

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra biologie

**Fyziologicky aktivní látky ovlivňující
stresovou reakci rostlin na těžké kovy**

Disertační práce

Autor: RNDr. Šárka Rečková
Studijní program: Biologie D
Studijní obor: Aplikovaná biologie a ekologie (DR-BI)
Vedoucí práce: doc. Ing. Jiří Tůma, CSc.
Konzultant: RNDr. Zuzana Kovalíková, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci pod vedením vedoucího práce vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité prameny a literaturu. Výsledky v předložené práci jsou originálními údaji, které byly získány během prezenční formy doktorského studia.

V Hradci Králové dne

.....
RNDr. Šárka Rečková

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat hlavně svému školiteli doc. Ing. Jiřímu Tůmovi, CSc. za odborné vedení, rady a konzultace v průběhu celého doktorského studia. Dále bych chtěla poděkovat za spolupráci, pomoc a konzultaci RNDr. Zuzaně Kovalíkové, Ph.D., za pomoc při stanovování specifických látek doc. Vlastimilu Dohnalovi, Ph.D. et Ph.D. a PharmDr. Adamu Skarkovi, Ph.D. Děkuji také Mgr. Matějovi Semerákovi za pomoc při některých experimentech, Dr hab. Martě Libik-Konieczny za vedení a odborné rady v průběhu mezinárodní stáže a doc. RNDr. Radomíře Vaňkové, CSc. za pomoc při stanovování obsahu rostlinných hormonů v rámci spolupráce s Ústavem experimentální botaniky AV ČR v Praze. V neposlední řadě bych ráda poděkovala rodině a přátelům za jejich podporu v průběhu celého mého doktorského studia.

Děkuji také Univerzitě Hradec Králové za finanční podporu v podobě grantů, ze kterých byly hrazeny všechny experimenty, výjezdy na stáže a konference. Konkrétně se jednalo o granty: Fyziologicky aktivní látky ovlivňující stresovou reakci rostlin na těžké kovy (SV UHK 2114/2015), Vliv hormonálních látek na adaptaci a detoxifikaci rostlin vystavených zvýšeným dávkám těžkých kovů (SV UHK 2109/2016) a SV katedry biologie (2017). Výjezdy na zahraniční stáže byly financovány z programu ERASMUS+.

Anotace

REČKOVÁ, Šárka. *Fyziologicky aktivní látky ovlivňující stresovou reakci rostlin na těžké kovy*. Hradec Králové, 2019. Disertační práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí disertační práce Jiří Tůma. 107 s.

Předkládaná práce obsahuje výsledky pokusů s kukuřicí setou (*Zea mays* L.), která byla pěstována v hydroponických nádobách v klimaboxu a stresována buď kadmíem nebo mědí. Studovány byly obranné mechanismy rostlin, účinky předošetření kyselinou salicylovou (SA) a změny v obsahu vybraných rostlinných hormonů. Bylo zjištěno, že v kořenech došlo ve stresu ke změně chemického složení, díky čemuž byl blokován příjem a transport Cu. Chemická reorganizace pletiv kořene však zřejmě omezila také absorpci minerálů potřebných pro normální růst, což vedlo k inhibici růstu. Silná negativní korelace mezi kyselinou jasmonovou (JA), kyselinou benzoovou (BzA), cytokininy (CK) a Cu naznačila jejich úlohu při snižování transportu Cu z kořenů do listů. Obsah většiny sledovaných hormonů se po aplikaci Cu zvýšil, stejně tak obsah obranných látek, jako jsou flavonoidy, fenoly a proteiny. Předošetření semen SA projevilo své ochranné účinky tím, že napomohlo inhibici translokace Cu a Cd, zmírnilo oxidační stres v kořenech a ovlivnilo aktivitu některých antioxidantních enzymů. Dále mělo za následek snížení fluorescence chlorofylu a zvýšení příjmu některých minerálních prvků. SA také v závislosti na své koncentraci snížila nebo zvýšila endogenní hladinu SA v semenech a v naklíčených kořenech a také urychlila jejich klíčení.

Klíčová slova: kadmium, měď, kyselina salicylová, fytohormony, *Zea mays*, těžké kovy

Annotation

REČKOVÁ, Šárka. *Physiologically active substances affecting the stress response of plants to heavy metals*. Hradec Králové, 2019. Dissertation Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis Supervisor Jiří Tůma. 107 p.

This thesis presents the results of experiments with maize (*Zea mays* L.), which was grown in hydroponic containers in a climabox and stressed either with cadmium or copper. The plant's defense mechanisms, the effects of salicylic acid pretreatment (SA) and changes in the content of the selected plant hormones were studied. It was found that there was a change in the chemical composition of the roots under stress, which prevented the intake and transport of Cu. However, the chemical reorganization of the root tissues has also reduced the absorption of minerals needed for normal growth, which has led to inhibited growth. The strong negative correlation between jasmonic acid (JA), benzoic acid (BzA), cytokinin (CK) and Cu indicated a role in reducing the transport of Cu from roots to leaves. The content of most of the studied hormones has increased after Cu treatment along with the content of defenses such as flavonoids, phenols and proteins. SA pretreatment of seeds has shown to have a protective effect by helping to inhibit the translocation of Cu and Cd, alleviating oxidative stress in the roots and influencing the activity of some antioxidant enzymes. It also resulted in a decrease in chlorophyll fluorescence and an increase in the intake of some mineral elements. SA also decreased or increased endogenous SA levels in seeds and sprouted roots as well as their germination, depending on its concentration.

Keywords: cadmium, copper, salicylic acid, phytohormones, *Zea mays*, heavy metals

Obsah

Seznam zkratek.....	8
Úvod.....	10
1. Aktuální přehled problematiky	12
1.1 Těžké kovy	12
1.1.1 Tolerance a detoxikace těžkých kovů.....	14
1.1.2 Kadmium	16
1.1.3 Měď'.....	19
1.2 Význam látek hormonální povahy v obraně rostlin.....	20
1.2.1 Kyselina salicylová.....	23
1.2.2 Mechanismy účinku kyseliny salicylové.....	24
1.2.3 Vliv kyseliny salicylové na toleranci kadmia	26
1.2.4 Vliv kyseliny salicylové na toleranci mědi	28
1.2.5 Vliv kyseliny salicylové na klíčení semen	28
1.3 Vybrané fyziologicky aktivní látky	29
1.3.1 Malondialdehyd	29
1.3.2 Fenolické látky.....	29
1.3.3 Proteiny	30
1.4 Kukuřice setá	30
2. Materiály a metody.....	33
2.1 Pokusy.....	33
2.1.1 Testování různých kultivarů kukuřice na odolnost k Cd	33
2.1.2 Vliv kyseliny salicylové na růst a obranné mechanismy kukuřice seté při zatížení kadmiem	34

2.1.3 Vliv kyseliny salicylové na klíčení, růst a obranné mechanismy kukuřice seté při zatížení mědí.....	35
2.1.4 Sledování změn v obsahu širokého spektra rostlinných hormonů kukuřice seté v reakci na stres z vysoké koncentrace mědi.....	35
2.2 Popis jednotlivých metod.....	36
3. Výsledky a diskuse.....	44
3.1 Testování různých kultivarů kukuřice na odolnost k Cd	44
3.2 Vliv kyseliny salicylové na růst a obranné mechanismy kukuřice seté při zatížení kadmíem.....	47
3.3 Vliv kyseliny salicylové na klíčení, růst a obranné mechanismy kukuřice seté při zatížení mědí	57
3.4 Sledování změn v obsahu širokého spektra rostlinných hormonů kukuřice seté v reakci na stres z vysoké koncentrace mědi	75
Závěr	86
Literatura	89
Příloha: Publikace v časopisu s IF.....	108

Seznam zkratek

ABA – kyselina abscisová
AOX – alternativní oxidáza
ATP – adenosintrifosfát
BSA – hovězí sérový albumin
BzA – kyselina benzoová
CAD – cinnamylalkohol dehydrogenáza
CAT – kataláza
CK – cytokininy
D4SA - [3,4,5,6-2 H4] - kyselina salicylová
DAB - 3,3'-diaminobenzidin
DPA – kyselina dyhydrofazeová
DTT – dithiotreitol
DW – suchá hmotnost
EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová
FW – čerstvá hmotnost
GSH – glutation
IAA – kyselina indol-3-octová
IBA – kyselina indol-3-máselná
JA – kyselina jasmonová
JAMe – methylester kyseliny jasmonové
PB – fosfátový pufr
MDA – malondialdehyd
NBT – nitro blue tetrazolium chlorid
PA – kyselina fazeová
PAA – kyselina fenyloctová
POD – peroxidáza
ROS – reaktivní formy kyslíku
SA – kyselina salicylová
SAD – sinapylalkohol dehydrogenáza
SAR – systémově získaná resistance
SDS – dodecylsulfát sodný

SOD – superoxid dismutáza

TBA – tertabutyl alkohol

TCA – kyselina trichloroctová

Úvod

Rostliny se neustále musejí vypořádávat s různými stresovými faktory, a to jak abiotickými, tak biotickými. Abiotické stresy, jako jsou těžké kovy, zasolení, ozón, UV-B záření, extrémní teploty a sucho, patří mezi největší hrozby pro rozvoj zemědělství a hospodářský výnos plodin. Tyto stresy (působící samostatně nebo kombinovaně) vyvolávají řadu nepříznivých účinků, které narušují biochemické, fyziologické a molekulární procesy a nakonec způsobují inhibici růstu, vývoje a celkové snížení produkce rostlin (Khan et al., 2015). Předpokládá se, že abiotické stresy mohou negativně ovlivnit až 70 % výnosů základních potravinářských plodin (Mantri et al., 2012). V jednom z odhadů americké Environmental Action Group byla toxicita způsobená různými kovy uvedena jako jeden z hlavních problémů zemědělství, který negativně působí na zdraví více než 10 milionů lidí v osmi zemích (Čína, Dominikánská republika, Indie, Kyrgyzstán, Peru, Rusko, Ukrajina a Zambie) (ENS, 2006 in Khan et al., 2015).

Znečištění půd těžkými kovy je stále rostoucí problém na celém světě. Je výsledkem lidské činnosti stejně tak, jako geochemického zvětrávání hornin a dalších environmentálních příčin, jako jsou sopečné výbuchy, kyselé deště a kontinentální prach. Z antropogenních činností je to hlavně těžba, používání hnojiv, pesticidů na bázi kovů a široká škála průmyslových činností, které uvolňují kovy do životního prostředí (Zawoznik et al., 2007). Příjem těžkých kovů rostlinami omezuje nejen úrodu, ale může být také hlavním nebezpečím pro zdraví lidí a celého ekosystému (Ahsan et al., 2009). Rostliny jsou totiž schopny převzít tyto prvky z půdy a zavést je do potravinového řetězce, čímž se zvyšuje riziko toxického působení kovů na lidi a zvířata (Roy and McDonald, 2015). Některé kovy, jako jsou zinek (Zn), rtuť (Hg), měď (Cu), arsen (As), olovo (Pb) a kadmium (Cd), mohou být perzistentní a bioakumulativní.

Aby bylo možné rozvíjet ideotypy pro udržitelné zemědělství a zlepšit celkovou výnosnost rostlin v podmínkách měnícího se klimatu a zvýšené závažnosti abiotických stresů, je nezbytné využívat dostupné informace o zapojení kyseliny salicylové (SA) a dalších fyziologicky aktivních látek do abiotické stresové tolerance u rostlin (Khan et al., 2015). Znalost obranných mechanismů rostlin a účinků

fyziologicky aktivních látek nám může pomoci snížit příjem těžkých kovů, ale i dalších toxických látek do zemědělských plodin.

Cílem této práce byl výzkum fyziologicky aktivních látek, především kyseliny salicylové, ovlivňujících stresovou reakci rostlin při zatížení těžkými kovy. Dále také prozkoumat obranné mechanismy rostlin, změny v metabolismu a obsahu hormonů při působení tohoto stresového faktoru. Experimenty byly prováděny s kukuřicí setou (*Zea mays* L.) v řízených podmínkách klimaboxu. Kukuřice byla vybrána jako pokusná rostlina, protože se jedná o velmi důležitou zemědělskou plodinu, zároveň se dobře pěstuje v laboratorních podmínkách a v neposlední řadě také disponuje rychlým růstem. Pokusy se zaměřovaly hlavně na zatížení vysokými koncentracemi těžkých kovů, jako je Cd a Cu. Některé experimenty byly provedeny ve spolupráci s Institutem fyziologie rostlin Polské akademie věd v Krakově v Polsku. Další pokusy sledující změny v obsahu širokého spektra rostlinných hormonů v reakci na stres z Cu byly provedeny ve spolupráci s Ústavem experimentální botaniky AV ČR v Praze.

1. Aktuální přehled problematiky

1.1 Těžké kovy

Těžké kovy jsou z chemického hlediska přiřazovány k přechodným kovům s relativní atomovou hmotností vyšší než 20 a specifickou hustotou vyšší než 5 g.cm^{-3} . V biologii se pojem „těžký“ přiřazuje k mnoha kovům a metaloidům, které mohou být toxické pro rostliny i živočichy ve velmi nízkých koncentracích. Některé z těchto kovů, jako je Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni nebo Zn, jsou v nízké koncentraci nezbytné pro normální růst rostlin. Pokud však jejich koncentrace překročí určité limity, stávají se toxickými. Další těžké kovy, mezi které se řadí As, Cd, Hg nebo Pb, nejsou pro rostliny nezbytné a nemají žádné fyziologické funkce (Rascio and Navari-Izzo, 2011).

Jsou přítomny v atmosféře, půdě i vodě. Na mnoha místech ve světě jsou těžkými kovy kontaminovány zemědělské půdy, a to hlavně Cd, Cu, Zn, Co, Ni, Cr, Pb a As. Toto znečištění je způsobeno hlavně dlouhodobým používáním fosfátových hnojiv, aplikací čistírenských kalů a kontaminovaných závlahových vod na zemědělské půdy, prachem z hutí a průmyslovým odpadem (Bell et al., 2001; Schwartz et al., 2001). Těžké kovy setrvávají v půdě tisíce let a představují řadu zdravotních hrozeb pro různé organismy, ovlivňují růst rostlin, znečišťují půdu a mají negativní dopad na půdní mikroflóru, ale mohou se i dostávat do potravinového řetězce a negativně působit na zdraví zvířat i lidí (Roy et al., 2005; Kumar, 2015).

Povolené limity obsahu těžkých kovů, které definují úroveň znečištění našich půd, jsou uvedeny v legislativních předpisech: vyhláška č. 163/2016 Sb. a vyhláška č. 437/2016 Sb. V České republice se nachází několik oblastí se zvýšenou kontaminací půdy těžkými kovy způsobenou především důlní činností. Sem patří například Kutná Hora, kde je hlavním zdrojem kontaminace As, Cd, Pb a Zn (Tlust'oš et al., 2007). Vysoká kontaminace těžkými kovy je také v severních Čechách, kde je provozován těžební, hutní a metalurgický průmysl. Toto území zaujímá 10 % ČR. Nejhuře jsou na tom lokality v oblasti Žatce, Chomutova a Sokolova, kde jsou půdy kontaminovány hlavně Cr, Cd, B, Ni a Zn (Petříková et al., 1995). Mezi nejvíce poškozené oblasti patří také Příbramsko, kde došlo ke kontaminaci při těžbě a zpracování olova (Rieuwertts et al., 1999).

Bioaktivní kovy jsou na základě jejich fyzikálně-chemických vlastností rozděleny do dvou skupin: redoxní kovy jako Cr, Cu, Mn a Fe a neredoxní kovy, jako jsou Cd, Ni, Hg, Zn a Al. Redoxní kovy mohou přímo vyvolat oxidační poškození rostlin prostřednictvím Haber-Weissovy a Fentonovy reakcí, které vedou k produkci reaktivních forem kyslíku (ROS). Ty způsobují oxidativní stres prostřednictvím nerovnováhy mezi prooxidační a antioxidační homeostázou (Jozefczak et al., 2012). Naproti tomu neredoxní kovy nepřímo působí jako oxidační stresory několika mechanismy zahrnujícími depleci glutathionu, vazbu na sulfhydrylové skupiny proteinů, inhibici antioxidačních enzymů nebo indukci enzymů produkujících ROS, jako jsou NADPH oxidázy (Bielen et al., 2013).

Příznaky toxicity pozorované při zatížení nadměrným množstvím těžkých kovů mohou být způsobeny řadou interakcí na buněčné i molekulární úrovni. Toxicita může vyplývat z vazby na sulfhydrylovou skupinu v proteinech, což vede k inhibici činnosti nebo narušení jejich struktury (Van Assche and Clijsters, 1990). Podle Lal (2010) mají těžké kovy negativní vliv na aktivitu enzymů, strukturu proteinů, minerální výživu, vodní bilanci, dýchání, obsah ATP, fotosyntézu, růst a morfogenezi a tvorbu ROS. Zvýšení ROS způsobuje v buňkách oxidativní stres, který následně vede k peroxidaci lipidů, biologickému poškození makromolekul, poruchám membrán, úniku iontů a štěpení DNA řetězce (Quartacci et al., 2001). Těžké kovy mohou také blokovat funkční skupiny metabolicky důležitých molekul, vytěšňovat nebo nahrazovat základní prvky (Rocca et al., 2009). Podle Demiral and Türkan (2005) je jeden z nejvýznamnějších účinků působení těžkých kovů v rostlinách peroxidace lipidů, která může přímo způsobit poškození membrány.

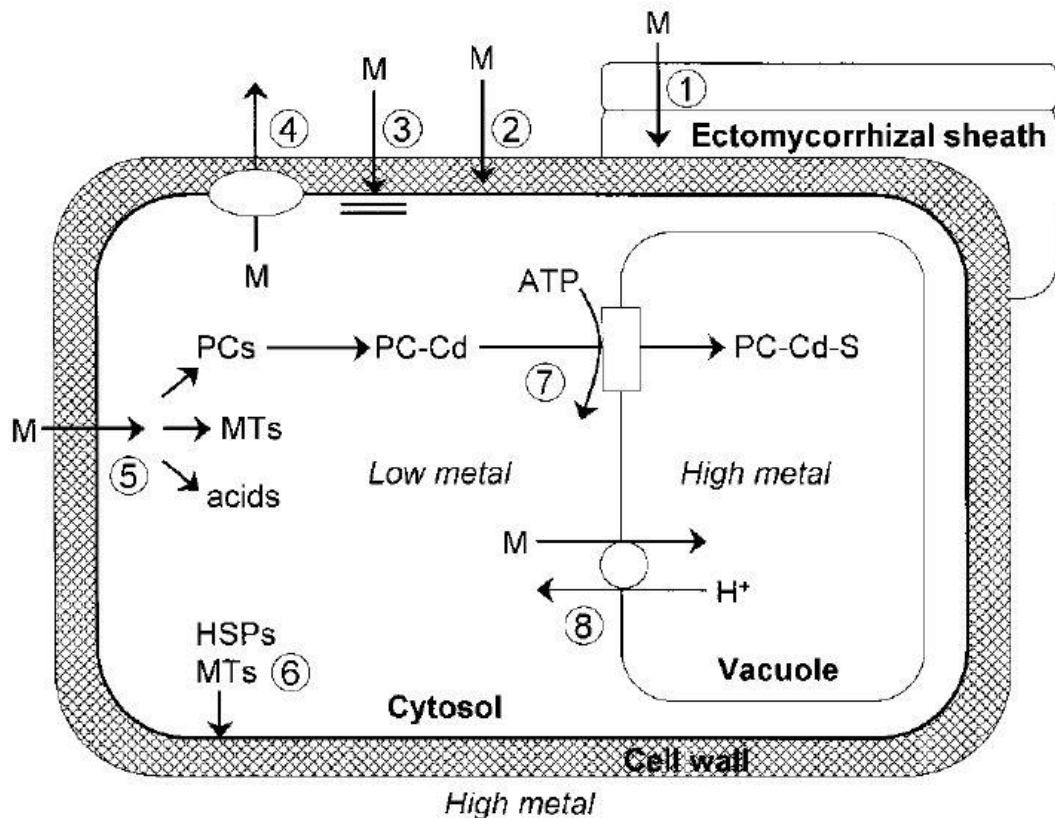
Kovy z půdy vstupují do kořenů symplastickými nebo apoplastickými cestami a následně se přemisťují do xylému a dále do nadzemních částí (Lux et al., 2011). Většina tolerantních rostlin akumuluje těžké kovy v podzemních částech. V kořenech se těžké kovy hromadí především v rhizodermis a kůře a v intracelulárních částech se nejvyšší koncentrace těžkých kovů nachází v buněčné stěně (Lal, 2010). Příjem a translokace závisí na druhu rostliny a kovu. Různé kovy jsou různě mobilní, například Cd a Zn jsou pohyblivější než Cu a Pb (Prasad, 2013). Z kořenů se dále do nadzemních částí dostávají skrze apoplast. Při vstupu do xylému musejí překonat endodermis a suberizované Casparyho proužky.

Většina kovů tedy do xylému projde mladšími částmi kořenů, kde nejsou Casparyho proužky ještě zcela vyvinuty (Marschner et al., 1995).

1.1.1 Tolerance a detoxikace těžkých kovů

Rostliny mají řadu potenciálních buněčných mechanismů, které mohou být zapojeny do detoxikace těžkých kovů a tím i do tolerance na stres z těžkých kovů (Obr. 1). Většinou se rostliny snaží vyhnout hromadění toxických koncentrací v citlivých místech uvnitř buňky a tím zabránit škodlivým účinkům spíše, než by začaly tvořit proteiny, které by odolaly účinkům těžkých kovů. Například je málo důkazů o tom, že by tolerantní druhy nebo ekotypy vykazovaly zvýšenou oxidační obranu. Tolerantní rostliny se hlavně snaží posílit avoidanci a homeostatické mechanismy, aby se zabránilo vzniku stresu (De Vos et al., 1991; Dietz et al., 1999). Podle Woolhouse (1983) jsou změny v rostlinách vyvolané těžkými kovy důsledkem buď přímého snížení metabolismu, nebo jsou to signalizační procesy, které iniciují adaptivní nebo toxické reakce, které je třeba považovat za aktivní procesy (Jonak et al., 2004).

Po vystavení těžkým kovům rostliny často syntetizují řadu různých metabolitů, které se hromadí v koncentracích v jednotkách mM, zejména specifické aminokyseliny (histidin, prolin), peptidy (glutathion, fytochelatiny), aminy (spermin, spermidin, putrescin, nicotianamin). Obecně platí, že tyto látky mají tři hlavní funkce: tvoření kovových vazeb, antioxidační obrana a signalizace. Na základě dostupných údajů je zřejmé, že změny v obsahu těchto metabolitů nesou funkční význam v souvislosti s tolerancí těžkých kovů (Sharma and Dietz, 2006). Dále se rostliny mohou bránit opravou stresem poškozených proteinů nebo umístěním kovů do vakuol (Hall, 2002), kde hrají důležitou roli fytochelatiny, které tvoří s toxickými kovy komplexy v cytosolu a následně zajišťují jejich transport na potřebné místo (Salt and Rauser, 1995). Tolerance také zahrnuje plazmatické membrány, které dokážou snížit příjem těžkých kovů nebo stimulovat odtok iontů kovů, jež vstoupily do cytosolu. V rámci protoplastu existuje řada potenciálních obranných mechanismů, například již zmíněná oprava poškozených proteinů nebo chelatace kovů organickými kyselinami, aminokyselinami a peptidy (Hall, 2002).



Obrázek 1: Shrnutí potenciálních obranných mechanismů v reakci na těžké kovy. 1. Zamezení pohybu do kořenů pomocí mykorrhizy. 2. Vázání na buněčné stěny a kořenové exudáty. 3. Redukce toku přes plazmatickou membránu. 4. Aktivní vylučování do apoplastu. 5. Chelatace v cytosolu různými ligandy. 6. Oprava a ochrana plazmatické membrány. 7. Transport PC-Cd komplexů do vakuoly. 8. Transport a akumulace kovů ve vakuole (Hall, 2002).

Rostliny pod tlakem těžkých kovů syntetizují proteiny související se stresem (Maksymiec, 2007). Mezi nimi jsou zvláště zajímavé proteiny spojené s enzymatickou regulací antioxidační homeostázy, protože mohou významně snížit účinky ROS, které jsou nadměrně produkovány při stresu z těžkých kovů. Nicméně v literatuře lze nalézt variabilní výsledky týkající se změn obsahu proteinů a enzymové aktivity v důsledku stresu z těžkých kovů. Tyto nesrovnalosti mohou být připsány rozdílům v aktivitách genů a funkcích proteinů v závislosti na rostlinných pletivech (Gao et al., 2008). Již dříve bylo popsáno, že expozice sazenic pšenice různým koncentracím Cu mírně zvyšuje akumulaci proteinů ve výhoncích, zatímco snižuje jejich obsah v kořenech (Al-Hakimi and Hamada, 2011).

Existují rostliny, které dokážou aktivně přijímat vysoké množství jednoho nebo více kovů z půdy. Tyto rostliny se nazývají hyperakumulátory a mají vysoký

potenciál pro použití v sanaci kontaminovaných půd těžkými kovy (fytoremediaci). Zdá se, že je možné tyto rostliny efektivně využít zkombinováním hyperakumulačních vlastností se schopností velké produkce biomasy. Některé hyperakumulátory totiž translokují těžké kovy do nadzemních částí, a to v koncentracích až 1000krát vyšších než ostatní rostliny, a navíc nevykazují žádné příznaky toxicity (Anh Tuan and Popova, 2013). Jasnější pochopení tolerance k těžkým kovům a hyperakumulačních mechanismů výrazně usnadňuje realizaci tohoto cíle (Demidchik et al., 2002; Hall and Williams, 2003). Tolerantní ekotypy a genotypy jsou druhy, které vznikly zrychleným mikrovývojem při akutním selekčním tlaku. Příklady tolerantních druhů jsou *Arabidopsis halleri* (Zn-hyperakumulátor), druhy rodu *Thlaspi* (Cd a Ni-hyperakumulátory), *Silene vulgaris* (s Zn, Cu a Cd odolnými ekotypy) a *Alyssum bertolonii* (Ni-hyperakumulátor) (Bert et al., 2003; Ernst and Nelissen, 2000; Freeman et al., 2004; Küpper et al., 2001).

Na základě akumulace těžkých kovů jsou rostliny rozděleny do tří hlavních skupin: (I) akumulátorové rostliny, (II) indikátorové rostliny a (III) tolerantní rostliny. Obecně platí, že hromadění těžkých kovů v rostlinných orgánech je v sérii: kořen > listy > stonk > květenství > semeno (Lal, 2010). Tolerantní rostliny těžké kovy často vylučují, omezují jejich vstup a translokaci, zatímco netolerantní rostliny převážně kovy hromadí v kořenech, přičemž kapacita pro přemístění těchto prvků do výhonku je faktor podílející se na toleranci (Verbruggen et al., 2009).

1.1.2 Kadmium

Kadmium (Cd) je vysoce toxický stopový prvek, který vstupuje do životního prostředí jak přirozeně, tak i lidskou činností. Nejvýznamnější přírodní zdroje jsou zvětrávání nerostů, eroze a vulkanické aktivity, z antropogenních zdrojů je to těžba, tavení, galvanizace, používání pesticidů a (fosfátových) hnojiv v zemědělství, aplikace kalů, průmyslový odpad a atmosférická depozice (Sabiha-Javied et al., 2009). Je to neesenciální těžký kov, jenž přilákal největší pozornost díky vysoké akumulaci v rostlinách, půdě a vodě, která následně vede k toxickým účinkům na lidské zdraví prostřednictvím kontaminace potravinového řetězce (Gill and Tuteja, 2010).

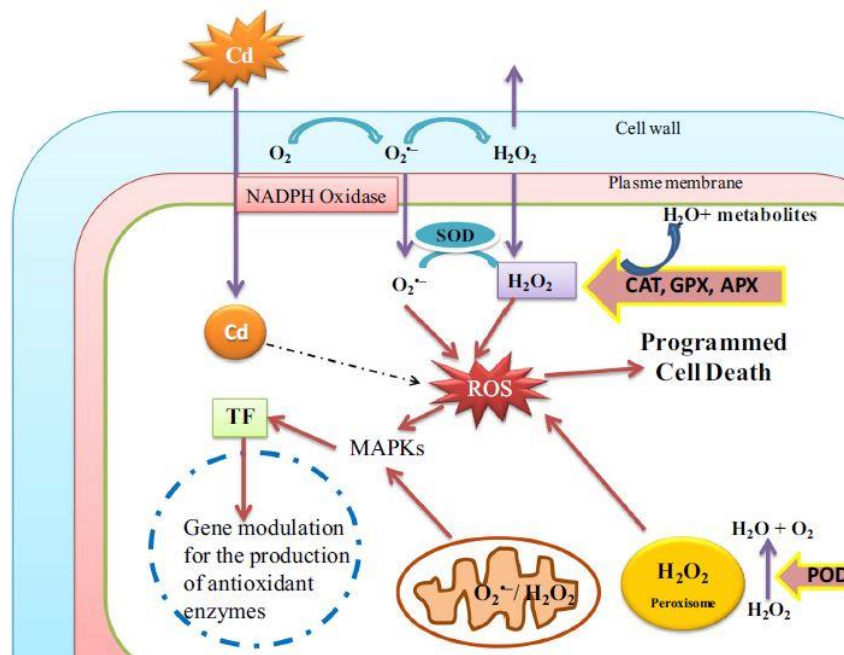
Kadmium je toxický kov kvůli poměrně vysoké mobilitě v půdním systému (Groppa et al., 2012). Bezpečná koncentrace Cd v půdě je 3 až 6 mg.kg⁻¹, v zelenině je to pak od 0,01 do 1,5 mg.kg⁻¹ čerstvé hmotnosti (Awasthi, 2000). Ačkoli Cd nemá v rostlinách žádnou známou fyziologickou funkci, může být snadno přijímán kořenovými buňkami rostlin prostřednictvím transportních systémů, které se podílejí na příjmu mikroživin (Gallego et al., 2012). Vzhledem k vysoké pohyblivosti a rozpustnosti ve vodě Cd snadno vstoupí do kořenů přes kortikální pletivo a následně do xylému apoplastickou nebo symplastickou dráhou, čímž vzniknou komplexy s organickými kyselinami nebo fytochelatiny (Salt et al., 1995). Do xylému se Cd dostává ATPasami (HMAS) přenášejícími těžké kovy, jako jsou ortologové AtHMA2 a AtHMA4 (Gallego et al., 2012). Tyto proteiny hrají důležitou roli při transportu iontů přechodových kovů proti elektrochemickému gradientu, k čemuž používají energii poskytovanou ATP hydrolýzou (Cailliatte et al., 2009). Většina přijatého Cd bývá zachycena v kořenech, menší část potom bývá translokována do nadzemních částí rostlin. Celkové množství nahromaděného Cd se však liší v závislosti na druhu rostliny (Anh Tuan and Popova, 2013). Translokace do nadzemních částí je vyvinuta hlavně u hyperakumulačních rostlin, které jsou schopné přijmout a snést vysoké množství těžkého kovu (Lasat et al., 2000).

Cd u rostlin inhibuje produkci biomasy, způsobuje peroxidaci lipidů, rozklad mastných kyselin a brání absorpci živin, jako je draslík, vápník, hořčík a železo (Belkhadi et al., 2010). Ve vyšších koncentracích vyvolává různé příznaky fyto toxicity, jako je kroucení listů, chloróza, hnědnutí kořenů a nakonec smrt (Kahle, 1993). Bylo prokázáno, že primární místa působení Cd jsou fotosyntetické pigmenty, zejména biosyntéza chlorofylu a karotenoidů (Qian et al., 2009). Cd toxicita může ovlivňovat rostliny různými způsoby změnou klíčových fyziologických a biochemických procesů, jako je klíčivost semen, syntéza pigmentů, fotosyntéza, výměna plynů, respirace, hormonální rovnováha, asimilace živin, syntéza proteinů, replikace DNA, také způsobuje blokování funkčních skupin metabolicky důležitých molekul a inaktivaci a denaturaci enzymů (Nagajyoti et al., 2010).

Dále může ovlivňovat buněčné biochemické mechanismy a strukturní aspekty, například snížení kontroly redoxního stavu buňky, což vyvolává oxidační stres a narušení složení a funkce membrán (Gallego et al., 2012). V rostlinách způsobuje oxidační stres v důsledku přerušení různých metabolických procesů.

Tento stres se projevuje vznikem velkého množství ROS, které jsou vedlejšími produkty normálního aerobního metabolismu, jako je respirace a fotosyntéza (Obr. 2). Jejich vysoké koncentrace jsou však vysoce reaktivní a toxické. Způsobují poškození lipidové membrány, proteinů, nukleových kyselin, inhibici enzymů a také nepříznivě působí na chloroplasty, mitochondrie a buněčné membrány, což nakonec vede k smrti buněk (Gill and Tuteja, 2010).

Rostliny vyvinuly spoustu mechanismů na obranu proti vysoké koncentraci Cd. Příkladem může být vylučování kovů, omezená distribuce v citlivých pletivech, vazba na buněčnou stěnu, chelace organickými molekulami a uložení do vakuol (Benavides et al., 2005). Rostliny mají také účinný antioxidační systém, který se sestává z enzymatických a neenzymatických sloučenin, jako jsou askorbát, glutathion, karotenoidy, prolin nebo fenoly (Bouazizi et al., 2007; Kováčik et al., 2010; Mei et al., 2015; Zengin, 2014). Mezi enzymy patří superoxid dismutáza (SOD), která tvoří první linii obrany proti ROS. Dalším enzymem je kataláza (CAT), která rozkládá H_2O_2 na vodu a kyslík, zatímco peroxidáza (POD) zachytí H_2O_2 v chloroplastu a cytosolu rostlinných buněk (Gill and Tuteja, 2010).



Obrázek 2: Diagramatická prezentace úlohy ROS v signálové transdukcii kadmia. TF-transkripční faktor (Chmielowska-Bąk et al., 2013).

1.1.3 Měď

Měď (Cu) je důležitý mikroprvek nezbytný pro růst rostlin, ale při vyšších koncentracích se stává toxickým. Do půdy se dostává hlavně z průmyslu a chemických zemědělských fungicidů. Jeho optimální endogenní koncentrace je přibližně 5-30 mg·kg⁻¹ sušiny (Kabata-Pendias and Pendias, 1992). Měď hraje zásadní roli v metabolismu rostlin jako součást hlavní molekuly fotosyntetického a respiračního elektron transportního řetězce. V nízkých koncentracích je nezbytným mikronutrientem spojeným s plastocyaninem, což je jeden z komponentů elektron transportního řetězce v chloroplastech. Proto má nedostatek mědi negativní vliv na přenos elektronů PSI, který je snížen kvůli nedostatečné tvorbě plastocyaninu. Kromě toho se podílí na mnoha redoxních reakcích při detekci ethylenu, metabolismu buněčné stěny nebo obraně proti oxidativnímu stresu (Baszyński et al., 1988).

Nicméně, nadměrná koncentrace Cu má na rostliny toxické účinky, což vede například ke snížení míry klíčivosti semen, potlačení prodlužování výhonků a kořenů, snížení hmotnosti rostlinné biomasy a obsahu vody (Ahsan et al., 2007). Bylo prokázáno, že 60 až 125 mg Cu·kg⁻¹ půdy je pro rostliny toxické (Kabata-Pendias and Pendias, 1992). Fytotoxicita Cu v rostlinách je důsledkem jejího zapojení do Fentonových reakcí usnadňujících tvorbu ROS. Ty mohou způsobit poškození buněk tím, že poškozují klíčové buněčné procesy v důsledku narušení struktury proteinů a inaktivace enzymů (Leon Morales and Sepulveda-Jimenez, 2012). Z mnoha studií je známo, že Cu vykazuje silný inhibiční účinek na růst a vývoj rostlin (Yang et al., 2015; Zengin, 2014). Liu et al. (2001) uvádějí, že růstové parametry kořenů semenáčků *Zea mays* se postupně snižovaly se zvyšující se koncentrací Cu v rozmezí 10⁻⁵ až 10⁻³ M. Benimeli et al. (2009) popisují, že vyšší hladina Cu (10⁻² M) ovlivňuje růst celých částí rostlin, zatímco nižší hladina Cu (10⁻⁴ M) ovlivňuje pouze kořeny. Dále uvádějí, že vysoká koncentrace Cu způsobuje také snížení obsahu chlorofylu a proteinů, zvýšení endogenní hladiny peroxidu vodíku (H₂O₂), stejně jako vyvolává změny v aktivitách peroxidázy. To může vést k peroxidaci lipidových membrán, obvykle vyjádřené jako zvýšení koncentrace malondialdehydu (MDA), a stimulaci antioxidantního systému.

Již dříve bylo popsáno, že Cu stres vedl ke změnám aktivity SOD, POD a CAT (Cetinkaya et al., 2014; Chamseddine et al., 2009; Gao et al., 2008; Singh et al., 2007).

Stimulační účinek Cu na enzymatickou aktivitu však závisí na její koncentraci. Studie prováděné na sadbách *Jatropha curcas* ukázaly, že aktivita SOD, POD a CAT vzrůstá s rostoucí koncentrací Cu až 400 μM , ale vyšší koncentrace Cu vede k významnému snížení aktivity těchto enzymů (Gao et al., 2008).

Je dobře známo, že redukce absorpce těžkých kovů nebo jejich ukládání v kořenových buňkách je jedním z primárních obranných mechanismů proti tomuto typu stresu v rostlinách. Některé studie uvádějí, že se zvyšující se koncentrací Cu je nižší schopnost akumulovat Cu stonky a listy, avšak kořeny stresovaných rostlin akumulují vysoké koncentrace Cu (Benimeli et al., 2009; Liu et al., 2001). Kromě toho bylo v mnoha studiích popsáno, že těžké kovy způsobují snížení absorpce základních minerálních prvků v rostlinách (Ke et al., 2007). Avšak Mostofa and Fujita (2013) popisují, že obsah Cu v kořenech a listech rýže se zvyšoval se zvyšujícími se koncentracemi Cu a obsah Cu nebyl zjištěn v kontrolních rostlinách. Liu et al. (2014) také popsali, že obsah mědi v kořenech kukuřice se zvyšoval se zvyšujícími se koncentracemi roztoku Cu. Tyto skutečnosti mohou naznačovat, že schopnost akumulace mědi v různých rostlinných orgánech závisí na druhu rostlin i na způsobu kultivace. Hydroponické pěstování poskytuje rostlinám jednotné doplnění živin a nižší mechanickou odolnost ve srovnání s rostlinami pěstovanými v půdě. To může způsobit nesrovnalosti mezi dosaženými výsledky. Problém využívání výsledků z jednoho růstového systému k předpovědi těch, které se nacházejí v jiných podmínkách růstu, byl zdůrazněn už v několika studiích (Liu et al., 2017).

1.2 Význam látek hormonální povahy v obraně rostlin

Regulátory růstu hrají důležitou roli při regulaci procesů vývoje rostlin a signalizačních sítí, neboť jsou přímo i nepřímo zapojeny do širokého spektra biotických a abiotických stresových reakcí a tolerance v rostlinách (Asgher et al., 2015). Tyto fyziologicky aktivní látky se souhrnně nazývají fytohormony. Jsou to molekuly produkované ve velmi nízkých koncentracích, ale schopné regulovat různé buněčné procesy v rostlinách a zajišťovat komunikaci mezi buňkami (Voš et al., 2014). Jsou považovány za nejdůležitější endogenní látky pro modulaci fyziologických a molekulárních odpovědí a celkově pro přežití rostlin jako

přisedlých organismů (Fahad et al., 2015). Působí buď v místě jejich syntézy, nebo jinde v rostlinách (Peleg and Blumwald, 2011). Jak přírodní, tak syntetické regulátory růstu jsou široce používány v zemědělství jako prostředek k ovlivnění růstu plodin. Studie ukazují, že auxiny, cytokininy (CK), kyselina salicylová (SA), kyselina jasmonová (JA), steroidní hormony (Epi-brassinosteroidy a homo-brassinosteroidy), ethylen, gibereliny, strigolaktony a kyselina abscisová (ABA) mohou rostlinám pomoci vyrovnat se se stresem z těžkých kovů (Singh et al., 2016; Wani et al., 2016).

Některé z nich, jako je například ABA, byly identifikovány jako stresové hormony. ABA hraje rozhodující roli ve vývoji rostlin, a to při udržování dormance semen, inhibici klíčivosti, regulaci růstu, uzavírání průduchů, padání ovoce, a kromě toho zprostředkovává abiotické a biotické stresové reakce (Li et al., 2010). V reakci na environmentální stres se hladiny endogenní ABA rychle zvyšují, dochází k aktivaci specifických signálních cest a modifikaci genové exprese (O'Brien and Benková, 2013). Je možné, že ABA indukuje uzavření stomatů, což způsobuje snížení transportu a redukuje tak translokaci kovů do kořenů a že úloha ABA v reakci rostlin na stres těžkých kovů je spojena s inhibicí růstu (Bücker-Neto et al., 2017). Může také snižovat stres z těžkých kovů ovlivněním transportu do nadzemních částí (Perfus-Barbeoch et al., 2002). Navzdory nedostatku znalostí o tom, jak se mění signalizační cesta ABA v reakci na expozici těžkými kovy, řada výsledků naznačuje silnou korelaci mezi vysokými hladinami ABA a poklesem stresu rostlin. Některé důkazy navíc svědčí o funkčním významu zvýšených koncentrací hormonů u rostlin vystavených toxicitě těžkých kovů (Bücker-Neto et al., 2017).

IAA (kyselina indol-3-octová) je jedním z nejvíce multifunkčních fytohormonů a je životně důležitá nejen pro růst a vývoj rostlin, ale také pro řízení a koordinaci růstu rostlin za stresových podmínek (Kazan, 2013). Je to nedílná součást adaptace rostlin k zasolení nebo zatížení těžkými kovy (Iqbal et al., 2014; Sheng and Xia, 2006). Obecně platí, že zatížení těžkými kovy vede ke snížení endogenních hladin auxinů. Například arzen je schopen měnit hladiny auxinů (IAA a kyseliny indol-3-máselné (IBA)) u *Brassica juncea* (Srivastava et al., 2013). Navzdory škodlivému účinku těžkých kovů na metabolismus auxinu se uvádí, že exogenní aplikace těchto fytohormonů může zvýšit endogenní hladiny auxinů. Například bylo pozorováno zvětšení biomasy kořenů a stonků rostlin slunečnic

(*Helianthus annuus*) rostoucích v půdě mírně kontaminované olovem po přidání fytohormonu IAA (Liphadzi et al., 2006). Podle Hacı-Wydro et al. (2016) mohou auxiny zmírnit toxické účinky expozice těžkých kovů podporou modulace membránových vlastností nebo zvýšením obsahu hemicelulózy (Zhu et al., 2013).

Kyselina fenylactová (PAA) je aktivní auxin (Wightman and Lighty, 1982), ale jeho role v růstu a vývoji rostlin zůstává nejasná. IAA a PAA mají překrývající se regulační role, ale odlišné transportní vlastnosti. PAA je široce distribuována ve vaskulárních a nevaskulárních rostlinách. V pletivech rostlin *Arabidopsis* bylo zjištěno, že její biologické aktivity jsou nižší než u IAA, ale endogenní hladiny PAA jsou mnohem vyšší než IAA. Nicméně PAA a IAA mohou regulovat stejnou skupinu genů (Sugawara et al., 2015).

Brassinosteroidy regulují expanzi a prodloužování buněk, fotomorfogenezi, kvetení, samčí fertilitu, klíčivost semen, vaskulární diferenciaci, stavbu rostlin, tvorbu průduchů a senescenci u rostlin (Mandava, 1988). Kromě jejich významu pro růst a vývoj rostlin obecně zajišťují různé fyziologické role při ochraně proti abiotickému stresu, včetně vysokých a nízkých teplot, zasolení, suchu, herbicidů a pesticidů (Bücker-Neto et al., 2017). Jak již bylo výše popsáno, fytotoxicita těžkých kovů je hluboce spojena s oxidačním stresem a následnou produkcí ROS v rostlinách. Tyto aktivity antioxidantních enzymů jsou regulovány také brassinosteroidy (Cao et al., 2005).

Cytokininy (CK) hrají významnou roli v regulaci růstu a vývoje rostlin. Změna endogenních hladin cytokininů v reakci na stres naznačuje, že se tento hormon podílí na stresových reakcích. CK hrají důležitou roli v různých procesech, jako je vaskulární diferenciaci, biogeneze chloroplastů, růst a větvení kořenů, výhonků a květenství, vývoj semen a tolerance stresu (Müller and Sheen, 2007). CK jsou antagonistou ABA a expozice rostlin nedostatku vody vede ke snížení hladin CK (Argueso et al., 2009). Například v reakci na sucho se drasticky snižuje koncentrace a transport *trans*-zeatinového ribosidu, zatímco hladiny ABA se zvyšují (Hansen and Dorffling, 2003). V poslední době se ukázalo, že CK jsou pozitivním regulátorem auxinové biosyntézy (Jones et al., 2010) a oba způsobují otevření stomatů (Ribeiro et al., 2009). Bylo také zjištěno, že CK mohou snížit obsah Hg v rostlinách rostoucích v půdě kontaminované Hg (Bulak et al., 2014).

Rostlinný hormon ethylen se podílí na mnoha vývojových procesech, jako je opadávání listů, zrání plodů a stárnutí. Jeho produkce se zvyšuje v rostlinách vystavených toxickým hladinám těžkých kovů a dochází ke snížení růstu a vývoje rostlin, což svědčí o silném zapojení tohoto fytohormonu do reakce rostlin na toxicitu těžkých kovů (Maksymiec, 2007).

Kyselina jasmonová (JA) hraje roli v obranných mechanismech proti stresu z těžkých kovů, UV záření a zasolení (Rakwal et al., 1999). Její akumulace se zvyšuje u rostlin ošetřovaných těžkými kovy (Maksymiec et al., 2005). Podle Maksymiec and Krupa (2002) methylester kyseliny jasmonové (JAMe) silně ovlivňuje toxicitu Cu a Cd u rostlin *Arabidopsis*. Tento účinek je podle autorů specifický pro kov a závisí na koncentraci JA a na jejím exogenním nebo endogenním původu.

1.2.1 Kyselina salicylová

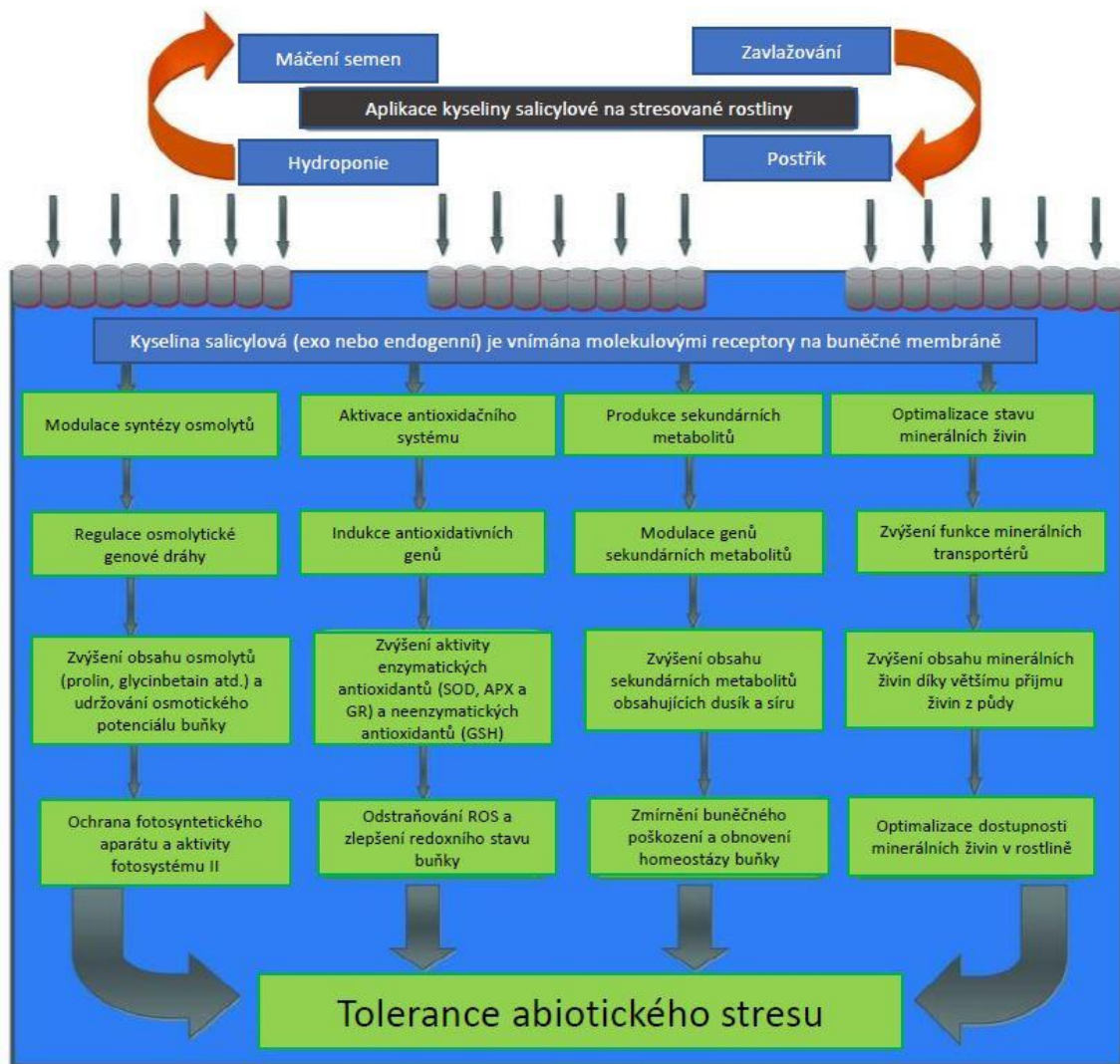
Kyselina salicylová (SA) je fenolická sloučenina známá jako fytohormon, který přispívá k regulaci růstových a vývojových procesů, zejména klíčení semen, fotosyntézy, dýchání, kvetení a senescence (Vicente and Plasencia, 2011). Kromě toho SA také působí jako silná signalizační molekula při aktivaci reakcí na obranu rostlin proti biotickým a abiotickým stresovým faktorům, jako jsou extrémní teploty, znečištění ozonem, UV záření, těžké kovy, sucho a zasolení (Han et al., 2015; Hara et al., 2012; Miura and Tada, 2014; Popova et al., 2009; Semida et al., 2015; Vicente and Plasencia, 2011).

SA hraje roli jak v lokální odolnosti, tak i v systémově získané odolnosti rostlin (Zhang et al., 2010). Exogenní aplikace SA nebo jejích funkčních analogů (jako je kyselina 2,6-dichlorisonikotonová a benzo-(1,2,3) thiadiazol-7-karbotioová) indukuje systémově získanou resistenci (SAR) v rostlinách, a tím poskytuje ochranu proti různým biotickým stresům, například resistenci vůči patogenům (Achuo et al., 2004; Hayat et al., 2010). Exogenní aplikace také indukuje expresi genů souvisejících s patogenezí a podporuje resistenci proti různým patogenům virového, bakteriálního a houbového původu u různých rostlin (Ryals et al., 1996; Pasquer et al., 2005; Makandar et al., 2006). Mandal et al. (2009) uvádějí, že exogenní SA by mohla být potenciálně používána pro prodloužení životnosti mnoha čerstvých plodů po sklizni. Konkrétně při rozkladu způsobeným *Fusarium oxysporum* u rajčat. Salicyláty také napomáhají rostlinám při obraně před býložravci zvýšením produkce

těkavých sekretů, které jsou odpovědné za přitahování jejich přirozených nepřátel (Thaler, 1999).

1.2.2 Mechanismy účinku kyseliny salicylové

Několik studií již ukázalo, že exogenní aplikace SA snižuje účinky těžkých kovů na rostliny (Obr. 3) (Han et al., 2015; Semida et al., 2015; Sinha et al., 2015; Zengin, 2014). Například, že ošetření SA může zmírnit toxicitu těžkých kovů vakuolizací v buňkách a zadržením iontů těžkých kovů v membránových složkách (Mingxuan et al., 2015). V počátečním stadiu vývoje rostlin může být příznivý účinek SA pravděpodobně způsoben prevencí narůstajícího poškození při vystavení těžkému kovu, čímž dochází ke snižování negativních důsledků oxidativního stresu způsobeného toxicitou těžkých kovů. SA vycytává hydroxylové radikály (OH \cdot) a dokáže na sebe navazovat železo. Proto SA může přímo působit jako antioxidant a nepřímo kontrolovat redoxní rovnováhu (Du et al., 2009). Podle Faghih et al. (2017) SA moduluje redoxní rovnováhu mezi membránami a působí tak proti negativním účinkům ROS zvýšením aktivity antioxidantních enzymů. Backer et al. (2015) uvádějí, že během oxidačního stresu SA indukuje transdukční dráhy ROS zahrnující geny NPR1. Tímto způsobem SA ovlivňuje aktivitu antioxidantních enzymů, hladinu glutathionu a expresi mitochondriálních genů modifikujících produkci ROS a nakonec oxidační stav buňky (Berkowitz et al., 2016). Freeman et al. (2005) se domnívají, že zvýšená tolerance některých rostlin k toxickým hladinám některých kovů je zprostředkována glutationem (GSH) a signalizována zvýšenou hladinou SA. GSH hraje klíčovou roli při detoxikaci kovů (jako prekurzor fytochelatinů), ale také jako antioxidant chrání rostlinné buňky před akumulací ROS. Ošetření SA také zvyšuje hladinu fenolických sloučenin, které mají antioxidantní vlastnosti a mohou snížit škodlivé účinky stresových stavů a zabránit tak vzniku mnoha typů fyziologických škod (Ali et al., 2007).



Obrázek 3: Zjednodušené schéma představující potenciální mechanismy, které jsou základem abiotické stresové tolerance zprostředkované SA, při různých způsobech aplikace SA. Upraveno podle Khan et al. (2015).

Předpokládá se také, že odpovědi iniciované SA jsou zprostředkovány změnami v koncentraci endogenního ethylenu. Etylen má regulační úlohu při růstu a vývoji rostlin. Působí jako signální molekula při růstu a fotosyntetických funkcích jak ve stresových, tak i nestresových podmínkách (Khan et al., 2014). SA inhibuje konverzi kyseliny 1-aminocyklopropan-1-karboxylové na ethylen a tím ovlivňuje biosyntézu ethylenu a růst rostlin (Leslie and Romani, 1986).

Nedávné molekulární studie prokázaly, že SA může regulovat mnoho aspektů v rostlinách na úrovni genů a tím může zlepšit toleranci vůči abiotickému stresu. Bylo popsáno, že SA indukuje několik genů odpovědných za kódování chaperonu, proteinů tepelného šoku (HSP), antioxidantů, sekundárních metabolitů,

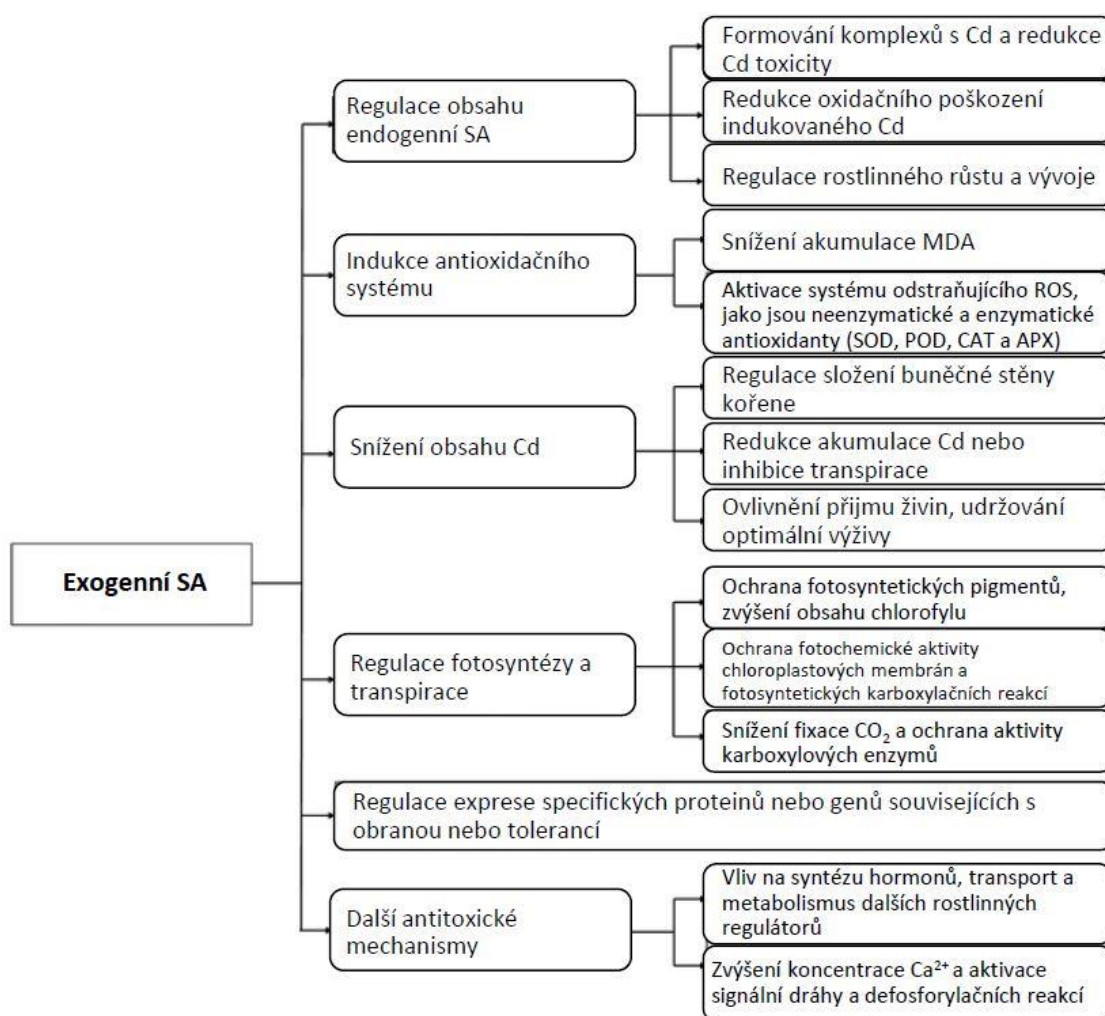
sinapylalkohol dehydrogenázy (SAD), cinnamylalkohol dehydrogenázy (CAD) a cytochromu P450 (Jumali et al., 2011).

Ačkoli několik studií popisuje úlohu exogenní SA v procesech adaptace na stres, vliv SA je poněkud nejasný. Dosud nebylo prokázáno, zda jsou mechanismy stresové reakce způsobeny samotnou SA nebo jinými složkami aktivovanými exogenní SA (Gondor et al., 2016). Szalai et al. (2011) ve svém výzkumu uvádějí, že zvýšená hladina volné a vázané SA, která se vyskytuje u rostlin pěstovaných ze semen ošetřených v SA roztoku před zasetím, je nově syntetizovaným produktem spíše, než že by byla přijata a mobilizována rostlinou. Gondor et al. (2016) uvádějí, že užitečnost SA při indukci mechanismu obrany rostlin závisí také na její koncentraci a způsobu aplikace. Pro aplikaci SA se používá několik metod, které se využívají při studiu ochrany rostlin proti různým stresům, včetně namáčení semen v roztoku SA (He et al., 2010), postřiku, zavlažování (Huang et al., 2016) nebo přidávání do živného média hydroponicky pěstovaných rostlin (Marcińska et al., 2013). Obecně platí, že nedostatek SA nebo velmi vysoká koncentrace SA zvyšuje citlivost rostlin na abiotický stres (Miura and Tada, 2014; Pál et al., 2002; Yuan and Lin, 2008). V nejnovějších studiích se uvádí, že účinky exogenní aplikace SA nemohou být generalizovány v různých experimentálních systémech. Například bylo zjištěno, že existují významné rozdíly v reakci biochemické a fyziologické obrany mezi obilninou pěstovanou při hydroponickém ošetření SA a rostlinami pěstovanými ze semen ošetřených roztokem SA (Gondor et al., 2016). Podle Vicente and Plasencia (2011) vliv exogenní SA na růst závisí na druhu rostliny, vývojové fázi a testované koncentraci.

1.2.3 Vliv kyseliny salicylové na toleranci kadmia

Expozice Cd indukuje syntézu SA zejména v listech a také syntézu fenyylpropanoidů, které jsou zodpovědné za akumulaci SA. Zvýšení hladiny SA v kořenech během Cd stresu v některých odrůdách pšenice je spojováno se zvýšením obsahu glutationu a má za následek aktivaci antioxidantních a metalických detoxikačních systémů, které podporují Cd toleranci u sazenic pšenice (Kovacs et al., 2014). Předběžné ošetření

lněných semen SA snižuje absorpci a transport Cd a zvyšuje absorpci jinak inhibovaných živin. Na úrovni listů má pozitivní vliv na zvýšený únik elektrolytů, obsah chlorofylu, malondialdehydu (MDA) a celkový obsah lipidů (Belkhadi et al., 2010). Podle Guo et al. (2013) ošetření SA výrazně snižuje akumulaci Cd a zvyšuje obsah chlorofylu a živin (K, Ca, Mg a Fe) v rostlinách, což je spojeno se snížením obsahu MDA a H₂O₂. Kromě toho předběžné ošetření SA zvyšuje aktivitu SOD, askorbát peroxidázy a POD v rostlinách vystavených působení Cd, ale snižuje CAT aktivitu (Obr. 4).



Obrázek 4: Možné mechanismy zmírnění toxicity Cd v rostlinách po aplikaci SA. Upraveno podle Liu et al. (2016).

1.2.4 Vliv kyseliny salicylové na toleranci mědi

Podle Mostofa and Fujita (2013) předošetření sazenic rýže exogenní SA také snižuje příznaky toxicity indukované Cu, což zahrnuje snížení aktivity lipoxygenázy, obsahu H₂O₂, MDA a prolinu, avšak hladiny relativního obsahu vody, chlorofylu, kyseliny askorbové a redoxního potenciálu se zvyšují. SA rovněž inhibuje příjem Cu a zvyšuje aktivitu antioxidantních enzymů, jako jsou SOD, askorbátová peroxidáza, glutathion reduktáza, glutathion peroxidáza, CAT, dehydroaskorbát-reduktáza a glutathion-S-transferáza. Vliv SA na oxidativní stres a aktivitu antioxidantních enzymů byl také studován u dalších druhů rostlin, včetně kukuřice a rýže pěstovaných ve vyšších koncentracích mědi nebo kadmia (Krantev et al., 2008; Mostofa and Fujita, 2013; Panda and Patra, 2007). Obecně se má za to, že předošetření SA zvyšuje aktivitu enzymu SOD podílejícího se na vylučování superoxidových radikálů.

1.2.5 Vliv kyseliny salicylové na klíčení semen

Kyselina salicylová má také vliv na klíčení semen. Její přesná úloha ale dosud nebyla popsána. Existují studie, které naznačují, že SA inhibuje klíčení, podle jiných naopak klíčení urychluje (Rajjou et al., 2006). Popsané nekonzistentní účinky se vztahují k aplikovaným koncentracím SA. Předpokládá se, že vysoké koncentrace SA (1 mM nebo více) vedou k úplné inhibici klíčivosti nebo silnému zpomalení růstu rostliny (Rajjou et al., 2006; Singh, 2010; Xiao et al., 2014). To proto, že sama SA může indukovat oxidační stres v ošetřených buňkách (Borsani et al., 2001). Několik studií však ukázalo, že SA aplikovaná v nízkých dávkách (méně než 0,5 mM) zvyšuje klíčivost pod účinkem různých abiotických stresorů (Baghizadeh, 2011; Dolatabadian et al., 2009). Již dříve bylo popsáno, že SA aplikovaná v koncentraci 0,5 až 1 mM stimuluje růst a klíčení nezralých embryí kukuřice izolovaných ze semen a kultivovaných *in vitro* (Krantev et al., 2008).

1.3 Vybrané fyziologicky aktivní látky

1.3.1 Malondialdehyd

Jedním z nepříznivých účinků těžkých kovů na rostliny je tvorba ROS, což vede k oxidativnímu stresu (Cheynier, 2012) a dochází k peroxidaci lipidů (Abuja and Albertini, 2001). Malondialdehyd (MDA) je jedním z hlavních konečných produktů procesu peroxidace lipidů (Yadav, 2010). Stanovení obsahu MDA je široce používáno jako spolehlivý nástroj pro detekci oxidativního stresu pomocí odhadu tvorby lipidových peroxidů v biologickém materiálu (Loureiro et al., 2006). Tvorba ROS a zvýšená produkce MDA byly již dříve pozorovány u rostlin vystavených různým těžkým kovům jako Cr, Pb, Cu a Zn (Wahsha et al., 2012).

1.3.2 Fenolické látky

Vedle dobře prostudovaných antioxidantních systémů sestávajících z nízkomolekulárních antioxidantů a specifických enzymů, které pomáhají zvládat oxidativní stres, hrají důležitou roli i fenolické látky. Některé fenolické sloučeniny jsou v rostlinách velmi rozšířené, jiné jsou specifické pro určitou skupinu nebo se vyskytují pouze v některých rostlinných pletivech (Cheynier, 2012). Tyto sloučeniny mají fyziologický a morfologický význam pro rostliny. Hrají důležitou roli v růstu a reprodukci a projevují fyziologické vlastnosti, jako jsou antioxidantní a antimikrobiální aktivity (Balasundram et al., 2006). Rozmanitost struktur souvisí s různými vlastnostmi, které jsou spojeny se specifickými rolemi v rostlinách, a tudíž jejich specifickou distribucí. Například antokyany jsou pigmenty většiny červených a modrých rostlinných orgánů. Nacházejí se v květech a ve zralých plodech a hrají roli v procesech spojených se šířením semen (Gould, 2010). Chrání rostliny před UV zářením (Winkel-Shirley, 2002) a mohou se podílet i na obraně rostlin proti býložravcům, houbám a virům (Haslam, 2007). Během stresu z těžkých kovů mohou fenolické sloučeniny působit jako chelatační látky nebo mohou přímo vychytávat ROS. Jejich antioxidantní účinek spočívá především v jejich chemické struktuře, protože mají hydroxylové a karboxylové skupiny k vazbě těžkých kovů. Chelatační schopnost fenolických sloučenin se také může vztahovat k vysokému nukleofilnímu charakteru aromatických kruhů (Michalak, 2006). V literatuře lze nalézt rozdílné výsledky týkající se obsahu fenolických látek po aplikaci těžkých

kovů. Například Kisa et al. (2016) popisují, že aplikace Cd, Cu a Pb zvýšila obsah celkových fenolů ve srovnání s kontrolními skupinami. Chlorogenová kyselina a rutin byly hlavními fenolickými sloučeninami, pokud jde o kvantifikaci. Avšak obsah kyseliny kávové, kyseliny ferulové a kyseliny vanilové byl ve všech vzorcích relativně nižší než kyselina chlorogenová a rutin. Naopak Okem et al. (2015) uvádějí snížení obsahu fenolických látek po vystavení rostlin Cd a Al.

1.3.3 Proteiny

Rostliny reagují na těžké kovy tím, že vyvolávají expresi genů, které kódují proteiny. Ty se podílejí na reakci na stres. Toxické kovové ionty ovlivňují homeostázu buněčných proteinů tím, že zasahují do procesu skládání a agregace proteinů, což vede ke snížení životaschopnosti buněk. Vzhledem k tomu, že proteiny mají důležité funkce, jako je chelace kovových iontů v cytosolu fytochelatiny a metallothioneiny, jejich následovné ukládání ve vakuolách, oprava proteinů poškozených stresem nebo jejich odstraňování a degradace, přirozené konformace jsou velmi důležité pro toleranci rostlin ke stresu z těžkých kovů. Existuje typická sada proteinů, nazývaných stresové proteiny nebo proteiny HSP, které jsou přednostně vytvářeny při stresu. HSP omezují agregaci proteinů a spouštějí opravu nesprávně přeložených proteinů (Hasan et al., 2017). Zatímco v některých studiích je popsáno snížení obsahu proteinů ve stresu z Cd (Bavi et al., 2011; Hashem et al., 2016; Zengin and Munzuroglu, 2006), jiné popisují jejich zvýšení (Ali et al., 2000). Khavari-Nejad et al. (2014) popisují, že v 50 μM CdCl_2 se celkový obsah proteinů zvýšil, ale ve 100 μM poklesl.

1.4 Kukuřice setá

Kukuřice setá (*Zea mays* L.) patří do čeledi lipnicovité (*Poaceae*). Původně pochází z tropických a subtropických oblastí Jižní a Střední Ameriky a v současné době je rozšířena po celé Zemi. Rychlost růstu při klíčení závisí na příjmu vody a při dobrých podmínkách se pohybuje mezi 4 - 5 dny (Skládanka, 2006). Kromě agronomického významu je kukuřice základním modelovým organismem, který se používá pro výzkum. Z obilovin, jako je rýže (*Oryza sativa*), čirok (*Sorghum bicolor*), pšenice (*Triticum* spp.) a ječmen (*Hordeum vulgare*), je kukuřice nejdůležitější zkoumanou

rostlinou. Jako modelový organismus je kukuřice předmětem rozsáhlých biologických výzkumů, jako je domestikace rostlin, vývoj genomu, vývojová fyziologie, epigenetika, rezistence proti škůdcům, heteroze, kvantitativní dědičnost a srovnávací genomika (Strable and Scanlon, 2009). Původ kukuřice jako modelového organismu je založen na počátečních studiích Gregora Mendela v roce 1869, kdy byla kukuřice používána k potvrzení věhlasnějších pěstitelských experimentů, které byly předtím prováděny na hrachu (*Pisum*) (Coe, 2001). Kukuřice je jednou z nejdůležitějších obilovin, která by mohla být považována za druh vhodný pro fytořemediaci - obnovu míst znečištěných těžkými kovy (Vatehová et al., 2016).

Běžně se používá pro výzkum působení těžkých kovů (Akinyemi et al., 2017; Deng et al., 2016; Pal et al., 2005), ale i dalších stresorů, jako je zaplavení (Pages et al., 1991), chlad (Janda et al., 1999) atd. Například Krantev et al. (2008) zkoumali vliv SA na kukuřici při zatížení Cd, přičemž zjistili, že předošetření SA zmírnilo negativní účinek Cd. Pozitivní efekt zaznamenali hlavně na růstové parametry, obsah chlorofylu, fotosyntézu a aktivitu enzymů. Dále došlo ke snížení produkce prolinu, rychlosti peroxidace lipidů a úniku elektrolytů. Podle nich tedy SA může ochránit buňky proti poškození oxidativním stresem a snížení fotosyntézy při stresu z Cd. Mohsenzadeh et al. (2011) pozorovali účinky SA a křemíku na některé fyziologické parametry kukuřičných sazenic v přítomnosti Cd (100 μM). Výsledky ukázaly, že SA a Si zmírňují inhibiční účinky Cd na sazenice kukuřice zvýšením obsahu chlorofylu a čerstvé hmotnosti. Individuální ošetření SA a Si snížilo obsah volného prolinu, rozpustných cukrů, absorpci kadmia a rychlost peroxidace lipidů. Kilic et al. (2017) studovali destruktivní účinky různých koncentrací Cd na morfologické, anatomické a fyziologické parametry kukuřičných semen. Cd inhibovalo klíčivost a růst. Vyšší koncentrace Cd vedly ke snížení vodivosti průduchů, obsahu chlorofylu, zmenšení listové plochy a došlo ke zvýšení degradace chlorofylu.

Co se týče použití kukuřice pro výzkum působení vysokých koncentrací Cu, Liu et al. (2014) zjistili, že aktivita POD se u kukuřice prudce zvyšuje při koncentraci vyšší než 10 μM , obsah MDA při koncentraci vyšší než 1000 μM , membránová propustnost při koncentraci nad 100 μM a kořenová aktivita výrazně klesá při koncentraci vyšší než 100 μM Cu. Guzel and Terzi (2013) ve svém výzkumu uvádějí,

že exogenně dodaný H_2O_2 zvyšuje produkci sušiny, obsah minerálů a osmotických látek u mladých listů kukuřice a zmírňuje tak škodlivé účinky stresu z Cu. Kumar et al. (2008) dospěli k závěru, že přebytek Cu ($100 \mu M$) indukuje u kukuřice oxidační stres zvýšením produkce H_2O_2 navzdory zvýšené antioxidační obraně a že nadměrné oxidační poškození indukované přebytkem Cu je minimalizováno vysokou dávkou Fe.

2. Materiály a metody

V rámci doktorského studia bylo provedeno několik pokusů, z nichž některé probíhaly na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové, další pak v Institutu fyziologie rostlin Polské akademie věd v Krakově v rámci dvouměsíční zahraniční stáže. Poslední část pokusů byla provedena ve spolupráci s Ústavem experimentální botaniky AV ČR v Praze.

Jako pokusná rostlina byla zvolena kukuřice setá (*Zea mays* L.) nejen z důvodu rychlého růstu a snadného pěstování, ale také proto, že se jedná o velmi důležitou hospodářskou plodinu, která by mohla být považována za druh vhodný pro fytremediaci, jak už bylo výše uvedeno. Rostliny byly pěstovány v řízených podmínkách klimaboxu, většinou v hydroponickém živném roztoku. Pokusy se zaměřovaly hlavně na ochranné vlastnosti kyseliny salicylové při zatížení těžkými kovy (Cd, Cu) a změny v obsahu širokého spektra rostlinných hormonů v reakci na stres z Cu.

2.1 Pokusy

2.1.1 Testování různých kultivarů kukuřice na odolnost k Cd

Nejprve byl proveden pokus se třemi kultivary kukuřice seté (*Zea mays* L), LG30.238, LG30.224 a PR39H32, jejichž semena nám poskytla OSEVA UNI, a.s., Choceň. LG30.238 je velmi raný silážní hybrid, LG30.224 středně raný a PR39H32 pozdní. Tento pokus byl zaměřen na získání nejvhodnějšího kultivaru pro všechny následující pokusy. Semena kukuřice seté byla sterilizována po dobu 10 min v 5% roztoku Sava a poté několikrát opláchnuta destilovanou vodou. Následně byla ponechána bobtnat po dobu 5 h při teplotě 25 °C ve tmě v destilované vodě a poté semena klíčila ve vlhkém filtračním papíře ve stejných podmínkách. Tři dny staré sazenice byly umístěny do hydroponických nádob s upraveným Hoaglandovým roztokem (0,2 mM KH_2PO_4 , 3,5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 2,5 mM KNO_3 , 2,0 mM MgSO_4 , 0,18 mM Fe_2O_3 , 0,046 mM H_3BO_3 , 0,32 μM CuSO_4 , 9,14 μM MnCl_2 , 0,077 μM $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24}$, 0,769 μM ZnSO_4). Hodnota pH byla upravena na 6,2 za použití KOH. Pro první tři dny byla použita poloviční koncentrace a živný roztok byl měněn každé tři dny. $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ byl přidán v požadované koncentraci 50 μM . Rostliny byly pěstovány v klimaboxu s denním/nočním cyklem 12/12 hodin při 23/20 °C, relativní vlhkostí mezi 70 % až 80 % a hustotou fotosyntetického toku fotonů 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a následně sklizeny

v 11. den hydroponického růstu (14. den pokusu). U rostlin byl měřen relativní obsah chlorofylu, intenzita fotosyntézy, vodivost průduchů, intenzita transpirace, délka kořenů a nadzemních částí a vzhled kořenů a nadzemních částí.

2.1.2 Vliv kyseliny salicylové na růst a obranné mechanismy kukuřice seté při zatížení kadmíem

Semena kukuřice seté (kultivar LG 30.224) byla sterilizována po dobu 10 min v 5% roztoku Sava a poté několikrát opláchnuta destilovanou vodou. Následně byla ponechána bobtnat po dobu 5 h při teplotě 25 °C ve tmě v destilované vodě nebo roztoku SA ve dvou různých koncentracích, 50 µM SA nebo 500 µM SA. Poté semena klíčila ve vlhkém filtračním papíře ve stejných podmínkách. Tři dny staré sazenice byly umístěny do hydroponických nádob s upraveným Hoaglandovým roztokem (0,2 mM KH₂PO₄, 3,5 mM Ca(NO₃)₂, 2,5 mM KNO₃, 2,0 mM MgSO₄, 0,18 mM Fe₂O₃, 0,046 mM H₃BO₃, 0,32 µM CuSO₄, 9,14 µM MnCl₂, 0,077 µM (NH₄)₆MO₇O₂₄, 0,769 µM ZnSO₄). Hodnota pH byla upravena na 6,2 za použití KOH. Pro první tři dny byla použita poloviční koncentrace a živný roztok byl měněn každé tři dny. Cd(NO₃)₂ byl přidán v požadované koncentraci 50 µM. Bylo studováno šest různých variant (Tab. 1)

Tabulka 1: Testované varianty

Varianta	Cd	SA
C	-	-
Cd	50 µM Cd(NO ₃) ₂	-
SA50	-	50 µM SA
SA500	-	500 µM SA
SA50Cd	50 µM Cd(NO ₃) ₂	50 µM SA
SA500Cd	50 µM Cd(NO ₃) ₂	500 µM SA

Rostliny byly pěstovány v klimaboxu s denním/nočním cyklem 12/12 hodin při 23/20 °C, relativní vlhkostí mezi 70 % až 80 % a hustotou fotosyntetického toku fotonů 100 pmol m⁻² s⁻¹. Následně byly sklizeny v 11. den hydroponického růstu (14. den pokusu) a rozděleny na výhonky a kořeny, které byly analyzovány samostatně.

U rostlin byla změřena délka stonků a kořenů, fluorescence chlorofylu, transpirace, vodivost průduchů, intenzita fotosynzély, obsah MDA, H₂O₂, chlorofylů *a* a *b*, karotenoidů a proteinů.

2.1.3 Vliv kyseliny salicylové na klíčení, růst a obranné mechanismy kukuřice seté při zatížení mědi

Rostliny byly pěstovány stejným způsobem jako v předchozím experimentu s kadmíem. Jediným rozdílem bylo použití těžkého kovu, a to mědi (CuSO₄) v koncentraci 100 μM. Semena byla ponechána bobtnat v SA 5 hodin. Byly použity i stejné varianty (Tab. 2). U těchto rostlin byl sledován vliv SA na klíčení pomocí kalorimetrických analýz a vliv na obsah endogenní a exogenní SA. Dále pak byla u rostlin měřena fluorescence chlorofylu, obsah chlorofylu, karotenoidů, H₂O₂, rozpustných proteinů, koncentrace Cu, změny morfologických parametrů a chemické skladby rostlin a v neposlední řadě také aktivita superoxid dismutázy a katalázy.

Tabulka 2: Testované varianty

Varianta	Cu	SA
C	-	-
Cu	100 μM CuSO ₄	-
SA50	-	50 μM SA
SA500	-	500 μM SA
SA50Cu	100 μM CuSO ₄	50 μM SA
SA500Cu	100 μM CuSO ₄	500 μM SA

2.1.4 Sledování změn v obsahu širokého spektra rostlinných hormonů kukuřice seté v reakci na stres z vysoké koncentrace mědi

Rostliny byly pěstovány stejným způsobem jako u předešlých pokusů. Semena byla ponechána bobtnat po dobu 5 h, při teplotě 25 °C ve tmě v destilované vodě. Poté byla ponechána klíčit ve vlhkém filtračním papíře ve stejných podmínkách. Tři dny staré sazenice byly umístěny do hydroponických nádob s upraveným Hoaglandovým roztokem, u kterého byla hodnota pH upravena na 6,2 za použití

KOH. CuSO₄ byl přidán v koncentraci 50 nebo 100 μM. Byly studovány tři různé varianty (Tab. 3).

Tabulka 3: Testované varianty

Varianta	Cu
C	-
Cu50	50 μM CuSO ₄
Cu500	100 μM CuSO ₄

Rostliny byly pěstovány v klimaboxu s denním/nočním cyklem 12/12 hodin při 23/20 °C, relativní vlhkostí mezi 70 % až 80 % a hustotou fotosyntetického toku fotonů 100 pmol.m⁻².s⁻¹. Následně byly sklizeny v 11. den hydroponického růstu (14. den pokusu) a rozděleny na výhonky a kořeny, které byly analyzovány samostatně. U těchto rostlin byla měřena světelná a temnostní fluorescence, provedena analýza obsahu hormonů (např. kyselina abscisová (ABA), kyselina salicylová (SA), kyselina jasmonová (JA), aktivní cytokyniny (CK) a další), měřeny délky nadzemních a podzemních částí, barvena přítomnost mědi ve stoncích a kořenech, dále byl stanoven obsah fenolických látek, flavonoidů, chlorofylů *a* a *b* a karotenoidů.

2.2 Popis jednotlivých metod

Kalorimetrické analýzy

Kalorimetrické analýzy byly provedeny v izotermickém kalorimetru TAM III vybaveném softwarem TAM Assistant Software (Thermometric, Jarfalla, Švédsko) při 25 °C ve tmě. Před měřením byla semena kukuřice předem namočena v 500μM roztoku SA po dobu 5 hodin, kontrolní semena byla namočena v destilované vodě. Následně byla semena umístěna na filtrační papír do 20ml ampulí s otvory umožňujícími volný přístup kyslíku a bylo přidáno 250 μl destilované vody. Po 45 minutách tepelné stabilizace se měřily emise tepla po dobu tří dnů (křivka specifické tepelné energie). Každé měření bylo provedeno na třech morfologicky podobných semenech. Po měření byla semena lyofilizována a stanovila se suchá hmotnost. Metabolická aktivita byla vyjádřena jako specifická tepelná křivka (mW.g⁻¹ DW)

a celková specifická tepelná energie ($J \cdot g^{-1} DW$). Celková specifická tepelná energie emitovaná během klíčení semen byla vypočítána integrací křivky specifické tepelné energie a převedena na suchou hmotnost rostlinného materiálu (Kula et al., 2014). Všechna prezentovaná data jsou průměrné hodnoty ze čtyř nezávislých replikátů.

Analýza obsahu SA

Semena, která byla ponechána bobtnat v roztoku 50 μM , 500 μM [3,4,5,6-2H4] - salicylové kyseliny (D4SA) (varianty D4SA50 5 h, D4SA500 5 h) a v destilované vodě (kontrola) po dobu 5 hodin, byla následně ponechána klíčit po dobu tří dnů za podmínek popsaných výše. Semena a vyvinuté kořeny byly homogenizovány ve třecí misce s kapalným dusíkem a extrahovány studeným methanolem, poté byly vystaveny působení ultrazvuku po dobu 10 min a centrifugovány při 38 000 g po dobu 10 min. Supernatant byl odebrán a čištěn podle Balcke et al. (2012) za použití kolon Oasis MCX SPE 1 cc/30 mg (Waters, Milford MA, USA). Vzorky byly analyzovány za použití systému HPLC Agilent 1260 vybaveného spektrometrem 6420 ESI Tandem Mass a kolonou Supelco Ascentis RP-Amide (7,5 cm x 4,6 mm, 2,7 μm). Byl použit gradient 0,1% roztoku kyseliny mravenčí, vody a acetonitrilu při průtokové rychlosti 0,5 ml.min⁻¹. Pro identifikaci a kvantifikaci SA (primární iont 139,0; sekundární ionty 121,0 a 39,0) a D4SA (primární iont 143,1; sekundární ionty 125,1 a 41,1) byly vybrány dva nejhojnější sekundární ionty (MRM). Pro analyzované sloučeniny byly připraveny desetibodové kalibrační křivky.

Analýza obsahu chlorofylů a karotenoidů

Čerstvé listy (1 g) byly homogenizovány v 5 ml acetonu s trochou mořského písku a CaCO₃. Vzorky byly následně centrifugovány při 5000 rpm a měřeny spektrofotometricky při vlnových délkách 415, 435, 470, 646,8, 663,2 a 710 nm. Obsah pigmentů byl vypočten podle rovnic, které navrhl Wellburn (1994).

$$\text{chl } a = 12,25 \cdot A_{663,2} - 2,79 \cdot A_{646,8}$$

$$\text{chl } b = 21,5 \cdot A_{646,8} - 5,1 \cdot A_{663,2}$$

$$\text{car} = (1000 \cdot A_{470} - 1,82 \cdot \text{chl } a - 85,02 \cdot \text{chl } b) / 198$$

Měření relativního obsahu chlorofylu

Pro měření relativního obsahu chlorofylu byl použit Chlorofylmetr OPTI-SCIENCES CCM 200. Měření bylo prováděno vždy na druhém listu.

Měření intenzity fluorescence (Mini-PAM)

Fluorescence plně vyvinutých listů byla stanovena za pomoci analyzátoru výtěžnosti fotosyntézy Mini-PAM, Walz, Effeltrich, Německo. K detekci poškození rostlin těžkým kovem byla u temnostně adaptovaných listů měřena fotosyntetická účinnost fotosystému II - maximální kvantová účinnost PSII (F_v/F_m), počet otevřených reakčních center PSII - fotochemické zhášení (qp), podíl absorbovaného světla PSII - kvantový výtěžek otevřených center PSII (Y_{II}) a energie, která je dispergována v nefotochemických reakcích – nefotochemické zhášení (NPQ). Tímto způsobem byla fluorescence měřena u pokusů prováděných ve spolupráci s Institutem fyziologie rostlin v Polsku.

Měření intenzity fluorescence (Chlorofyl Fluorometrem OS1p)

Měření intenzity fluorescence na PřF UHK bylo provedeno Chlorofyl Fluorometrem OS1p (OPTI-SCIENCES, USA). K měření byl vždy použit druhý plně vyvinutý list a byla zaznamenána světelná i temnostní fluorescence.

Měření intenzity fotosyntézy, transpirace a vodivosti průduchů

Pro měření byl použit přístroj LCpro+ (ADC Bio Scientific Ltd., Hoddeson, UK). V asimilační komoře byla teplota 25 °C a intenzita osvětlení 500 lx. Přístrojem byly zaznamenávány tyto hodnoty: A (intenzita fotosyntézy), g_s (vodivost průduchů), E (intenzita transpirace). K měření byl opět použit vždy druhý plně vyvinutý list.

Analýza obsahu mědi

Sušené listy, stonky a kořeny byly rozloženy pomocí mikrovlnného záření ve směsi H_2O_2 a HNO_3 v zařízení Microwave Labstation MLS 1200 Mega. Stanovení Cu bylo prováděno pomocí AAS metody při absorpci 324,8 nm (zařízení AAS Perkin-Elmer 3110).

Analýza obsahu minerálních prvků včetně mědi a kadmia

Pro mineralizaci vzorků bylo naváženo 0,1 g namletého rostlinného materiálu, smícháno se 2 ml 30% H₂O₂ a 9 ml 65% HNO₃ a rozloženo v mineralizačním zařízení (Berghof Speedware MWS-4). Mineralizace probíhala 10 min při 0–400 W a 50 min při 400 W, poté následovalo 15 min chlazení. Mineralizované vzorky byly převedeny do 15ml flakonek.

Pro stanovení prvků byl použit přístroj ICP-OES (GBC INTEGRA XL, Austrálie) a standardní roztoky od firem MERCK a Analytika Praha. Pro měření obsahu Ca byla použita vlnová délka 217,933 nm, pro Mg 279,806 nm, pro K 769,896 nm, pro Zn 213,856 nm, pro Cu 324,754 nm a pro Cd 228,802 nm.

Barvení bivalentních kovů v kořenech a stoncích

Stonky a kořeny byly nařezány na úzké plátky a vloženy do roztoku 30 mg dithizonu (difenylthiokarbazon), 60 ml acetonu, 20 ml destilované vody a inkubovány po dobu 1,5 h. Červené zbarvení prokázalo přítomnost bivalentních kovů (Pielichowska and Wierzbicka, 2004).

FT-Raman spektroskopie

Měření FT-Raman byla prováděna na lyofilizovaných semenech, která klíčila tři dny v destilované vodě nebo v 500 μ M roztoku SA. Stejně bylo měření prováděno na listech a kořenech rostlin *Zea mays* pocházejících ze semen ošetřených SA (50 μ M SA nebo 500 μ M SA) nebo ze semen, která klíčila v destilované vodě, po 11 dnech hydroponického růstu za působení stresu Cu nebo za kontrolních podmínek. Postup byl proveden podle modifikované metody vyvinuté Saja et al. (2014). Spektra FT-Raman byla zaznamenána pomocí spektroskopie Nicolet NXR 9650 FT-Raman prostřednictvím laseru Nd: YAG³⁺ (1.064 nm) a detektoru InGaAs. Teplota měření byla 20-23 °C. Byl použit otvor 80 a spektrální rozlišení 4 cm⁻¹, 64 skenů pro semena a 128 skenů pro listy a kořeny. Dále byly použity tři úrovně výkonu laseru: 0,5 W pro semena, 0,1 W pro listy a 0,7 W pro kořeny. Analýza spektra byla provedena s použitím programu Omnic 8 a softwarového balíčku Statistica 13.1 pro Windows (StatSoft, Inc. 2011) v rozmezí 400-3600 cm⁻¹. Výsledná spektra a dendrogramy jsou uvedeny v rozmezí hodnot 600-2000 cm⁻¹ vzhledem k nejvýznamnějším rozdílům v tomto rozmezí.

Analýza obsahu hormonů

Pro analýzu obsahu hormonů bylo naváženo 0,1 g čerstvého rostlinného materiálu a zamrazeno tekutým dusíkem ve 2ml Eppendorfově zkumavce. Následně byl vzorek uchován při -20 °C. Tato analýza byla popsána již dříve (Dobrev and Vankova, 2012; Dobrev and Kamínek, 2002). Homogenizace byla provedena v modifikovaném roztoku Bielecki (methanol/voda/kyselina mravenčí, 15:4:1) za použití kuličkového mlýnku Retsch MM301 s kuličkou zirkonia (5 mm) při 20 Hz po dobu 3 minut. Potom byly přidány následující izotopově značené standardy (10 pmol/vzorek): $^{13}\text{C}_6$ -IAA (Cambridge Isotope Laboratories); $^2\text{H}_4$ -SA (Sigma-Aldrich); $^2\text{H}_3$ -PA, $^2\text{H}_3$ -DPA (NRC-PBI); $^2\text{H}_6$ -ABA, $^2\text{H}_5$ -JA, $^2\text{H}_2$ -GA4, $^2\text{H}_5$ -transZ, $^2\text{H}_5$ -transZR, $^2\text{H}_5$ -transZ7G, $^2\text{H}_5$ -transZ9G, $^2\text{H}_5$ -transZOG, $^2\text{H}_5$ -transZROG, $^2\text{H}_5$ -transZRMP, $^2\text{H}_3$ -DZ, $^2\text{H}_3$ -DZR, $^2\text{H}_3$ -DZ9G, $^2\text{H}_6$ -iP, $^2\text{H}_6$ -iPR, $^2\text{H}_6$ -iP7G, $^2\text{H}_6$ -iP9G, $^2\text{H}_6$ -iPRMP (Olchemim). Fytohormony byly odděleny sloupcem SPE s reverzní fázovou kationtovou výměnou (Oasis-MCX, Waters) do kyselé frakce elucí s methanolem (auxiny, ABA, SA, JA) a do bazické frakce elucí s 0,35M NH_4OH v 60% methanolu (CK). Frakce byly analyzovány za použití HPLC (Ultimate 3000, Dionex) připojeného k 3200 Q TRAP hybridnímu iontovému hmotnostnímu spektrometru (Applied Biosystems). Kvantifikace hormonů byla provedena metodou ředění izotopů s víceúrovňovými kalibračními křivkami ($r^2 > 0,99$). Zpracování dat bylo provedeno pomocí softwaru Analyst 1.5 (Applied Biosystems).

Tato analýza byla prováděna ve spolupráci s Ústavem experimentální botaniky AV ČR v Praze a postup byl proveden podle Dobrev and Kamínek (2002).

Analýza obsahu malondialdehydu (MDA)

Ve třech miskách bylo homogenizováno 0,2 g čerstvého materiálu s trochou mořského písku a 2 ml 0,1% kyseliny trichloroctové (TCA). Vzorek byl následně centrifugován (14 000 rpm po dobu 15 minut) při laboratorní teplotě. Do skleněných zkumavek bylo napipetováno 1,5 ml 20% TCA obsahující 0,5% TBA a přidáno 0,5 ml supernatantu. Výsledná směs byla zahřívána v termostabilním plastovém stojanu 30 min při teplotě 90 °C. Vzorky byly následně zchlazeny ponořením do vody s ledovou drtí a měřeny na spektrofotometru při 532 nm a 600 nm (korekce nescifického zákalu). Výsledky byly vyjádřeny jako μmol MDA na gram FW využitím molárního extinkčního koeficientu MDA-TBA $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Stanovení obsahu fenolických látek a flavonoidů

Ve třecích miskách bylo homogenizováno 0,15 g čerstvých kořenů nebo 0,2 g čerstvých listů s 1,5 ml 80% methanolu a centrifugováno po dobu 15 min při 14 000 rpm. Pro stanovení obsahu fenolických látek byla k supernatantu následně přidána destilovaná H₂O, 2% Na₂CO₃ a Folin – Ciocalteuovo činidlo. Směs byla inkubována jednu hodinu při teplotě 45 °C a absorbance byla následně změřena při 750 nm. Pro analýzu obsahu flavonoidů byl k supernatantu přidán 2% roztok AlCl₃ ve 100% methanolu a směs byla inkubována při laboratorní teplotě jednu hodinu. Absorbance byla měřena při 420 nm. Koncentrace fenolických látek a flavonoidů byla vypočítána na základě kalibrační křivky připravené pomocí kyseliny galové a kvercetinu.

Analýza obsahu peroxidu vodíku

Postup č. 1:

Obsah H₂O₂ byl analyzován sadou Amplex Red Hydrogen Peroxid Test Kit (Molecular Probes). Čerstvé kořeny a výhonky (0,1 g) byly rozmělněny v 0,5 ml reakčního pufru (dodávaného v soupravě). Extrakt byl centrifugován po dobu 5 min při 14 000 rpm. 50 µl supernatantu bylo inkubováno s 50 µl pracovního roztoku obsahujícího 100mM činidlo Amplex Red a 0,2 ml peroxidázy po dobu 30 min za tmy při pokojové teplotě. Koncentrace H₂O₂ byla měřena spektrofotometricky pomocí 96jamkové čtečky čipů Synergy 2 (Biotek) za použití excitace při 530 nm a detekce fluorescence při 590 nm. Standardní křivka v rozmezí 0,05-1 µM byla provedena za použití různých koncentrací H₂O₂, které byly dodány v soupravě.

Postup č. 2:

Superoxidový anion a H₂O₂ byly také vizualizovány v listech podle Jambunathana (2010) NBT nebo DAB barvením.

Postup č. 3:

Ve vychlazených třecích miskách bylo homogenizováno 0,1 g čerstvé hmotnosti rostliny se 2 ml draslíkového fosfátového pufru (50 mM, pH 7.0) (PB) a malým množstvím třecího písku. Vzniklý extrakt byl centrifugován po dobu 15 minut při 14 000 rpm. Následně bylo odebráno 500 µl supernatantu a přidáno 250 µl TiCl₄ (0,5% TiCl₄ v 20% H₂SO₄) a opět centrifugováno za stejných podmínek. Absorbance byla měřena při 410 nm v UV kyvetě podle metodiky Jana and Choudhuri (1982) na UV-

VIS spektrofotometru Cintra 101 (GBC). Obsah H₂O₂ byl vypočítán z kalibrační křivky a vyjádřen jako μmol H₂O₂ na g FW.

Stanovení obsahu rozpustných proteinů

V třech miskách bylo homogenizováno 0,1 g čerstvého rostlinného materiálu se 2 ml draslíkového fosfátového pufru (50 mM, pH 7.0) (PB) a následně centrifugováno 15 min při 4 °C a 14 000 rpm. K 970 μl Bradfordova (BIO-RAD) činidla bylo přidáno 30 μl supernatantu a necháno 5 min stát při laboratorní teplotě. Absorbance byla měřena při 597 nm. Obsah rozpustných proteinů byl vyjádřen jako mg.g⁻¹ FW. Jako standard pro tvorbu kalibrační křivky byl použit komerčně dostupný hovězí sérový albumin (BSA) (BIO-RAD) (Bradford, 1976).

Extrakce proteinů

Čerstvé listy nebo kořeny (0,5 g) byly homogenizovány při 4 °C v 1 ml homogenizačního pufru (17,9 g.l⁻¹ Tricin, 0,74 g.l⁻¹ MgSO₄, 0,155 g.l⁻¹ DTT, 1,14 g.l⁻¹ EDTA, upraveno na pH 8,0 pomocí 1M Tris). Poté byly vzorky centrifugovány při 3000 rpm po dobu 3 min. Koncentrace proteinů byla analyzována dle Bradford (1976) za použití Bio-Rad Protein Assay Kit s BSA jako standardu.

Analýza aktivity superoxid dismutázy a katalázy

Proteinové extrakty byly odděleny nativní PAGE při teplotě 4 °C a 180 V v Laemmli pufrovacím systému (Laemmli, 1970) bez dodecylsulfátu sodného (SDS). Pásky SOD byly vizualizovány na 12% polyakrylamidových gelech za použití postupu barvení aktivity popsaného Beauchamp and Fridovich (1971). Do každé jamky bylo naneseno stejné množství proteinu (15 μg). Pro identifikaci isoform SOD byla provedena selektivní inhibice. Cu/Zn superoxid dismutáza (Cu/ZnSOD) a Fe superoxid dismutáza (FeSOD) byly inhibovány přidáním H₂O₂ do barvicího pufru v koncentraci 5 mM, zatímco Cu/ZnSOD byla inhibována 3 mM KCN. Pro katalázovou inhibici bylo použito 10 mM 3-amino-1, 2,4-triazolu.

Pásky aktivity CAT byly vizualizovány na 10% polyakrylamidových gelech za použití postupu, který popsal Woodbury a kol. (1971). Do každé jamky bylo naneseno stejné množství proteinu (7,5 μg). Gely byly skenovány pomocí skeneru Epson Perfection V700 Photo.

Denzitometrické analýzy

Gely byly analyzovány pomocí programu ImageJ. Aktivity všech isoforem byly určeny v libovolných jednotkách odpovídajících oblasti pod denzitometrickou křivkou.

Statistické analýzy

Pro statistické analýzy byl použit program Statistica (Statsoft, ČR, verze 10) a jednorozměrná analýza rozptylu (ANOVA), Tukeyův test na úrovni $P < 0,05$ a Scott-Knott test. Klastrová analýza Ramanových spekter byla provedena pomocí Wardova algoritmu. Pro odhalení vzájemných vztahů měřených parametrů byla použita také korelační analýza. Grafy byly zpracovány v programu Excel (Microsoft, USA).

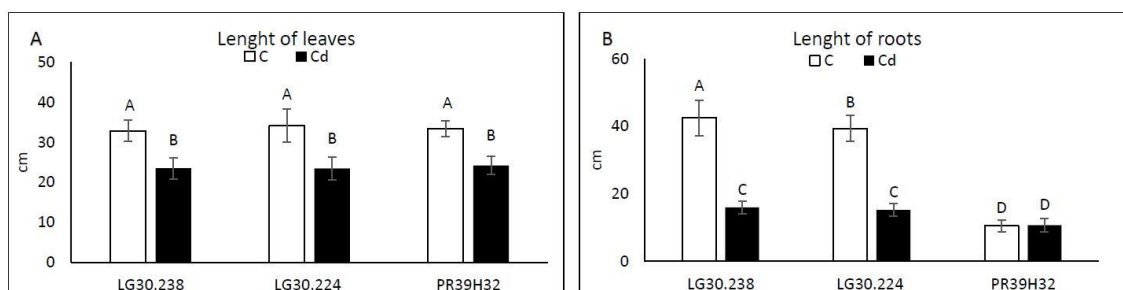
3. Výsledky a diskuse

3.1 Testování různých kultivarů kukuřice na odolnost k Cd

Cílem tohoto experimentu bylo najít kultivar, který se bude nejlépe hodit pro naše experimenty. Testovány byly kultivary LG30.238, LG30.224, PR39H32. Měřeny byly délky nadzemních a podzemních částí, intenzita fotosyntézy, rychlost transpirace, vodivost průduchů a relativní obsah chlorofylu.

Vliv kadmia na délku nadzemních a podzemních částí rostlin

Délka listů i kořenů se po ošetření Cd zmenšila u většiny kultivarů (Obr. 5 A, B). Pouze kořeny kultivaru PR39H32 zůstaly stejné. Listy všech kultivarů měřily průměrně kolem 35 cm a jejich délka se po aplikaci Cd zmenšila průměrně na 25 cm, což je zmenšení zhruba o 30 %. Kořeny kultivaru LG30.238 byly nejdelší (kolem 40 cm) a došlo u nich také k největšímu zmenšení po aplikaci Cd, a to o více než 50 %. Kořeny sledovaných kultivarů se také lišily morfologickou stavbou. Odlišnosti byly patrné hlavně v počtu a tvaru adventivních kořenů.



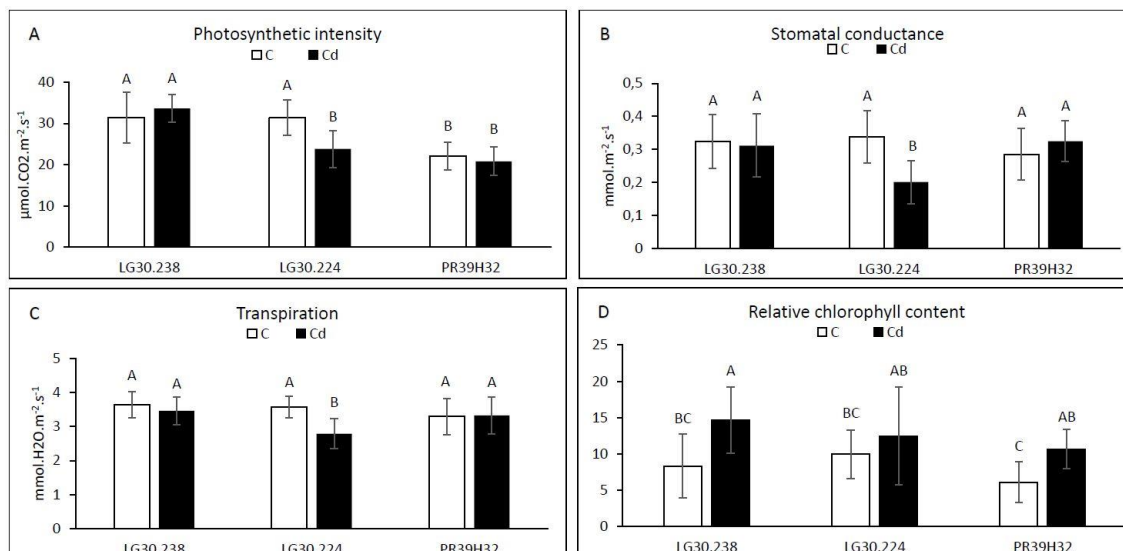
Obrázek 5: Změny v délce listů (A) a kořenů (B) u rostlin kukuřice po vystavení Cd po 11. dni hydroponického pěstování. Data jsou průměry \pm SD. Hodnoty se stejným písmenem se významně neliší.

Vliv kadmia na fotosyntetickou aktivitu

Fotosyntetická intenzita, vodivost průduchů i transpirace se po aplikaci Cd prokazatelně snížily pouze u kultivaru LG30.224. U ostatních dvou kultivarů nedošlo ke změně. U kultivaru PR39H32 byla intenzita fotosyntézy celkově nižší než u ostatních dvou kultivarů (Obr. 6 A, B, C).

Vliv kadmia na relativní obsah chlorofylu

Relativní obsah chlorofylu se po aplikaci Cd zvýšil u kultivaru LG30.238 a PR39H32, a to až o 43 %. U kultivaru LG30.224 k signifikantnímu zvýšení nedošlo (Obr. 6 D).



Obrázek 6: Změny v intenzitě fotosyntézy (A), vodivosti průduchů (B), transpiraci (C) a relativním obsahu chlorofylu (D) u rostlin kukuřice po vystavení Cd po 11. dni hydroponického pěstování. Data jsou průměry ± SD. Hodnoty se stejným písmenem se významně neliší.

Diskuse

Po aplikaci Cd se délka listů zmenšila u všech kultivarů zhruba o 30 %, kořeny se nejvíce zmenšily u kultivaru LG30.238, u PR39H32 zůstala délka stejná jako u kontroly. Pouze u kultivaru LG30.224 došlo ke snížení intenzity fotosyntézy, vodivosti průduchů a transpirace, což byly hlavní parametry, na základě kterých jsme zvolili právě kultivar LG30.224. U tohoto kultivaru také jako u jediného nedošlo ke změně relativního obsahu chlorofylu. U ostatních dvou došlo po aplikaci Cd ke zvýšení jeho obsahu.

Rozdílné reakce kultivarů kukuřice byly popsány již dříve například ve studii Guo et al. (2011), kteří naměřili rozdílný obsah Cd a Zn v různých kultivarech kukuřice. Anjum et al. (2016a) zase uvádějí, že dva kultivary kukuřice rozdílně reagovaly na stres z Cd a As. Rozdíly byly patrné v chování antioxidantů, osmolytů a ROS. Du et al. (2017) ve své studii také popisují rozdíly v reakci kultivarů kukuřice na stres z As. Kultivar Dongdan90 vykazoval vyšší hodnoty biomasy, délky výhonků

a kořenů, aktivitu SOD, POD a CAT, ale měl nižší obsah MDA. O rozdílných reakcích se můžeme dočíst i v práci Artiushenko et al. (2014), kde se uvádí, že kultivary kukuřice se lišily v reakci na stres z Cd a Ni v obsahu glutationu a kyseliny askorbové. Rozdíly v intenzitě fotosyntézy, vodivosti průduchů a rychlosti transpirace u dvou kultivarů kukuřice ve stresu z Cd a As popisují Anjum et al. (2017). Kultivary se také lišily ve výšce, počtu listů, ploše listů, čerstvé a suché hmotnosti.

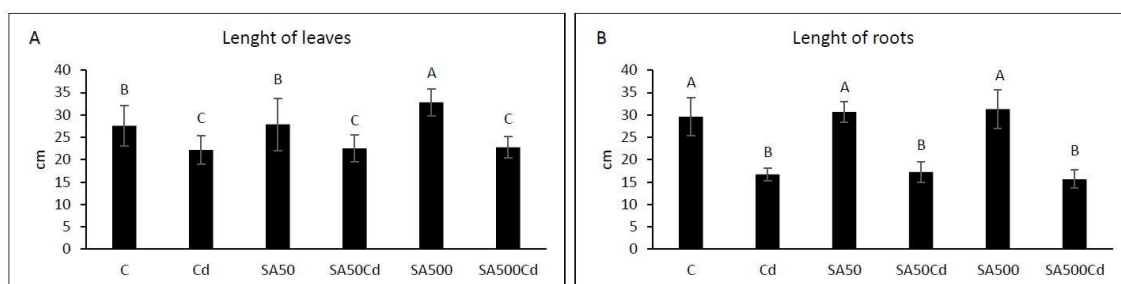
Kultivary vybrané pro náš experiment také reagovaly na stres z Cd různě. Pro další pokusy byl vybrán kultivar LG30.224, u kterého došlo k snížení délky nadzemní i podzemní části, k poklesu intenzity fotosyntézy, vodivosti průduchů a transpirace, ale nedošlo ke změně relativního obsahu chlorofylu. Na základě těchto výsledků jsme usoudili, že kultivar LG30.224 nejvíce reaguje na zatížení stresem z Cd, a to hlavně z důvodu zaznamenaného poklesu intenzity fotosyntézy, vodivosti průduchů a transpirace.

3.2 Vliv kyseliny salicylové na růst a obranné mechanismy kukuřice seté při zatížení kadmíem

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit úlohu kyseliny salicylové v obranných mechanismech kukuřice seté při zatížení kadmíem. Studován byl její vliv na délku nadzemních a podzemních částí, obsah chlorofylu a karotenoidů, fluorescenci chlorofylu, fotosyntetické parametry, obsah H₂O₂ a MDA a v neposlední řadě také vliv na obsah vybraných prvků Ca, Mg, K, Zn, Cu a Cd.

Vliv kadmia a kyseliny salicylové na délku nadzemních a podzemních částí rostlin

Výška nadzemní části i kořenů se po aplikaci Cd zmenšila u všech variant nezávisle na ošetření SA (Obr. 7 A, B). Délka nadzemní části kontrolních rostlin se pohybovala okolo 29 cm a po aplikaci Cd se zmenšila průměrně na 22 cm, což znamená snížení zhruba o 25 %. Pouze samostatné předošetření 500 μM SA mělo za následek zvýšení nadzemních částí rostlin oproti kontrole, a to o 19 %. Délka kořenů kontrolních rostlin dosahovala v průměru 30 cm, po aplikaci Cd pak došlo ke zmenšení na 16 cm, celkem tedy o 45 %. Aplikace SA neměla na délku kořenů žádný vliv.

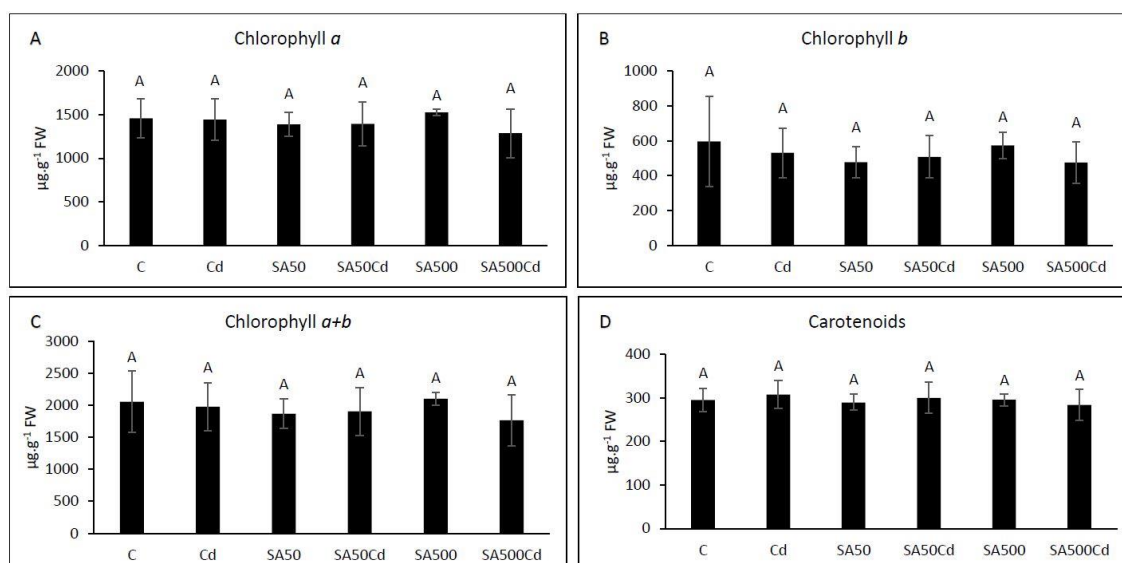


Obrázek 7: Změny v délce listů (A) a kořenů (B) u rostlin kukuřice po vystavení různým ošetřením po 11. dni hydroponického pěstování. Data jsou průměry ± SD. Hodnoty se stejným písmenem se významně neliší.

Vliv kadmia a kyseliny salicylové na obsah chlorofylu a karotenoidů

Obsah chlorofylu ani karotenoidů se po aplikaci Cd ani SA prokazatelně nelišil od kontroly (Obr. 8). Obsah chlorofylu *a* se pohyboval okolo 1500 μg.g⁻¹ FW, obsah

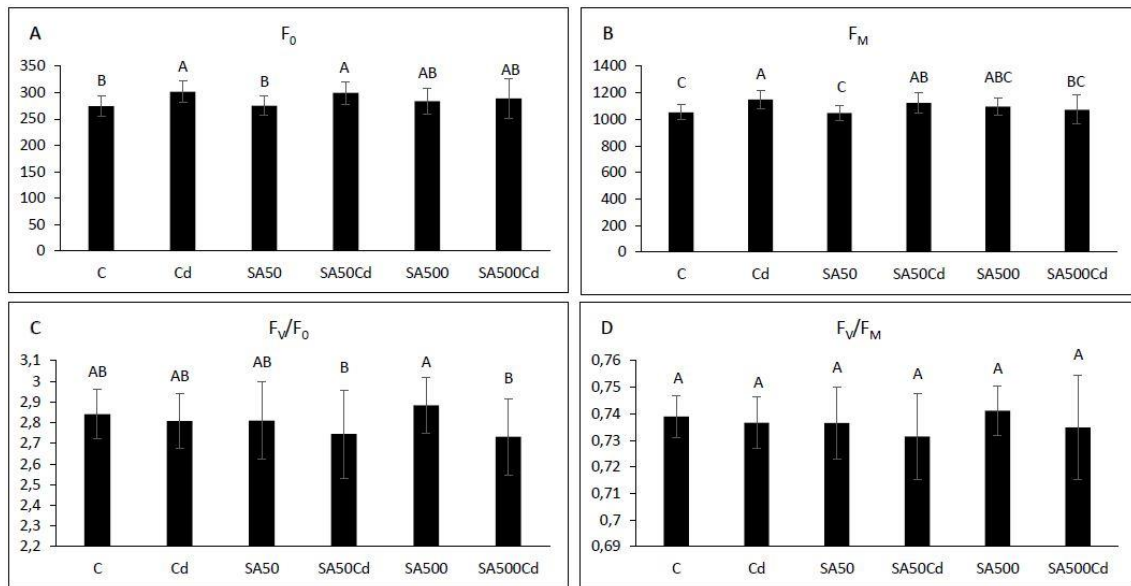
chlorofylu *b* byl průměrně okolo 500 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW, dohromady pak kolem 2000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW. Obsah karotenoidů se pohyboval okolo 300 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW.



Obrázek 8: Změny v obsahu chlorofylu *a*, chlorofylu *b*, chlorofylu *a* a *b* a karotenoidů u rostlin kukuřice po vystavení různým ošetřením po 11. dni hydroponického pěstování. Data jsou průměry \pm SD. Hodnoty se stejným písmenem se významně neliší.

Vliv kadmia a kyseliny salicylové na fluorescenční parametry

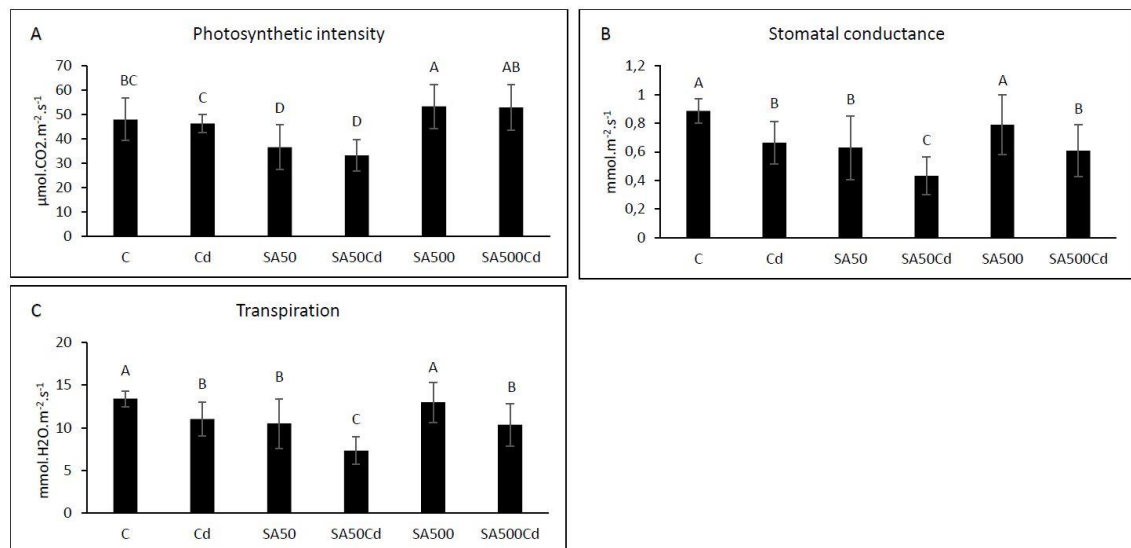
Parametry F_0 (minimální fluorescence) a F_M (maximální fluorescence) se po aplikaci Cd prokazatelně zvýšily a ošetření SA ve vyšší koncentraci vedlo pouze ke snížení parametru F_M (Obr. 9 A, B). Maximální fotochemická účinnost PSII (F_V/F_M) se nezměnila po aplikaci Cd ani SA. Pouze u parametru F_V/F_0 , což je citlivější ukazatel stresu než F_V/F_M , došlo ke snížení u rostlin ošetřených SA a zároveň stresovaných Cd (Obr. 9 C, D).



Obrázek 9: Změny parametrů fluorescence chlorofylu (F_0 , F_M , F_v/F_0 a F_v/F_M) u rostlin kukuřice po vystavení různým ošetřením po 11. dni hydroponického pěstování. Data jsou průměry \pm SD. Hodnoty se stejným písmenem se významně neliší.

Vliv kadmia a kyseliny salicylové na fotosyntetické parametry

Intenzita fotosyntézy se snížila po předšetření 50 μ M SA, a to jak ve variantě s Cd, tak i po samostatném použití SA (Obr. 10 A).

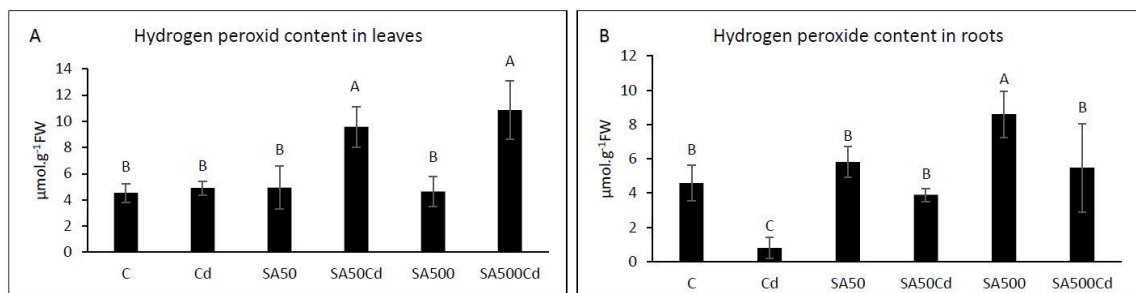


Obrázek 10: Změny v intenzitě fotosyntézy (A), vodivosti průduchů (B) a transpirace (C) u rostlin kukuřice po vystavení různým ošetřením po 11. dni hydroponického pěstování. Data jsou průměry \pm SD. Hodnoty se stejným písmenem se významně neliší.

Naopak ošetření 500 μ M SA vedlo ke zvýšení intenzity fotosyntézy ve variantě s Cd i bez něho. Vodivost průduchů a transpirace poklesly po aplikaci Cd a ještě více po aplikaci Cd současně s předošetřením 50 μ M SA, po aplikaci vyšší koncentrace SA ale zůsly stejné ve srovnání s kontrolou (Obr 10 B, C).

Vliv kadmia a kyseliny salicylové na obsah peroxidu vodíku

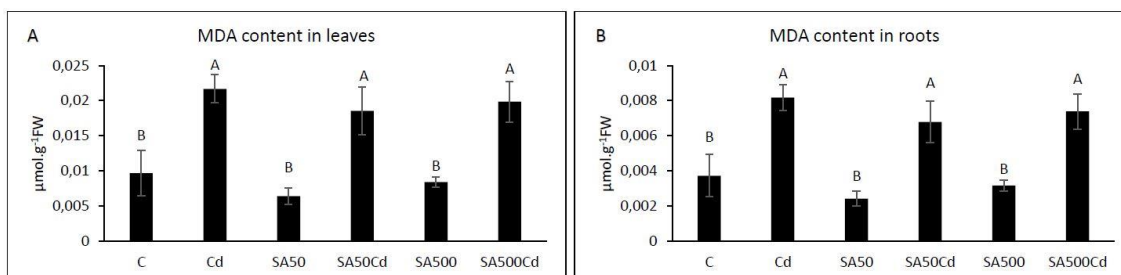
Obsah H₂O₂ v listech se prokazatelně zvýšil pouze u variant, kde byla SA aplikována současně s Cd, a to až o 55 % (Obr. 11 A). Samostatně aplikované Cd nemělo na obsah H₂O₂ v listech žádný vliv. U kořenů však došlo ke snížení H₂O₂ po aplikaci Cd o 82 % (Obr. 11 B). U variant, kde byla současně s Cd aplikována SA, došlo ke zvýšení obsahu H₂O₂ oproti variantě pouze s Cd, a to až o 85 %. Ke zvýšení došlo ale i po samostatné aplikaci 500 μ M SA oproti kontrole.



Obrázek 11: Změny obsahu H₂O₂ v listech (A) a v kořenech (B) u rostlin kukuřice po vystavení různým ošetřením po 11. dni hydroponického pěstování. Data jsou průměry \pm SD. Hodnoty se stejným písmenem se významně neliší.

Vliv kadmia a kyseliny salicylové na obsah MDA

Obsah MDA se prokazatelně zvýšil v listech i v kořenech po aplikaci Cd, a to přibližně o 50 % oproti kontrole (Obr. 12). Aplikace SA neměla na obsah MDA žádný prokazatelný vliv.



Obrázek 12: Změny obsahu MDA v listech (A) a v kořenech (B) u rostlin kukuřice po vystavení různým ošetřením po 11. dni hydroponického pěstování. Data jsou průměry \pm SD. Hodnoty se stejným písmenem se významně neliší.

Vliv kadmia a kyseliny salicylové na obsah Ca, Mg, K, Zn, Cu a Cd

Po aplikaci Cd došlo u rostlin kukuřice k prokazatelnému snížení obsahu Ca, Mg, K i Zn v listech i kořenech (Obr. 13 A, B, C, D).

Obsah Ca v listech se však snížil i po samostatném ošetření SA, ta ale neměla žádný vliv na varianty s Cd (Obr. 13 A). V kořenech došlo po současné aplikaci Cd a SA k ještě většímu snížení obsahu Ca oproti samostatné aplikaci Cd. Samotné použití nižší koncentrace SA mělo za následek snížení obsahu Ca, naopak vyšší koncentrace SA způsobila jeho zvýšení.

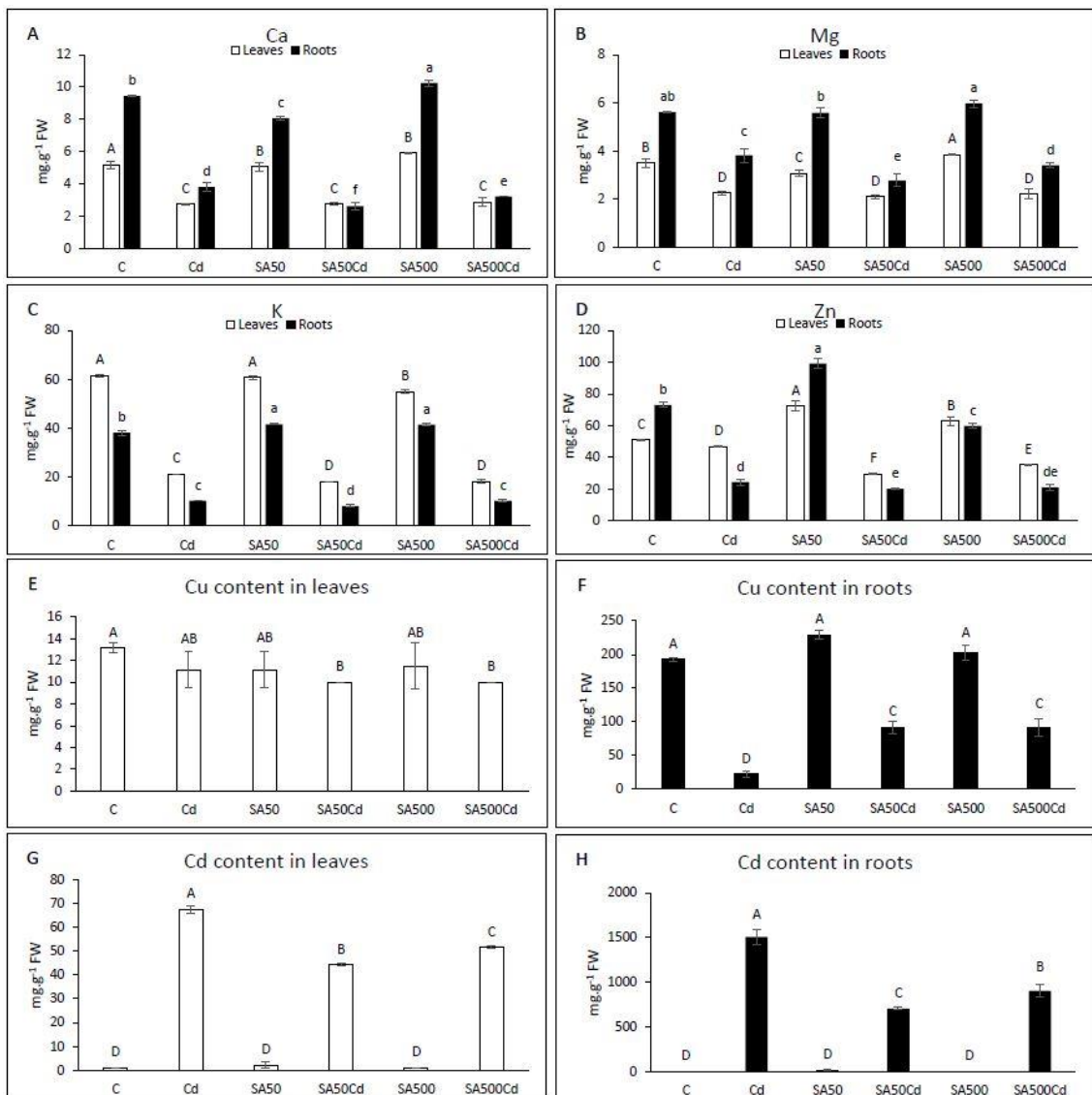
Aplikace SA současně s Cd neměla žádný vliv na obsah Mg v listech (Obr. 13 B). Samostatně však, podobně jako u Ca, došlo ke snížení obsahu Mg oproti kontrole po ošetření rostlin nižší koncentrací SA a zvýšení po použití vyšší koncentrace SA, a to jak v listech, tak v kořenech. V kořenech měla navíc SA prokazatelný vliv na obsah Mg u variant s Cd. Podobně jako u Ca došlo ještě k většímu snížení jeho obsahu.

Obsah K se v listech po aplikaci SA současně s Cd snížil oproti variantě, kde bylo aplikováno Cd samostatně (Obr. 13 C). Samostatné použití vyšší koncentrace SA mělo za následek snížení obsahu K oproti kontrole. V kořenech došlo ke snížení obsahu K u variant s Cd pouze po použití nižší koncentrace SA a samotná aplikace SA měla za následek zvýšení jeho obsahu v obou použitých koncentracích.

Ošetření SA současně s Cd mělo v listech za následek snížení obsahu Zn oproti variantě pouze s Cd (Obr. 13 D). Samotná aplikace SA způsobila zvýšení obsahu K v listech. V kořenech také došlo ke snížení obsahu Zn po aplikaci SA současně s Cd oproti variantě, kde bylo aplikováno pouze Cd. Nižší koncentrace samostatně aplikované SA pak měla za následek zvýšení jeho obsahu a vyšší koncentrace zase jeho snížení.

Obsah Cu v listech se u variant rostoucích v Cd nezměnil, při současné aplikaci Cd a SA však došlo k jeho snížení (Obr. 13 E). V kořenech došlo k výraznému poklesu obsahu Cu u variant s Cd a ošetření SA současně s Cd vedlo ke zvýšení jeho obsahu oproti variantě pouze s Cd (Obr. 13 F). Obsah Cu v kořenech byl několikanásobně vyšší než v listech.

Obsah Cd se u rostlin rostoucích v médiu obohaceném Cd výrazně zvýšil, a to jak v listech, tak v kořenech (Obr. 13 G, H). V kořenech byl jeho obsah tisícinásobně vyšší než v listech. Aplikace SA však vedla ke snížení obsahu Cd, přičemž větší snížení jeho obsahu následovalo po ošetření nižší koncentrací SA, tedy 50 μ M.



Obrázek 13: Změny obsahu Ca, Mg, K, Zn, Cu a Cd v listech a v kořenech u rostlin kukuřice po vystavení různým ošetřením po 11. dni hydroponického pěstování. Data jsou průměry \pm SD. Hodnoty se stejným písmenem se významně neliší.

Diskuse

Z mnoha studií je dobře známo, že stres z Cd způsobuje snížení délky nadzemních i podzemních částí rostlin (Anjum et al., 2016a, 2016b; Elloumi et al., 2014; Guo et al., 2018; Wang et al., 2013). V našem pokusu také došlo ke snížení délky nadzemních i podzemních částí, což zřejmě souvisí s blokováním transportu potřebných minerálních látek (Moravcova et al., 2018). Wang et al. (2013) popisují, že přírůstky výšky výhonků a biomasy v jejich výzkumu byly stimulovány při poměrně nízkých hladinách Cd ($<100 \mu\text{M}$), zatímco byly inhibovány při hladinách Cd nad $200 \mu\text{M}$. SA neměla v našem výzkumu žádný pozitivní efekt na délku podzemních ani nadzemních částí rostlin stresovaných Cd. Canakci and Dursun (2013) však pozitivní vliv SA na růstové parametry stresovaných rostlin popisují, stejně tak Szalai et al. (2013).

Snížení obsahu chlorofylu a karotenoidů je také jedním z příznaků působení Cd (Elloumi et al., 2014; Guo et al., 2018; Krantev et al., 2008; Wang et al., 2013). Wang et al. (2013) uvádějí, že při nejvyšší dávce Cd ($800 \mu\text{M}$) obsah chlorofylu *a*, chlorofylu *b* a karotenoidů v listu činil pouze 38,9, 46,0 a 29,7 % toho, co se nacházelo v kontrolních rostlinách. Kromě toho byl chlorofyl *b* citlivější na stres z Cd než chlorofyl *a*. V našem pokusu však k signifikantnímu snížení nedošlo, a ani žádný efekt SA jsme nezaznamenali. Podle výzkumu Krantev et al. (2008) by však SA měla zvyšovat obsah chlorofylu u rostlin kukuřice stresovaných Cd. Zvýšení obsahu chlorofylu u stresovaných rajčat po aplikaci SA popisuje i Guo et al. (2018). Výsledky se mohou lišit z důvodu použití nižší koncentrace Cd, než jsme použili my. Nicméně podle Liu et al. (2016) není vztah mezi SA a obsahem chlorofylu ještě zcela jasný. Vliv SA může souviset s rozšířením schopnosti kořenového systému absorbovat Mg^{2+} anebo s biosyntézou chlorofylu.

Podle Souza et al. (2004) má stres za následek strukturální a funkční poruchu fotosyntetického aparátu a poškození přenosu elektronů, a proto dochází k tvorbě reaktivních radikálů akumulací redukovaných akceptorů elektronů. Působením Cd dochází ve fotosystému k tvorbě vysokého množství energie a tím se zvyšuje intenzita fluorescence (Sofa et al., 2009). Narušení PSII je tedy indikováno zvýšenými hodnotami F_0 a F_M , zatímco hodnoty F_V/F_M klesají (Qiu et al., 2013). To se částečně shoduje s našimi výsledky, kde také došlo ke zvýšení parametrů F_0 a F_M , parametr F_V/F_M se ale nezměnil. Snížení F_V/F_M působením Cd popisují i Gogolakova

et al. (2008), Ozfidan-Konakci et al. (2018) a Shafi et al. (2011). Naopak Santos et al. (2018) uvádějí snížení parametrů F_0 , F_M i F_V/F_M po aplikaci Cd. Podle předchozích výzkumů by SA měla mít pozitivní vliv na fotosyntetické parametry (Yongping et al., 2014; Yotsova et al., 2018), to se ale v našem experimentu měření parametrů F_0 a F_M a F_V/F_M neprokázalo. Podle Yotsova et al. (2018) měla sice SA pozitivní vliv na fotosyntetické parametry, ale vliv na F_V/F_M také nezaznamenali. Pozitivní vliv SA na fotosyntetické parametry u rostlin zatížených Cd stresem byl pozorován pouze při měření intenzity fotosyntézy, kde aplikace 500 μ M SA zvýšila intenzitu fotosyntézy sníženou stresem z Cd. Naopak bylo pozorováno snížení intenzity fotosyntézy, transpirace i vodivosti průduchů po aplikaci 50 μ M SA samostatně i současně s Cd. Podobné výsledky uvádějí i Yongping et al. (2014), kteří zaznamenali snížení intenzity fotosyntézy, vodivosti průduchů i transpirace po aplikaci Cd a zvýšení po ošetření SA. Samotné Cd mělo za následek snížení vodivosti průduchů i transpirace. To se shoduje s předchozími výzkumy (Anjum et al., 2016b; Elloumi et al., 2014; Shi and Cai, 2008), kde ale na rozdíl od našeho pokusu došlo také k signifikantnímu snížení intenzity fotosyntézy.

Jedním z hlavních důsledků působení těžkých kovů je zvýšená produkce ROS, která obvykle poškozuje buněčné komponenty, jako jsou membrány, nukleové kyseliny a chloroplastové pigmenty (Drażkiewicz et al., 2004; Tewari et al., 2002). Mezi ROS patří superoxidový radikál ($\bullet O_2^-$), H_2O_2 a hydroxylový radikál ($\bullet OH$) (Salin, 1988). Zvýšení obsahu H_2O_2 po aplikaci Cd uvádí například i Ni et al. (2018). V našem experimentu se však obsah H_2O_2 v listech po aplikaci Cd nelišil od kontroly a v kořenech došlo ke snížení jeho obsahu. Z literatury je známo že SA snižuje obsah H_2O_2 naakumulovaného v rostlinách v důsledku Cd stresu (Guo et al., 2007; Yotsova et al., 2018; Zhang et al., 2011). To se ale také v našem experimentu nepotvrdilo. Naopak ošetření SA společně s Cd mělo za následek zvýšení obsahu H_2O_2 v listech a samotná aplikace vyšší koncentrace SA měla za následek jeho zvýšení v kořenech. Yang et al. (2013) uvádějí, že stanovení hladiny endogenního H_2O_2 ukázalo, že sazenice ošetřené SA mohou indukovat akumulaci H_2O_2 . Jejich výsledky odhalily významnou úlohu SA při podpoře adventivního zakořeňování prostřednictvím procesu H_2O_2 akumulace. Ze současných studií vyplývá, že H_2O_2 může být životně důležitá signální molekula, která řídí růst a vývoj rostlin (Niu and Liao, 2016). Xia et al. (2015) naznačují, že ROS a SA fungují společně v samozesilovací zpětné smyčce,

ve které ROS indukuje akumulaci SA a následně SA zvyšuje akumulaci ROS. Již dříve bylo totiž zjištěno, že SA narušuje buněčnou redoxní homeostázu inhibicí CAT v peroxizomech (Chen et al., 1993) a následné zvýšení akumulace ROS aktivuje thiolové signalizační cesty zahrnující glutathion a thioredoxin (Tada et al., 2008).

MDA je hlavním produktem membránové peroxidace lipidů a jeho nadměrná akumulace brání normálnímu růstu a vývoji rostlin. Obsah MDA přímo odráží stupeň poškození buněčných membránových struktur (Parida and Jha, 2010). Při stresu z Cd může nadměrná akumulace MDA vést ke zvýšení ROS, jako jsou O_2^- a H_2O_2 (Xu et al., 2014). Tato zjištění se shodují s našimi výsledky, kde jsme také naměřili zvýšený obsah MDA u rostlin vystavených Cd stresu, a to až o 50 %. Metwally et al. (2003) zjistili, že SA může snižovat obsah MDA nahromaděného v důsledku stresu z Cd (25 μ M). Ke stejnému výsledku došli i Guo et al. (2018), kteří naměřili snížení MDA až o 40 %. Snížení obsahu MDA po předošetření SA uvádí i Krantev et al. (2008). Ti namáčeli semena podobně jako my v 500 μ M SA po dobu 6 hodin, ale nejvyšší použitá koncentrace Cd byla 25 μ M. V našem pokusu jsme použili koncentraci 50 μ M $Cd(NO_3)_2$ a snížení MDA v důsledku předošetření SA jsme nezaznamenali. Výsledky se mohou lišit právě v důsledku použití rozdílné koncentrace Cd. SA v našem pokusu nedokázala rostlinu v tak vysoké koncentraci Cd ochránit před peroxidací lipidů. Nižší koncentrace Cd použili i Metwally et al. (2003), jejichž výsledky byly popsány výše. Ve výzkumu Canakci and Dursun (2013) došlo ke snížení MDA po ošetření SA pouze u rostlin ošetřených 50 μ M Cd, u rostlin ošetřených 100 μ M Cd k signifikantnímu snížení nedošlo.

Již dříve bylo zjištěno, že Cd může interferovat s příjmem, transportem a využitím základních minerálních prvků, což vede k významnému snížení jejich obsahu v rostlinách. Jedná se hlavně o vápník (Ca), hořčík (Mg), železo (Fe), fosfor (P) a draslík (K) (Dong et al., 2006; Metwally et al. 2003). Snížení absorpce Ca, Mg, Fe a Cu po aplikaci 100 μ M Cd popisuje i Xu et al. (2014). Podle Carvalho Bertoli et al. (2012) může Cd zasahovat do vychytávání živin v rostlinných pletivech tím, že ovlivní propustnost plazmatické membrány. To se shoduje s našimi výsledky, kde jsme také naměřili snížený obsah Ca, Mg, K, Zn a Cu u rostlin stresovaných Cd. Podle Moravcova et al. (2018) dochází při stresu z těžkých kovů ke změnám v chemickém složení kořenových pletiv. Tyto změny představují ochranné mechanismy, které blokují tok těžkých kovů do dalších orgánů, čímž chrání proti oxidativnímu stresu

a poškození buněk. Nicméně chemická reorganizace pletiv kořene omezuje také absorpci minerálů potřebných pro normální růst, což může vést k inhibici růstu.

Ve výzkumu Bai et al. (2015) zjistili, že přidání 100, 200, 300 μ M SA výrazně zvýšilo příjem a translokaci minerálních prvků. Xu et al. (2015) také uvádějí zlepšení minerální výživy po aplikaci SA na rostliny stresované Cd. Podle nich by SA mohla zmírňovat toxické účinky Cd prostřednictvím regulace K v kořenech, což podporuje vstřebávání Fe a zvyšuje koncentraci Mg v listech a Ca v kořenech. Pozitivní vliv SA na obsah K, Ca, Mg a Fe zaznamenali i Guo et al. (2013). Podle Liu et al. (2016) může SA indukovat aktivitu Hp-ATPázy, což by mohlo představovat schopnost SA zvyšovat absorpci K, Ca, Mg a Fe. V našem výzkumu jsme však tento pozitivní vliv SA na příjem živin u stresovaných rostlin nezaznamenali. Naopak ve většině případů mělo předošetření stresovaných rostlin SA za následek ještě větší snížení obsahu Ca, Mg, K a Zn než samotné stresování Cd. Pozitivní vliv měla SA pouze na obsah Cu v kořenech, kde přispěla ke zvýšení jejího obsahu u stresovaných rostlin. Snížení obsahu Fe a Mn po aplikaci SA na Cd stresované rostliny popisují i Metwally et al. (2003). Obsah P, K, Ca a Mg se v jejich výzkumu po aplikaci SA nezměnil, pouze obsah Zn a S se zvýšil. Rozdílné výsledky mohou být způsobeny použitím rozdílných koncentrací Cd a SA nebo rozdílnou reakcí rostlin a jejich kultivarů. Úlohu SA v příjmu minerálních živin je potřeba více prozkoumat v dalších experimentech.

Rostliny rostoucí v roztoku obohaceném Cd absorbují více tohoto těžkého kovu. Například Xu et al. (2014) uvádí, že stres z Cd (100 μ M) dramaticky zvýšil akumulaci Cd v listech i v kořenech. To bylo potvrzeno i v našem výzkumu s kukuřicí. Již v předchozích studiích bylo zjištěno, že ošetření SA snižuje absorpci Cd. Bai et al. (2015) uvádějí, že přidání 200 μ M SA nejen snížilo příjem Cd u jílku, ale také snížilo translokaci Cd z kořenů do nadzemních částí a změnilo subcelulární distribuci v rostlinách. Přidání 200 μ M SA zvýšilo koncentraci Cd v rozpustné frakci a buněčné stěně v nadzemní části i v kořenech, přičemž většina Cd se nacházela v buněčné stěně a v rozpustných frakcích a menší část v buněčných organelách. Snížení obsahu Cd po aplikaci SA uvádí i Guo et al. (2013). To bylo potvrzeno i v našem experimentu, kde předošetření SA mělo za následek významné snížení obsahu Cd ve stresovaných rostlinách. Drazic and Mihailovic (2005) předpokládají, že SA může tvořit komplexy s Cd, což vede k jeho pasivaci, nebo může jeho obsah

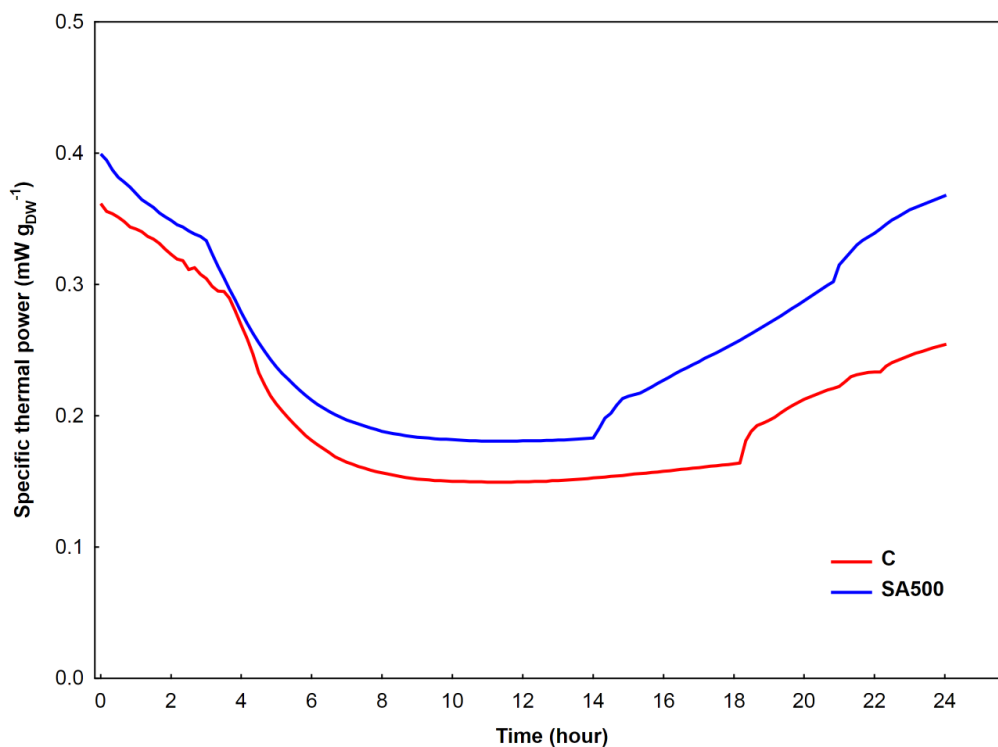
snižovat prostřednictvím interakce s fytochelatiny nebo prostřednictvím kanálů, ve kterých byly ionty Cd přijaty.

3.3 Vliv kyseliny salicylové na klíčení, růst a obranné mechanismy kukuřice seté při zatížení mědí

V tomto experimentu jsme sledovali vliv SA na klíčení semen a obranné mechanismy proti stresu z Cu. Semena kukuřice byla do SA namáčena jen na 5 hodin ještě před aplikací Cu, chtěli jsme proto zjistit, zda se SA do semen opravdu dostává a jak ovlivňuje klíčení rostliny. Dále jsme sledovali vliv SA a Cu na morfologické parametry rostlin, fotosyntetickou aktivitu, obsah Cu, chemickou skladbu semen a kořenů, obsah ROS a proteinů a v neposlední řadě také aktivitu SOD a CAT.

Vliv kyseliny salicylové na klíčení semen

Na základě výsledků z kalorimetrických analýz jsme nenalezli žádné statisticky významné rozdíly v množství emisí tepelné energie mezi semeny předošetřenými v obou koncentracích SA nebo inkubovaných v destilované vodě. Dosažené hodnoty (v průměru 276 J gDW^{-1}) byly srovnatelné ve sledovaných skupinách po celou dobu měření. Během prvního dne měření byl v průběhu specifických křivek tepelné energie pozorován rozdíl mezi semeny ošetřenými $500 \mu\text{M}$ SA a těmi, které byly ponechány pouze v destilované vodě (Obr. 14). Nižší koncentrace SA ($50 \mu\text{M}$) nezpůsobila žádné změny v průběhu specifické tepelné křivky. U kontrolních semen, stejně jako u semen předem ošetřených $50 \mu\text{M}$ SA, bylo pozorováno zvýšení emisí tepelné energie asi o 4 hodiny později než u semen ošetřených $500 \mu\text{M}$ SA.



Obrázek 14: *Specifické křivky tepelné energie z kalorimetrické analýzy semen kukuřice předošetřené SA nebo destilovanou vodou. Uvedené údaje představují střední hodnoty ze 4 nezávislých replikátů.*

Příjem kyseliny salicylové semeny

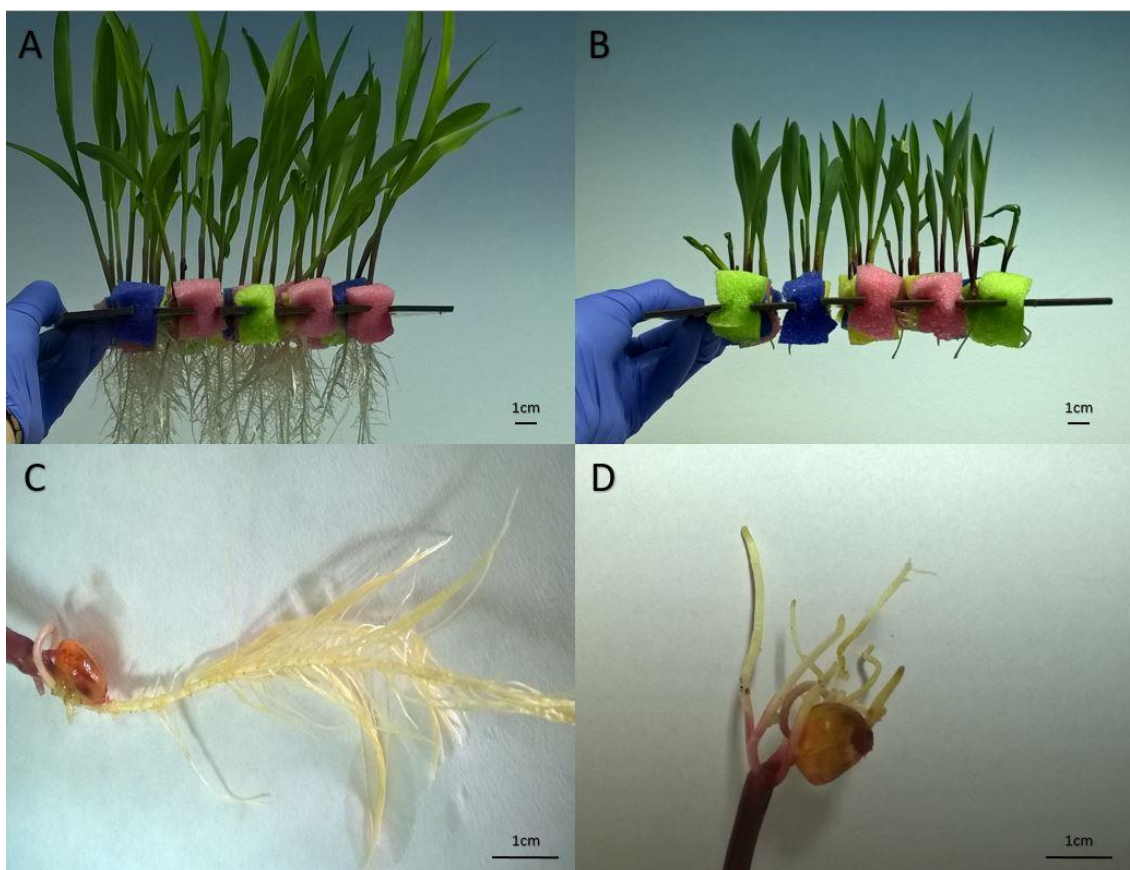
Analýza obsahu D4SA ukázala, že byla semeny přijímána v obou zvolených koncentracích. Její přítomnost byla detekována jak u semen, tak i u naklíčených kořenů a její obsah v analyzovaném pletivu pozitivně koreloval s aplikovanou koncentrací pro předošetření semen (Tab. 4). Bylo zjištěno, že koncentrace D4SA byla vyšší u vyklíčených kořenů než v semenech. Exogenně aplikovaná D4SA měla vliv na endogenní hladinu SA u semen a kořenů. Aplikace D4SA ve vyšší koncentraci (500 μM D4SA) potlačila syntézu endogenní SA v kořenech, ale ne v semenech (Tab. 4). Naopak aplikace nižší koncentrace D4SA (50 μM) vedla ke zvýšení endogenní hladiny SA ve vyklíčených kořenech, ale ne v semenech (Tab. 4).

Tabulka 4: Změny koncentrace SA a D4SA (ng.g⁻¹ FW) u semen a kořenů po ošetření D4SA po dobu 5 hodin. Data jsou průměry ± SD. Hodnoty v řadách se stejným písmenem se významně neliší.

	<i>Semena</i>		
	<i>C</i>	<i>D4SA50 5h</i>	<i>D4SA500 5h</i>
SA	10,9±3,8b	7,7±0,9b	12,4±0,9b
D4SA	0	6,0±0,3b	44,5±1,1a
	<i>Kořeny</i>		
	<i>C</i>	<i>D4SA50 5h</i>	<i>D4SA500 5h</i>
SA	200,8±9,3d	446,0±8,4b	39,1±2,5e
D4SA	0	376,5±6,0c	674,9±2,4a

Morfologické parametry

Přidání Cu do hydroponické kultury kukuřičných rostlin způsobilo inhibici růstu a vývoje (Obr. 15). Kořeny a výhonky jedenáctidenních rostlin pěstovaných ve 100 μM CuSO₄ byly 10krát a 1,6krát menší než kontrolní rostliny (Obr. 15, Tab. 5). Na základě makroskopického pozorování bychom mohli konstatovat, že kořeny kontrolních rostlin měly jeden dlouhý hlavní kořen a menší boční kořeny (Obr. 15 C), zatímco hlavní kořen rostlin ošetřovaných Cu byl načervenalý, menší a tlustší než boční kořeny (Obr. 15 D). Žádný jiný viditelný vliv předošetření semen v SA na růst a vývoj rostlin nebyl pozorován.



Obrázek. 15: Kontrolní rostliny (A) a jejich kořeny (C), rostliny ošetřené $100\mu\text{Cu}$ (B) a jejich kořeny (D) po 11 dnech hydroponické kultivace.

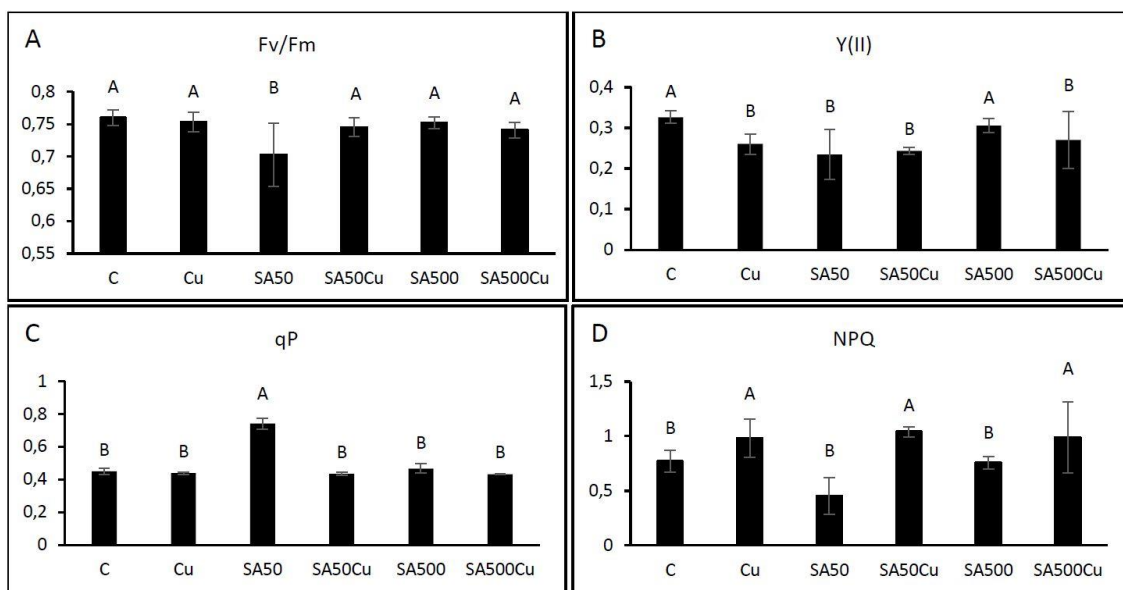
Tabulka 5: Změny v délce kořenů a listů (cm) a v obsahu fotosyntetických pigmentů ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$) v listech rostlin kukuřice po vystavení různým ošetřením po 11. dni hydroponického pěstování. Data jsou průměry \pm SD. Hodnoty v řádcích se stejným písmenem se významně neliší.

Délka listů a kořenů [cm]						
	C	Cu	SA50	SA50Cu	SA500	SA500Cu
<i>Listy</i>	16,3 \pm 2,5a	10,1 \pm 3,1b	15,9 \pm 3,3a	11,1 \pm 2,0b	17,3 \pm 1,5a	9,8 \pm 3,5b
<i>Kořeny</i>	28,6 \pm 3,2a	2,6 \pm 0,5b	29,1 \pm 2,0a	2,1 \pm 1,2b	29,6 \pm 2,5a	2,8 \pm 0,2b
Obsah fotosyntetických pigmentů [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$]						
	C	Cu	SA50	SA50Cu	SA500	SA500Cu
<i>Chlorofyl a</i>	834,4 \pm 17,2 a	684,8 \pm 74,5 b	875,0 \pm 65,1 a	682,3 \pm 24,8 b	782,2 \pm 32,4 a	750,1 \pm 40 b
<i>Chlorofyl b</i>	294,8 \pm 17,7 a	235,9 \pm 26,0 b	292,4 \pm 24,7 a	225,9 \pm 17,3 b	250,8 \pm 9,5 b	248,4 \pm 9,1 b
<i>Chlorofyl a+b</i>	1129,5 \pm 29 a	920,0 \pm 92,9 c	1167,4 \pm 86 a	908,3 \pm 41,8 c	1033,0 \pm 41 b	998,5 \pm 49,0 b
<i>Karotenoidy</i>	172,5 \pm 13,4 a	128,9 \pm 14,8 b	167,6 \pm 17,7 a	146,7 \pm 6,0 b	168,1 \pm 4,1 a	168,1 \pm 4,2 a

Fotosyntetická aktivita

Rostliny kukuřice nevykazovaly žádné zjevné příznaky chlorózy nebo nekrózy způsobené aplikací Cu, nicméně došlo k výraznému snížení obsahu fotosyntetických pigmentů, jako je chlorofyl *a*, chlorofyl *b* a karotenoidy (Tab. 5). Předošetření SA neovlivnilo obsah celkového chlorofylu, ale vyšší koncentrace SA zmírnila negativní účinek Cu na obsah karotenoidů (Tab. 5).

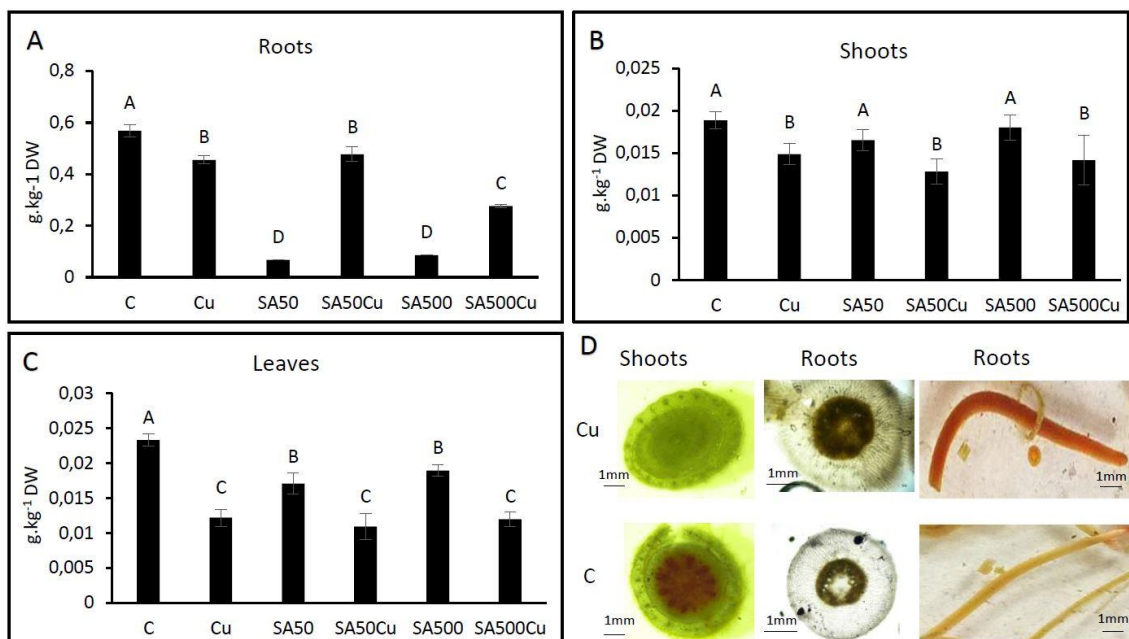
Dle výsledků měření fluorescenčních parametrů lze konstatovat, že aplikace Cu měla prokazatelný vliv pouze na kvantový výtěžek otevřených center PSII (YII) a parametry nefotochemického zhášení (NPQ) (Obr. 16 B, D). Maximální účinnost fotosystému II (Fv/Fm) se po aplikaci Cu nezměnila (Obr. 16 A) a na základě parametrových analýz by bylo možno uvést, že SA aplikovaná v nižší koncentraci vedla ke snížení Fv/Fm u kukuřičných rostlin. Došlo ke značnému poklesu účinnosti nesyklického transportu elektronů a poměru absorpční energie využívané v PSII (YII) v důsledku stresu z Cu. Žádný vliv SA na tento parametr nebyl pozorován (Obr. 16 B). Fotochemické zhášení variabilní chlorofylové fluorescence (qP) poskytující indikaci podílu PSII otevřených reakčních center se zvýšilo u rostlin rostoucích ze semen předošetřených v nižší koncentraci SA; žádný vliv na parametr qP však nebyl pozorován u rostlin stresovaných Cu (Obr. 16 C). Navíc byl v rostlinách rostoucích v Cu zvýšený parametr nefotochemického zhášení (NPQ) známý jako indikátor přebytečné tepelné energie v PSII, avšak vliv předošetření SA nebyl nalezen ani u kontrolních rostlin, ani u stresovaných (Obr. 16 D).



Obrázek 16: Změny parametrů fluorescence chlorofylu (F_v/F_m , $Y(II)$, qP a NPQ) u rostlin kukuřice po vystavení různým ošetřením po 11. dni hydroponického pěstování. Data jsou průměry \pm SD. Hodnoty se stejným písmenem se významně neliší.

Koncentrace mědi

Bylo zjištěno, že rostliny pěstované v kontrolních podmínkách, vykazovaly vyšší hladiny Cu než ty, které byly pěstovány v Cu stresu (Obr. 17). Nejvyšší koncentrace Cu byla pozorována v kořenech, nicméně výhonky a listy také vykazovaly vestigiální množství Cu. Předošetření semen vyšší koncentrací SA mělo za následek snížení obsahu Cu v kořenech stresovaných rostlin a došlo také ke snížení obsahu Cu v listech a kořenech nestresovaných rostlin v důsledku předošetření SA v obou koncentracích (Obr. 17).



Obrázek 17: Koncentrace Cu v kořenech (A), výhoncích (B) a listech (C) rostlin kukuřice po vystavení různým ošetřením po 11. dni hydroponického pěstování. Data jsou průměry ± SD. Hodnoty se stejným písmenem se významně neliší. Fragменты a průřezy výhonů zbarvené dithizonem (D) C: kontrolní rostlina, Cu: rostliny ošetřené Cu v 11. dni hydroponického pěstování.

Přítomnost bivalentních kovů v kořenech a ve stoncích

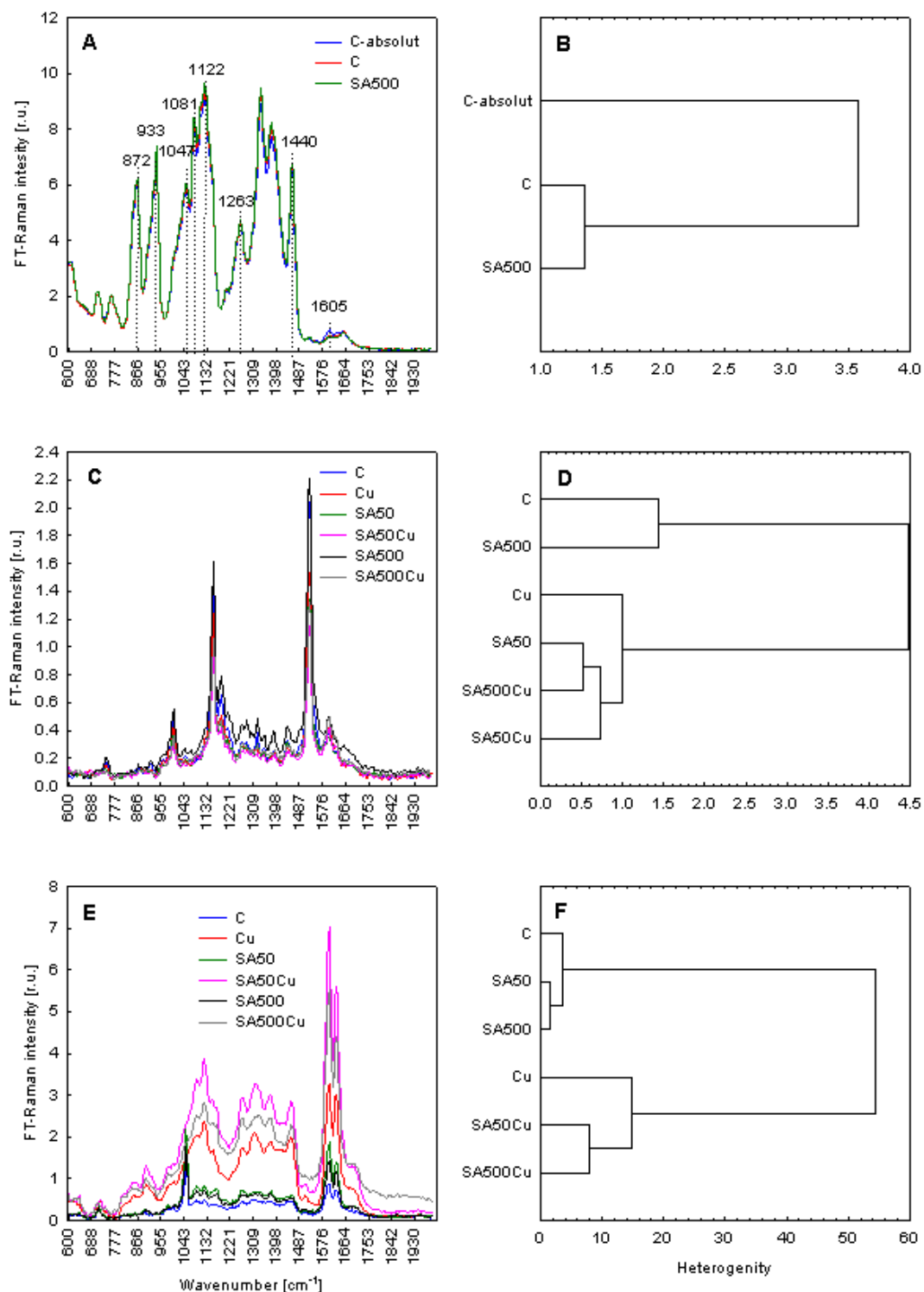
Při barvení bivalentních kovů včetně Cu^{2+} v kukuřičných stoncích došlo k silnému červenému zbarvení stonkových řezů pouze u rostlin pěstovaných v Hoaglandově médiu s esenciální koncentrací Cu (Obr. 17 D). U stonků rostlin kultivovaných v médiu s vysokou koncentrací Cu se charakteristické červené barvení neobjevilo. Barvení kořenových průřezů nevedlo k zbarvení rostlin pěstovaných ve stresu ani rostlin kontrolních. Pouze kořeny stresovaných rostlin byly na povrchu načervenalé. Žádné rozdíly v intenzitě barvení nebyly pozorovány v kořenech ani ve stoncích u rostlin předošetřených SA.

Chemická skladba klíčících semen, listů a kořenů

Na základě měření získaných z Ramanovy spektroskopie jsme zjistili, že jak předběžné ošetření SA, tak aplikace Cu neovlivňují chemické složení klíčících semen (Obr. 18 A) ani listů (Obr. 18 C, D) kukuřice. Analýza získaných spekter odhalila přítomnost typických pásem, které odrážejí specifické chemické sloučeniny (viz

diskusní část). Stejné chemické složení studovaných skupin bylo potvrzeno hierarchickou analýzou podobnosti, která byla provedena za účelem porovnání celkového chemického složení (Obr. 18 B, D). Naopak v kořenech se ukázalo, že Cu měla významný vliv na chemické složení tohoto pletiva (Obr. 18 E). Stres způsobil změny v pásmech intenzity FT Ramanu s hodnotami vln 872 cm^{-1} , 933 cm^{-1} , 1081 cm^{-1} , 1122 cm^{-1} , 1263 cm^{-1} , 1440 cm^{-1} a 1605 cm^{-1} Ramanova spektra, nicméně tyto změny nebyly ovlivněny předošetřením SA. Navíc pás v rozmezí 1047 cm^{-1} zjištěný v kořenech kontrolních rostlin i rostlin pocházejících ze semen ošetřených SA nebyl nalezen v kořenech rostlin rostoucích za stresu z mědi.

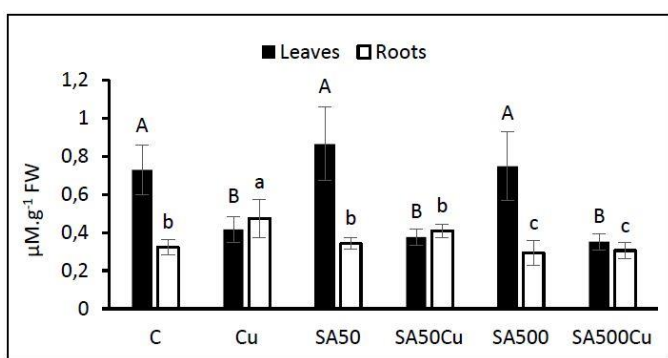
Hierarchická analýza podobnosti (Obr. 18 F) potvrdila významné rozdíly v chemickém složení kořenů rostlin ošetřených Cu a rostlin kontrolních bez ohledu na použitou koncentraci SA.



Obrázek 18: FT-Raman spektra klíčících semen (A), listů (C) a kořenů (E) rostlin vystavených různým způsobům ošetření po 11. dni hydroponického pěstování. Dendrogramy (B, D, F) ukazují podobnosti v chemickém složení. Klastrová analýza FT-Ramanových spekter byla provedena pomocí Wardova algoritmu.

Koncentrace reaktivních forem kyslíku

Spektrofotometrická analýza obsahu H_2O_2 v listech studovaných rostlin ukázala, že listy rostlin ošetřených Cu vykazovaly o 43-65 % méně H_2O_2 než rostliny kontrolní. Předšetření SA nemělo žádný vliv na hladinu ROS v listech. Naopak v kořenech rostlin ošetřených Cu byla naměřena o 32 % vyšší hladina H_2O_2 než v kontrolních rostlinách. Předšetření semen SA v koncentraci 500 μM vedlo k významnému snížení obsahu H_2O_2 v kořenech nestresovaných rostlin, zatímco u rostlin rostoucích ve stresu byl zaznamenán významný pokles H_2O_2 po použití obou koncentrací SA (Obr. 19).



Obrázek 19: Obsah H_2O_2 v listech a kořenech rostlin kukuřice po vystavení různým ošetřením po 11. dni hydroponického pěstování. Data jsou průměry \pm SD. Hodnoty se stejným písmenem se významně neliší.

Barvení superoxidového radikálu a H_2O_2 NBT a DAB, potvrdilo výsledky dosažené ze spektrofotometrického měření. V listech kontrolních rostlin ve srovnání s Cu stresovanými byla zjištěna vyšší koncentrace ROS (Obr. 20).



Obrázek 20: DAB (A) a NBT (B) barvení H_2O_2 a superoxidového radikálu v listech rostlin kukuřice po vystavení různým ošetřením v 11. dni hydroponického pěstování.

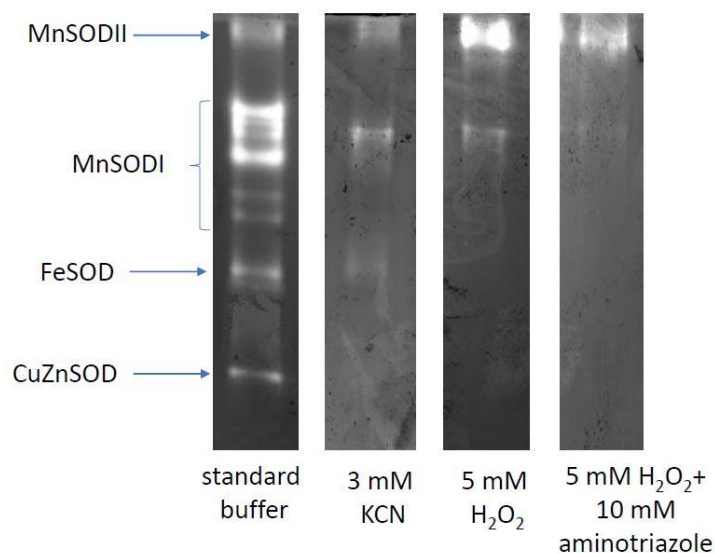
Obsah proteinů

Listy rostlin pěstovaných v médiu doplněném Cu obsahovaly o 25-35 % více proteinů než kontrolní varianty, ale předšetření SA nevedlo u obou skupin k žádným změnám v jejich obsahu. Kořeny rostlin ošetřených Cu obsahovaly asi o 50 % více proteinů než kontrolní rostliny. Předšetření SA mělo za následek zvýšený obsah proteinu přibližně o 62-66% ve variantách SA50Cu a SA500Cu ve srovnání s kontrolními rostlinami (Obr. 22 A).

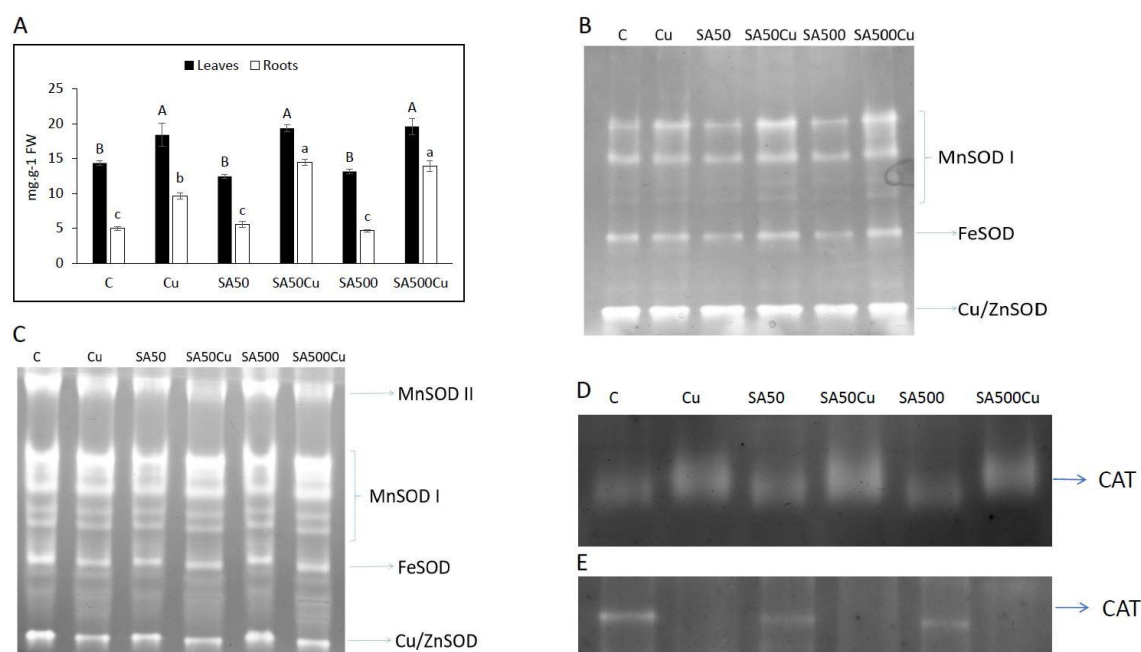
Aktivita superoxid dismutázy a katalázy

Listy a kořeny kukuřičných rostlin vykazovaly aktivitu několika izoform SOD (Obr. 22 B, C), které byly identifikovány po selektivním zabarvení za použití specifických inhibitorů (Obr. 21). V kořenech, na rozdíl od listů, jsme identifikovali další pás SOD odpovídající manganové superoxid dismutáze (MnSODII) (Obr. 22 C). Ze všech identifikovaných izoform vykazovaly MnSODI, MnSODII a Cu/ZnSOD nejvýznamnější rozdíly v jejich aktivitě v důsledku aplikace stresu nebo přeošetření SA (Obr. 22 B, C, Tab. 6). Cu stres zvýšil aktivitu MnSODI v listech a aktivitu MnSODII a MnSODI v kořenech. Předšetření kukuřičných semen různými koncentracemi SA nemělo za následek změnu aktivity MnSODI v listech stresovaných rostlin (Obr. 22 B, Tab. 6), ale pokles aktivit této izoformy byl pozorován v kořenech stresovaných rostlin pěstovaných ze semen předšetřených 500 μ M SA (Obr. 22 C, Tab. 6). Aktivita MnSODII významně poklesla v kořenech stresovaných rostlin, které byly předšetřeny SA.

Aktivita CAT byla silnější v listech než v kořenech rostlin (Obr. 22 D, E, Tab. 6). Stres Cu způsobil zvýšení aktivity CAT v listech (Obr. 22 D, Tab. 6), ale v kořenech došlo naopak k inhibici aktivity CAT. Předšetření SA ve vyšší koncentraci vedlo k významnému poklesu aktivity CAT v listech nestresovaných rostlin, ale byl také zaznamenán zmírňující účinek SA v nižší koncentraci na aktivitu CAT v listech stresovaných rostlin. V kořenech stresovaných rostlin neměla SA žádný zlepšující účinek. Navíc bylo zaznamenáno snížení aktivity CAT v kořenech nestresovaných rostlin (Obr. 22 D, E, Tab. 6).



Obrázek 21: Identifikace izoform SOD selektivním zbarvením pomocí specifických inhibitorů. Každá jamka byla naplněna 15 µg proteinu.



Obrázek 22: Obsah proteinů v listech a kořenech (A) rostlin kukuřice po vystavení různým ošetřením po 11. dni hydroponického pěstování. Reprezentativní gely ukazující zbarvení aktivity SOD proteinových extraktů z listů (B) a kořenů (C) a CAT aktivity z listů (D) a kořenů (E). Každá jamka byla naplněna 15 µg proteinu. Data jsou průměry ± SD. Hodnoty se stejným písmenem se významně neliší.

Tabulka 6: Densitometrická analýza aktivity SOD a CAT v listech a kořenech rostlin kukuřice po vystavení různým ošetřením po 11. dni hydroponického pěstování. Čísla v tabulce ukazují aktivitu celkového SOD nebo CAT (vyjádřeno v arbitrárních jednotkách - plocha pod densitometrickou křivkou). Hodnoty se stejným písmenem se významně neliší ($P < 0,05$, $n = 6$).

Aktivita SOD izoforem	Listy					
	C	Cu	SA50	SA50Cu	SA500	SA500Cu
<i>MnSODI</i>	51280b	60695a	48889b	64406a	45680b	65405a
<i>FeSOD</i>	16342a	20200a	19913a	19894a	14946a	19022a
<i>Cu/ZnSOD</i>	38699a	43390a	45932a	40792a	45908a	35700a
CAT aktivita	22306c	43983b	22297c	48122a	16804d	40553b
Kořeny						
Aktivita SOD izoforem	Kořeny					
	C	Cu	SA50	SA50Cu	SA500	SA500Cu
<i>MnSODI</i>	63125b	82994a	56787b	80487a	52706b	67871b
<i>MnSODII</i>	35815b	47256a	33092b	28494c	32289c	27617c
<i>FeSOD</i>	22110a	23504a	19829a	31786a	19621a	26867a
<i>Cu/ZnSOD</i>	36539a	21775b	26672b	24124b	35439a	20835b
CAT aktivita	10492a	0d	2620c	0d	5480b	0d

Diskuse

Jak již bylo výše popsáno, v literatuře lze nalézt rozdílné informace o vlivu SA na klíčení semen a jejich vývoj a předpokládá se, že může klíčení buď inhibovat nebo podporovat (Rajjou et al., 2006). V předchozích pokusech provedených na kukuřici bylo zjištěno, že SA aplikovaná v koncentraci 0,5 až 1 mM stimuluje růst a klíčení nezralých embryí izolovaných ze semen a *in vitro* kultivovaných v přítomnosti SA (Krantev et al., 2008). Podobně i v našich studiích došlo k pozitivní stimulaci klíčení semen, a to pouze ve vyšší koncentraci SA (500 μ M). Množství tepelné energie produkované kukuřičnými semeny z kontrolní skupiny a ošetřené SA bylo podobné, avšak čas indukce tepelné energie se mezi jednotlivými vzorky lišil. Tepelná energie z metabolické aktivity semen předem namočených v 500 μ MSA začala růst o několik hodin dříve než u kontrolních semen. Protože se předpokládá, že indukce produkce tepla způsobená ošetřením SA je spojena s nárůstem nefosforylační dráhy transportu elektronů (Popova et al., 2012; Raskin et al., 1987; Rhoads and McIntosh, 1991; Straeten et al., 1995; Wen and Liang, 1994), lze usoudit, že zrychlení produkce tepelné energie v semenech kukuřice předošetřených SA je způsobeno zlepšením

dráhy alternativní oxidázy (AOX) během klíčení. Na základě mnoha výzkumů se předpokládá, že funkce alternativní oxidázy je zvláště důležitá během stresu (Vanlerberghe, 2013). Proto bychom mohli usuzovat, že semena předošetřená SA mohla být vybavena hladinou ROS připravenou pro vyvolání signalizační odpovědi na faktory způsobující oxidační stres.

Analýzy hmotnostní spektrometrie provedené v našich studiích potvrzují schopnost kukuřičných semen přijímat exogenní SA a naznačují, že účinek exogenně aplikovaného SA je spojen se změnami obsahu endogenní SA. Významné zvýšení koncentrace endogenní SA bylo pozorováno po předošetření semen v 50 μ M roztoku D4SA, zatímco vyšší koncentrace exogenní SA vedla k významnému snížení hladiny endogenní SA v nově vytvořených kořenech. Již dříve bylo zjištěno, že v semenech hrachu předošetřených SA se většina exogenní SA vázala v konjugovaných formách, zatímco došlo k indukci syntézy endogenní SA ve vyvíjejících se rostlinných orgánech (Szalai et al., 2011). Poruchy endogenní homeostázy SA, které byly zjištěny v důsledku předošetření kukuřičných semen SA v různých koncentracích, by mohly mít význam pro vysvětlení účinku SA na vyvolání obranných mechanismů. Podrobné studie exprese genů prováděné na pšeničných rostlinách ukázaly, že předošetření SA diferenciólně aktivovalo velké množství genů kódujících proteiny, které se podílely na reakci na environmentální stresový faktor narušující buněčnou homeostázu (Gondor et al., 2016). Nedávno bylo prokázáno, že některé geny stimulované SA kódují antioxidační enzymy jako CAT, SOD a askorbátové peroxidázy, které chrání před nadprodukcí ROS, jež způsobují oxidativní stres (El- Esawi et al., 2017). Navíc SA může působit přímo jako antioxidant a zneškodňovat ROS (Popova et al., 2009).

Z mnoha studií je známo, že Cu vykazuje silný inhibiční účinek na růst a vývoj rostlin (Liu et al., 2001; Yang et al., 2015; Zengin, 2014), nicméně inhibice určitých rostlinných orgánů závisí na koncentraci Cu (Benimeli et al., 2009). V našich studiích ovlivnil roztok Cu o koncentraci 100 μ M růst celých rostlin kukuřice, avšak nejsilnější inhibice růstu byla pozorována u kořenů. Přestože bylo v našich studiích zjištěno, že aplikace SA ovlivňuje metabolické změny v ošetřených semenech a v kořenech klíčících semenáčků, aplikace SA ve vysoké (500 μ M) i nízké koncentraci (50 μ M) nezmírnila negativní účinek 100 μ M CuSO₄ na růst rostlin kukuřice. Nesrovnalosti mezi našimi výsledky a předchozími studiemi, které uvádějí pozitivní účinky SA na

rostliny při stresu z těžkých kovů, mohou naznačovat, že vliv SA spočívá spíše v modifikaci, než ve zlepšení reakce rostliny na stres.

Přestože v některých studiích bylo zjištěno, že předošetření SA vede ke značnému zvýšení obsahu chlorofylu a karotenoidu (Belkhadi et al., 2010; Saidi et al., 2013) a může také přispět ke zlepšení fotosyntézy (Hayat et al., 2010; Zhang et al., 2015), v našich experimentech jsme došli ke zjištění, že působení stresu na fotosyntetickou účinnost rostlin nebylo předošetřením SA zmírněno. Obsah chlorofylu se také výrazně snížil u rostlin ošetřených Cu a SA na jeho obsah neměla žádný vliv. Pouze hladina karotenoidů vykazovala zvýšení díky předošetření vyšší koncentrací SA. Podobné výsledky získali Moharekar et al. (2003), kteří vysvětlují, že zvýšená syntéza karotenoidů a xantofylů byla způsobena zvýšením rychlosti hluboké oxidace. Tato reakce, k níž dochází během xantofylového cyklu, umožňuje rostlinám zbavit se přebytku energie ve formě tepla, čímž se zabrání poškození fotosyntetického aparátu. Koncentrace Cu použitá v našich studiích vedla k významným změnám fotosyntetické účinnosti stresovaných rostlin měřené jako pokles parametru YII, který koreloval se zvýšením NPQ parametru. To může naznačovat, že Cu stresované rostliny jsou schopny zvládnout negativní účinky Cu na fotosyntetickou aktivitu zvýšením procesů rozptylu nadbytku energie, aby se zabránilo generování oxidativního stresu.

Je dobře známo, že redukce absorpce mědi do rostlin nebo její sekvestrace v kořenových buňkách je jedním z primárních obranných mechanismů proti tomuto typu stresu v rostlinách (Benimeli et al., 2009; Liu et al., 2001). Kromě toho bylo popsáno, že stres z těžkých kovů způsobuje snížení absorpce základních minerálních prvků v rostlinách (Ke et al., 2007). Podobné výsledky byly zaznamenány i v našich experimentech. Bivalentní kovové barvení kukuřičných stonků, které byly pěstovány v Hoaglandově médiu se základním obsahem Cu, ukázalo silně červené zbarvení, což znamená, že tyto výhonky obsahují vysokou koncentraci bivalentního kovu. Toto zbarvení se však neobjevilo u rostlin pěstovaných ve vysoké koncentraci Cu. Barvení průřezů kořenů nevedlo k vizualizaci červené barvy v rostlinách pěstovaných pod stresem Cu ani v kontrolních rostlinách. Pozorovali jsme také, že rostliny pěstované v kontrolních podmínkách vykazovaly vyšší množství Cu, než ty, které byly kultivovány ve stresu z Cu. To by mohlo být způsobeno indukcí primárních obranných mechanismů

spočívajících v blokování absorpce Cu z média, což mohlo také zároveň omezit absorpci minerálů potřebných pro normální růst. Mohlo také dojít ke změně oxidačního čísla Cu, takže barvení by přítomnost Cu neprokázalo. Naše výsledky se však liší od Mostofa and Fujita (2013), kteří zjistili, že obsah mědi v kořenech a listech rýže se zvyšoval se zvyšující se koncentrací Cu a obsah Cu nebyl zjištěn v kontrolních rostlinách. Liu et al. (2014) také popsali, že obsah Cu v kořenech kukuřice vzrostl s rostoucí koncentrací Cu v médiu. Tyto skutečnosti mohou naznačovat, že schopnost akumulace Cu v různých rostlinných orgánech závisí na druhu rostlin i na způsobu pěstování. To může způsobit nesrovnalosti mezi dosaženými výsledky. Vědci již naznačili důležitost architektury kořenového systému při získávání živin z prostředí. Architektura kořenového systému byla však zřídka považována za kritérium důležité pro odolnost vůči těžkým kovům. Výše popsané skutečnosti mohou naznačovat nový studijní předmět týkající se obrany proti těžkým kovům v rostlinách.

V naší studii bylo prokázáno, že předošetření SA ovlivnilo schopnost kořenů akumulovat Cu ve stresovaných rostlinách. Předošetření SA totiž způsobilo snížení koncentrace Cu v kořenech. Tento výsledek se shoduje se zjištěními Mei et al. (2015) a Mostofa and Fujita (2013), kteří popsali, že SA brání příjmu Cu. Bylo také popsáno, že SA zvyšuje toleranci vůči stresu z Cu díky buněčné detoxikaci Cu (Tukendorf et al., 1984) a tvorbě ligandů s fytochelatinu (Daud et al., 2009).

Naše výsledky týkající se akumulace mědi korelovaly se změnami v chemickém složení kořenového pletiva při stresu z Cu, což bylo také zjištěno v několika studiích (Fidalgo et al., 2013; Kovácik and Klejdus 2008). Výsledky Ramanovy spektroskopie ukázaly významné rozdíly v chemickém složení kukuřičných kořenů rostoucích v podmínkách stresu z Cu ve srovnání s kontrolou, avšak předošetření SA nemělo na chemické složení kořenů žádný vliv. Byly pozorovány výrazné změny v množství monosacharidů: 872 cm^{-1} , polysacharidů: 933 cm^{-1} , 1081 cm^{-1} , 1122 cm^{-1} a mastných kyselin: 1263 cm^{-1} , 1440 cm^{-1} (Schulz and Baranska, 2007). Kromě toho ionty Cu způsobily významné zvýšení obsahu flavonoidů 1605 cm^{-1} (Schrader et al., 1999) v kořenech rostlin ošetřených Cu. Je známo, že flavonoidy mohou při ochraně rostlin před oxidačním stresem působit jako chelátory těžkých kovů a antioxidanty (Hassan and Mathesius, 2012). Navíc bylo prokázáno, že přítomnost iontů mědi způsobila ztrátu pásma (1047 cm^{-1}),

nicméně chemické studie tohoto pásma zatím nevedly k jeho rozpoznání ani v jiných studiích (Edwards et al., 2005; Kula et al., 2016). Na základě toho lze konstatovat, že rozdíly v chemickém složení jsou výsledkem přestavby kořenových buněk stresovaných Cu, aby se zabránilo dalšímu pronikání Cu do rostliny a také indukci toxických účinků v nadzemní části rostlin.

Je známo, že prvním důsledkem toxicity těžkých kovů v rostlinných buňkách je nadprodukce ROS vedoucí k oxidativnímu stresu (Shahid et al., 2014). Měď patří do skupiny těžkých kovů, které přímo produkují ROS tím, že se účastní redoxních reakcí (Contreras et al., 2009). Rostliny mají různé obranné mechanismy, aby odolaly stresu způsobenému těžkými kovy. Patří sem například vazba těžkých kovů glutathionem, aminokyselinami nebo fytochelatiny a aktivace antioxidantních enzymů. V naší studii bylo zjištěno, že stres z Cu vedl ke zvýšení obsahu ROS v kořenech a snížení v listech. Předpokládáme, že by to mohlo být způsobeno imobilizací Cu v kořenech, čímž zde došlo k jejímu hromadění. Vysoká koncentrace Cu v kořenech vedla k tvorbě nadměrného množství ROS měřeného jako zvýšení hladiny H_2O_2 . Hladina H_2O_2 v kořenech kukuřičných rostlin pěstovaných za stresu z Cu výrazně poklesla po předošetření $500\mu M$ roztokem SA. Tyto výsledky se shodují s předchozími studiemi, které popisují, že předošetření SA vedlo i u jiných druhů rostlin vystavených Cu stresu ke snížení oxidativního stresu snížením obsahu H_2O_2 (Janda et al., 2003; Mostofa and Fujita, 2013).

Rostliny pod stresem z těžkých kovů syntetizují stresové proteiny (Maksymiec, 2007). Mezi nimi jsou zvláště zajímavé proteiny spojené s enzymatickou regulací antioxidantní homeostázy, které mohou významně snížit účinky ROS a které jsou nadměrně produkovány za stresu z mědi. Již dříve bylo popsáno, že expozice sazenic pšenice různým koncentracím Cu mírně zvyšuje akumulaci proteinů ve stoncích, zatímco snižuje jejich obsah v kořenech. Dále bylo zjištěno, že ošetření SA také vykazuje inhibiční účinek na akumulaci proteinů ve stoncích, ale stimuluje akumulaci proteinů v kořenech rostlin pšenice (Al-Hakimi and Hamada, 2011). Podobné výsledky byly dosaženy v našich studiích. Listy a kořeny kukuřičných rostlin pěstovaných v médiu doplněném Cu obsahovaly více proteinů než kontrolní varianty. Zatímco předošetření SA nemělo žádný vliv na obsah proteinů v listech u rostlin rostoucích ve stresu z Cu, v kořenech vedlo k jeho významnému zvýšení.

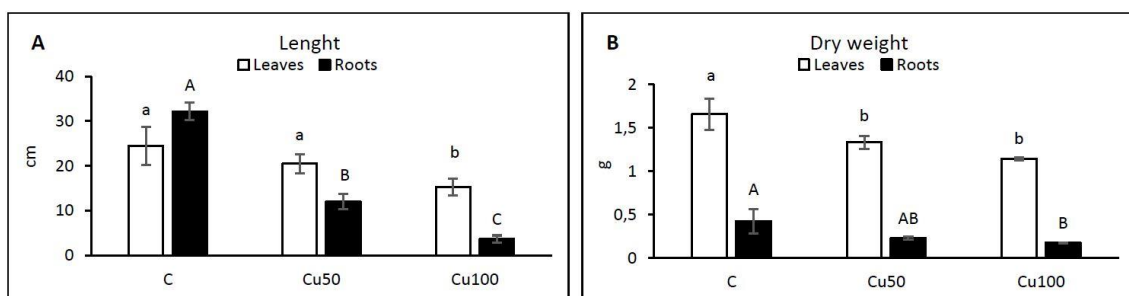
V literatuře se uvádí, že aplikace mědi vedla ke změnám aktivity SOD, POD a CAT (Cetinkaya et al., 2014; Chamseddine et al., 2009; Gao et al., 2008; Singh et al., 2007). Stimulační účinek Cu na enzymatickou aktivitu však závisí na její koncentraci (Gao et al., 2008). V naší studii aplikace 100 μ M CuSO₄ vedla ke zvýšení aktivity MnSODI a CAT u listů kukuřičných rostlin, zatímco v kořenech byly MnSODII a MnSODI zvýšeny a aktivita CAT byla inhibována. Změny v aktivitě antioxidantních enzymů korelují s hladinou H₂O₂. Nejvyšší obsah H₂O₂ byl zjištěn u kořenů rostlin ošetřovaných Cu. Zmírňující účinek předošetření SA na oxidativní stres způsobený těžkými kovy a aktivitu antioxidantních enzymů byl také studován u různých druhů rostlin, včetně kukuřice a rýže zatížené Cu nebo Cd (Krantev et al., 2008; Mostofa and Fujita, 2013; Panda and Patra, 2007). Bylo zjištěno, že předošetření SA zvyšuje aktivitu enzymu SOD podílejícího se na vylučování superoxidových radikálů. Podobně jsme i v naší studii došli k závěru, že předošetření semen SA vedlo ke zvýšení aktivity MnSODI v listech stresovaných rostlin. U kořenů rostlin ošetřovaných SA a rostoucích ve stresu z Cu bylo však pozorováno snížení aktivity MnSODII. Může to být vysvětleno skutečností, že SA v komplexu salicylát-železo má SOD aktivitu a může katalyzovat dismutaci superoxidových radikálů (Yang et al., 2004), čímž snižuje funkci enzymatických antioxidantů.

3.4 Sledování změn v obsahu širokého spektra rostlinných hormonů kukuřice seté v reakci na stres z vysoké koncentrace mědi

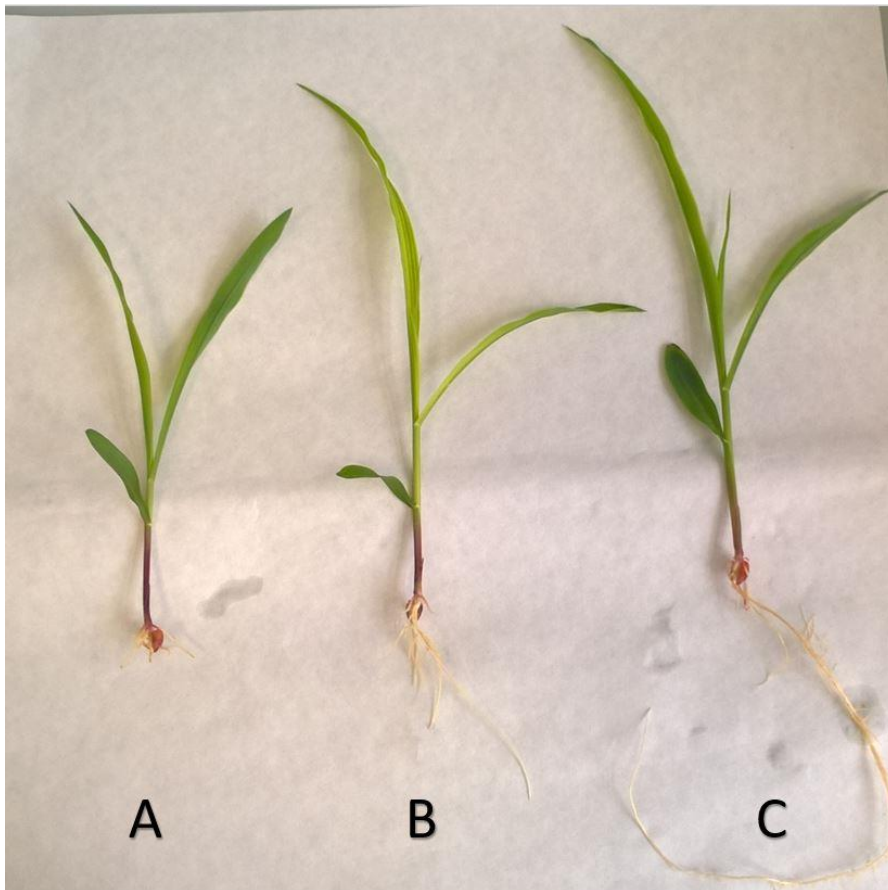
Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, jak se mění obsah hormonů a některých jejich prekurzorů a metabolitů při různě velikém stresu z Cu. Pozorovali jsme také změny v morfologických parametrech, v obsahu fenolických látek, flavonoidů, proteinů a vybraných minerálních látek.

Morfologické parametry

Přidání 50 μ M a 100 μ M CuSO₄ do živného média způsobilo inhibici růstu kukuřice (Obr. 23). Kořeny a listy byly v porovnání s kontrolami menší (Obr. 24). Kořeny rostlin ošetřených 50 μ M CuSO₄ měly strukturu podobnou struktuře kontrolních rostlin, ale byly kratší o 63 %. Hlavní kořeny rostlin ošetřených 100 μ M CuSO₄ byly kratší o 89 %, tlustší s načervenalým zbarvením (Obr. 25). Délka nadzemní části rostlin ošetřených 50 μ M CuSO₄ byla o 16 % nižší než u kontrolních, rostliny ošetřené 100 μ M CuSO₄ byly o 38 % kratší než kontrolní. Kromě změny délky, nebyl zaznamenán u nadzemních částí rostlin žádný rozdíl. Rostliny neměly žádné nekrotické skvrny. Suchá hmotnost listů a kořenů klesala s rostoucí koncentrací CuSO₄ v médiu. (Obr. 23 A, B), u listů až o 31 % ve 100 μ M CuSO₄ a v případě kořenů až o 50 % ve 100 μ M CuSO₄.



Obrázek 23: Změny v délce (A) a suché hmotnosti (B) listů a kořenů rostlin kukuřice po expozici různým ošetřením Cu v 11. dni hydroponického pěstování. Data jsou průměry \pm SD. Hodnoty se stejným písmenem se významně neliší.



Obrázek 24: Změny v délce stonků a kořenů rostlin rostoucích ve $100\mu\text{M CuSO}_4$ (A), $50\mu\text{M CuSO}_4$ (B) a rostliny kontrolní (C) po expozici různým ošetřením Cu v 11. dni hydroponického pěstování.



Obrázek 25: Detail změny morfologie kořene rostlin rostoucích ve $100\mu\text{M CuSO}_4$ (A), $50\mu\text{M CuSO}_4$ (B) a rostliny kontrolní (C) po expozici různým ošetřením Cu v 11. dni hydroponického pěstování.

Obsah hormonů

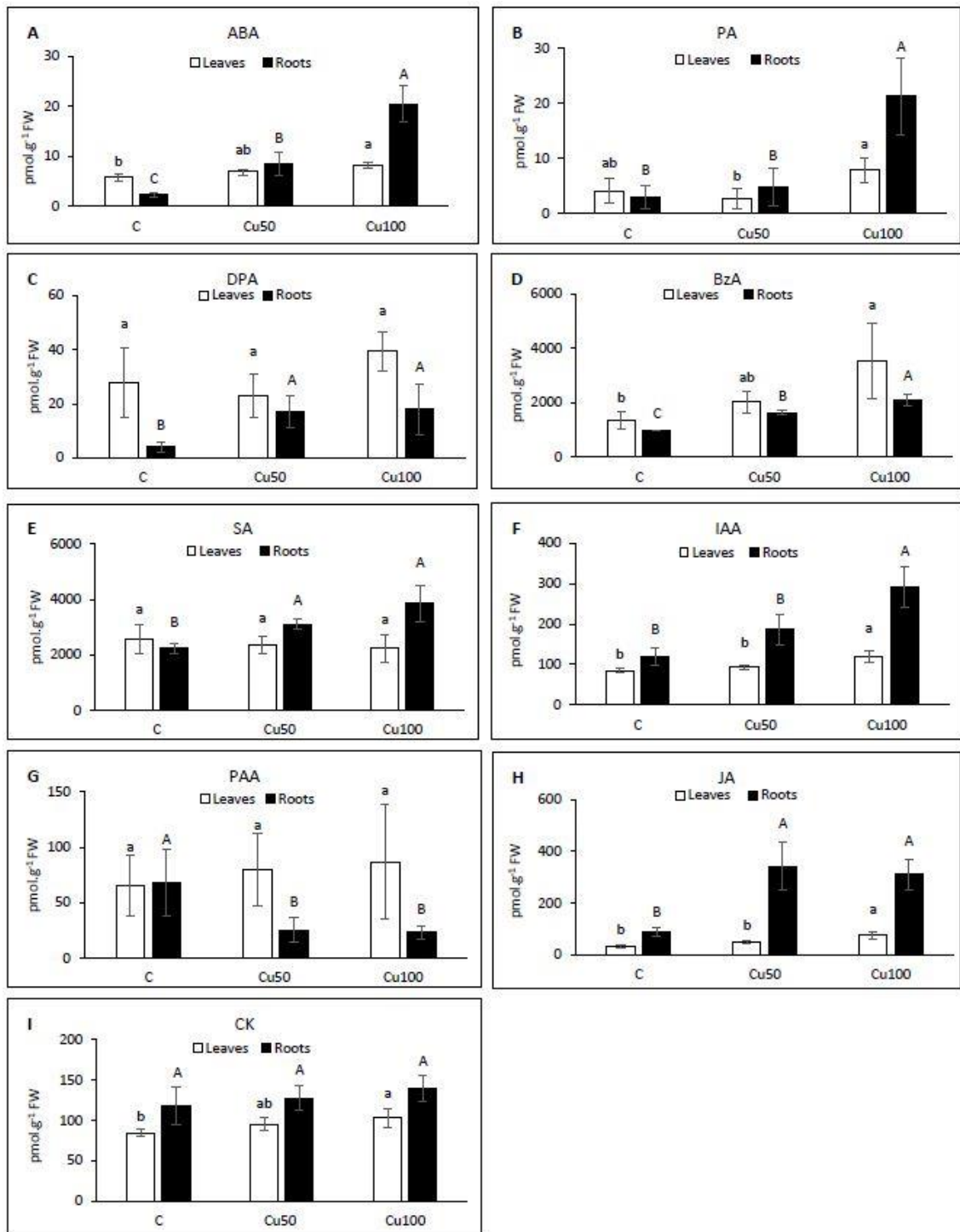
Obsah ABA v listech a kořenech se zvyšoval se zvyšující se koncentrací Cu v živném médiu, přičemž vyšší nárůst byl naměřen v kořenech (Obr. 26 A). Obsah PA, který je metabolitem ABA, mírně poklesl v listech v koncentraci 50 μM CuSO_4 , naopak v porovnání s kontrolou se zvýšil v koncentraci 100 μM CuSO_4 , zatímco obsah následně vzniklého metabolitu DPA se v listech nezměnil. Obsah PA v kořenech se při koncentraci 50 μM CuSO_4 nezměnil, ale zvýšil se při koncentraci 100 μM CuSO_4 a obsah DPA v kořenech se zvýšil v obou použitých koncentracích (Obr. 26 B, C).

Obsah BzA, který je prekurzorem biosyntézy SA, se v listech a kořenech zvyšoval se zvyšující se koncentrací Cu v médiu, také obsah SA v kořenech vzrostl v obou koncentracích Cu, ale obsah SA v listech se po ošetření Cu nezměnil (Obr. 26 D, E).

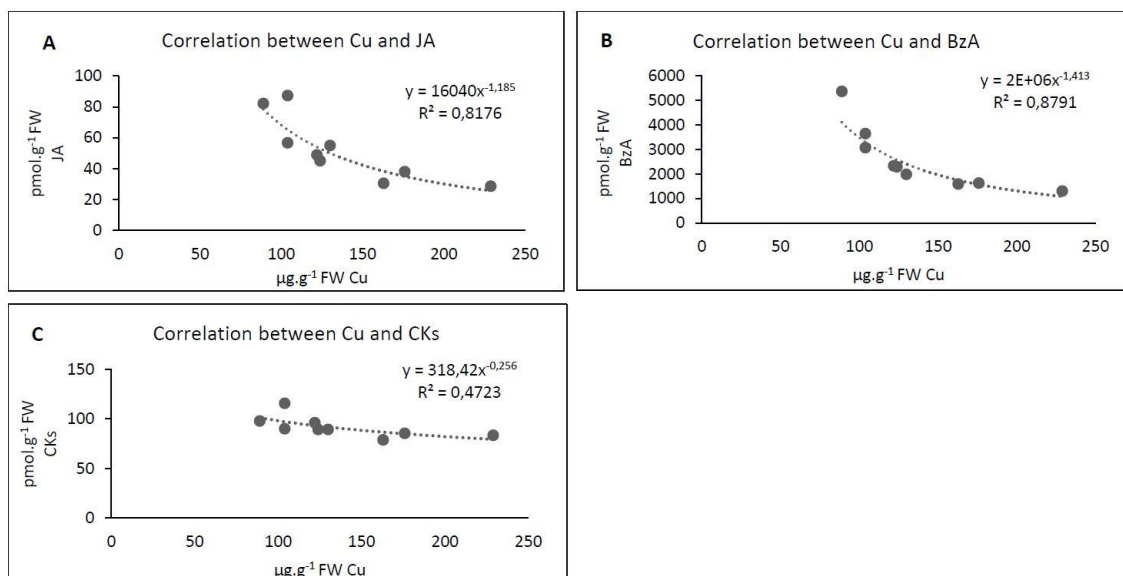
Množství IAA v listech a kořenech se prokazatelně zvýšilo v koncentraci 100 μM CuSO_4 v porovnání s kontrolou. Obsah PAA se v listech nezměnil, ale v obou koncentracích se snížil v kořenech (Obr. 26 F, G).

Obsah aktivních CK a JA v listech se zvyšoval se zvyšující se koncentrací Cu v médiu. Obsah JA v kořenech se zvýšil v obou koncentracích Cu, ale obsah CK v kořenech se nezměnil (Obr. 26 H, I).

Dále byla zjištěna silná negativní korelace mezi obsahem Cu a JA a obsahem Cu a BzA v listech s hodnotou spolehlivosti $R^2 = -0.8176$ a $R^2 = -0.8791$, což znamená, že se zvyšující se koncentrací JA a BzA klesal obsah mědi v listech (Obr. 27 A, B). Mírně negativní korelace byla zjištěna také mezi obsahem Cu a CK v listech s $R^2 = -0,4723$, což opět znamená, že s rostoucí koncentrací CK se koncentrace Cu v listech snižovala (Obr. 27 C).



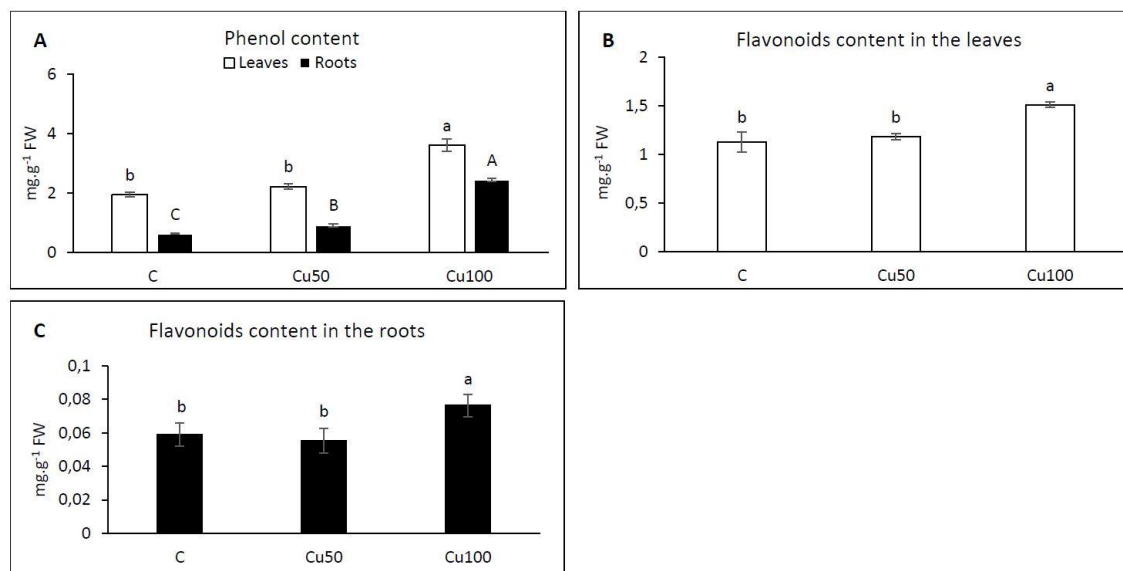
Obrázek 26: Obsah hormonů v listech a kořenech rostlin kukuřice po expozici různým ošetřením Cu v 11. dni hydroponického pěstování. Data jsou průměry ± SD. Hodnoty se stejným písmenem se významně neliší.



Obrázek 27: Korelace mezi obsahem Cu a JA (A), Cu a BzA (B) a Cu a CK (C) v listech rostlin kukuřice po expozici různým ošetřením Cu v 11. dni hydroponického pěstování.

Obsah fenolických látek a flavonoidů

Obsah fenolických látek v kořenech vzrůstal se zvyšující se koncentrací Cu v médiu až o 283 % ve 100 μ M CuSO₄, zatímco jejich obsah v listech vzrostl pouze v koncentraci 100 μ M CuSO₄, a to o 85 % (Obr. 28 A).

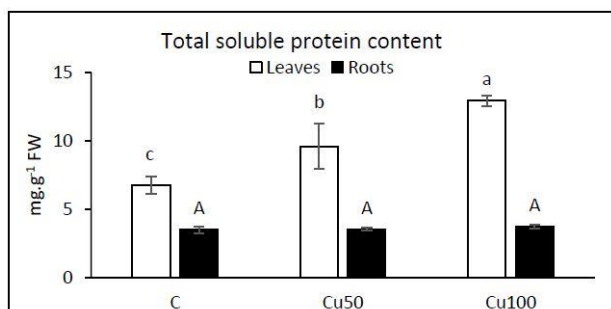


Obrázek 28: Obsah fenolických látek (A) a flavonoidů v listech (B) a kořenech (C) rostlin kukuřice po expozici různým ošetřením Cu v 11. dni hydroponického pěstování. Data jsou průměry \pm SD. Hodnoty se stejným písmenem se významně neliší.

Obsah flavonoidů v listech a kořenech se zvýšil v roztoku CuSO_4 o koncentraci 100 μM (o 34 % a 41 %), ale v koncentraci CuSO_4 50 μM se jejich obsah nezměnil (Obr. 28 B, C).

Obsah proteinů

Obsah celkových rozpustných proteinů v listech se zvyšoval se zvyšující se koncentrací Cu (v 50 μM CuSO_4 o 41 % a ve 100 μM o 91 %). Obsah proteinů v kořenech se však nezměnil (Obr. 29).

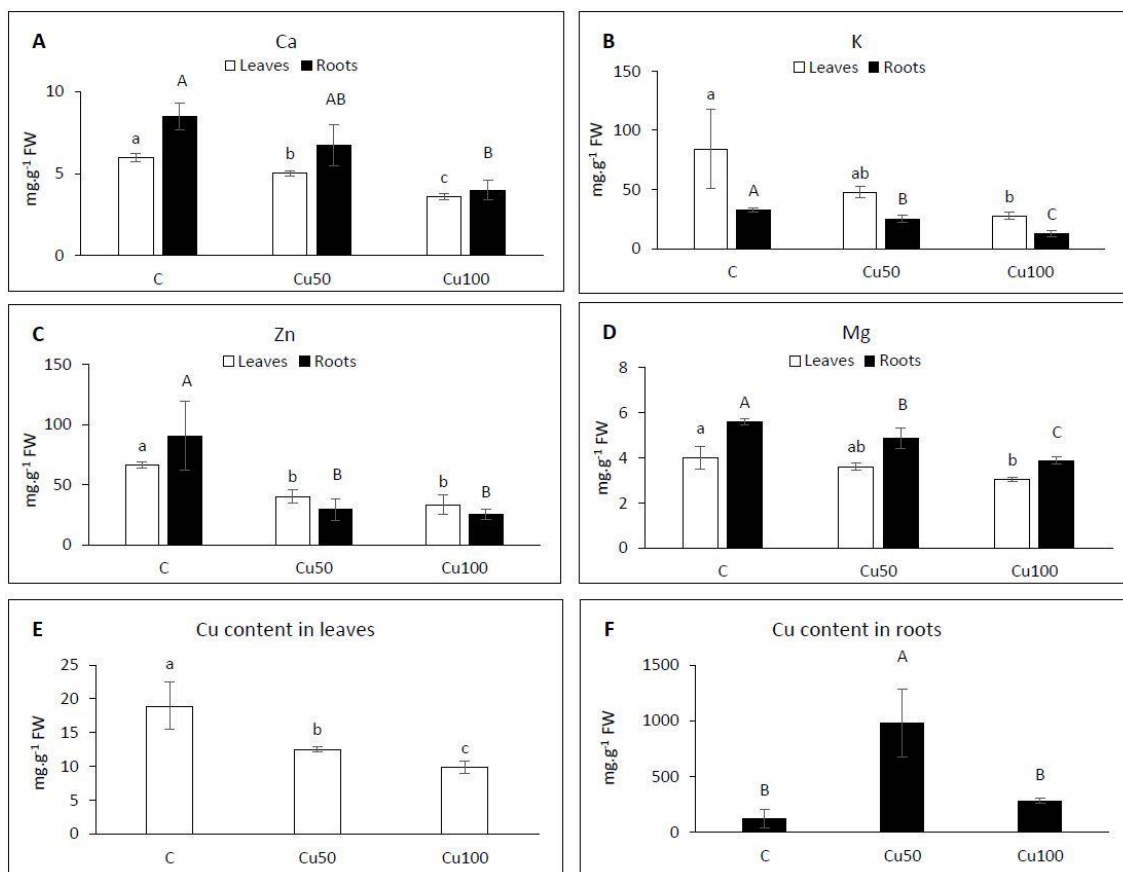


Obrázek 29: Obsah celkových rozpustných proteinů v listech a kořenech rostlin kukuřice po expozici různým ošetřením Cu v 11. dni hydroponického pěstování. Data jsou průměry \pm SD. Hodnoty se stejným písmenem se významně neliší.

Obsah minerálních látek včetně mědi

Obsah Ca a K v kořenech a listech s rostoucí koncentrací Cu v médiu klesal. V případě Ca až o 41 % v listech a 53 % v kořenech a v případě K až o 68 % v listech a 61 % v kořenech ve 100 μM koncentraci CuSO_4 v médiu ve srovnání s kontrolou (Obr. 30 A, B). Obsah Zn v kořenech a listech se snížil v koncentraci 50 μM CuSO_4 stejně jako ve 100 μM CuSO_4 . V listech poklesl až o 50 % a v kořenech až o 72 % (Obr. 30 C). Obsah Mg v listech se snižoval se zvyšující se koncentrací Cu v médiu až o 25 % a také v kořenech se jeho obsah s rostoucí koncentrací Cu snižoval, a to až o 31 % ve 100 μM CuSO_4 v porovnání s kontrolou (Obr. 30 D).

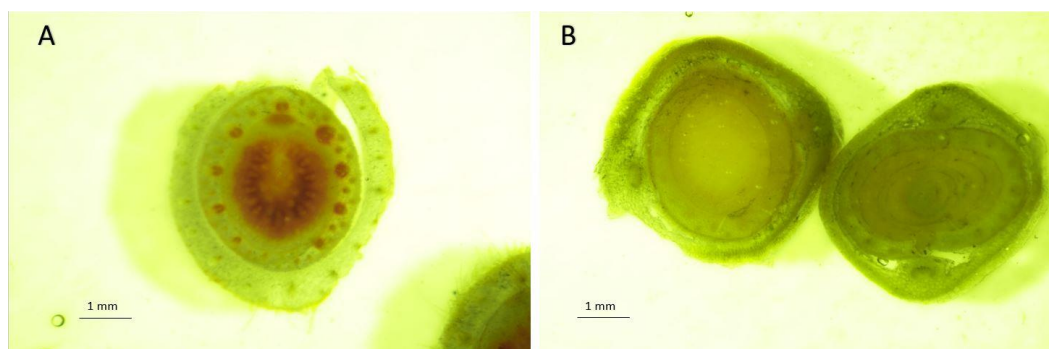
Obsah Cu v listech klesal se zvyšující se koncentrací Cu v živném médiu, a to až o 48 % ve srovnání s kontrolou. Naopak v kořenech se obsah Cu zvýšil v koncentraci 50 μM CuSO_4 cca 8krát, zatímco v koncentraci 100 μM CuSO_4 se obsah zvýšil pouze cca 2krát, a to ještě statisticky nevýznamně oproti kontrole (Obr. 30 E, F).



Obrázek 30: Obsah minerálních prvků v listech a kořenech rostlin kukuřice po expozici různým ošetřením Cu v 11. dni hydroponického pěstování. Data jsou průměry ± SD. Hodnoty se stejným písmenem se významně neliší.

Barvení bivalentních kovů

Barvení bivalentních kovů (včetně Cu²⁺) vytváří červeně zbarvené cheláty s dithizonem. Pouze příčné řezy stonků rostlin pěstovaných v Hoaglandově živném roztoku s esenciální koncentrací Cu byly červeně zbarveny (Obr. 31 A). Stonky rostlin rostoucích v 50 μM nebo ve 100 μM CuSO₄ nebyly zbarveny (Obr. 31 B).



Obrázek 31: Barvení bivalentních kovů v příčném řezu stonkem kontrolní rostliny (A) a rostliny vystavené stresu z Cu (B) v 11. dni hydroponického pěstování.

Diskuse

Je dobře známo, že stres z Cu způsobuje snížení růstu rostlin (Al-Hakimi and Hamada, 2011; Yang et al., 2015). Naše výsledky rovněž ukázaly pokles růstu a hmotnosti rostlin. Na rostlinách však nebyla pozorována žádná nekróza ani jiné poškození. Stejně výsledky jsou také popsány ve studii Sheldon and Menzies (2005). Liší se však od Freitas et al. (2018), kteří popsali změny barvy, struktury a vznik lézí na listech po ošetření Cu.

Jak již bylo uvedeno výše, rostlinné hormony hrají klíčovou roli v obranných mechanismech rostlin proti stresu z těžkých kovů. Jednou z nejrychlejších reakcí na abiotický stres je syntéza ABA, která vyvolává změny v genové expresi (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006). Již v minulosti bylo zjištěno, že obsah ABA stoupá během stresu z těžkých kovů (Bücker-Neto et al., 2017; Perez Chaca et al., 2014). Také v našich studiích byl obsah ABA zvýšen v kořenech i listech, což naznačuje její zapojení do reakce na Cu stres. ABA je známá jako inhibitor růstu, který způsobuje uzavírání průduchů, čímž dochází ke snížení transpirace a také růstu (Wilkinson and Davies, 2010), což může pomoci v reakci na stres z těžkých kovů. Rovněž bylo prokázáno, že exogenní aplikace ABA snižuje transport Cd a Ni z kořenů do listů (Rubio et al., 1994). To se shoduje s naším výzkumem, kde došlo k omezení transportu Cu do listů, takže můžeme předpokládat, že kromě Ni a Cd, ABA také blokuje transport Cu. Zřejmě to také souvisí s tím, že ABA snižuje transpirační tok. Vyšší koncentrace ABA a PA v listech a kořenech a současně žádná změna v koncentraci DPA u rostlin rostoucích ve 100 μ M CuSO₄ naznačuje, že metabolizace PA na DPA v kořenech byla nižší než u kontroly. A byla také nižší v obou koncentracích v listech.

V předchozích studiích bylo zjištěno, že obsah JA vzrostl po ošetření Cu a Cd (Maksymiec et al., 2005). Také náš výzkum ukázal zvýšení obsahu JA v kořenech a listech, což se však liší od výzkumu Perez Chaca et al. (2014), kteří popsali snížení obsahu JA v Cd stresovaných kořenech. JA je považována za signální molekulu, která je spojena s retardací růstu a zrychlením procesu stárnutí (Maksymiec and Krupa, 2007), což může napomáhat při stresu tím, že rostlina soustředí zdroje a energii do obranných mechanismů místo do růstu.

Uvádí se, že stres z těžkých kovů způsobuje snížení obsahu auxinu v *Brassica juncea* (Srivastava et al., 2013). V našich studiích s kukuřicí však koncentrace IAA po

ošetření Cu vzrostla v kořenech i listech. To může naznačovat specifickou reakci jednotlivých druhů na stres. Výsledky se také liší od Sugawara et al. (2015), kteří popisují, že endogenní hladiny PAA jsou mnohem vyšší než hladiny IAA v různých rostlinných pletivech u *Arabidopsis thaliana*. Koncentrace IAA v našem výsledku byla dvakrát nebo i vícekrát vyšší než PAA v listech i kořenech.

Několik studií již ukázalo, že exogenní aplikace SA snižuje účinky těžkých kovů na rostliny (Han et al., 2015; Semida et al., 2015). Podle Mostofa and Fujita (2013) SA brání vstřebávání Cu do rostlin. Dále bylo zjištěno, že BzA (prekurzor biosyntézy SA) indukuje toleranci k biotickému stresu způsobenému *Phytophthora cinnamomi* u *Banksia attenuata* (Williams et al., 2003). V našem výzkumu se obsah BzA a SA po ošetření Cu zvýšil, což potvrzuje předchozí výzkumy a naznačuje zapojení těchto kyselin do obranné reakce na stres z Cu.

Dle výsledků našich analýz se obsah CK v listech po vystavení stresu z Cu zvýšil a nezměnil v kořenech. Podle Veselov et al. (2017) CK udržují růst rostlin při mírném stresu, zatímco pokles CK brání růstu při silném působení stresu, což umožňuje mobilizaci zdrojů a zajištění životaschopnosti rostlin. Bulak et al. (2014) uvedli, že CK mohou snížit obsah Hg v rostlinách rostoucích v kontaminované půdě Hg, což odpovídá našim výsledkům, kde CK také přispěly ke snížení obsahu Cu v rostlinách, což jsme usoudili na základě nalezení negativní korelace mezi Cu a CK. Naopak v jiných studiích zjistili, že vystavení rostlin stresu, například ze zaplavení, vede ke snížení hladin CK (Argueso et al., 2009; Bano et al., 1994), což našim výsledkům neodpovídá.

Silná negativní korelace mezi JA, BzA, CK a Cu naznačuje, že zvyšující se koncentrace JA, BzA a CK způsobily pokles obsahu Cu v listech. Na základě toho můžeme usoudit, že JA, BzA a CK hrají roli při snižování transportu Cu z kořenů do listů.

Naše výsledky ukázaly zvýšení obsahu flavonoidů ve vyšší koncentraci mědi, zatímco v nižší se jejich obsah nezměnil. To je v souladu se zjištěními, že flavonoidy významně přispívají k obranyschopnosti vyšších rostlin na abiotický stres. Ve stresovaných rostlinách mají klíčovou funkci jako antioxidanty tím, že inhibují produkci a snižují obsah ROS. Tyto flavonoidy, zvláště deriváty kvercetinu, ovlivňují pohyb auxinu na intra a intercelulární úrovni a regulují tak vývoj jednotlivých orgánů a celé rostliny (Di Ferdinando et al., 2012). Lachman et al. (2005) popisují

pokles obsahu flavonoidů u ječmene při Cd stresu a vysvětlují, že flavonoidy tvoří chelátové komplexy s kovy, proto v jejich výzkumu zaznamenali pokles volných flavonoidů, zatímco Schulz et al. (2016) popisují, že flavonoidy se hromadí v reakci na abiotické stresy, jako je sucho, chlad a vysoká intenzita světla. Naše výsledky ukazují, že obsah flavonoidů vzrostl ve vyšší koncentraci Cu, zatímco u nižší se nezměnil. Nestejné výsledky mohou být způsobeny rozdíly v použitém kovu, koncentraci, způsobu pěstování nebo použité rostlině. Pokud jde o fenolické látky, v předchozích studiích bylo zjištěno, že obsah fenolických látek vzrostl po aplikaci Cu (Jung et al., 2015), což se shoduje s našimi výsledky.

Obsah celkových rozpustných proteinů v listech se u stresovaných rostlin zvýšil, v kořenech se však nezměnil. Tyto výsledky jsou podobné jako Al-Hakimi and Hamada (2011), kteří zaznamenali zvýšení obsahu proteinů v listech, ale pokles v kořenech po aplikaci Cu. Zvýšení obsahu proteinů v listech bylo pravděpodobně způsobeno zvýšenou syntézou stresových proteinů (Maksymiec, 2011). V kořenech se jejich obsah nezměnil, protože jeho zvýšení bylo zřejmě současně sníženo toxickým účinkem Cu, která působí primárně a nejvíce na kořeny. Již z předchozích studií je známo, že Cu způsobuje tvorbu ROS, které způsobují degradaci proteinů (Palma et al., 2002).

V minulosti bylo zjištěno, že stres z Cu snižuje obsah základních minerálních látek v rostlinách (Ke et al., 2007). Podobně i v našem výzkumu byl obsah Ca, K, Zn a Mg v rostlinách snížen po pěstování ve stresu z Cu. Bylo však zjištěno, že listy rostlin kultivovaných v kontrolních podmínkách obsahovaly vyšší hladiny Cu než ty kultivované pod stresem Cu. Obsah Cu v listech se snižoval s rostoucí koncentrací Cu v médiu. Podobné výsledky jsme již popsali v našem předchozím výzkumu (Moravcova et al., 2018). Koncentrace Cu v kořenech se v našem výzkumu zvýšila u rostlin pěstovaných v médiu s $50\mu\text{M}$ CuSO_4 , ale ve $100\mu\text{M}$ CuSO_4 zůstala stejná jako u kontroly. Je dobře známo, že rostliny mohou snížit absorpci Cu jako obranu proti příjmu vysokých koncentrací Cu (Benimeli et al., 2009). To se pravděpodobně stalo během transportu Cu do listů v obou koncentracích CuSO_4 a u kořenů ve vyšší koncentraci CuSO_4 . Při nižší koncentraci Cu v médiu nedošlo zřejmě k tak intenzivnímu blokování Cu do kořenů. Naopak Ke et al. (2007), Liu et al. (2014), Mostofa and Fujita (2013) zjistili, že koncentrace Cu se v rostlinných pletivech zvyšovala se zvyšující se koncentrací Cu v roztoku. Rozdílné výsledky popsané

v literatuře jsou nejspíše způsobeny různými způsoby kultivace a použitím různých druhů rostlin.

Při barvení bivalentních kovů se ukázalo, že pouze příčné řezy stonků rostlin pěstovaných v Hoaglandově živném médiu s esenciální koncentrací Cu byly červeně zbarveny. Stonky rostlin rostoucích v 50 μ M nebo ve 100 μ M CuSO₄ nebyly zbarveny. To potvrzuje, že v kontrolních rostlinách byla vyšší koncentrace Cu než u stresovaných rostlin. Stresované rostliny také mohly chelatovat kovy ve větší míře, a tím pádem nemohly být kovy obarveny. K podobnému výsledku jsme již dospěli v předchozí studii (Moravcova et al., 2018), kde jsme sledovali pouze koncentraci 100 μ M CuSO₄.

Závěr

V této práci jsou popsány výsledky několika experimentů prováděných na kukuřici seté (*Zea mays* L.), která byla pěstována v hydroponických nádobách v řízených podmínkách klimaboxu za použití Hoaglandova živného roztoku. Přidávány byly těžké kovy Cu (CuSO_4) a Cd ($(\text{CdNO}_3)_2$). Předmětem zkoumání byly obranné mechanismy rostlin při působení těchto stresových faktorů a také vliv předošetření semen SA. V rámci analýz byl měřen obsah proteinů, H_2O_2 , prvků, MDA atd. jako ukazatelů stresu. Zajímaly nás také změny v intenzitě fotosyntézy, rychlosti transpirace, vodivosti průduchů, fluorescence, morfologických a anatomických parametrech. Předmětem experimentů bylo i analyzování změn v obsahu vybraných hormonů, jejich prekurzorů a metabolitů, dále pak vliv SA na klíčení semen.

Aplikace Cd do živného roztoku měla za následek snížení velikosti nadzemních i podzemních částí rostlin, zvýšení fluorescence, snížení transpirace a vodivosti průduchů, snížení obsahu H_2O_2 v kořenech, zvýšení obsahu MDA a snížení obsahu Ca, Mg, K, a Zn v kořenech i v listech. Dále došlo ke snížení obsahu Cu, ale pouze v kořenech a zvýšení obsahu Cd v kořenech i v listech.

Pozitivní vliv předošetření SA na rostliny stresované Cd se projevil ve snížení fluorescence chlorofylu, zvýšení obsahu H_2O_2 (zřejmě s funkcí signální molekuly), zvýšení příjmu Cu a snížení příjmu Cd. Naopak negativní vliv měla SA na intenzitu fotosyntézy, vodivost průduchů, transpiraci a příjem minerálních prvků.

Stres z Cu způsobil snížení velikosti nadzemních i podzemních částí rostlin, snížení obsahu chlorofylu a karotenoidů, značný pokles účinnosti necyklického transportu elektronů a poměru absorpční energie využívané v PSII (YII), zvýšení parametru nefotochemického zhášení (NPQ). Obsah H_2O_2 se v kořenech zvýšil, ale v listech snížil. Předpokládáme, že by to mohlo být způsobeno imobilizací Cu v kořenech, kde stres působil nejvíce. Dále došlo ke zvýšení obsahu obranných látek, jako jsou flavonoidy, fenoly a proteiny, a poklesu obsahu minerálních živin Ca, K, Zn a Mg.

Bylo pozorováno signifikantní snížení obsahu Cu u stresovaných rostlin v listech, v kořenech se obsah Cu zvýšil pouze v nižší koncentraci Cu ($50\mu\text{M}$ CuSO_4) a ve $100\mu\text{M}$ koncentraci CuSO_4 zůstal buď stejný, nebo nižší než u kontroly. Můžeme

předpokládat, že obranné mechanismy proti toxickému účinku Cu při růstu rostlin kukuřice se nacházejí především v kořenech. Změny v chemickém složení kořenového pletiva představují ochranné mechanismy, které blokují tok Cu do dalších orgánů, čímž chrání proti oxidativnímu stresu a poškození buněk. Nicméně chemická reorganizace pletiv kořene omezuje také absorpci minerálů potřebných pro normální růst, což může vést k inhibici růstu.

Bylo zjištěno, že při barvení bivalentních kovů, kam spadá i Cu^{2+} , v kukuřičných stoncích došlo k silnému červenému zbarvení pouze u rostlin pěstovaných v Hoaglandově médiu s esenciální koncentrací Cu. U stonků rostlin kultivovaných v médiu s vysokou koncentrací Cu se charakteristické červené zbarvení neobjevilo. Podle analýz bylo sice ve stoncích stresovaných rostlin Cu méně než v kontrolních, ale zřejmě došlo ke změně oxidačního čísla z důvodu navázání Cu po aktivaci obranných mechanismů.

Obsah ABA v kukuřici se po stresu z Cu zvýšil, což by naznačovalo její zapojení do obranných mechanismů a také do mechanismu, který zajišťuje blokování transportu Cu do nadzemních částí rostlin. Silná negativní korelace mezi JA, BzA, CK a Cu naznačila jejich úlohu při snižování transportu Cu z kořenů do listů. Cu stres zvýšil obsah ABA, PA, BzA, IAA, JA a CK v listech a ABA, PA, DPA, BzA, SA, IAA a JA v kořenech. Obsah DPA, SA a PAA v listech se nezměnil. V kořenech se obsah PAA snížil a CK nezměnil.

Exogenní aplikace SA na semena kukuřice, která následně rostla v roztoku obohaceném Cu, projevila své ochranné účinky tím, že inhibovala translokaci Cu a zmírnila oxidační stres v kořenech způsobený stresem z Cu. SA také ovlivnila aktivitu některých antioxidantních enzymů, nicméně nelze vyloučit, že SA může také účinně odstraňovat ROS sama o sobě. SA také zvýšila obsah proteinů a zmírnila negativní účinek Cu na obsah karotenoidů. Dále bylo zjištěno, že exogenně aplikovaná SA v závislosti na své koncentraci snižuje nebo zvyšuje endogenní hladinu SA v semenech a v naklíčených kořenech a urychluje klíčení semen.

Vliv SA na obsah H_2O_2 se liší v pokusu s Cd a s Cu. Při stresu z Cd mělo předošetření SA za následek zvýšení H_2O_2 , při stresu z Cu však jeho snížení. Podle literatury by SA měla hladinu ROS u stresovaných rostlin snižovat, ale jak je popsáno v diskusi, některé studie uvádějí, že SA může obsah ROS i zvyšovat. Rozdílné výsledky mohou být důsledkem použití jiného těžkého kovu nebo rozdílnou dávkou.

Role SA v obranných mechanismech rostlin na těžké kovy se zdá být velice komplikovaná a pro hlubší pochopení jejích účinků bude potřeba dalších výzkumů. Podle našich výsledků lze říci, že předošetření semen SA má pozitivní vliv na rostliny stresované těžkými kovy.

Literatura

- Abuja, P.M., Albertini, R., 2001. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 306, 1–17. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(01\)00393-X](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(01)00393-X)
- Achuo, E.A., Audenaert, K., Meziane, H., Höfte, M., 2004. The salicylic acid-dependent defence pathway is effective against different pathogens in tomato and tobacco. *Plant Pathol.* 53, 65–72. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2004.00947.x>
- Ahsan, N., Lee, D.-G., Lee, S.-H., Kang, K.Y., Lee, J.J., Kim, P.J., Yoon, H.-S., Kim, J.-S., Lee, B.-H., 2007. Excess copper induced physiological and proteomic changes in germinating rice seeds. *Chemosphere* 67, 1182–1193. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.10.075>
- Ahsan, N., Renaut, J., Komatsu, S., 2009. Recent developments in the application of proteomics to the analysis of plant responses to heavy metals. *Proteomics* 9, 2602–2621. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800935>
- Akinyemi, A.J., Faboya, O.L., Olayide, I., Faboya, O.A., Ijabadeniyi, T., 2017. Effect of Cadmium Stress on Non-enzymatic Antioxidant and Nitric Oxide Levels in Two Varieties of Maize (*Zea mays*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 98, 845–849. <https://doi.org/10.1007/s00128-017-2069-7>
- Al-Hakimi, A.-B.M., Hamada, A.M., 2011. Ascorbic Acid, Thiamine or Salicylic Acid Induced Changes in Some Physiological Parameters in Wheat Grown under Copper Stress. *Plant Prot. Sci.* 47, 92–108.
- Ali, G., Srivastava, P.S., Iqbal, M., 2000. Influence of cadmium and zinc on growth and photosynthesis of *Bacopa monniera* cultivated in vitro. *Biol. Plant.* 43, 599–601. <https://doi.org/10.1023/A:1002852016145>
- Ali, M.B., Hahn, E.-J., Paek, K.-Y., 2007. Methyl jasmonate and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolics in *Panax ginseng* bioreactor root suspension cultures. *Mol. Basel Switz.* 12, 607–621.
- Anh Tuan, T., Popova, L., 2013. Functions and toxicity of cadmium in plants: Recent advances and future prospects. *Turk. J. Bot.* 37, 1–13. <https://doi.org/10.3906/bot-1112-16>
- Anjum, S.A., Tanveer, M., Hussain, S., Ashraf, U., Khan, I., Wang, L., 2017. Alteration in Growth, Leaf Gas Exchange, and Photosynthetic Pigments of Maize Plants Under Combined Cadmium and Arsenic Stress. *Water. Air. Soil Pollut.* 228, 13. <https://doi.org/10.1007/s11270-016-3187-2>
- 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., 2016a. Osmoregulation and antioxidant production in maize under combined cadmium and arsenic stress. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 11864–11875. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6382-1>
- Anjum, S.A., Tanveer, M., Hussain, S., Ullah, E., Wang, L., Khan, I., Samad, R.A., Tung, S.A., Anam, M., Shahzad, B., 2016b. Morpho-Physiological Growth and Yield Responses of Two Contrasting Maize Cultivars to Cadmium Exposure. *Clean-Soil Air Water* 44, 29–36. <https://doi.org/10.1002/clen.201400905>
- Argueso, C.T., Ferreira, F.J., Kieber, J.J., 2009. Environmental perception avenues: The interaction of cytokinin and environmental response pathways. *Plant*

- Cell Environ. 32, 1147–1160. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01940.x>
- Artiushenko, T., Syshchykov, D., Gryshko, V., Ciamporova, M., Fiala, R., Repka, V., Martinka, M., Pavlovkin, J., 2014. Metal uptake, antioxidant status and membrane potential in maize roots exposed to cadmium and nickel. *Biologia (Bratisl.)* 69, 1142–1147. <https://doi.org/10.2478/s11756-014-0414-4>
- Asgher, M., Khan, M.I.R., Anjum, N.A., Khan, N.A., 2015. Minimising toxicity of cadmium in plants-role of plant growth regulators. *Protoplasma* 252, 399–413. <https://doi.org/10.1007/s00709-014-0710-4>
- Awasthi, S.K., 2000. Prevention of food adulteration Act No. 37 of 1954.
- Backer, R., Mahomed, W., Reeksting, B.J., Engelbrecht, J., Ibarra-Laclette, E., van den Berg, N., 2015. Phylogenetic and expression analysis of the NPR1-like gene family from *Persea americana* (Mill.). *Front. Plant Sci.* 6, 300. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00300>
- Baghizadeh, A., 2011. Effect of drought stress and its interaction with ascorbate and salicylic acid on okra (*Hibiscus esculents* L.) germination and seedling growth. *J. Stress Physiol. Biochem.* 7, 55–65.
- Bai, X., Dong, Y., Kong, J., Xu, L., Liu, S., 2015. Effects of application of salicylic acid alleviates cadmium toxicity in perennial ryegrass. *Plant Growth Regul.* 75, 695–706. <https://doi.org/10.1007/s10725-014-9971-3>
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 99, 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
- Balcke, G.U., Handrick, V., Bergau, N., Fichtner, M., Henning, A., Stellmach, H., Tissier, A., Hause, B., Frolov, A., 2012. An UPLC-MS/MS method for highly sensitive high-throughput analysis of phytohormones in plant tissues. *Plant Methods* 8, 47. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-8-47>
- Bano, A., Hansen, H., Dorffling, K., Hahn, H., 1994. Changes in the Contents of Free and Conjugated Abscisic-Acid, Phaseic Acid and Cytokinins in Xylem Sap of Drought-Stressed Sunflower Plants. *Phytochemistry* 37, 345–347. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)85058-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)85058-5)
- Baszyński, T., Tukendorf, A., Ruszkowska, M., Skórzyńska, E., Maksymieci, W., 1988. Characteristics of the Photosynthetic Apparatus of Copper Non-tolerant Spinach Exposed to Excess Copper. *J. Plant Physiol.* 132, 708–713. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(88\)80233-5](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(88)80233-5)
- Bavi, K., Kholdebarin, B., Moradshahi, A., 2011. Effect of Cadmium on Growth, Protein Content and Peroxidase Activity in Pea Plants. *Pak. J. Bot.* 43, 1467–1470.
- Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44, 276–287.
- Belkhadi, A., Hediji, H., Abbes, Z., Nouairi, I., Barhoumi, Z., Zarrouk, M., Chaïbi, W., Djebali, W., 2010. Effects of exogenous salicylic acid pre-treatment on cadmium toxicity and leaf lipid content in *Linum usitatissimum* L. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1004–1011. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.03.009>
- Bell, F.G., Bullock, S.E.T., Hällich, T.F.J., Lindsay, P., 2001. Environmental impacts associated with an abandoned mine in the Witbank Coalfield, South Africa. *Int. J. Coal Geol., Geotechnical and Environmental Issues related to Coal Mining* 45, 195–216. [https://doi.org/10.1016/S0166-5162\(00\)00033-1](https://doi.org/10.1016/S0166-5162(00)00033-1)

- Benavides, M.P., Gallego, S.M., Tomaro, M.L., 2005. Cadmium toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 17, 21–34. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202005000100003>
- Benimeli, C.S., Medina, A., Navarro, C.M., Medina, R.B., Amoroso, M.J., Gómez, M.I., 2009. Bioaccumulation of Copper by *Zea mays*: Impact on Root, Shoot and Leaf Growth. *Water. Air. Soil Pollut.* 210, 365–370. <https://doi.org/10.1007/s11270-009-0259-6>
- Berkowitz, O., De Clercq, I., Van Breusegem, F., Whelan, J., 2016. Interaction between hormonal and mitochondrial signalling during growth, development and in plant defence responses. *Plant Cell Environ.* 39, 1127–1139. <https://doi.org/10.1111/pce.12712>
- Bert, V., Meerts, P., Saumitou-Laprade, P., Salis, P., Gruber, W., Verbruggen, N., 2003. Genetic basis of Cd tolerance and hyperaccumulation in *Arabidopsis halleri*. *Plant Soil* 249, 9–18. <https://doi.org/10.1023/A:1022580325301>
- Bielen, A., Remans, T., Vangronsveld, J., Cuypers, A., 2013. The influence of metal stress on the availability and redox state of ascorbate, and possible interference with its cellular functions. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 6382–6413. <https://doi.org/10.3390/ijms14036382>
- Borsani, O., Valpuesta, V., Botella, M.A., 2001. Evidence for a Role of Salicylic Acid in the Oxidative Damage Generated by NaCl and Osmotic Stress in *Arabidopsis* Seedlings. *Plant Physiol.* 126, 1024–1030. <https://doi.org/10.1104/pp.126.3.1024>
- Bouazizi, H., Jouili, H., Ferjani, E., 2007. Copper-induced oxidative stress in maize shoots (*Zea mays* L.): H₂O₂ accumulation and peroxidases modulation. *Acta Biol. Hung.* 58, 209–218. <https://doi.org/10.1556/ABiol.58.2007.2.7>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bücker-Neto, L., Paiva, A.L.S., Machado, R.D., Arenhart, R.A., Margis-Pinheiro, M., 2017. Interactions between plant hormones and heavy metals responses. *Genet. Mol. Biol.* 40, 373–386. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0087>
- Bulak, P., Walkiewicz, A., Brzezińska, M., 2014. Plant growth regulators-assisted phytoextraction. *Biol. Plant.* 58, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s10535-013-0382-5>
- Cailliatte, R., Lapeyre, B., Briat, J.-F., Mari, S., Curie, C., 2009. The NRAMP6 metal transporter contributes to cadmium toxicity. *Biochem. J.* 422, 217–228. <https://doi.org/10.1042/BJ20090655>
- Canakci, S., Dursun, B., 2013. Amelioration of Cd toxicity by pretreatment of salicylic acid in *Cicer arietinum* L. seedlings. *J. Environ. Biol.* 34, 1089–1094.
- Cao, S., Xu, Q., Cao, Y., Qian, K., An, K., Zhu, Y., Binzeng, H., Zhao, H., Kuai, B., 2005. Loss-of-function mutations in DET2 gene lead to an enhanced resistance to oxidative stress in *Arabidopsis*. *Physiol. Plant.* 123, 57–66. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2004.00432.x>
- Carvalho Bertoli, A., Gabriel Cannata, M., Carvalho, R., Ribeiro Bastos, A.R., Puggina Freitas, M., dos Santos Augusto, A., 2012. *Lycopersicon esculentum* submitted to Cd-stressful conditions in nutrition solution: Nutrient contents

- and translocation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 86, 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.09.011>
- Cetinkaya, H., Seckin Dinler, B., Tasci, E., 2014. Investigation of Comparative Regulation on Antioxidant Enzyme System under Copper Treatment and Drought Stress in Maize (*Zea mays* L.). *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca* 42, 363–371. <https://doi.org/10.15835/nbha4229632>
- Chamseddine, M., Wided, B.A., Guy, H., Marie-Edith, C., Fatma, J., 2009. Cadmium and copper induction of oxidative stress and antioxidative response in tomato (*Solanum lycopersicon*) leaves. *Plant Growth Regul.* 57, 89–99. <https://doi.org/10.1007/s10725-008-9324-1>
- Chen, Z., Silva, H., Klessig, D.F., 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262, 1883–1886.
- Cheynier, V., 2012. Phenolic compounds: from plants to foods. *Phytochem. Rev.* 11, 153–177. <https://doi.org/10.1007/s11101-012-9242-8>
- Chmielowska-Bąk, J., Lefèvre, I., Lutts, S., Deckert, J., 2013. Short term signaling responses in roots of young soybean seedlings exposed to cadmium stress. *J. Plant Physiol.* 170, 1585–1594. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.06.019>
- Coe, E.H., 2001. The origins of maize genetics. *Nat. Rev. Genet.* 2, 898–905. <https://doi.org/10.1038/35098524>
- Contreras, L., Mella, D., Moenne, A., Correa, J.A., 2009. Differential responses to copper-induced oxidative stress in the marine macroalgae *Lessonia nigrescens* and *Scytosiphon lomentaria* (*Phaeophyceae*). *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 94, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.06.004>
- Daud, M.K., Sun, Y., Dawood, M., Hayat, Y., Variath, M.T., Wu, Y.-X., Raziuddin, null, Mishkat, U., Salahuddin, null, Najeeb, U., Zhu, S., 2009. Cadmium-induced functional and ultrastructural alterations in roots of two transgenic cotton cultivars. *J. Hazard. Mater.* 161, 463–473. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.03.128>
- De Vos, C.H.R., Schat, H., De Waal, M. a. M., Vooijs, R., Ernst, W.H.O., 1991. Increased resistance to copper-induced damage of the root cell plasmalemma in copper tolerant *Silene cucubalus*. *Physiol. Plant.* 82, 523–528. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1991.tb02942.x>
- Demidchik, V., Davenport, R.J., Tester, M., 2002. Nonselective cation channels in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 67–107. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.091901.161540>
- Demiral, T., Türkan, İ., 2005. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environ. Exp. Bot.* 53, 247–257. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2004.03.017>
- Deng, B., Yang, K., Zhang, Y., Li, Z., 2016. Can heavy metal pollution defend seed germination against heat stress? Effect of heavy metals (Cu²⁺, Cd²⁺ and Hg²⁺) on maize seed germination under high temperature. *Environ. Pollut.* 216, 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.050>
- Di Ferdinando, M., Brunetti, C., Fini, A., Tattini, M., 2012. *Flavonoids as Antioxidants in Plants Under Abiotic Stresses*. Springer, New York.
- Dietz, K.-J., Baier, M., Krämer, U., 1999. Free Radicals and Reactive Oxygen Species as Mediators of Heavy Metal Toxicity in Plants, in: *Heavy Metal Stress in*

- Plants. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 73–97.
https://doi.org/10.1007/978-3-662-07745-0_4
- Dobrev, P., Vankova, R., 2012. Quantification of abscisic acid, cytokinin, and auxin content in salt-stressed plant tissues. *Methods in Molecular Biology* 251–261.
- Dobrev, P.I., Kamínek, M., 2002. Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A* 950, 21–29.
- Dolatabadian, A., Sanavy, S.A.M.M., Sharifi, M., 2009. Effect of salicylic acid and salt on wheat seed germination. *Acta Agric. Scand. Sect. B-Soil Plant Sci.* 59, 456–464. <https://doi.org/10.1080/09064710802342350>
- Dong, J., Wu, F., Zhang, G., 2006. Influence of cadmium on antioxidant capacity and four microelement concentrations in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum*). *Chemosphere* 64, 1659–1666. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.01.030>
- Drazic, G., Mihailovic, N., 2005. Modification of cadmium toxicity in soybean seedlings by salicylic acid. *Plant Sci.* 168, 511–517. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.09.019>
- Drażkiewicz, M., Skórzyńska-Polit, E., Krupa, Z., 2004. Copper-induced oxidative stress and antioxidant defence in *Arabidopsis thaliana*. *Biometals* 17, 379–387. <https://doi.org/10.1023/B:BIOM.0000029417.18154.22>
- Du, L., Ali, G.S., Simons, K.A., Hou, J., Yang, T., Reddy, A.S.N., Poovaiah, B.W., 2009. Ca²⁺/calmodulin regulates salicylic-acid-mediated plant immunity. *Nature* 457, 1154–1158. <https://doi.org/10.1038/nature07612>
- Du, L., Xia, X., Lan, X., Liu, M., Zhao, L., Zhang, P., Wu, Y., 2017. Influence of Arsenic Stress on Physiological, Biochemical, and Morphological Characteristics in Seedlings of Two Cultivars of Maize (*Zea mays* L.). *Water, Air, Soil Pollut.* 228, 55. <https://doi.org/10.1007/s11270-016-3231-2>
- Edwards, H.G.M., Moody, C.D., Jorge Villar, S.E., Wynn-Williams, D.D., 2005. Raman spectroscopic detection of key biomarkers of cyanobacteria and lichen symbiosis in extreme Antarctic habitats: Evaluation for Mars Lander missions. *Icarus, Mars Polar Science III* 174, 560–571. <https://doi.org/10.1016/j.icarus.2004.07.029>
- El-Esawi, M.A., Elansary, H.O., El-Shanhorey, N.A., Abdel-Hamid, A.M.E., Ali, H.M., Elshikh, M.S., 2017. Salicylic Acid-Regulated Antioxidant Mechanisms and Gene Expression Enhance Rosemary Performance under Saline Conditions. *Front. Physiol.* 8, 716. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00716>
- Elloumi, N., Zouari, M., Chaari, L., Jomni, C., Ben Rouina, B., Ben Abdallah, F., 2014. Ecophysiological responses of almond (*Prunus dulcis*) seedlings to cadmium stress. *Biologia (Bratisl.)* 69, 604–609. <https://doi.org/10.2478/s11756-014-0348-x>
- Ernst, W.H., Nelissen, H.J., 2000. Life-cycle phases of a zinc- and cadmium-resistant ecotype of *Silene vulgaris* in risk assessment of polymetallic mine soils. *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987 107, 329–338.
- Faghih, S., Ghobadi, C., Zarei, A., 2017. Response of Strawberry Plant cv. “Camarosa” to Salicylic Acid and Methyl Jasmonate Application Under Salt Stress Condition. *J. Plant Growth Regul.* 36, 651–659. <https://doi.org/10.1007/s00344-017-9666-x>

- Fahad, S., Hussain, S., Bano, A., Saud, S., Hassan, S., Shan, D., Khan, F.A., Khan, F., Chen, Y., Wu, C., Tabassum, M.A., Chun, M.X., Afzal, M., Jan, A., Jan, M.T., Huang, J., 2015. Potential role of phytohormones and plant growth-promoting rhizobacteria in abiotic stresses: consequences for changing environment. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22, 4907–4921. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3754-2>
- Fidalgo, F., Azenha, M., Silva, A.F., de Sousa, A., Santiago, A., Ferraz, P., Teixeira, J., 2013. Copper-induced stress in *Solanum nigrum* L. and antioxidant defense system responses. *Food Energy Secur.* 2, 70–80. <https://doi.org/10.1002/fes3.20>
- Freeman, J.L., Garcia, D., Kim, D., Hopf, A., Salt, D.E., 2005. Constitutively Elevated Salicylic Acid Signals Glutathione-Mediated Nickel Tolerance in *Thlaspi Nickel* Hyperaccumulators. *Plant Physiol.* 137, 1082–1091. <https://doi.org/10.1104/pp.104.055293>
- Freeman, J.L., Persans, M.W., Nieman, K., Albrecht, C., Peer, W., Pickering, I.J., Salt, D.E., 2004. Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators. *Plant Cell* 16, 2176–2191. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.023036>
- Freitas, F., Lunardi, S., Souza, L.B., von der Osten, J.S.C., Arruda, R., Andrade, R.L.T., Battirola, L.D., 2018. Accumulation of copper by the aquatic macrophyte *Salvinia biloba* Raddi (*Salviniaceae*). *Braz. J. Biol.* 78, 133–139. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.166377>
- Gallego, S.M., Pena, L.B., Barcia, R.A., Azpilicueta, C.E., Lannone, M.F., Rosales, E.P., Zawoznik, M.S., Groppa, M.D., Benavides, M.P., 2012. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms. *Environ. Exp. Bot.* 83, 33–46. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.04.006>
- Gao, S., Yan, R., Cao, M., Yang, W., Wang, S., Chen, F., 2008. Effects of copper on growth, antioxidant enzymes and phenylalanine ammonia-lyase activities in *Jatropha curcas* L. seedling. *Plant Soil Environ.* 54, 117–122.
- Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* PPB 48, 909–930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Gogolakova, A., Hegeduesova, A., Svikruhova, J., Strba, P., Bolecek, P., 2008. Application of chlorophyll fluorescence to detect chelate-induced cadmium stress in *Zea mays*. *Comp. Biochem. Physiol. -Mol. Integr. Physiol.* 150, S160–S160. <https://doi.org/10.1016/i.cbpa.2008.04.418>
- Gondor, O.K., Janda, T., Soós, V., Pál, M., Majláth, I., Adak, M.K., Balázs, E., Szalai, G., 2016. Salicylic Acid Induction of Flavonoid Biosynthesis Pathways in Wheat Varies by Treatment. *Front. Plant Sci.* 7, 1447. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01447>
- Gould, K.S., 2010. Muriel Wheldale Onslow and the Rediscovery of Anthocyanin Function in Plants, in: *Recent Advances in Polyphenol Research*. Wiley-Blackwell, pp. 206–225. <https://doi.org/10.1002/9781444323375.ch7>
- Groppa, M.D., Ianuzzo, M.P., Rosales, E.P., Vazquez, S.C., Benavides, M.P., 2012. Cadmium modulates NADPH oxidase activity and expression in sunflower leaves. *Biol. Plant.* 56, 167–171.
- Guo, B., Liang, Y.C., Zhu, Y.G., Zhao, F.J., 2007. Role of salicylic acid in alleviating oxidative damage in rice roots (*Oryza sativa*) subjected to cadmium stress.

- Environ. Pollut. 147, 743–749.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.09.007>
- Guo, J., Zhou, R., Ren, X., Jia, H., Hua, L., Xu, H., Lv, X., Zhao, J., Wei, T., 2018. Effects of salicylic acid, Epi-brassinolide and calcium on stress alleviation and Cd accumulation in tomato plants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 157, 491–496.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.04.010>
- Guo, Q., Meng, L., Mao, P.-C., Jia, Y.-Q., Shi, Y.-J., 2013. Role of exogenous salicylic acid in alleviating cadmium-induced toxicity in Kentucky bluegrass. *Biochem. Syst. Ecol.* 50, 269–276. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2013.05.002>
- Guo, X.-F., Wei, Z.-B., Wu, Q.-T., Qiu, J.-R., Zhou, J.-L., 2011. Cadmium and Zinc Accumulation in Maize Grain as Affected by Cultivars and Chemical Fixation Amendments. *Pedosphere* 21, 650–656. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(11\)60167-7](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(11)60167-7)
- Guzel, S., Terzi, R., 2013. Exogenous hydrogen peroxide increases dry matter production, mineral content and level of osmotic solutes in young maize leaves and alleviates deleterious effects of copper stress. *Bot. Stud.* 54, 26. <https://doi.org/10.1186/1999-3110-54-26>
- Hąc-Wydro, K., Sroka, A., Jabłońska, K., 2016. The impact of auxins used in assisted phytoextraction of metals from the contaminated environment on the alterations caused by lead(II) ions in the organization of model lipid membranes. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 143, 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.03.018>
- Hall, J.L., 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* 53, 1–11. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.366.1>
- Hall, J.L., Williams, L.E., 2003. Transition metal transporters in plants. *J. Exp. Bot.* 54, 2601–2613. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg303>
- Han, Y., Chen, G., Chen, Y., Shen, Z., 2015. Cadmium Toxicity and Alleviating Effects of Exogenous Salicylic Acid in *Iris hexagona*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 95, 796–802. <https://doi.org/10.1007/s00128-015-1640-3>
- Hansen, H., Dorffling, K., 2003. Root-derived trans-zeatin riboside and abscisic acid in drought-stressed and rewatered sunflower plants: interaction in the control of leaf diffusive resistance? *Funct. Plant Biol.*
- Hara, M., Furukawa, J., Sato, A., Mizoguchi, T., Miura, K., 2012. *Abiotic Stress and Role of Salicylic Acid in Plants*. Springer, New York.
- Hasan, M.K., Cheng, Y., Kanwar, M.K., Chu, X.-Y., Ahammed, G.J., Qi, Z.-Y., 2017. Responses of Plant Proteins to Heavy Metal Stress-A Review. *Front. Plant Sci.* 8, 1492. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01492>
- Hashem, A., Abd Allah, E.F., Alqarawi, A.A., Egamberdieva, D., 2016. Bioremediation of adverse impact of cadmium toxicity on *Cassia italica* Mill by arbuscular mycorrhizal fungi. *Saudi J. Biol. Sci.* 23, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.11.007>
- Haslam, E., 2007. Vegetable tannins – Lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry, Highlights in the Evolution of Phytochemistry: 50 Years of the Phytochemical Society of Europe* 68, 2713–2721. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.09.009>
- Hassan, S., Mathesius, U., 2012. The role of flavonoids in root-rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. *J. Exp. Bot.* 63, 3429–3444. <https://doi.org/10.1093/jxb/err430>

- Hayat, Q., Hayat, S., Irfan, M., Ahmad, A., 2010. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environ. Exp. Bot.* 68, 14–25. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.08.005>
- He, J., Ren, Y., Pan, X., Yan, Y., Zhu, C., Jiang, D., 2010. Salicylic acid alleviates the toxicity effect of cadmium on germination, seedling growth, and amylase activity of rice. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 173, 300–305. <https://doi.org/10.1002/jpln.200800302>
- Huang, C., Wang, D., Sun, L., Wei, L., 2016. Effects of exogenous salicylic acid on the physiological characteristics of *Dendrobium officinale* under chilling stress. *Plant Growth Regul.* 79, 199–208. <https://doi.org/10.1007/s10725-015-0125-z>
- Iqbal, N., Umar, S., Khan, N.A., Khan, M.I.R., 2014. A new perspective of phytohormones in salinity tolerance: Regulation of proline metabolism. *Environ. Exp. Bot.* 100, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.12.006>
- Jana, S., Choudhuri, M.A. (Burdwan U., 1982. Glycolate metabolism of three submersed aquatic angiosperms during ageing [aquatic weeds]. *Aquat. Bot. Neth.*
- Janda, T., Szalai, G., Rios-Gonzalez, K., Veisz, O., Páldi, E., 2003. Comparative study of frost tolerance and antioxidant activity in cereals. *Plant Sci.* 164, 301–306. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00414-4](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00414-4)
- Janda, T., Szalai, G., Tari, I., Paldi, E., 1999. Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta* 208, 175–180. <https://doi.org/10.1007/s004250050547>
- Jonak, C., Nakagami, H., Hirt, H., 2004. Heavy Metal Stress. Activation of Distinct Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways by Copper and Cadmium. *Plant Physiol.* 136, 3276–3283. <https://doi.org/10.1104/pp.104.045724>
- Jones, B., Ljung, K., Gunnerås, S.A., Petersson, S.V., Tarkowski, P., Graham, N., May, S., Dolezal, K., Sandberg, G., 2010. Cytokinin regulation of auxin synthesis in *Arabidopsis* involves a homeostatic feedback loop regulated via auxin and cytokinin signal transduction. *Plant Cell* 22, 2956–2969. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.074856>
- Jozefczak, M., Remans, T., Vangronsveld, J., Cuypers, A., 2012. Glutathione Is a Key Player in Metal-Induced Oxidative Stress Defenses. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 3145–3175. <https://doi.org/10.3390/ijms13033145>
- Jumali, S.S., Said, I., Ismail, I., Zainal, Z., 2011. Genes induced by high concentration of salicylic acid in *Mitragyna speciosa*. *Aust. J. Crop Sci.* 5.
- Jung, Y., Ha, M., Lee, J., Ahn, Y.G., Kwak, J.H., Ryu, D.H., Hwang, G.-S., 2015. Metabolite Profiling of the Response of Burdock Roots to Copper Stress. *J. Agric. Food Chem.* 63, 1309–1317. <https://doi.org/10.1021/jf503193c>
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 1992. Trace elements in soils and plants. CRC Press.
- Kahle, H., 1993. Response of roots of trees to heavy metals. *Environ. Exp. Bot., The Impact of the Environment on Roots and Root Systems* 33, 99–119. [https://doi.org/10.1016/0098-8472\(93\)90059-0](https://doi.org/10.1016/0098-8472(93)90059-0)
- Kazan, K., 2013. Auxin and the integration of environmental signals into plant root development. *Ann. Bot.* 112, 1655–1665. <https://doi.org/10.1093/aob/mct229>
- Ke, W., Xiong, Z.-T., Chen, S., Chen, J., 2007. Effects of copper and mineral nutrition on growth, copper accumulation and mineral element uptake in two *Rumex*

- japonicus* populations from a copper mine and an uncontaminated field sites. Environ. Exp. Bot. 59, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.10.007>
- Khan, M.I.R., Asgher, M., Khan, N.A., 2014. Alleviation of salt-induced photosynthesis and growth inhibition by salicylic acid involves glycinebetaine and ethylene in mungbean (*Vigna radiata* L.). Plant Physiol. Biochem. PPB 80, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.03.026>
- Khan, M.I.R., Fatma, M., Per, T.S., Anjum, N.A., Khan, N.A., 2015. Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. Front. Plant Sci. 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00462>
- Khavari-Nejad, R.A., Najafi, F., Rezaei, M., 2014. The Influence of Cadmium Toxicity on Some Physiological Parameters as Affected by Iron in Rice (*Oryza Sativa* L.) Plant. J. Plant Nutr. 37, 1202–1213. <https://doi.org/10.1080/01904167.2014.881866>
- Kilic, S., Karaboyaci, M., Sencan, A., Kilic, M., 2017. Ecotoxicological Responses of Morphological and Physiological Parameters. Bangladesh J. Bot. 46, 211–216.
- Kisa, D., Elmastas, M., Ozturk, L., Kayir, O., 2016. Responses of the phenolic compounds of *Zea mays* under heavy metal stress. Appl. Biol. Chem. 59, 813–820. <https://doi.org/10.1007/s13765-016-0229-9>
- Kováčik, J., Klejdus, B., 2008. Dynamics of phenolic acids and lignin accumulation in metal-treated *Matricaria chamomilla* roots. Plant Cell Rep. 27, 605–615. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0490-9>
- Kováčik, J., Klejdus, B., Hedbavny, J., Mártonfi, P., Štork, F., Mártonfiová, L., 2010. Copper Uptake, Physiology and Cytogenetic Characteristics in Three *Matricaria chamomilla* Cultivars. Water. Air. Soil Pollut. 218, 681–691. <https://doi.org/10.1007/s11270-010-0677-5>
- Kovacs, V., Gondor, O.K., Szalai, G., Darko, E., Majlath, I., Janda, T., Pal, M., 2014. Synthesis and role of salicylic acid in wheat varieties with different levels of cadmium tolerance. J. Hazard. Mater. 280, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.07.048>
- Krantev, A., Yordanova, R., Janda, T., Szalai, G., Popova, L., 2008. Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants. J. Plant Physiol. 165, 920–931. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.11.014>
- Kula, M., Rys, M., Możdżeń, K., Skoczowski, A., 2014. Metabolic activity, the chemical composition of biomass and photosynthetic activity of *Chlorella vulgaris* under different light spectra in photobioreactors. Eng. Life Sci. 14, 57–67. <https://doi.org/10.1002/elsc.201200184>
- Kula, M., Rys, M., Saja, D., Tys, J., Skoczowski, A., 2016. Far-red dependent changes in the chemical composition of *Spirulina platensis*. Eng. Life Sci. 16, 777–785. <https://doi.org/10.1002/elsc.201500173>
- Kumar, J., 2015. Role of salicylic acid-seed priming in the regulation of chromium (VI) and UV-B toxicity in maize seedlings. J. Plant Growth Regul.
- Kumar, P., Tewari, R.K., Sharma, P.N., 2008. Modulation of copper toxicity-induced oxidative damage by excess supply of iron in maize plants. Plant Cell Rep. 27, 399–409. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0453-1>
- Küpper, H., Lombi, E., Zhao, F.J., Wieshammer, G., McGrath, S.P., 2001. Cellular compartmentation of nickel in the hyperaccumulators *Alyssum lesbiacum*, *Alyssum bertolonii* and *Thlaspi goesingense*. J. Exp. Bot. 52, 2291–2300.

- Lachman, J., Dudjak, J., Miholova, D., Kolihovala, D., Pivec, V., 2005. Effect of cadmium on flavonoid content in young barley (*Hordeum sativum* L.) plants. *Plant Soil Environ. - UZPI Czech Repub.*
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lal, N., 2010. *Molecular Mechanisms and Genetic Basis of Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants*. Springer, Dordrecht.
- Lasat, M.M., Pence, N.S., Garvin, D.F., Ebbs, S.D., Kochian, L.V., 2000. Molecular physiology of zinc transport in the Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *J. Exp. Bot.* 51, 71–79.
- Leon Morales, J.M., Sepulveda-Jimenez, G., 2012. Oxidative Damage Caused by Copper and the Antioxidant Response of Plants. *Interciencia* 37, 805–811.
- Leslie, C.A., Romani, R.J., 1986. Salicylic acid: A new inhibitor of ethylene biosynthesis. *Plant Cell Rep.* 5, 144–146. <https://doi.org/10.1007/BF00269255>
- Li, X.-J., Yang, M.-F., Chen, H., Qu, L.-Q., Chen, F., Shen, S.-H., 2010. Abscisic acid pretreatment enhances salt tolerance of rice seedlings: proteomic evidence. *Biochim. Biophys. Acta* 1804, 929–940. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.01.004>
- Liphadzi, M.S., Kirkham, M.B., Paulsen, G.M., 2006. Auxin-enhanced root growth for phytoremediation of sewage-sludge amended soil. *Environ. Technol.* 27, 695–704. <https://doi.org/10.1080/09593332708618683>
- Liu, D.H., Jiang, W.S., Hou, W.Q., 2001. Uptake and accumulation of copper by roots and shoots of maize (*Zea mays* L.). *J. Environ. Sci.-China* 13, 228–232.
- Liu, J.J., Wei, Z., Li, J.H., 2014. Effects of copper on leaf membrane structure and root activity of maize seedling. *Bot. Stud.* 55, 47. <https://doi.org/10.1186/s40529-014-0047-5>
- Liu, Z., Ding, Y., Wang, F., Ye, Y., Zhu, C., 2016. Role of salicylic acid in resistance to cadmium stress in plants. *Plant Cell Rep.* 35, 719–731. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1925-3>
- Liu, Z., Gao, K., Shan, S., Gu, R., Wang, Z., Craft, E.J., Mi, G., Yuan, L., Chen, F., 2017. Comparative Analysis of Root Traits and the Associated QTLs for Maize Seedlings Grown in Paper Roll, Hydroponics and Vermiculite Culture System. *Front. Plant Sci.* 8, 436. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00436>
- Loureiro, S., Santos, C., Pinto, G., Costa, A., Monteiro, M., Nogueira, A.J.A., Soares, A.M.V.M., 2006. Toxicity assessment of two soils from Jales mine (Portugal) using plants: growth and biochemical parameters. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 50, 182–190. <https://doi.org/10.1007/s00244-004-0261-3>
- Lux, A., Martinka, M., Vaculik, M., White, P.J., 2011. Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. *J. Exp. Bot.* 62, 21–37. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq281>
- Makandar, R., Essig, J.S., Schapaugh, M.A., Trick, H.N., Shah, J., 2006. Genetically engineered resistance to Fusarium head blight in wheat by expression of Arabidopsis NPR1. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* 19, 123–129. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0123>
- Maksymiec, W., 2011. Effects of jasmonate and some other signalling factors on bean and onion growth during the initial phase of cadmium action. *Biol. Plant.* 55, 112–118. <https://doi.org/10.1007/s10535-011-0015-9>

- Maksymiec, W., 2007. Signaling responses in plants to heavy metal stress. *Acta Physiol. Plant.* 29, 177. <https://doi.org/10.1007/s11738-007-0036-3>
- Maksymiec, W., Krupa, Z., 2007. Effects of methyl jasmonate and excess copper on root and leaf growth. *Biol. Plant.* 51, 322–326. <https://doi.org/10.1007/s10535-007-0062-4>
- Maksymiec, W., Krupa, Z., 2002. Jasmonic acid and heavy metals in *Arabidopsis plants* - a similar physiological response to both stressors? *J. Plant Physiol.* 159, 509–515. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00610>
- Maksymiec, W., Wianowska, D., Dawidowicz, A.L., Radkiewicz, S., Mardarowicz, M., Krupa, Z., 2005. The level of jasmonic acid in *Arabidopsis thaliana* and *Phaseolus coccineus* plants under heavy metal stress. *J. Plant Physiol.* 162, 1338–1346. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.01.013>
- Mandal, S., Mallick, N., Mitra, A., 2009. Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. *Plant Physiol. Biochem. PPB* 47, 642–649. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.03.001>
- Mandava, N.B., 1988. Plant Growth-Promoting Brassinosteroids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39, 23–52. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.39.060188.000323>
- Mantri, N., Patade, V., Penna, S., Ford, R., Pang, E., 2012. Abiotic Stress Responses in Plants: Present and Future, in: *Abiotic Stress Responses in Plants*. Springer, New York, NY, pp. 1–19. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0634-1_1
- Marcińska, I., Czyczyło-Mysza, I., Skrzypek, E., Grzesiak, M.T., Janowiak, F., Filek, M., Dziurka, M., Dziurka, K., Waligórski, P., Juzoń, K., Cyganek, K., Grzesiak, S., 2013. Alleviation of Osmotic Stress Effects by Exogenous Application of Salicylic or Abscisic Acid on Wheat Seedlings. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 13171–13193. <https://doi.org/10.3390/ijms140713171>
- Marschner, H., George, E., Römheld, V., 1995. Preface to Second Edition, in: *Mineral Nutrition of Higher Plants (Second Edition)*. Academic Press, London, pp. vii–viii. <https://doi.org/10.1016/B978-012473542-2/50001-8>
- Mei, L., Daud, M.K., Ullah, N., Ali, S., Khan, M., Malik, Z., Zhu, S.J., 2015. Pretreatment with salicylic acid and ascorbic acid significantly mitigate oxidative stress induced by copper in cotton genotypes. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 9922–9931. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4075-9>
- Metwally, A., Finkemeier, I., Georgi, M., Dietz, K.-J., 2003. Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant Physiol.* 132, 272–281. <https://doi.org/10.1104/pp.102.018457>
- Michalak, A., 2006. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Pol. J. Environ. Stud.* 15, 523–530.
- Mingxuan, Z., Yingbang, L., Aiyun, L., Xuewen, Z., 2015. Cadmium Toxicology to Cultured BY-2 Cells and the Relief Effects of Salicylic Acid to the Cadmium Toxicity. *Asian J. Ecotoxicol.* 10, 224–229. <https://doi.org/10.7524/AJE.1673-5897-20141030001>
- Miura, K., Tada, Y., 2014. Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Front. Plant Sci.* 5, 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00004>
- Moharekar, S.T., Lokhande (Moharekar), S.D., Hara, T., Tanaka, R., Tanaka, A., Chavan, P.D., 2003. Effect of Salicylic Acid on Chlorophyll and Carotenoid Contents of Wheat and Moong Seedlings. *Photosynthetica* 41, 315. <https://doi.org/10.1023/B:PHOT.0000011970.62172.15>

- Mohsenzadeh, S., Shahrtash, M., Mohabatkar, H., 2011. Interactive effects of salicylic acid and silicon on some physiological responses of cadmium-stressed maize seedlings. *Iran. J. Sci. Technol. Trans. -Sci.* 35, 57–60.
- Moravcova, S., Tuma, J., Ducaiova, Z.K., Waligorski, P., Kula, M., Saja, D., Slomka, A., Baba, W., Libik-Konieczny, M., 2018. Influence of salicylic acid pretreatment on seeds germination and some defence mechanisms of *Zea mays* plants under copper stress. *Plant Physiol. Biochem.* 122, 19–30. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.11.007>
- Mostofa, M.G., Fujita, M., 2013a. Salicylic acid alleviates copper toxicity in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings by up-regulating antioxidative and glyoxalase systems. *Ecotoxicology* 22, 959–973. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1073-x>
- Müller, B., Sheen, J., 2007. Advances in Cytokinin Signaling. *Science* 318, 68–69. <https://doi.org/10.1126/science.1145461>
- Nagajyoti, P.C., Lee, K.D., Sreekanth, T.V.M., 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ. Chem. Lett.* 8, 199–216. <https://doi.org/10.1007/s10311-010-0297-8>
- Ni, J., Wang, Q., Shah, F.A., Liu, W., Wang, D., Huang, S., Fu, S., Wu, L., 2018. Exogenous Melatonin Confers Cadmium Tolerance by Counterbalancing the Hydrogen Peroxide Homeostasis in Wheat Seedlings. *Molecules* 23, 799. <https://doi.org/10.3390/molecules23040799>
- Niu, L., Liao, W., 2016. Hydrogen Peroxide Signaling in Plant Development and Abiotic Responses: Crosstalk with Nitric Oxide and Calcium. *Front. Plant Sci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00230>
- O'Brien, J.A., Benková, E., 2013. Cytokinin cross-talking during biotic and abiotic stress responses. *Front. Plant Sci.* 4, 451. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00451>
- Okem, A., Southway, C., Stirk, W.A., Street, R.A., Finnie, J.F., Van Staden, J., 2015. Effect of cadmium and aluminum on growth, metabolite content and biological activity in *Drimys elata* (Jacq.) Hyacinthaceae. *South Afr. J. Bot.* 98, 142–147. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.02.013>
- Ozfidan-Konakci, C., Yildiztugay, E., Bahtiyar, M., Kucukoduk, M., 2018. The humic acid-induced changes in the water status, chlorophyll fluorescence and antioxidant defense systems of wheat leaves with cadmium stress. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 155, 66–75. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.071>
- Pages, M., Ludevid, D., Vilardell, J., Freire, M., Pla, M., Torrent, M., Goday, A., 1991. Genes Induced by Abscisic-Acid and Water-Stress in Maize. Plenum Press Div Plenum Publishing Corp, New York.
- Pal, M., Horvath, E., Janda, T., Paldi, E., Szalai, G., 2005. Cadmium stimulates the accumulation of salicylic acid and its putative precursors in maize (*Zea mays*) plants. *Physiol. Plant.* 125, 356–364. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00545.x>
- Pál, M., Szalai, G., Horváth, E., Janda, T., Páldi, E., 2002. Effect of salicylic acid during heavy metal stress. *Acta Biol. Szeged.* 46, 119–120.
- Palma, J.M., Sandalio, L.M., Javier Corpas, F., Romero-Puertas, M.C., McCarthy, I., del Río, L.A., 2002. Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiol. Biochem., Free radicals and oxidative stress in plants: A new insight* 40, 521–530. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(02\)01404-3](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(02)01404-3)

- Panda, S.K., Patra, H.K., 2007. Effect of salicylic acid potentiates cadmium-induced oxidative damage in *Oryza sativa* L. leaves. *Acta Physiol. Plant.* 29, 567–575. <https://doi.org/10.1007/s11738-007-0069-7>
- Parida, A.K., Jha, B., 2010. Antioxidative Defense Potential to Salinity in the Euhalophyte *Salicornia brachiata*. *J. Plant Growth Regul.* 29, 137–148. <https://doi.org/10.1007/s00344-009-9129-0>
- Pasquer, F., Isidore, E., Zarn, J., Keller, B., 2005. Specific patterns of changes in wheat gene expression after treatment with three antifungal compounds. *Plant Mol. Biol.* 57, 693–707. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-1728-y>
- Peleg, Z., Blumwald, E., 2011. Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14, 290–295. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.02.001>
- Perez Chaca, M.V., Vigliocco, A., Reinoso, H., Molina, A., Abdala, G., Zirulnik, F., Pedranzani, H., 2014. Effects of cadmium stress on growth, anatomy and hormone contents in *Glycine max* (L.) Merr. *Acta Physiol. Plant.* 36, 2815–2826. <https://doi.org/10.1007/s11738-014-1656-z>
- Perfus-Barbeoch, L., Leonhardt, N., Vavasseur, A., Forestier, C., 2002. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 32, 539–548.
- Petříková, V., Ustjak, S., Roth, J., 1995. Těžké kovy v půdách a zemědělských plodinách v pěti různě imisně zatížených lokalitách ČR. *Rostl Výr* 17–23.
- Pielichowska, M., Wierzbicka, M., 2004. Uptake and localization of cadmium by *Biscutella laevigata*, a cadmium hyperaccumulator. *Acta Biol. Cracoviensia Ser. Bot.* 46, 57–63.
- Popova, L.P., Maslenkova, L.T., Ivanova, A., Stoinova, Z., 2012. Role of Salicylic Acid in Alleviating Heavy Metal Stress, in: Ahmad, P., Prasad, M.N.V. (Eds.), *Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change*. Springer New York, pp. 447–466. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0815-4_21
- Popova, L.P., Maslenkova, L.T., Yordanova, R.Y., Ivanova, A.P., Krantev, A.P., Szalai, G., Janda, T., 2009. Exogenous treatment with salicylic acid attenuates cadmium toxicity in pea seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* 47, 224–231. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.11.007>
- Prasad, M.N.V., 2013. *Heavy Metal Stress in Plants: From Biomolecules to Ecosystems*. Springer Science & Business Media.
- Qian, H., Li, J., Sun, L., Chen, W., Sheng, G.D., Liu, W., Fu, Z., 2009. Combined effect of copper and cadmium on *Chlorella vulgaris* growth and photosynthesis-related gene transcription. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 94, 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.05.014>
- Qiu, Z., Wang, L., Zhou, Q., 2013. Effects of bisphenol A on growth, photosynthesis and chlorophyll fluorescence in above-ground organs of soybean seedlings. *Chemosphere* 90, 1274–1280. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.09.085>
- Quartacci, M.F., Cosi, E., Navari-Izzo, F., 2001. Lipids and NADPH-dependent superoxide production in plasma membrane vesicles from roots of wheat grown under copper deficiency or excess. *J. Exp. Bot.* 52, 77–84.
- Rajjou, L., Belghazi, M., Huguet, R., Robin, C., Moreau, A., Job, C., Job, D., 2006. Proteomic Investigation of the Effect of Salicylic Acid on Arabidopsis Seed

- Germination and Establishment of Early Defense Mechanisms. *Plant Physiol.* 141, 910–923. <https://doi.org/10.1104/pp.106.082057>
- Rakwal, R., Agrawal, G.K., Yonekura, M., 1999. Separation of proteins from stressed rice (*Oryza sativa* L.) leaf tissues by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: Induction of pathogenesis-related and cellular protectant proteins by jasmonic acid, UV irradiation and copper chloride. *ELECTROPHORESIS* 20, 3472–3478. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(19991101\)20:17<3472::AID-ELPS3472>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(19991101)20:17<3472::AID-ELPS3472>3.0.CO;2-0)
- Rascio, N., Navari-Izzo, F., 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Sci. Int. J. Exp. Plant Biol.* 180, 169–181. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.08.016>
- Raskin, I., Ehmann, A., Melander, W.R., Meeuse, B.J., 1987. Salicylic Acid: a natural inducer of heat production in arum lilies. *Science* 237, 1601–1602. <https://doi.org/10.1126/science.237.4822.1601>
- Rhoads, D.M., McIntosh, L., 1991. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding an alternative oxidase protein of *Sauromatum guttatum* (Schott). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 2122–2126.
- Ribeiro, D.M., Desikan, R., Bright, J., Confraria, A., Harrison, J., Hancock, J.T., Barros, R.S., Neill, S.J., Wilson, I.D., 2009. Differential requirement for NO during ABA-induced stomatal closure in turgid and wilted leaves. *Plant Cell Environ.* 32, 46–57. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01906.x>
- Rieuwerts, J.S., Farago, M., Cikrt, M., Bencko, V., 1999. Heavy Metal Concentrations in and Around Households Near a Secondary Lead Smelter. *Environ. Monit. Assess.* 58, 317–335. <https://doi.org/10.1023/A:1006058331453>
- Rocca, N.L., Andreoli, C., Giacometti, G.M., Rascio, N., Moro, I., 2009. Responses of the Antarctic microalga *Koliella antarctica* (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) to cadmium contamination. *Photosynthetica* 47, 471–479. <https://doi.org/10.1007/s11099-009-0071-y>
- Roy, M., McDonald, L.M., 2015. Metal Uptake in Plants and Health Risk Assessments in Metal-Contaminated Smelter Soils. *Land Degrad. Dev.* 26, 785–792. <https://doi.org/10.1002/ldr.2237>
- Roy, S., Labelle, S., Mehta, P., Mihoc, A., Fortin, N., Masson, C., Leblanc, R., Châteauneuf, G., Sura, C., Gallipeau, C., Olsen, C., Delisle, S., Labrecque, M., Greer, C.W., 2005. Phytoremediation of heavy metal and PAH-contaminated brownfield sites. *Plant Soil* 272, 277–290. <https://doi.org/10.2307/42951704>
- Rubio, M.I., Escrig, I., Martínez-Cortina, C., López-Benet, F.J., Sanz, A., 1994. Cadmium and nickel accumulation in rice plants. Effects on mineral nutrition and possible interactions of abscisic and gibberellic acids. *Plant Growth Regul.* 14, 151–157. <https://doi.org/10.1007/BF00025217>
- Ryals, J., Neuenschwander, U., Willits, M., Molina, A., Steiner, H., Hunt, M., 1996. Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* 8, 1809–1819.
- Sabiha-Javied, Mehmood, T., Chaudhry, M.M., Tufail, M., Irfan, N., 2009. Heavy metal pollution from phosphate rock used for the production of fertilizer in Pakistan. *Microchem. J.* 91, 94–99. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2008.08.009>
- Saidi, I., Ayouni, M., Dhieb, A., Chtourou, Y., Chaibi, W., Djebali, W., 2013. Oxidative damages induced by short-term exposure to cadmium in bean plants:

- Protective role of salicylic acid. *South Afr. J. Bot.* 85, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2012.12.002>
- Saja, D., Rys, M., Stokłosa, A., Skoczowski, A., 2014. Physiological tests for early detection of rigid ryegrass (*Lolium rigidum* Goud.) resistance to fenoxaprop-P. *Acta Physiol. Plant.* 36, 485–491. <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1428-1>
- Salin, M.L., 1988. Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiol. Plant.* 72, 681–689. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1988.tb09182.x>
- Salt, D.E., Prince, R.C., Pickering, I.J., Raskin, I., 1995. Mechanisms of Cadmium Mobility and Accumulation in Indian Mustard. *Plant Physiol.* 109, 1427–1433. <https://doi.org/10.1104/pp.109.4.1427>
- Salt, D.E., Rauser, W.E., 1995. MgATP-Dependent Transport of Phytochelatins Across the Tonoplast of Oat Roots. *Plant Physiol.* 107, 1293–1301.
- Santos, L.R., Batista, B.L., Lobato, A.K.S., 2018. Brassinosteroids mitigate cadmium toxicity in cowpea plants. *Photosynthetica* 56, 591–605. <https://doi.org/10.1007/s11099-017-0700-9>
- Schrader, B., Klump, H.H., Schenzel, K., Schulz, H., 1999. Non-destructive NIR FT Raman analysis of plants. *J. Mol. Struct.* 509, 201–212. [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(99\)00221-5](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(99)00221-5)
- Schulz, E., Tohge, T., Zuther, E., Fernie, A.R., Hinch, D.K., 2016. Flavonoids are determinants of freezing tolerance and cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Sci. Rep.* 6, 34027. <https://doi.org/10.1038/srep34027>
- Schulz, H., Baranska, M., 2007. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vib. Spectrosc.* 43, 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2006.06.001>
- Schwartz, C., Gérard, E., Perronnet, K., Morel, J.L., 2001. Measurement of in situ phytoextraction of zinc by spontaneous metallophytes growing on a former smelter site. *Sci. Total Environ.* 279, 215–221. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(01\)00784-7](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(01)00784-7)
- Semida, W.M., Rady, M.M., Abd El-Mageed, T.A., Howladar, S.M., Abdelhamid, M.T., 2015. Alleviation of cadmium toxicity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants by the exogenous application of salicylic acid. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 90, 83–91.
- Shafi, M., Bakht, J., Razuddin, Hayat, Y., Zhang, G.P., 2011. Genotypic Difference in the Inhibition of Photosynthesis and Chlorophyll Fluorescence by Salinity and Cadmium Stresses in Wheat. *J. Plant Nutr.* 34, 315–323. <https://doi.org/10.1080/01904167.2011.536874>
- Shahid, M., Pourrut, B., Dumat, C., Nadeem, M., Aslam, M., Pinelli, E., 2014. Heavy-metal-induced reactive oxygen species: phytotoxicity and physicochemical changes in plants. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 232, 1–44. https://doi.org/10.1007/978-3-319-06746-9_1
- Sharma, S.S., Dietz, K.-J., 2006. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *J. Exp. Bot.* 57, 711–726. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj073>
- Sheldon, A.R., Menzies, N.W., 2005. The Effect of Copper Toxicity on the Growth and Root Morphology of Rhodes Grass *Chloris gayana* in Resin Buffered Solution Culture. *Plant Soil* 278, 341–349. <https://doi.org/10.1007/s11104-005-8815-3>

- Sheng, X.-F., Xia, J.-J., 2006. Improvement of rape (*Brassica napus*) plant growth and cadmium uptake by cadmium-resistant bacteria. *Chemosphere* 64, 1036–1042. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.01.051>
- Shi, G.R., Cai, Q.S., 2008. Photosynthetic and anatomic responses of peanut leaves to cadmium stress. *Photosynthetica* 46, 627–630. <https://doi.org/10.1007/s11099-008-0107-8>
- Singh, D., Nath, K., Sharma, Y.K., 2007. Response of wheat seed germination and seedling growth under copper stress. *J. Environ. Biol.* 28, 409–414.
- Singh, P.K., 2010. Effects of salicylic acid on seedling growth and nitrogen metabolism in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *J. Stress Physiol. Biochem.* 6, 102–113.
- Singh, S., Singh, A., Bashri, G., Prasad, S.M., 2016. Impact of Cd stress on cellular functioning and its amelioration by phytohormones: An overview on regulatory network. *Plant Growth Regul.* 80, 253–263. <https://doi.org/10.1007/s10725-016-0170-2>
- Sinha, P., Shukla, A.K., Sharma, Y.K., 2015. Amelioration of Heavy-Metal Toxicity in Cauliflower by Application of Salicylic Acid. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 46, 1309–1319. <https://doi.org/10.1080/00103624.2015.1033543>
- Skládanka, J., 2006. Kukuřice setá.
- Sofo, A., Dichio, B., Montanaro, G., Xiloyannis, C., 2009. Photosynthetic performance and light response of two olive cultivars under different water and light regimes. *Photosynthetica* 47, 602–608. <https://doi.org/10.1007/s11099-009-0086-4>
- Souza, R.P., Machado, E.C., Silva, J.A.B., Lagôa, A.M.M.A., Silveira, J.A.G., 2004. Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and some associated metabolic changes in cowpea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery. *Environ. Exp. Bot.* 51, 45–56. [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(03\)00059-5](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(03)00059-5)
- Srivastava, S., Srivastava, A.K., Suprasanna, P., D'Souza, S.F., 2013. Identification and profiling of arsenic stress-induced microRNAs in *Brassica juncea*. *J. Exp. Bot.* 64, 303–315. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers333>
- Strable, J., Scanlon, M.J., 2009. Maize (*Zea mays*): A Model Organism for Basic and Applied Research in Plant Biology. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2009, pdb.emo132. <https://doi.org/10.1101/pdb.emo132>
- Straeten, D.V.D., Chaerle, L., Sharkov, G., Lambers, H., Montagu, M.V., 1995. Salicylic acid enhances the activity of the alternative pathway of respiration in tobacco leaves and induces thermogenicity. *Planta* 196, 412–419. <https://doi.org/10.1007/BF00203637>
- Sugawara, S., Mashiguchi, K., Tanaka, K., Hishiyama, S., Sakai, T., Hanada, K., Kinoshita-Tsujimura, K., Yu, H., Dai, X., Takebayashi, Y., Takeda-Kamiya, N., Kakimoto, T., Kawaide, H., Natsume, M., Estelle, M., Zhao, Y., Hayashi, K.-I., Kamiya, Y., Kasahara, H., 2015. Distinct Characteristics of Indole-3-Acetic Acid and Phenylacetic Acid, Two Common Auxins in Plants. *Plant Cell Physiol.* 56, 1641–1654. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv088>
- Szalai, G., Horgosi, S., Soós, V., Majláth, I., Balázs, E., Janda, T., 2011. Salicylic acid treatment of pea seeds induces its de novo synthesis. *J. Plant Physiol.* 168, 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.07.029>

- Szalai, G., Krantev, A., Yordanova, R., Popova, L.P., Janda, T., 2013. Influence of salicylic acid on phytochelatin synthesis in *Zea mays* during Cd stress. *Turk. J. Bot.* 37, 708–714. <https://doi.org/10.3906/bot-1210-6>
- Tada, Y., Spoel, S.H., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., Zuo, J., Dong, X., 2008. Plant Immunity Requires Conformational Changes of NPR1 via S-Nitrosylation and Thioredoxins. *Science* 321. <https://doi.org/10.1126/science.1156970>
- Tewari, R.K., Kumar, P., Sharma, P.N., Bisht, S.S., 2002. Modulation of oxidative stress responsive enzymes by excess cobalt. *Plant Sci.* 162, 381–388. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00578-7](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00578-7)
- Thaler, J.S., 1999. Jasmonate-inducible plant defences cause increased parasitism of herbivores. *Nature* 399, 686–688. <https://doi.org/10.1038/21420>
- Tlust'oš, P., Száková, J., Šichorová, K., Pavlíková, D., Balík, J., 2007. Rizika kovů v půdě v agroekosystémech v ČR.
- Tukendorf, A., Lyszcz, S., Baszynski, T., 1984. Copper-Binding Proteins in Spinach Tolerant to Excess Copper. *J. Plant Physiol.* 115, 351–360.
- Van Assche, F., Clijsters, H., 1990. Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ.* 13, 195–206. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1990.tb01304.x>
- Vanlerberghe, G.C., 2013. Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 6805–6847. <https://doi.org/10.3390/ijms14046805>
- Vatehová, Z., Malovíková, A., Kollárová, K., Kučerová, D., Lišková, D., 2016. Impact of cadmium stress on two maize hybrids. *Plant Physiol. Biochem.* 108, 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.06.035>
- Verbruggen, N., Hermans, C., Schat, H., 2009. Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 364–372. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.05.001>
- Veselov, D.S., Kudoyarova, G.R., Kudryakova, N.V., Kusnetsov, V.V., 2017. Role of cytokinins in stress resistance of plants. *Russ. J. Plant Physiol.* 64, 15–27. <https://doi.org/10.1134/S1021443717010162>
- Vicente, M.R.-S., Plasencia, J., 2011. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *J. Exp. Bot.* 62, 3321–3338. <https://doi.org/10.1093/jxb/err031>
- Voß, U., Bishopp, A., Farcot, E., Bennett, M.J., 2014. Modelling hormonal response and development. *Trends Plant Sci.* 19, 311–319. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.02.004>
- Wahsha, M., Bini, C., Fontana, S., Wahsha, A., Zilioli, D., 2012. Toxicity assessment of contaminated soils from a mining area in Northeast Italy by using lipid peroxidation assay. *J. Geochem. Explor., Reclamation of Mining Site Soils* 113, 112–117. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2011.09.008>
- Wang, C.X., Tao, L., Ren, J., 2013. The response of maize seedlings to cadmium stress under hydroponic conditions. *Russ. J. Plant Physiol.* 60, 295–299. <https://doi.org/10.1134/S1021443713020209>
- Wani, S.H., Kumar, V., Shriram, V., Sah, S.K., 2016. Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *Crop J.* 4, 162–176. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2016.01.010>

- Wellburn, A., 1994. The Spectral Determination of Chlorophyll-a and Chlorophyll-B, as Well. *J. Plant Physiol.* 144, 307–313.
- Wen, J.-Q., Liang, H.-G., 1994. Comparison of the effects of salicylic acid on alternative pathway in slices of dormant and dormancy-breaking potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Plant Sci.* 102, 127–131. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(94\)90029-9](https://doi.org/10.1016/0168-9452(94)90029-9)
- Wightman, F., Lighty, D.L., 1982. Identification of phenylacetic acid as a natural auxin in the shoots of higher plants. *Physiol. Plant.* 55, 17–24. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1982.tb00278.x>
- Wilkinson, S., Davies, W.J., 2010. Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant Cell Environ.* 33, 510–525. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02052.x>
- Williams, M., Senaratna, T., Dixon, K., Sivasithamparam, K., 2003. Benzoic acid induces tolerance to biotic stress caused by *Phytophthora cinnamomi* in *Banksia attenuata*. *Plant Growth Regul.* 41, 89–91. <https://doi.org/10.1023/A:1027355604096>
- Winkel-Shirley, B., 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 218–223. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00256-X](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00256-X)
- Woolhouse, H.W., 1983. Toxicity and Tolerance in the Responses of Plants to Metals, in: *Physiological Plant Ecology III, Encyclopedia of Plant Physiology*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 245–300. https://doi.org/10.1007/978-3-642-68153-0_8
- Xia, X.-J., Zhou, Y.-H., Shi, K., Zhou, J., Foyer, C.H., Yu, J.-Q., 2015. Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance. *J. Exp. Bot.* 66, 2839–2856. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv089>
- Xiao, Z., Chunqin, Z., Jing, H., Deng'an, X., Chihong, Z., Jing, C., 2014. Effect of exogenous abscisic acid and salicylic acid on germination and physiological characteristics of wheat seed. *Chin. J. Appl. Environ. Biol.* 20, 139–143. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1145.2014.00139>
- Xu, L., Dong, Y., Kong, J., Liu, S., 2014. Effects of root and foliar applications of exogenous NO on alleviating cadmium toxicity in lettuce seedlings. *Plant Growth Regul.* 72, 39–50. <https://doi.org/10.1007/s10725-013-9834-3>
- Xu, L.L., Fan, Z.Y., Dong, Y.J., Kong, J., Bai, X.Y., 2015. Effects of exogenous salicylic acid and nitric oxide on physiological characteristics of two peanut cultivars under cadmium stress. *Biol. Plant.* 59, 171–182. <https://doi.org/10.1007/s10535-014-0475-9>
- Yadav, S.K., 2010. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South Afr. J. Bot.* 76, 167–179. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2009.10.007>
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., 2006. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 781–803. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105444>
- Yang, W., Zhu, C., Ma, X., Li, G., Gan, L., Ng, D., Xia, K., 2013. Hydrogen peroxide is a second messenger in the salicylic acid-triggered adventitious rooting process in mung bean seedlings. *PloS One* 8, e84580. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084580>

- Yang, Y., Qi, M., Mei, C., 2004. Endogenous salicylic acid protects rice plants from oxidative damage caused by aging as well as biotic and abiotic stress. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 40, 909–919. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02267.x>
- Yang, Z., Chen, J., Dou, R., Gao, X., Mao, C., Wang, L., 2015. Assessment of the Phytotoxicity of Metal Oxide Nanoparticles on Two Crop Plants, Maize (*Zea mays* L.) and Rice (*Oryza sativa* L.). *Int. J. Environ. Res. Public Health* 12, 15100–15109. <https://doi.org/10.3390/ijerph121214963>
- Yongping, Z., Youyuan, C., Shaojun, Y., Shuang, X., 2014. Effects of Exogenous Salicylic Acid on Seedling Growth, Photosynthetic and Chlorophyll Fluorescent Parameters in Melon Seedlings under Cadmium Stress. *Xibei Zhiwu Xuebao* 34, 778–785. <https://doi.org/10.7606/j.issn.1000-4025.2014.04.0778>
- Yotsova, E.K., Dobrikova, A.G., Stefanov, M.A., Kouzmanova, M., Apostolova, E.L., 2018. Improvement of the rice photosynthetic apparatus defence under cadmium stress modulated by salicylic acid supply to roots. *Theor. Exp. Plant Physiol.* 30, 57–70. <https://doi.org/10.1007/s40626-018-0102-9>
- Yuan, S., Lin, H.-H., 2008. Role of salicylic acid in plant abiotic stress. *Z. Naturforschung C J. Biosci.* 63, 313–320.
- Zawoznik, M.S., Groppa, M.D., Tomaro, M.L., Benavides, M.P., 2007. Endogenous salicylic acid potentiates cadmium-induced oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* 173, 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.05.004>
- Zengin, F., 2014. Exogenous Treatment with Salicylic Acid Alleviating Copper Toxicity in Bean Seedlings. *Proc. Indian Natl. Sci. Acad. Part B Biol. Sci.* 84, 749–755. <https://doi.org/10.1007/s40011-013-0285-4>
- Zengin, F.K., Munzuroglu, O., 2006. Toxic effects of cadmium (Cd⁺⁺) on metabolism of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedlings. *Acta Agric. Scand. Sect. B-Soil Plant Sci.* 56, 224–229. <https://doi.org/10.1080/0906471051003087>
- Zhang, F., Zhang, H., Xia, Y., Wang, G., Xu, L., Shen, Z., 2011. Exogenous application of salicylic acid alleviates cadmium toxicity and reduces hydrogen peroxide accumulation in root apoplasts of *Phaseolus aureus* and *Vicia sativa*. *Plant Cell Rep.* 30, 1475–1483. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1056-4>
- Zhang, Y., Xu, S., Yang, S., Chen, Y., 2015. Salicylic acid alleviates cadmium-induced inhibition of growth and photosynthesis through upregulating antioxidant defense system in two melon cultivars (*Cucumis melo* L.). *Protoplasma* 252, 911–924. <https://doi.org/10.1007/s00709-014-0732-y>
- Zhang, Yaxi, Xu, S., Ding, P., Wang, D., Cheng, Y.T., He, J., Gao, M., Xu, F., Li, Y., Zhu, Z., Li, X., Zhang, Yuelin, 2010. Control of salicylic acid synthesis and systemic acquired resistance by two members of a plant-specific family of transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 18220–18225. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005225107>
- Zhu, X.F., Wang, Z.W., Dong, F., Lei, G.J., Shi, Y.Z., Li, G.X., Zheng, S.J., 2013. Exogenous auxin alleviates cadmium toxicity in *Arabidopsis thaliana* by stimulating synthesis of hemicellulose 1 and increasing the cadmium fixation capacity of root cell walls. *J. Hazard. Mater.* 263 Pt 2, 398–403. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.09.018>