; Pál, M. (2014): Synthesis and role of salicylic acid in wheat varieties with different levels of cadmium tolerance. *Journal of hazardous materials*, 280, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.07.048>
 - Kumar, S. – Trivedi, P.K. (2018) Glutathione S-Transferases: Role in Combating Abiotic Stresses Including Arsenic Detoxification in Plants. *Front. Plant Sci.*, 9, 751. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00751>
 - Kutman, U.B. – Kutman, B.Y. – Ceylan, Y. – Ova, E.A. – Cakmak, I. (2012): Contributions of root uptake and remobilization to grain zinc accumulation in wheat depending on post-anthesis zinc availability and nitrogen nutrition. *Plant and Soil*, 361, 177–187. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1300-x>
 - Lagriffoul, A. – Mocquot, B. – Mench, M. – Vangronsveld, J. (1998): Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.). *Plant Soil*, 200, 241–250. <https://doi.org/10.1023/A:1004346905592>
 - Liavonchanka A. – Feussner I. (2006): Lipooxygenases: Occurrence, functions and catalysis. *Journal of Plant Physiology*, 163, 348–357. DOI: 10.1016/j.jplph.2005.11.006
 - Liu, D.Y. – Liu, Y.M. – Zhang, W. – Chen, X.P. – Zou, C.Q. (2019): Zinc uptake, translocation, and remobilization in winter wheat as affected by soil application of Zn

fertilizer. *Frontiers in Plant Science*, 10, 443999. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00426>

- Liu, H. – Gan, W. – Rengel, Z. – Zhao, P. (2016): Effects of zinc fertilizer rate and application method on photosynthetic characteristics and grain yield of summer maize. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 16(2), 550–562. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162016005000045>
- Liu, M. – Liu, X. – Li, M. – Fang, M. – Chi, W. (2010): Neural-network model for estimating leaf chlorophyll concentration in rice under stress from heavy metals using four spectral indices. *Biosystems engineering*, 106(3), 223–233. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2009.12.008>
- Livak, K.J. – Schmittgen, T.D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *Methods*, 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- López-Millán, A.F. – Ellis, D.R. – Grusak, M.A. (2005): Effect of zinc and manganese supply on the activities of superoxide dismutase and carbonic anhydrase in *Medicago truncatula* wild type and *raz* mutant plants. *Plant Science*, 168(4), 1015–1022. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.11.018>
- Lorenzo F. – Marek Ž. – Marek K. – Andrea C. – Simonetta P. – Suleyman I.A. – Marian B. (2022): Fast chlorophyll a fluorescence induction (OJIP) phenotyping of chlorophyll-deficient wheat suggests that an enlarged acceptor pool size of Photosystem I helps compensate for a deregulated photosynthetic electron flow. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 234, 112549. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2022.112549>
- Lukács, H. – Jócsák, I. – Somfalvi-Tóth, K. – Keszthelyi S. (2022): Physiological Responses Manifested by Some Conventional Stress Parameters and Biophoton Emission in Winter Wheat as a Consequence of Cereal Leaf Beetle Infestation. *Frontiers in Plant Science*, 13, 839855. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.839855>
- Mahmood, T. – Gupta, K.J. – Kaiser, W.M. (2009): Cd stress stimulates nitric oxide production by wheat roots. *Pak J Bot*, 41, 1285–1290
- Mahmoud, A. – AbdElgawad, H. – Hamed, B.A. – Beemster, G.T. – El-Shafey, N.M. (2021): Differences in cadmium accumulation, detoxification and antioxidant defenses between contrasting maize cultivars implicate a role of superoxide dismutase in Cd tolerance. *Antioxidants*, 10(11), 1812. <https://doi.org/10.3390/antiox10111812>
- Maksymiec, W. – Drazkiewicz, M. – Skorzynska-Polit, E. (2008): Responses of Higher Plants to Heavy Metal Stress, In Khan, N.A. and Singh, S. (szerk.) *Abiotic Stress and Plant Responses*. pp. 139-163. I.K. International Publishing House Pvt. Ltd. New Delhi - Bangalore - Mumbai.
- Maksymiec, W. – Krupa, Z. (2006): The effects of short-term exposition to Cd, excess Cu ions and jasmonate on oxidative stress appearing in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental and Experimental Botany*, 57, 187–194. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.05.006>
- Marschner H. (szerk.) (2012): Function of Nutrients: Micronutrients (Chap. 7). In *Marschner's mineral nutrition of higher plants*, 3rd ed. Elsevier Ltd.: Oxford, UK, Academic Press; pp 212–222.
- Martens, D.C. – Westermann, D.T. (1991): Fertilizer applications for correcting micronutrient deficiencies (Chap. 15) In Mortvedt, J.J., F.R. Cox, L.M. Shuman, and R.M. Welch (szerk.) *Micronutrients in Agriculture* (2nd ed.), Soil Science Society of America, Madison, Wisc. pp 549–592.

- Moons A. (2003): *Osgtu3* and *osgtu4*, encoding tau class glutathione S-transferases, are heavy metal-and hypoxic stress-induced and differentially salt stress-responsive in rice roots. *FEBS letters*, 553(3), 427–432. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01077-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01077-9)
- Najeeb, U. – Jilanic, G. – Alia, S. – Sarward, M. – Xua, L. – Zhoua, W. (2011): Insights into cadmium induced physiological and ultra-structural disorders in *Juncus effusus* L. and its remediation through exogenous citric acid. *Journal of Hazardous Materials*, 186, 565–574. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.11.037>
- Nocito, F.F. – Pirovano, L. – Cocucci, M. – Sacchi, G.A. (2002): Cadmium-Induced Sulfate Uptake in Maize Roots. *Plant Physiology*, 129(4), 1872–1879. <https://doi.org/10.1104/pp.002659>
- Nriagu J.O. (szerk.) (1980): Cadmium in the atmosphere and in precipitation. In *Cadmium in the Environment*, Part 1, John Wiley & Sons, Inc.: New York, USA, pp. 35–114.
- Nriagu, J.O. – Pacyna, J.M. (1988): Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature*, 333, 134–139.
- Nyitrai, P. – Bóka, K. – Gáspár, L. – Sárvári, É. – Lenti, K. – Keresztes, Á. (2003): Characterization of the stimulating effect of low-dose stressors in maize and bean seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 160, 1175–1183. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00770>
- Oláh Cs. (2020): *Biológiailag aktív vegyület, az S-metilmetionin-szalicilát fiziológiai és stresszkivédő hatásai kukoricában*. [PhD értekezés] Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biológiai Doktori Iskola. DOI: 10.15476/ELTE.2020.003
- Pál, M. – Horváth, E. – Janda, T. – Páldi, E. – Szalai, G. (2006): Physiological changes and defense mechanisms induced by cadmium stress in maize. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 169(2), 239–246. DOI: 10.1002/jpln.200520573
- Pónya, Z. – Jócsák, I. – Keszthelyi, S. (2021): Detection of ultra-weak photon emission in sunflower (*Helianthus annuus* L.) infested by two spotted-spider mite, *Tetranychus urticae* Koch-research note. *Phytoparasitica*, 50, 43–50. doi: 10.1007/s12600-021-00938-4
- Porta H. – Rocha-Sosa M. (2002): Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. *Plant Physiology*, 130, 15–21. DOI: 10.1104/pp.010787
- Prasad M.N.V. (1995): Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Environ. Exp. Bot.*, 35, 525–545. [https://doi.org/10.1016/0098-8472\(95\)00024-0](https://doi.org/10.1016/0098-8472(95)00024-0)
- Prasad, A. – Sedlářová, M. – Kale, R.S. – Pospíšil, P. (2017): Lipoxygenase in singlet oxygen generation as a response to wounding: in vivo imaging in *Arabidopsis thaliana*. *Sci. Rep.* 7, 9831. DOI: 10.1038/s41598-017-09758-1
- Radics L. (szerk.) (2012) *Fenntartható szemléletű szántóföldi növénytermesztés 2*. Agroinform kiadó, Budapest
- Rascio, N. – Dalla Vecchia, F. – Ferretti, M. – Merlo, L. – Ghisi, R. (1993): Some effects of cadmium on maize plants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 25, 244–249. <https://doi.org/10.1007/BF00212136>
- Remans, T. – Opdenakker, K. – Smeets, K. – Mathijsen, D. – Vangronsveld, J. – Cuypers, A. (2010): Metal-specific and NADPH oxidase dependent changes in lipoxygenase and NADPH oxidase gene expression in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium or excess copper. *Functional Plant Biology*, 37(6) 532–544. <https://doi.org/10.1071/FP09194>
- Romheld, V. – Marschner, H. (1991) Function of micronutrients in plants (Chap.9). In Mortvedt J.J. – Cox, F.R. – Shuman, L.M. – Welch, R.M. (szerk.) *Micronutrients in*

agriculture, 2nd ed. Soil Science Society of America: Madison, Wisc., USA, pp. 297–328. <https://doi.org/10.2136/sssabookser4.2ed.c9>

- Rubino F.M. (2015): Toxicity of glutathione-binding metals: a review of targets and mechanisms. *Toxics*, 3, 20–62. <https://doi.org/10.3390/toxics3010020>
- Sadeghzadeh B. (2013): A review of zinc nutrition and plant breeding. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13, 905–927. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162013005000072>
- Sanchez-Martin, M.J. – Sanchez-Camazano, M. (1993): Adsorption and mobility of cadmium in natural uncultivated soils. *Journal of Environmental Quality*, 22, 737–742. <https://doi.org/10.2134/jeq1993.00472425002200040015x>
- Sánchez-Moreiras, A.M. – Graña, E. – Reigosa, M.J. – Araniti, F. (2020): Imaging of chlorophyll a fluorescence in natural compound-induced stress detection. *Front. Plant Sci.* 11, 583590. DOI: 10.3389/fpls.2020.583590.
- Schuerger, A.C. – Capelle, G.A. – Di Benedetto, J.A. – Mao, C. – Thai, C.N. – Evans, M.D. – Richards, J.F. – Blank, T.A. – Stryjewski, E.C. (2003): Comparison of two hyperspectral imaging and two laser-induced fluorescence instruments for the detection of zinc stress and chlorophyll concentration in bahia grass (*Paspalum notatum* Flugge.). *Remote sensing of environment*, 84(4), 572–588. [https://doi.org/10.1016/S0034-4257\(02\)00181-5](https://doi.org/10.1016/S0034-4257(02)00181-5)
- Schulze, ED. – Beck, E. – Buchmann, N. – Clemens, S. – Müller-Hohenstein, K. – Scherer-Lorenzen, M. (szerk.) (2019): Adverse Soil Mineral Availability (Chap. 7). In: *Plant Ecology*. Springer, Berlin, Heidelberg; pp. 203–256. https://doi.org/10.1007/978-3-662-56233-8_7
- Schützendübel, A. – Polle, A. (2002): Plant responses to abiotic stresses: heavy metal induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1351–1365.
- Seregin, I. – Kozhevnikova, A. (2005): Distribution of cadmium, lead, nickel and strontium in imbibing maize caryopses. *Russian Journal of Plant Physiology*, 52, 565–569. <https://doi.org/10.1007/s11183-005-0084-8>
- Singh, B. – Kumar, S. – Natesan, A. – Singh, B.K. – Usha, K. (2005): Improving Zinc deficiency of cereals under zinc deficiency. *Current Science*, 88, 36–44.
- Siroka, B. – Huttova, J. – Tamas, L. – Simonoviva, M. – Mistrik, I. (2004): Effect of cadmium on hydrolytic enzymes in maize root and coleoptile. *Biologia*, 59, 513–517.
- Sridhar, B.M. – Han, F.X. – Diehl, S.V. – Monts, D.L. – Su, Y. (2007): Spectral reflectance and leaf internal structure changes of barley plants due to phytoextraction of zinc and cadmium. *International journal of remote sensing*, 28(5), 1041–1054. <https://doi.org/10.1080/01431160500075832>
- Stepić, V. – Cvijanović, G. – Đurić, N. – Bajagić, M. – Marinković, J. – Cvijanović, V. (2022): Influence of zinc treatments on grain yield and grain quality of different maize genotypes. *Plant, Soil and Environment*, 68(5), 223–230. DOI: 10.17221/93/2022-PSE
- Subramanian, K.S. – Bharathi, C. – Gomathy, M. – Balakrishnan, N. (2014): Role of arbuscular mycorrhizal (*Glomus intraradices*) fungus inoculation on Zn nutrition in grains of field grown maize. *Australian Journal of Crop Science*, 8(5), 655–665. <https://search.informit.org/doi/10.3316/informit.370638247902722>
- Szalontai, B. – Horváth, L.I. – Debreczeny, M. (1999): Molecular rearrangements of thylakoids after heavy metal poisoning, as seen by Fourier transform infrared (FTIR) and electron spin resonance (ESR) spectroscopy. *Photosynthesis Research* 61, 241–252 <https://doi.org/10.1023/A:1006345523919>

- Tamás, L. – Dudíková, J. – Ďurčková, K. (2009): Effect of cadmium and temperature on the lipoxygenase activity in barley root tip. *Protoplasma* 235, 17–25. <https://doi.org/10.1007/s00709-008-0027-2>
- Tang, Z. – Su, Y. – Du, Q. – Li, S. (2023): The influence mechanism of exogenous trehalose on the growth and development of maize under cadmium stress. *Journal of Biotech Research*, 15, 295–307.
- Tewari, R.K. – Kumar, P. – Sharma, P.N. (2019). An effective antioxidant defense provides protection against zinc deficiency-induced oxidative stress in Zn-efficient maize plants. *Journal of plant nutrition and soil science*, 182(5), 701–707. <https://doi.org/10.1002/jpln.201800622>
- Tripathy, B.N. – Gaur, J.P. (2004): Relationship between copper- and zinc-induced oxidative stress and proline accumulation in *Scenedesmus* sp. *Planta*, 219, 397–404. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1237-2>
- Tsonev, T. – Cebola Lidon, F.J. (2012): Zinc in plants - An overview. *Journal of Food & Agriculture (EJFA)*, 24 (4), 322–333.
- Tyler, G. – Pålsson, A.M.B. – Bengtsson, G. – Bååth, E. – Tranvik, L. (1989): Heavy-metal ecology of terrestrial plants, microorganisms and invertebrates. *Water, Air, and Soil Pollution*, 47 (3–4), 189–215.
- Verkleji J. (1993): The effects of heavy metals stress on higher plants and their use as biomonitors. In Markert B. (szerk.) *Plant as Bioindicators: Indicators of Heavy Metals in the Terrestrial Environment*; VCH: New York, NY, USA, pp. 415–424
- Wagner G.J. (1993): Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Adv. Agron.* 51, 173–212.
- Wang, F. – Chen, F. – Cai, Y. – Zhang, G. – Wu, F. (2011): Modulation of exogenous glutathione in ultrastructure and photosynthetic performance against Cd stress in the two barley genotypes differing in Cd tolerance. *Biol Trace Elem Res*, 144 (1–3):1275–1288. <https://doi.org/10.1007/s12011-011-9121-y>
- Wang, M. – Zou, J. – Duan, X. – Jiang, W. – Liu, D. (2007): Cadmium accumulation and its effects on metal uptake in maize (*Zea mays* L.). *Bioresource Technology*, 98, 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.11.028>
- Waters, B.M. – Uauy, C. – Dubcovsky, J. – Grusak, M.A. (2009): Wheat (*Triticum aestivum*) NAM proteins regulate the translocation of iron, zinc, and nitrogen compounds from vegetative tissues to grain. *Journal of Experimental Botany*. 60, 4263–4274 <https://doi.org/10.1093/jxb/erp257>
- Weckx, J.E.J. – Clijsters, H.M.M. (1997): Zn phytotoxicity induces oxidative stress in primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology and Biochemistry (Paris)*, 35, 405–410.
- Weitner, T. – Inić, S. – Jablan, J. – Gabričević, M. – Domijan, A.M. (2016): Spectrophotometric determination of malondialdehyde in urine suitable for epidemiological studies. *Croatica Chemica Acta*, 89(1), 133–139. <https://doi.org/10.5562/cca2902>
- Wickham H. (2016). *Ggplot2: Elegant graphics for data analysis* (2nd ed.) [PDF]. Springer International Publishing.
- Wickham, H. – Hester, J. – Chang, W. – Bryan, J. (2022). devtools: Tools to Make Developing R Packages Easier. <https://devtools.r-lib.org/>, <https://github.com/r-lib/devtools>.
- Wiedemuth, K. – Müller, J. – Kahlau, A. – Amme, S. – Mock, H.P. – Grzam, A. – Hell, R. – Egle, K. – Beschow, H. – Humbeck, K. (2005): Successive maturation and senescence of individual leaves during barley whole plant ontogeny reveals temporal and

spatial regulation of photosynthetic function in conjunction with C and N metabolism. *Journal of Plant Physiology*, 162(11), 1226–1236. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.01.010>

- Wójcik, M. – Tukendorf, A. (1999): Cd-tolerance of maize, rye and wheat seedlings. *Acta Physiol. Plant*, 21, 99–107. <https://doi.org/10.1007/s11738-999-0063-3>
- Wójcik, M. – Tukendorf, A. (2005): Cadmium uptake, localization and detoxification in *Zea mays*. *Biol. Plant*, 49, 237–245. <https://doi.org/10.1007/s10535-005-7245-7>
- Wood, J.M. – Wang, H.-K. (1983): Microbial resistance to heavy metals. *Environ. Science and Technology*, 17, 582A–590A. <https://doi.org/10.1021/es00118a717>
- Xu, X. – Liu, C. – Zhao, X. – Li, R. – Deng, W. (2014): Involvement of an Antioxidant Defense System in the Adaptive Response to Cadmium in Maize Seedlings (*Zea mays* L.). *Bull Environ Contam Toxicol*, 93, 618–624. <https://doi.org/10.1007/s00128-014-1361-z>
- Xue, Y.F. – Yue, S.C. – Zhang, Y.Q. – Cui, Z.L. – Chen, X.P. – Yang, F.C. – Cakmak, I. – McGrath, S.P. – Zhang, F.S. – Zou, C.Q. (2012): Grain and shoot zinc accumulation in winter wheat affected by nitrogen management. *Plant Soil*, 361, 153–163. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1510-2>
- Xue, Y.F. – Zhang, W. – Liu, D.Y. – Yue, S.C. – Zou, C.Q. (2014): Effects of nitrogen management on root morphology and zinc translocation from root to shoot of winter wheat in the field. *Field Crops Res.* 161, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2014.01.009>
- Ying, R.R. – Qiu, R.L. – Tang, Y.T. – Hu, P.J. – Qiu, H. – Chen, H.R. – Shi, T.H. – Morel, J.L. (2010): Cadmium tolerance of carbon assimilation enzymes and chloroplast in Zn/Cd hyperaccumulator *Picris divaricata*. *J Plant Physiol*, 167, 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.07.005>

7.1 Internetes források

Gruiz Katalin: Cinkhiányos talajok Magyarországon. KÖRINFO honlapja (Letöltve:2024.03.02.). <https://enfo.hu/node/5781>

Konica Minolta (1989): Chlorophyll meter SPAD-502. https://www.konicaminolta.com.cn/instruments/download/manual/pdf/SPAD-502_Manual.pdf (Letöltve: 2023.10.10.).

R Core Team (2023) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>