

Univerzita Hradec Králové
Přírodovědecká fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra biologie

Spolupůsobení křemíku a kyseliny salicylové jako
protektivních látek při působení kadmia

Bakalářská práce

Autor: Petra, Detková
Studijní program: B1501 Biologie
Studijní obor: Systematická biologie a ekologie

Vedoucí práce: RNDr. Zuzana Kovalíková, Ph.D

Hradec Králové

srpen 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Spolupůsobení křemíku a kyseliny salicylové jako protektivních látek při působení kadmia vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a pramenů. Výsledky v předložené práci jsou originálními údaji, získané během prezenční formy bakalářského studia. Dále prohlašuji, že tato bakalářská práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne 13. 8. 2018

.....

Jméno a příjmení

Poděkování

Ráda bych poděkovala své vedoucí bakalářské práce RNDr. Zuzaně Kovalíkové, Ph.D. za odborné vedení, pomoc, rady a čas při zpracování této práce. Rovněž patří poděkování rodině za podporu při studiu a tvorbu potřebného zázemí.

Anotace

DETKOVÁ, P *Spolupůsobení křemíku a kyseliny salicylové jako protektivních látek při působení kadmia*. Hradec Králové, 2018. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí bakalářské práce Zuzana Kovalíková. 52 s.

Cílem práce bylo podrobněji prozkoumat úlohu křemíku a kyseliny salicylové jako protektivních látek proti negativnímu působení těžkých kovů, konkrétně kadmia. V hydroponickém experimentu s rostlinami pšenice jsme na základě analýz základních fyziologických parametrů (akumulace biomasy a obsah asimilačních pigmentů) ověřili, zda vzájemná součinnost těchto dvou protektivních látek je prospěšnější jako jejich individuální aplikace. Analýza dalších stresových parametrů, a to obsah reaktivních forem kyslíku a následná míra poškození membránových lipidů nám poukázala na celkový negativní dopad kadmia. V experimentální části byl zjištěn větší vliv kadmia na kořenový systém, než v nadzemních částech rostlin. Potvrdila se samostatná činnost látek SA a Si, ale v některých případech bylo pro rostlinu lepší přijímat obě látky najednou. Bylo také potvrzeno, že látky Si a SA působí na rostliny jinými principy.

Klíčová slova

Pšenice (*Triticum sp.*), stres rostlin, těžké kovy, kadmium, křemík, kyselina salicylová, oxidační stres

Annotation

DETKOVÁ, P *Co-action of silicon and salicylic acid as cadmium-protecting compounds*. Hradec Králové, 2018. Bachelor Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis Supervisor Zuzana Kovalíková. 52 s.

The aim of the work was to investigate in detail the role of silicon and salicylic acid as protective agents against the negative effects of heavy metals, namely cadmium. In a hydroponic experiment with wheat plants, based on analyses of basic physiological parameters (biomass accumulation and the content of photosynthetic pigments) we tested whether the interaction of these two preservatives was more beneficial than their individual application. Further analyses such as the content of reactive oxygen species and the subsequent degree of membrane lipid peroxidation), pointed to the overall negative impact of cadmium. In the experimental part, the cadmium has a greater influence on the root system than in the above-ground parts of the plants. Independent activity of SA and Si was confirmed, but in some cases it was better for the plant to take both substances at once. It has also been confirmed that Si and SA act on plants by other principles.

Keywords

Wheat (*Triticum sp.*), plant stress, heavy metals, cadmium, silicon, salicylic acid, oxidative stress

Obsah

Úvod	8
1 Teoretická část	9
1.1 Pšenice setá.....	9
1.2 Stres v rostlinné fyziologii	10
1.2.1 Definice stresu a průběh stresové reakce	10
1.2.2 Odpovědi rostlin na stres	13
1.3 Těžké kovy a jejich toxicita.....	13
1.3.1 Vlastnosti těžkých kovů.....	13
1.3.2 Mechanismus obrany rostliny proti toxicitě těžkých kovů	14
1.3.3 Kadmium	16
1.4 Oxidační stres	19
1.4.1 Oxidační stres a reaktivní formy kyslíku.....	19
1.4.2 Vybrané reaktivní formy kyslíku.....	20
1.4.3 Poškození způsobené ROS	21
1.4.4 Obranné mechanismy při oxidačním stresu	22
1.5 Křemík	23
1.5.1 Křemík v rostlinách.....	23
1.5.2 Projevy křemíku v rostlinách.....	24
1.5.3 Vliv křemíku při působení těžkých kovů.....	25
1.6 Kyselina salicylová.....	26
1.6.1 Charakteristika SA a syntéza v rostlině	26
1.6.2 Význam SA ve stresu	27
1.6.3 Vliv SA při působení kadmia.....	28
2 Praktická část	29
2.1 Materiál a metodiky	29
2.2 Výsledky	33
2.2.1 Základní fyziologické parametry	33
2.2.2 Chlorofyly a fluorescence.....	37
2.2.3 Reaktivní formy kyslíku	38
2.2.4 Malondialdehyd	41
2.2.5 Prvková analýza.....	42
3 Diskuse	43

Závěr.....	44
Seznam použité literatury.....	45

Úvod

Z toxických kovů největší pozornost vyvolává kadmium. Je to dáno tím, že se jedná o nejtoxičtější kov, který je v posledních letech ve větším množství uvolňován do životního prostředí. Jedná se o kumulativní jed, který svůj obsah v organismech v průběhu ontogeneze zvyšuje. To má za následek ovlivnění výnosu zemědělských plodin. Důležitým zdrojem kadmia v prostředí jsou minerální hnojiva superfosfáty, průmyslové těžby a zpracování rud. Největším zdrojem kadmia jsou však v 21. století výfukové emise benzínových dopravních prostředků.

Akumulace těžkých kovů v rostlinách ovlivňuje fyziologické a metabolické procesy v rostlinách. V některých případech dochází v zemědělském průmyslu k menšímu výnosu plodin nebo rovnou k úhynu celé rostliny. S rostoucími nároky na výnos zemědělských plodin je důležité zajistit jejich plnou vitalitu. Pokud se kadmium dostane do výnosových částí rostlin, pak dochází ke kontaminaci potravního řetězce. Tato kontaminace, hlavně u lidí, má neblahé účinky, protože těžké kovy způsobují rakovinná bujení.

Proto se v posledních letech hledají protektivní látky při působení těžkých kovů. Při mnoha laboratorních experimentech se jako protektivní látky osvědčily křemík a kyselina salicylová. Oba dva prvky se pozitivně podílejí při ochraně rostlin, které jsou vystaveny stresovým faktorům v podobě těžkých kovů.

V teoretické části bakalářské práce se věnuji jednotlivým prvkům (kadmium, křemík a kyselina salicylová) a jejich působení na rostlinné organismy. Dalšími důležitými jevy při toxicitě, jsou stresové projevy a reaktivní formy kyslíku v podobě oxidativního stresu. V praktické části jsem se zaměřila na spolupůsobení křemíku a kyseliny salicylové jako protektivních látek při působení kadmia.

1 Teoretická část

1.1 Pšenice setá

Pšenice (*Triticum sp.*) se považuje za nejstarší obilovinu světa pocházející z jihozápadní Asie a je rozšířená po celém světě. Jedná se o jednoděložnou rostlinu patřící do čeledi lipnicovitých (*Poaceae*). Stonek u obilnin je stéblo rozdělené kolénky na mezičlánky. Listy jsou tvořené listovou pochvou a listovou čepelí. Plevy jsou široké a mnohožilnaté, pluchy jsou hladké a pluška blanitá. Jazyček je krátký a na okraji vroubkovaný. Ouška jsou malá a ochmýřená. Charakteristickým květenstvím je klas, který může být osinatý, osinkatý či bezosinný (Obrázek 1). Barva klasu a osinatost se samozřejmě liší od jednotlivých variant rodů pšenice. Plodem je obilka (Zemědělské komodity [online]).

Z hlediska půdních vlastností se pšenice nejlépe pěstuje v neutrálním pH s půdním typem černozem, hnědozem nebo rendzina. Z půdních druhů se nejlépe rostlině daří ve středně hlinité, jílovito–hlinité až hlinito–jílovité. Tato komodita je celosvětově nejvýznamnější obilninou. Zrna se mohou využít jako potravina (např. pečivo, těstoviny), krmivo (např. krmné směsi pro hlodavce) či jako surovina (výroba škrobu, lihu atd.). Ze stébel lze vytvořit slámu či otruby (Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích [online]).



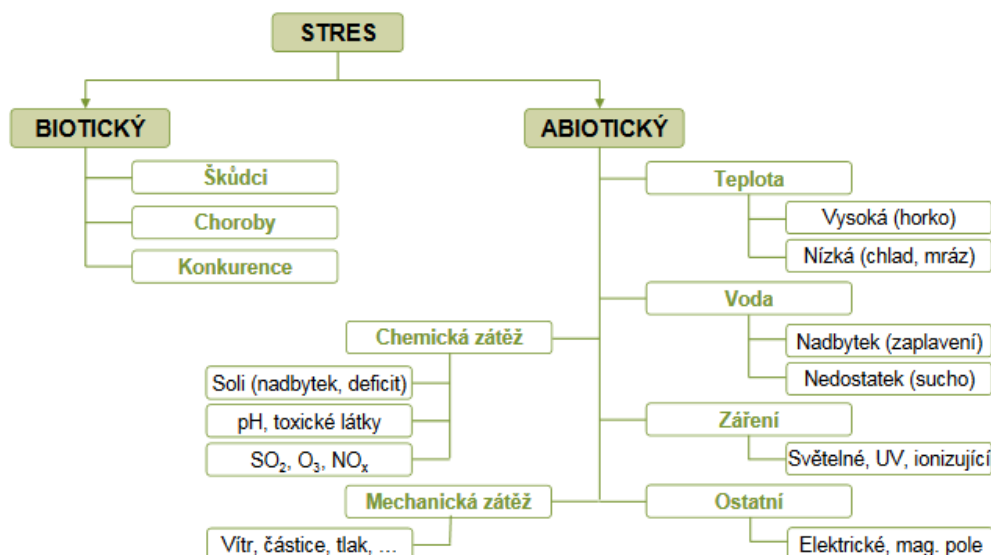
Obrázek 1: Charakteristický vzhled pšenice seté (*Triticum aestivum*) (https://cs.wikipedia.org/wiki/P%C5%A1enice_set%C3%A1#/media/File:Illustration_Triticum_aestivum1.jpg).

1.2 Stres v rostlinné fyziologii

1.2.1 Definice stresu a průběh stresové reakce

Rostliny jsou během svého života vystaveny velmi různým podmínkám vnějšího prostředí. Problematika fyziologie stresu u rostlin je komplikovanější než u živočichů. Je to dáno neschopností uniknutí před působením stresorů, větší mezidruhovou variabilitou a heterogenitou vnitřního prostředí. Může tak docházet ke zpomalování životních funkcí, poškození orgánů a v krajním případě k uhynutí. Nepříznivé vlivy vnějšího prostředí, které ohrožují rostlinu, označujeme jako stresové faktory (*stresory*). Jedná se o odchylku z optimálních podmínek. Termín stres se používá pro souhrnné označení stavu, ve kterém se rostlina nachází pod vlivem stresorů (Procházka et al., 1998).

Pod pojmem stresové faktory se řadí extrémní environmentální podmínky, které indukují funkční změny v rostlinách do takové míry, že se v nich vyvine stres. V přírodě nejsou ideální ani stabilní podmínky pro život rostlin. To znamená, že na rostlinu nepůsobí jen jeden stres (například teplota, voda, nedostatek kyslíku, pH půdy, toxické látky), ale jedná se o součinnost spolupůsobení stresorů. Mnohé faktory v prostředí vytváří různou kombinaci stresových podmínek (Slováková and Mistrík, 2007). To má za následek inhibici růstu, snížení bioprodukce nebo fyziologickou aklimatizaci. V zemědělství jsou nejčastější stresové faktory například nedostatek či nadbytek vody, vysoká či nízká teplota, vysoká salinita půdy, krupobití nebo toxicita pesticidů (Kukla and Kuklová, 2013). Stres se všeobecně definuje na abiotické a biotické faktory (Obrázek 2) (Slováková and Mistrík, 2007).



Obrázek 2: Přehled nejběžnějších stresových faktorů (podle Cerkala, 2011).

Jelikož rostliny nemohou opustit stresové prostředí, vyvinuly se u nich během evolučního vývoje různé strategické životní adaptace. Pokud stresové faktory nepřekročí ekologické pesimum, je rostlina schopná odolávat stresu. Jakmile se intenzita stresového faktoru dostane v ekologické amplitudě za ekologický pejus, rostlina odumírá (Prausová, 2015). U adaptace rostlin rozlišujeme tři hlavní prvky: vnímání stresu, přenos stresových signálů a výslednou reakci. Tyto adaptační reakce lze pozorovat v morfologické a fyziologické struktuře (například výrazná impregnace buněčných stěn, rezervoáry vody nebo tlustá kutikula na listech) (Slováková and Mistrík, 2007). Jedná se vlastně o schopnost vyhnout se stresu, kterému přispívají vhodně načasované životní cykly (Levitt, 1980).

Druhová variabilita rostlin napomáhá k přizpůsobení se různým životním podmínkám při odlišných faktorech prostředí. Působením stresů může rostlina dosáhnout rovnovážného stavu pomocí kompenzačních procesů. V takovém případě dochází ke sledu reakcí, který bývá označován jako stresová reakce (Obrázek 3) (Slováková and Mistrík, 2007).

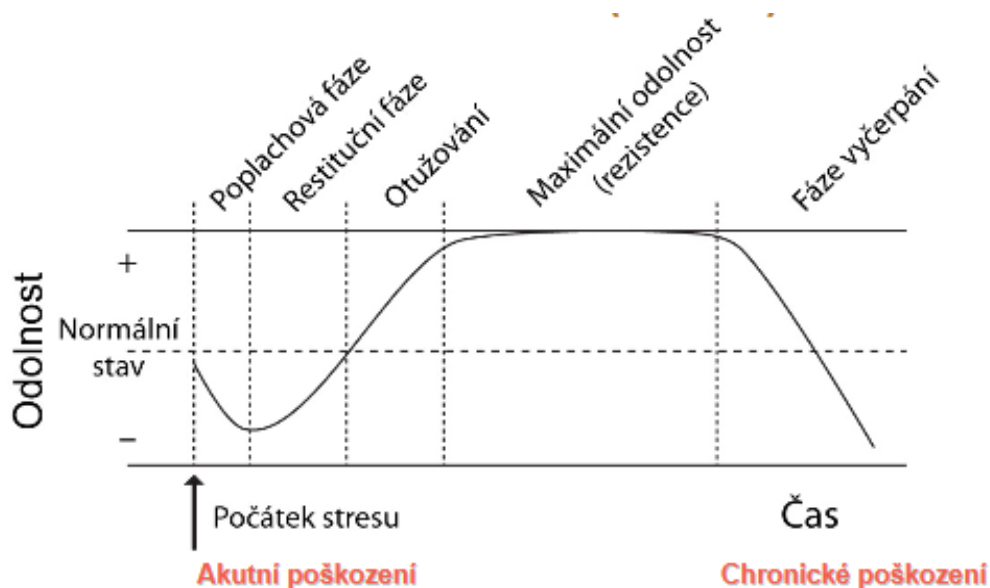
1. *Poplachová fáze:* Začíná bezprostředně po začátku působení stresového faktoru. Rostlina pomocí senzorů zjistí přítomnost stresoru. Dochází k poškození protoplazmy, klesá viskozita, zvyšuje se

permeabilita pro vodu a osmotický tlak. V rostlině probíhají oxidačně-hydrolytické reakce.

2. *Restituční fáze:* Probíhá za podmínek, kdy intenzita působení stresoru nepřekračuje letální úroveň. Aktivují se obranné mechanismy a rostlina je více odolná. Stoupá viskozita, klesá permeabilita pro vodu, snižuje se respirace, zvyšuje se fotosyntéza a obsah cukrů. V rostlině probíhají redukčně – syntetické reakce

3. *Fáze rezistence:* Dochází k mobilizaci kompenzačních mechanismů, které směřují ke zvýšení odolnosti rostliny vůči působícím faktorům.

4. *Fáze vyčerpání:* Při dlouhodobém a intenzivním působení stresového faktoru nastává zlom a z překonání zvýšení odolnosti dochází k poklesu odolnosti, což má za následek úhyn rostliny (Procházka et al., 1998).



Obrázek 3: Idealizovaný průběh stresové reakce (upraveno podle Larchera, 1995).

1.2.2 Odpovědi rostlin na stres

Během svého života se rostliny přizpůsobily různým stresorům ve svém prostředí. Vyvinuly si mechanismy ochrany, které jim pomáhají překonat nepříznivé podmínky.

- 1) *Náchylnost (susceptibility)* – Jedná se o stav rostliny, kdy už není schopná překonávat nepříznivé podmínky. Dochází ke zpomalení růstu a následně rostlina umírá.
- 2) *Vyhnutí se (avoidance)* – Rostliny se adaptují na život v nepříznivých podmínkách například krátkým životním cyklem nebo modifikací listů.
- 3) *Únik (escape)* – Životní cyklus rostlin začíná pouze za příznivých podmínek.
- 4) *Tolerance* – Rostliny se přizpůsobí a dokáží odolávat stresu.
- 5) *Rezistence* – V rostlinném organismu se následkem stresu spustí mechanismy, které jsou schopné stres překonat.
- 6) *Adaptace* – Jedná se o dědičné přizpůsobení ve struktuře nebo funkci rostlin (například CAM rostliny).
- 7) *Aklimatizace* – Proces nedědičných fyziologických změn, které jsou vyvolané například chladem nebo teplem (Slováková and Mistrík, 2007).

1.3 Těžké kovy a jejich toxicita

1.3.1 Vlastnosti těžkých kovů

Těžké kovy lze definovat jako kovy, které mají specifickou hmotnost (hustotu) větší než 5g / cm³. Toxické kovy v malých dávkách působí negativně na životní prostředí a mají tak toxické účinky. Nejvýznamnější jsou kadmium (Cd), olovo (Pb), měď (Cu), rtuť (Hg), zinek (Zn) a nikl (Ni). Podstata toxicity je schopnost vázat se na -SH, -COOH a NH₂ skupiny rostlinných struktur, čímž přeměňují jejich strukturu a funkci. Může dojít k deaktivaci enzymů, katalytickým reakcím produkující volné radikály nebo náhradě jiných důležitých prvků v biomembránách. Celkový toxický účinek je ovlivněn množstvím přijetí těžkého kovu, ale také i formou přijatého kovu a cestou vstupující do organismu (Tomašík, 2010).

V životním prostředí je přirozeným zdrojem těžkých kovů zvětrávání mateřské horniny. V dnešní době je jejich výskyt všude kolem nás a to například v půdě, vodě, atmosféře a organismech (Novotná, 2012).

Hlavním zdrojem těžkých kovů je antropogenní činnost (například průmyslová činnost, spalování fosilních paliv, umělá hnojiva, pesticidy a detergenty) a dochází tak k většímu pronikání těžkých kovů do životního prostředí. Řadíme je do skupiny cizorodých látek, které se významně podílejí na kontaminaci zemědělských půd (Mendelova univerzita v Brně [online]). Takto se do prostředí dostávají sloučeniny, které se v přírodě přirozeně nevyskytují, a nazýváme je *xenobiotiky* (Procházka et al., 1998).

K největší akumulaci těžkých kovů dochází v půdě a jejich geochemické cykly jsou ovlivněné pH půdy. Pokud dojde k okyselení půdního roztoku, těžké kovy se uvolňují a jsou snáze přijatelné rostlinami a vyplaví se do spodních vod. Každá půda je charakteristická svojí hodnotou těžkých kovů, což představuje jejich přirozený obsah. V důsledku lidské činnosti však dochází ke zvyšování jejich hladiny a kumulaci a to zejména v orniční vrstvě, kde dochází k ovlivnění mikrobiální aktivity (Novotná, 2012).

Z toxických kovů se nejčastěji do půdy, ve větším množství, dostává zinek, olovo a kadmium. Je to dáno usazováním prachu z průmyslových procesů a výfukových plynů, dále z kontaminovaných odpadních vod a hnojiv. Ionty těchto kovů rostlina velmi snadno přijímá kořeny, protože selektivita transportních proteinů je nedostatečná pro jejich rozlišení od nezbytných prvků pro rostlinu (Procházka et al., 1998).

1.3.2 Mechanismus obrany rostliny proti toxicitě těžkých kovů

Toxicita se v rostlině projevuje různými způsoby. Po přijetí těžkého kovu se v buňkách inaktivují některé enzymy a redoxní systémy. Dále dochází k inhibici dělení a prodlužovacího růstu buněk, což se projevuje zejména zpomalením růstu primárního kořene, protože v kořenech dochází k největšímu hromadění těžkých kovů (první příznak toxického působení na rostlinu). Menší množství toxických

iontů se přenese do nadzemních orgánů, kde nejvíce ovlivňuje fyziologické procesy v listech a tím ovlivňuje průběh fotosyntézy (Procházka et al., 1998).

Ochrana rostlin proti toxickému působení těžkými kovy začíná nejčastěji u kořenů. Prvním obranným mechanismem je vylučování látek do půdy, které na sebe těžký kov navážou a tak se zabrání příjem kořeny. Během tohoto procesu tu svoji roli hrají mykorhizní houby (ektomykorhizy a arbuskulární mykorhizy), které snižují příjem kovů rostlinou (Kovářová, 2010). Příjem kovů rostlinou snižují svými hyfálními exudáty nebo ukládají kovy do vakuol (Hall, 2002).

Druhý obranný mechanismus se spouští, když dojde k příjmu těžkých kovů kořeny. V kořenech rostlin se aktivují detoxikační procesy, proto se těžké kovy v malém či minimálním množství dostanou do nadzemních částí rostlin. Ionty těžkých kovů narušují enzymatickou aktivitu a konformaci nukleových kyselin. Projevuje se tu chelace iontů v cytosolu buněk, což zajišťuje detoxikaci buněk a výsledkem je snížení koncentrace volných kovových iontů (Kovářová, 2010). Kovy, které prošly procesem chelatace, jsou v rostlině ukládány do vakuol, buněčné stěny v začleněných proteinech nebo v podobě silikátů (Hall, 2002).

Vyvinutí odolnosti rostlin k působení těžkých kovů jsou v rámci rostlinných druhů a variet velmi odlišné. Tolerantní rostlina dokáže růst v ekosystémech s vyšším obsahem škodlivých látek, než by byly ostatní rostliny schopné přežít. Například některé trávy mohou znesnadňovat vstup toxických iontů do cytosolu pomocí vylučování organických kyselin do rhizosféry, sorpcí na pektinové látky v buněčných stěnách a i větší selektivitou transportních proteinů v plazmatické membráně. Pokud je rostlina vystavena těžkým kovům, může omezit jejich příjem pomocí mykorhizních hub a kořenových exudátů (Hall, 2002; Procházka et al., 1998).

Tvorba stresových hormonů patří do vnitrobuněčných detoxikačních mechanismů a dochází ke vzniku odolnějších izoenzymů, proteáz a ubikvitinu, který napomáhá k urychlení rozkladu poškozených proteinů (Procházka et al., 1998).

Dalším projevem tolerance rostlin na těžké kovy je schopnost začlenění kovu do buněčné stěny, minimalizace příjmu přes plazmatickou membránu, chelatace na ligandy (fytochelatin, metalothioneiny a proteiny), opravy stresem poškozených

proteinů a kompartmentací kovů do vakuol přes tonoplastové transportéry (Kovářová, 2010). Při zvládnutí tolerance vůči těžkým kovům mají důležitou roli organické kyseliny a glutathion. Díky nim se vytvářejí komplexy s kovy a tak dochází k detoxikaci (Prasad and Freitas, 2003).

Fytochelatiny (PC) jsou peptidy, které jsou syntetizovány jako odpověď na ionty kovů a v rostlinách se podílejí na detoxikaci rizikových prvků (Fišer et al., 2013). PC se nejenom podílejí na homeostáze esenciálních těžkých kovů, ale mají také důležitou roli při metabolismu síry nebo fungují jako antioxidanty (Cobbett, 2000). Syntéza FC neprobíhá v ribosomech, ale je indukována až přítomností iontů kovů v cytosolu. Komplex toxických kovů je poté transportován do vakuol, kde dojde k uvolnění z PC, a tak jsou inaktivovány vysokou koncentrací organických kyselin (Procházka et al., 1998).

1.3.3 Kadmium

Koncentrace kadmia v půdě kolísá mezi 0,01 – 0,15 mg/kg a jeho přirozený obsah v půdě se velmi nemění. Množství výskytu je ovlivněn matečnou horninou, intenzivním zvětráváním a následným transportem (Cibulka, 1991). Celková koncentrace kadmia v půdě nám dává informaci o potenciálním množství dostupném pro rostlinu, ale nevypovídá o skutečné dostupnosti kadmia pro rostlinu (Slováková and Mistrík, 2007).

Do půdy vstupuje kadmium několika cestami, a to hlavně jako aerosoly vzniklémi spalováním paliv a odpadů, odpady po těžbě a také zemědělskými chemikáliemi (například hnojiva, pesticidy a detergenty) (Cibulka, 1991).

Kadmium je neesenciální těžký kov, silný inhibitor enzymů a díky tomu se považuje za velmi nebezpečný polutant, protože je vysoce toxický a dobře rozpustný ve vodě (Slováková and Mistrík, 2007). Přenos kadmia v rostlinách je ovlivněn chemickou formou, která je závislá na složení vod nebo srážek, dále na pH a obsahu některých iontů, které mohou tvořit stabilní komplexní sloučeniny, dále pak na redoxním potenciálu, který je důležitý pro posouzení stability různých forem kovů. Důležitý je i obsah organického uhlíku, který ovlivňuje mobilitu, rychlost a cestu migrace kontaminantu. Příjem kadmia kořeny rostlin se zvyšuje

vyšším pH nebo výskytem dalších prvků (například olova) a snižuje se obsahem alkalických kovů, výskytem jiných těžkých kovů nebo vápněním. Výskyt vyšší koncentrace konkurenčních iontů vede ke snížení adsorpce ostatních kovů a tím lze ovlivnit adsorpci kadmia. Díky tomuto jevu je pak navýšena mobilita prvku v půdě a tím je lépe využitelnější pro rostliny (Bělohlávková Staffová, 2013).

Jelikož je kadmium součástí matečných hornin, vyskytuje se prakticky ve všech půdách. Výsledkem je určitá koncentrace tohoto prvku v potravinách, a proto jsou všichni lidé vystaveni přirozené dávce tohoto prvku (Tran and Popova, 2013).

Mechanismus příjmu

Kadmium proniká do kořenů rostlin přes epidermis, kortex apoplastem (permeabilní buněčné stěny a vodivé svazky) nebo symplastem (protoplasty spojené plazmodezmami) do xylému, kde vznikají komplexy s ligandy (organické kyseliny a fytochelatiny). Velký podíl kadmia zůstává v kořenech a malý podíl se transportuje do nadzemních částí (Tlustoš et al., 2006). Tento jev vzniká díky indukci mechanismu suberinizace a vytvořením více vrstev buněk endodermis v kořenu.

Vliv kadmia na metabolismus rostlin

Kořenový systém rostliny přichází jako první do styku s kontaminantem a reaguje snížením vitality, fertility a hnědnutím kořenových vlásků (Slováková and Mistrík, 2007). Dochází k vyšší redukci hmotnosti nadzemní biomasy v porovnání s kořeny (Prasad and Hagemeyer, 1999). Potlačení růstu se projevuje redukcí rychlosti prodlužovacího růstu buněk (hlavně stonků), protože kadmium inhibuje činnost protonové pumpy odpovědné za tento děj (Aidid and Okamoto, 1993). Například v buňkách kořenových špiček cibule kuchyňské (*Allium cepa*) kadmium poškozuje jádérko, v rýži (*Oryza sp.*) mění syntézu RNA a inhibuje ribonukleázovou aktivitu, u pšenice (*Triticum sp.*) a slunečnice (*Helianthus sp.*) redukuje ATP-ázovou aktivitu plazmatické membrány (Slováková and Mistrík, 2007).

Chlorózy na listech mohou být způsobeny inhibicí biosyntézy chlorofylu, deficitem železa nebo kadmíem indukovaným poklesem obsahu hořčíku (Larbi et al., 2002).

Červenohnědé skvrny jsou pravděpodobně způsobené změnou v metabolismu fenolických látek (Tlustoš et al., 2006).

Krycí pletiva rostlin obsahující kadmium se vyznačují redukovanou velikostí epidermálních buněk, větším výskytem trichomů, redukcí intercelulárních prostorů a trvalým uzavřením svěřacích buněk průduchů. U obvodových vrstev kortexu stonku dochází k rozsáhlým ultrastrukturálním změnám. Jedná se hlavně o změny tvaru plastidů, zvýšené zastoupení plastoglobulů a dezintegraci vnitřního membránového prostoru (Barceló et al., 1988).

Negativní působení kadmia na fotosyntézu je již mnohokrát popsán. Ovlivňuje fotosyntetické reakce v důsledku změn a složení fotosyntetických pigmentů. Dochází k ovlivnění světelné a tmavé fáze fotosyntézy. Při předčasné senescenci listu, inhibici růstu a poruše pohybu průduchů dochází ke snížení aktivity fotosyntézy na úrovni listu. Tento sled procesů má za následek potlačení prodlužovacího růstu buněk a to zejména ve stonku (Slováková and Mistrík, 2007). Chloroplasty ovlivněné kadmíem mají redukováný objem a vyskytují se v menší míře než u rostlin nekontaminovaných. Příklad symptomu poškození chloroplastů je degradace acylu lipidů v thylakoidních membránách (Tlustoš et al., 2006).

Tento kov ovlivňuje i dýchání rostlin. Chová se jako inhibitor oxidativní fosforelace v mitochondriích (Kessles and Brand, 1995).

Kadmium patří mezi prvky, které dokáží vyvolat oxidační stres. Ionty kadmia mohou inhibovat nebo stimulovat aktivitu antioxidantních enzymů (Tlustoš et al., 2006). Následkem oxidačního stresu dochází ke zvýšení zásob volných mastných kyselin, porušení struktury gran a k inhibici syntézy chlorofylu (Slováková and Mistrík, 2007).

Kadmium celkově ovlivňuje rovnováhu makro a mikroelementů v rostlině. Při jeho nadbytku dochází k potlačení příjmu železa a tím vzniká chloróza rostlin. Toxicita kadmia indukuje nedostatek fosforu a redukuje transport manganu. Toxické působení kadmia je spojeno s nedostatkem zinku v rostlině (Khan and Frankland, 1983). Dále má za následek omezení příjmu, transportu a využití některých prvků a látek. Jedná se například o vápník, hořčík, fosfor, draslík a vodu. Velký vliv má na rostlinu celkový výskyt kadmia a železa. Pokud se toto množství mění, ovlivňuje to

růst rostliny, fotosyntézu, příjem obou prvků a jejich distribuci. Kadmium interferuje s železem translokovaným z kořenů do listů (Slováková and Mistrík, 2007). Nicméně bylo zjištěno, že kyselina abscisová a kyselina salicylová hrají velkou roli při ochraně rostliny před toxickým účinkem kadmia. Podílejí se na snižování inhibice růstu, které je způsobeno toxicitou (Sharikova et al., 2016).

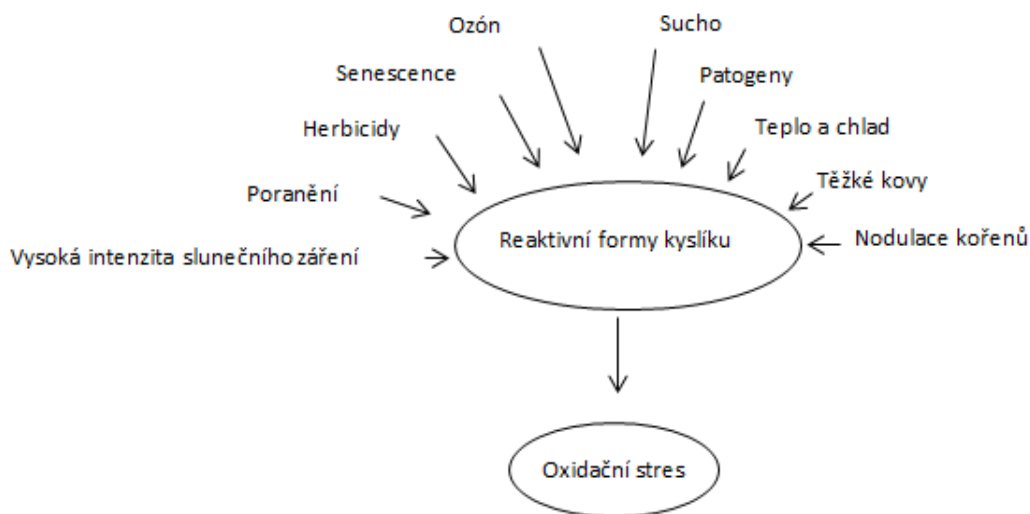
1.4 Oxidační stres

1.4.1 Oxidační stres a reaktivní formy kyslíku

Při vystavení rostlin stresovým faktorům, v podobě biotických či abiotických (Obrázek 4), dochází k produkci reaktivních forem kyslíku (ROS; Reactive Oxygen Species) (Kyseláková, 2012). Produkce ROS se zvyšuje i během senescence. Řadí se mezi primární mediátory oxidačního poškození a patří sem superoxidový radikál ($\bullet\text{O}_2^-$), hydroxylový radikál ($\bullet\text{OH}$), singletový kyslík ($^1\text{O}_2$), peroxid vodíku (H_2O_2) a jsou produkovány v různých částech rostlin a organelách (Slováková and Mistrík, 2007).

Oxidační poškození vzniká při porušení rostlinné homeostázy, když je kapacita bunčkových antioxidačních systémů vyčerpána ROS a jinými bunčkovými oxidanty. Produkce reaktivních forem kyslíku ovlivňuje produktivitu rostlin, a to tím, že jejich produktivita klesá (Slováková and Mistrík, 2007).

Rostliny mohou prodělat oxidační stres za jakýchkoliv podmínek, jako například při napadení patogenem nebo okusu herbivorem. ROS jsou však produkovány i v průběhu běžných buněčných metabolických procesů. Jedná se například o buněčné dýchání, fotosyntézu, intra- a inter-buněčné signální cesty, a bývají tvořeny i membránově vázanými nebo volnými enzymy v cytoplazmě (Asada, 2006). Nejdůležitější místa vzniku ROS jsou však chloroplasty, mitochondrie, endoplazmatické retikulum, plazmatická membrána a mikrotělíška (Slováková and Mistrík, 2007).



Obrázek 4: Oxidační stres a produkce ROS vyvolaná působením různých stresových faktorů (upraveno podle Slováková and Mistrík, 2007).

1.4.2 Vybrané reaktivní formy kyslíku

Běžně se vyskytující forma kyslíku je poměrně málo reaktivní, protože je v základním stavu tripletem ($^3\text{O}_2$). Jedná se tedy o biradikál obsahující dva nepárové elektrony s paralelním spinem (Blokhina et al., 2003). Reaktivní formy kyslíku se označují jako aktivované a jeho aktivace může proběhnout dvěma způsoby. První možností je absorpce potřebného množství energie na převrácení spinu jednoho z elektronů. Po přijetí energie se mění základní tripletový stav na singletový stav, který má elektrony s opačnými spiny a díky tomu je mnohem reaktivnější. Druhou možností je monovalentní redukce na superoxid, peroxid vodíku, hydroxylový radikál a vodu. Aktivace kyslíku na superoxid probíhá pomocí dodané energie a vyžaduje donor elektronů. Při následujících jedno–elektronových redukcích už není vyžadována energie, takže se mohou vyskytovat spontánně nebo za pomoci e^-/H^+ donorů (Slováková and Mistrík, 2007).

Superoxid je nabitá molekula, která nemůže procházet biologickými membránami. Tvoří se v matrixu i na buněčné membráně (Slováková and Mistrík, 2007). Může oxidovat řadu aminokyselin (například histidin a methionin), kyselinu askorbovou, NADPH, redukovaný cytochrom C a komplexy přechodných kovů (dochází

k ovlivnění aktivity metaloenzymů). Protonová pumpa superoxidového radikálu je hydrofobnější oproti superoxidu a díky tomu dochází ke snadnějšímu pronikání biologickými membránami, kde se odebírají atomy vodíku z polynenasycených mastných kyselin a lipidových hydroperoxidů. Díky tomu je spuštěna řetězová peroxidace lipidů (Kyseláková, 2012). V chloroplastech je vysoký obsah kyseliny askorbové, která napomáhá k rychlé redukci $\bullet\text{O}_2^-$ (Noctor and Foyer, 1998).

Peroxid vodíku je produkován dvouelektronovou redukcí kyslíku, je středně reaktivní a patří mezi významné oxidanty (Halliwell, 2006). Jedná se o silný toxický oxidant, který způsobuje silné poškození buněk během oxidačního stresu. Na druhou stranu se chová jako signální molekula, která aktivuje obranný systém k navrácení buněčné homeostázy (Hung et al., 2005). Může tedy fungovat jako zprostředkovatel indukce oxidačního stresu, nebo jako produkt již vzniklého stresu. Peroxid vodíku může dále vzniknout následujícími způsoby: v peroxizomálním dýchacím řetězci za pomoci flavinoxidázy, β -oxidací mastných kyselin a činností glykolát oxidázy v peroxizómech (Slováková and Mistrík, 2007). V mnoha experimentech bylo prokázáno, že peroxid vodíku je důležitý při přenosu signálů během adaptace rostlin k měnícím se životním podmínkám a při aktivaci obranných mechanismů (Neil et al., 2002).

1.4.3 Poškození způsobené ROS

Při působení ROS jsou nejvíce náchylné nukleové kyseliny, proteiny a nenasycené mastné kyseliny v lipidech. Oxidační poškození DNA způsobuje například delecii, mutaci nebo jiné genetické defekty. Oxidace proteinů s enzymatickou funkcí narušuje jejich katalytickou schopnost. Během ROS dochází u proteinů ke znehodnocení všech aminokyselin (hlavně methioninu a cysteinu) (Kyseláková, 2012).

Reaktivní formy kyslíku peroxidují polynenasycené mastné kyseliny, které jsou součástí fosfolipidové buněčné membrány (Bokov et al., 2004). Peroxidační poškození plazmalemy má za následek únik buněčného obsahu a to vede k buněčné smrti. Poškození membrán uvnitř buňky ovlivňuje respirační aktivitu mitochondrií a schopnost chloroplastu fixovat CO_2 (Kyseláková, 2012).

1.4.4 Obranné mechanismy při oxidačním stresu

Nadměrné množství ROS v rostlinách způsobuje oxidační stres. Tvorbě ROS zabraňují nízko molekulové antioxidanty (například kyselina askorbová, glutamin a tokoferoly), enzymy regenerující redukované formy antioxidantů a enzymy peroxidázy a katalázy. V rostlinných pletivech fungují jako antioxidanty fenolické složky, například flavonoidy, taniny nebo prekurzory ligninu (Slováková and Mistrík, 2007).

ROS v rostlinách mohou vznikat neenzymovými nebo enzymovými reakcemi. Co bude v rostlinném organismu upřednostněno, závisí na koncentraci O_2 uvnitř rostlinného pletiva. Pokud je intracelulární koncentrace nižší, je blokován vznik ROS a nedochází tak k saturaci terminálních oxidáz v dýchacím řetězci a rychlost respirace je limitována dostupností O_2 . Při vyšších koncentracích O_2 jsou oxidázy dýchacího řetězce saturovány a dochází tak v rostlinném pletivu k nárůstu koncentrace O_2 (Kyseláková, 2012).

Do neenzymatických antioxidantů se řadí askorbát, glutation, α -tokoferol, β -karoten a flavonoidy. Jsou rozváděny hlavně v chloroplastech, mitochondriích a peroxizomech. Tyto antioxidanty zabezpečují buňkovou ochranu před ROS, ale pokud tvorba ROS přesáhne jejich kapacitu, vzniká oxidační stres jako sekundární stres. Neenzymatické reakce se také podílejí na enzymaticky katalyzovaných detoxikačních procesech (Slováková and Mistrík, 2007).

Nejdůležitějším procesem na odstraňování ROS je Asada – Halliwellův cyklus. Využívá se zde askorbát a glutation a podílejí se na katalýze antioxidantními enzymy. Součástí je oxidace a opětovná redukce askorbátu a glutationu askorbát peroxidázou a glutation reduktázou, což slouží na odstranění peroxidu vodíku. Tento cyklus se nachází v chloroplastech, cytosolu, mitochondriích a peroxizomech (Slováková and Mistrík, 2007).

1.5 Křemík

Křemík (Si) je polokov a je po kyslíku druhým nejběžnějším prvkem zemské kůry. V půdách se vyskytuje hlavně ve formě nerozpustných oxidů a křemičitanů (Richmond and Sussman, 2003). Po fyzikální a chemické stránce se jedná o monokřemičité kyseliny, polykřemičité kyseliny nebo organokřemičité sloučeniny (Balakhnina and Borkowska, 2013).

V rostlinách Si napomáhá k lepším morfologickým a fyziologickým procesům. Během optimálních podmínek je role Si minimální nebo dokonce žádná. Ve stresových podmínkách jeho role narůstá a nejčastěji se porovnává s úlohami sekundárních organických metabolitů (Epstein, 2009).

1.5.1 Křemík v rostlinách

Velké množství Si se v půdě vyskytuje v nerozpustné formě. Jedná se například o oxid křemičitý nebo křemičitany železa a hliníku, které rostlina nedokáže vstřebat. Kyselina polysilicová má velký vliv na strukturu půdy, schopnost zadržovat vodu, absorpční kapacitu a stabilitu eroze půdy (Balakhnina and Borkowska, 2013). Rostlina nejčastěji Si získává v podobě kyseliny ortosilikátové, která je rozpustná v půdním roztoku. Po zvětrávání minerálů na bázi křemíku nebo po přidání křemíku vytvoří hnojivo, které se podobá křemičitanu draselnému (Časopis českého svazu greenkeeperů [online]). Příjem křemičitanů je ovlivněn rychlostí průsaku pletiva. Jedná se o pasivní pohyb, který je ovlivněn kyselinou křemičitou a odpařováním vody (Bauer et al., 2011).

U různých rostlinných druhů jsou velké rozdíly v příjmu a transportu Si (Balakhnina and Borkowska, 2013). Na základě dřívějších experimentů bylo zjištěno, že příjem Si je aktivní (v akumulčních rostlinách), pasivní nebo rostliny vylučující tento prvek. Toto rozdělení je založeno na měření obsahu Si a rychlosti průsvitu (Richmond and Sussman, 2003).

V rýži, kukuřici a ječmeni byly identifikovány transportéry pro Si. V rýži je akumulátor Si v podobě Lsi1 a Lsi2 a jedná se o přívodní a výstupní transportéry Si. Vyskytují se na plazmatických membránách exodermálních a endodermálních

buněk kořenů. Lsi1 je lokalizován na distální (okrajové) straně buněk a Lsi2 je lokalizován na proximální (vnitřní) straně. Dalším transportérem křemíku je Lsi6 a je lokalizován v buňkách xylému parenchymu listů a uzlů (Yamaji a Ma, 2009).

U kukuřice byly zjištěny geny typu ZmLsi1 a ZmLsi6. Transportér ZmLsi1 se nachází na plazmatické membráně distální strany epidermálních a hypodermálních kořenových buněk. Na výhoncích je ZmLsi6 přítomen v xylému listových pláštů a čepelí a je zodpovědný za vychytávání Si kořeny. Transportéry pro vylučování Si z kukuřice a ječmene se vyskytují pouze v endodermálních plazmalemových membránách v kořenech a nevykazují žádnou polaritu. Různá lokalizace a polarita transportérů v kukuřici a ječmenu naznačuje odlišný systém vychytávání Si od rýže (Mitani et al., 2009). U dvouděložné rostliny tykve muškátové (*Cucurbita moschata*) byly také identifikovány transportéry pro křemík (Mitani et al., 2011).

1.5.2 Projevy křemíku v rostlinách

Si nepatří mezi důležité prvky v rostlině, ale byl prokázán jeho pozitivní vliv na růst a výnos rostlin (Balakhnina and Borkowska, 2013). Existuje pouze jedna čeleď přesličkovité (*Equisetaceae*), pro které je výskyt Si zásadní (Epstein, 1994). Dále se může obsah Si lišit v rámci různých zemědělských kultivarů (Cooke and Leishman, 2011). Byly však pozorovány růstové abnormality při kultivacích s nedostatkem tohoto prvku. Si se snadno vstřebává, takže jeho výskyt v rostlinách je pozorován v rozmezí od 1 – 10 % sušiny nebo dokonce i více (Mihaličová et al., 2014).

V půdách se Si vyskytuje ve velkých koncentracích. I tak se v zemědělství využívají hnojiva s obsahem Si na zvýšení výnosu a kvality plodin, a to zejména pro rýži (*Oryza sp.*) a cukrovou třtinu (*Saccharum officinarum*) (Hodson et al., 2005). Pokud rostlina zvýší příjem křemíku, zlepší se tím strukturální integrita plodin, což může zlepšit jejich toleranci vůči chorobám a různým abiotickým stresům (Ma and Yamaji, 2006).

Rostliny mohou Si uložit do různých částí a to například do buněčné stěny, lumenu, intracelulárního prostoru, kořenů, listů a reprodukčních orgánů (Richmond and Sussman, 2003). Dále má každý orgán v rostlině specifická místa k ukládání

křemíku, zatímco jiné buňky mohou aktivně vylučovat oxid křemičitý. Tento jev byl objeven u trav a jehličnanů (Bauer et al., 2011).

Křemičité struktury u rodu *Equisetum* se nacházejí na epidermálním povrchu celé buněčné stěny. U čeledi *Poaceae* se oxid křemičitý vyskytuje ve dvou vrstvách o šířce 2,5 μ m. Křemičité buňky se ještě nacházejí v epidermis a vaskulárních pletivech stonku, listové pochvy a slupek (Currie and Perry, 2007).

1.5.3 Vliv křemíku při působení těžkých kovů

V mnoha studiích bylo prokázáno, že Si zmírňuje různé biotické a abiotické stresy (Liang et al., 2007). V poslední době se věnuje velká pozornost Si v rámci tolerance stresu těžkými kovy. Pokusnými rostlinami byla například rýže setá (*Oryza sativa*), kukuřice setá (*Zea mays*), okurka setá (*Cucumis sativus*) a dokonce i čínské zelí (*Brassica chinensis*). I přes velké množství laboratorních pokusů nebyl podrobně popsán mechanismus účinku křemíku v rostlinách (Mihaličová et al., 2014).

Hlavním cílem, při používání křemíku s těžkými kovy, je snížit zdravotní rizika z plodin pěstovaných v kontaminovaných lokalitách (Mihaličová et al., 2014). Při výskytu křemičitanu vápenatého (CaSiO_3) a Cd v půdě nebyly pozorovány žádné změny pH půdy. Křemík ale změnil distribuci Cd a Zn v půdní frakci a snížil tak jejich biologickou dostupnost pro rostlinu. Na druhou stranu však došlo ke zvýšení příjmu kovů na více stabilní frakci a tím došlo k zablokování pohybu Cd a Zn (Cunha et al., 2008).

Bylo také zjištěno, že rostliny ošetřené Si přijaly více Cd než neošetřené rostliny. Kadmium se však koncentrovalo v kořenech. Inhibice transportu kovů z kořene k výhonku je tedy považována jako pozitivní účinek Si k těžkým kovům (Liang et al., 2005).

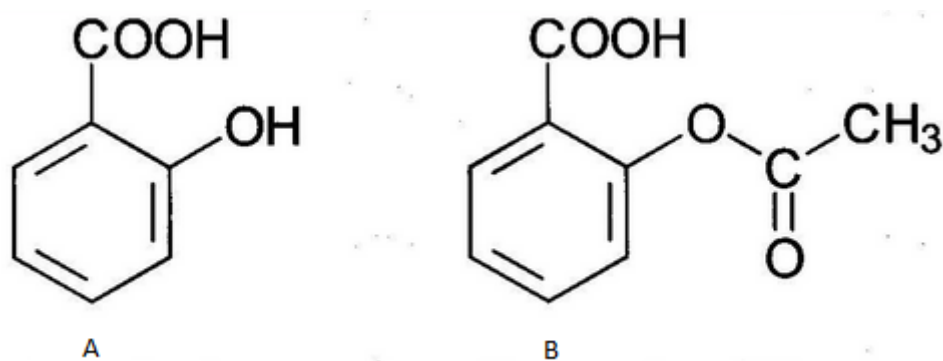
Při pokusu s kukuřicí setou (*Zea mays*), která byla pěstovaná v půdě obsahující Cd, Zn a křemičitan vápenatý, byl zjištěn nárůst biomasy a vyšší akumulace kovů. Byly pozorovány strukturální změny v epidermis, xylému a tloušťce mezofylu. Předpokládá se, že uložení oxidu křemičitého ovlivňuje toleranci kukuřice vůči stresu z působení Cd a Zn. Díky těmto výsledkům se předpokládá, že Si může být

použit při fyto-technologických zaměřených na zvýšení tolerance a akumulace kovů v rostlinách (Cuncha and Nascimento, 2009).

1.6 Kyselina salicylová

1.6.1 Charakteristika SA a syntéza v rostlině

Kyselina salicylová (SA) je chemická sloučenina s názvem kyselina 2-hydroxybenzoová. Jedná se o fenolickou sloučeninu, jejíž název je odvozen od latinského názvu pro vrbu (*Salix sp.*). V roce 1899 byl vytvořen derivát kyseliny salicylové s názvem kyselina acetylsalicylová (Obrázek 5), který je účinnou složkou jednoho z nejrozšířenějších léků s názvem aspirin (Janda and Valentová, 2014).



Obrázek 5: Strukturální vzorec kyseliny salicylové (A) a kyseliny acetylsalicylové (B) (<https://slideplayer.cz/slide/2838147/>).

SA je rostlinný hormon, který reguluje mnoho fyziologických procesů. Jedná se například o klíčení semen, buněčný růst, zavírání průduchů, dýchání nebo senescenci. Podílí se také na odpovědi při působení abiotických stresů. Působení kyseliny salicylové v některých procesech je dáno jejím efektem na jiné rostlinné hormony (Vlot et al., 2009).

1.6.2 Význam SA ve stresu

Systémově získaná rezistence (SAR) je indukovaný imunitní mechanismus v rostlinách. Není spojen s programovanou buněčnou smrtí, protože podporuje záchranu a přežití rostlinné buňky. Tato rezistence může být aktivována týdně či měsíce a dokonce se předpokládá, že se může přenášet z generace na generaci (jedná se o tzv. transgenerační imunitní paměť). Výsledkem tohoto procesu je produkce obranných proteinů v částech rostlin (Fu and Dong, 2013).

Rostlina pomocí SAR identifikuje napadení patogenem a pomocí dosud nezjištěných signálů tuto informaci předá do jiných částí rostliny. V nekontaminovaných částech rostlin se spustí obranné reakce, které vedou k větší rezistenci vůči napadení patogenem (Janda and Valentová, 2014). Rostlina se obecně proti patogenům brání tím, že v místě infekce dojde k hypersenzitivní reakci a k programované buněčné smrti (Glazebrook, 2005).

Jakmile je rostlina napadena patogenem a vystavena stresu, dochází k tvorbě komplexu, který je zodpovědný za zvýšenou tvorbu SA. Součástí komplexu je lipáza PAD4 (phytoalexin deficient 4) a EDS1 (enhanced disease susceptibility 1) (Vlot et al., 2009). Dále existuje protein v signální dráze spuštěné SA s názvem NPR1 (nonexpressor of pathogenesis – related 1) (Gordon et al., 1994). Tento protein se vyskytuje v cytosolu rostlinné buňky jako oligomer. Jakmile dojde ke zvýšení hladiny SA v buňce, dochází k monomerizaci tohoto oligomeru a jeho přechodu do jádra, kde se akumuluje. Hladina monomeru NPR1 v jádře je regulována, což slouží k zeslabení obranné reakce ve chvíli, kdy k žádnému napadení nedochází (Janda and Valentová, 2014).

U většiny fytohormonů jsou známé receptory, na které se hormony vážou. Bohužel u SA k takovému objevu ještě nedošlo. Předpokládá se ale, že receptorem je NPR1, ale jeho afinita k SA nebyla dosud prokázána (Janda and Valentová, 2014).

1.6.3 Vliv SA při působení kadmia

V posledních letech se mnoho experimentů věnuje vlivu SA při působení Cd na různých druzích rostlin. Je prokázáno, že SA zlepšuje toleranci k těžkým kovům. Na druhou stranu ale exogenní SA zhoršuje příznaky toxicity Cd u ječmene (*Hordeum sp.*), sóji (*Glycine sp.*), hrachu (*Pisum sp.*), kukuřice (*Zea sp.*), rýže (*Oryza sp.*) a některých kultivarů melounů (Liu et al., 2016). SA nezmírňuje toxicitu Cd na úrovni obrany antioxidantů, ale ovlivňuje jiné mechanismy detoxikace (Guo et al., 2013).

Při působení Cd na rostlinu dochází k menšímu vzrůstu a hmotnosti kořenové i nadzemní části. Naproti tomu se čerstvá hmotnost rostliny zvýšila po aplikaci SA. Dále účinkem SA došlo ke snížení distribuce Cd do orgánů rostlin. V jiných případech došlo při výskytu Cd u rýže (*Oryza sp.*) k inhibici růstu kořene a listy semenáčku sóji (*Glycine sp.*) byly dehydratované a ani při aplikaci SA nedošlo k potlačení negativních vlivů (Liu et al., 2016).

Při exogenním dodání SA u rýže (*Oryza sp.*) došlo k celkovému snížení poškození a to ovlivnění negativního účinku Cd na délku kořenů α -amylázovou aktivitu a mitotický index v kořenových špičkách. Rovněž bylo zjištěno, že SA podporuje klíčení semen a časný růst sazenic, aby byl vliv toxikace na semenáčky co nejmenší (Liu et al., 2016).

2 Praktická část

2.1 Materiál a metodiky

V rámci prezenční formy studia byly provedeny laboratorní experimenty s pšenicí (*Triticum sp.*) na Univerzitě Hradec Králové. Jednalo se o formu nádobového pokusu.

Z několika různých kultivarů pšenice byly provedeny testy klíčivosti semen a následně byl vybrán nejvhodnější z nich - Grany. Před začátkem experimentu byla semena vydezinfikována 5% roztokem Sava. Následně se nechaly 24 hodin imbibovat v kádinkách s destilovanou vodou nebo 500 μM roztokem SA. Poté se semena přendala do pískového substrátu a nechala se růst v klimaboxu zakryté černou fólií. Po 4 dnech se folie opatrně odstranila a semena dále klíčily ještě 2 dny.

Vzrostlé rostliny byly přendány do 3 litrových tmavých nádobek (30 rostlin na nádobu) s mírně upraveným Hoaglandovým médiem o pH 6, do kterého se podle variant přidal dusičnan kademnatý o koncentraci 50 μM a / nebo Si ve formě křemičitého skla o koncentraci 2,5 mM. Celkově bylo vytvořeno 8 variantů (Tabulka 1). Takto připravené nádoby byly vloženy do klimaboxu, kde byly napojeny na provzdušňovací systém. Médium se měnilo každé 3 dny po dobu 2 týdnů. Podmínky v klimaboxu (Binder) byly následovné: fotoperioda 16 hodin/8 hodin (den/noc), teplota 25 °C/20 °C (den/noc), vlhkost 60 %.

	Imbibice v destilované vodě	Imbibice v 500 μM SA
K	Hoaglandovo médium	X
SA	X	Hoaglandovo médium
Si	Přídavek 2,5 mM Si	X
Cd	Přídavek 50 μM Cd	X
SA+Si	X	Přídavek 2,5 mM Si
SA+Cd	X	Přídavek 50 μM Cd
Si+Cd	Přídavek 2,5 mM Si Přídavek 50 μM Cd	X
SA+Si+Cd	X	Přídavek 2,5 mM Si Přídavek 50 μM Cd

Tabulka 1: Přehled variantů použité v experimentu.

Na jednotlivé analýzy byli vybráni uniformní jedinci. Jednotlivé rostliny byly rozděleny na nadzemní a podzemní část, které se analyzovaly samostatně. Poté následovalo měření délky kořenů a nadzemní části, čerstvé hmotnosti a sušiny, obsahu chlorofylů, obsahu peroxidu vodíku, superoxidového radikálu a malondialdehydu (MDA).

Stanovení vybraných fyziologických parametrů

Zaznamenaná data z čerstvého materiálu jsme vyjádřili na jednotku suché hmotnosti (DW) pomocí procentuálního obsahu sušiny v rostlinném pletivu podle rovnice: $[100 - (DW \times 100 / FW)]$. Suchou hmotnost jsme určili po vysušení rostlin do konstantní hmotnosti při teplotě 80 °C v sušárně (Memmert).

Celkový obsah asimilačních pigmentů (chlorofyl *a*, *b* a karotenoidy) jsme stanovili dle rovnic odvozených Wellburnem (1994) s využitím spektrofotometru (Cintra 101). Absorbanci metanolových extraktů výhonků (ředění 1 g materiálu na 100 ml) jsme měřili při vybraných vlnových délkách: 666 nm (chlorofyl *a*), 653 nm (chlorofyl *b*), 470 nm (celkové karotenoidy) a 750 nm (korekce nespecifické absorbance).

Fluorescence chlorofylu byla měřena fluorometrem OS1p (Opti-Sciences, USA). Výsledky jsou vyjádřeny jako $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$; kde F_m je maximální fluorescence a F_o je minimální fluorescence u rostlin adaptovaných na tmou po dobu 30 minut.

Stanovení reaktivních forem kyslíku a míry poškození membránových lipidů

V rámci ROS jsme stanovili obsah peroxidu vodíku a superoxidového radikálu. Ve vychlazených třenkách jsme zpracovali alikvótní část rostlinného materiálu v 50 mM fosfátovém tlumivém roztoku (pH = 7,0) (ředění 1 g materiálu na 20 ml roztoku). Homogenáty jsme centrifugovali 15 min při 15 000 rpm.

Obsah peroxidu vodíku jsme stanovili reakcí s $TiCl_4$ (Dučaiová et al., 2016). Výslední reakční směs obsahovala 500 μ l supernatantu a 250 μ l 0,5% roztoku $TiCl_4$ v 20% H_2SO_4 . Po promíchání a opětovné centrifugaci jsme absorbanci měřili při 410 nm. Výsledky jsme vyjádřili jako množství peroxidu vodíku v μ mol/g DW.

Obsah superoxidového radikálu jsme stanovili jako množství nitritu uvolněného z hydroxylaminu (Dučaiová et al., 2016). K reakční směsi obsahující 300 μ l supernatantu, 270 μ l 50 mM fosfátového tlumivého roztoku (pH = 7,0) a 30 μ l 10 mM hydroxylaminu jsme postupně po 15 minutových intervalech inkubace přidávali 300 μ l 17 mM sulfanilamidu, 300 μ l 7 mM α -naftylaminu a 300 μ l dietyléteru. Absorbanci jsme měřili při 530 nm a výsledky jsme vyjádřili jako množství superoxidového radikálu v μ g/g DW.

Míru peroxidace membránových lipidů jsme stanovili jako obsah malondialdehydu (MDA) reakcí s kyselinou 2-tiobarbiturovou (komplex TBARS; Tio-Barbituric Acid Reactive Substances) (Dučaiová et al., 2016). Alikvotní část rostlinného materiálu jsme homogenizovali v 0,1% kyselině trichloroctové (ředění 1 g materiálu na 10ml). Homogenáty jsme centrifugovali 15 minut při 20 °C a 15 000 rpm. Reakční směs 0,5 ml supernatantu a 1,5 ml 20% kyseliny trichloroctové obsahující 0,5% kyselinu tiobarbiturovou (TBA) jsme inkubovali při 90 °C po dobu 30 minut. Po prudkém ochlazení v ledové drti a pozvolném ohřátí na laboratorní teplotu jsme absorbanci měřili při 532 nm a 600 nm na korekci zákalu. Výsledky jsme vyjádřili jako množství MDA v μ mol/g DW využitím molového absorpčního koeficientu MDA-TBA, $\epsilon = 155$ mM/cm.

Prvková analýza

Rostliny byly rozděleny na kořenovou (podzemní) a nadzemní část a sušeny v sušárně do konstantní hmotnosti (cca 48 hodin při 80 °C). Poté byly zpracovány na jemný prášek. 25 mg prášku bylo mineralizováno ve 3 ml koncentrované HNO₃ a 1 ml 30% H₂O₂ (ve spolupráci s Katedrou chemie). Mineralizační program byl nastaven na 15 min se stálým nárůstem výkonu na 600 W a poté 20 minut konstantně 600 W. Všechny nádoby pro odběr vzorků byly opláchnuty a vzorky zředěny destilovanou vodou na 15 ml celkového objemu vzorku pro analýzu AAS. Mineralizované vzorky byly analyzovány metodou AAS s elektrotermickou atomizací (ve spolupráci s laboratořemi Povodí Labe). Obsah Cd byl vypočítán metodou kalibrační křivky a vyjádřen jako µg Cd/g DW.

Statistické zpracování dat

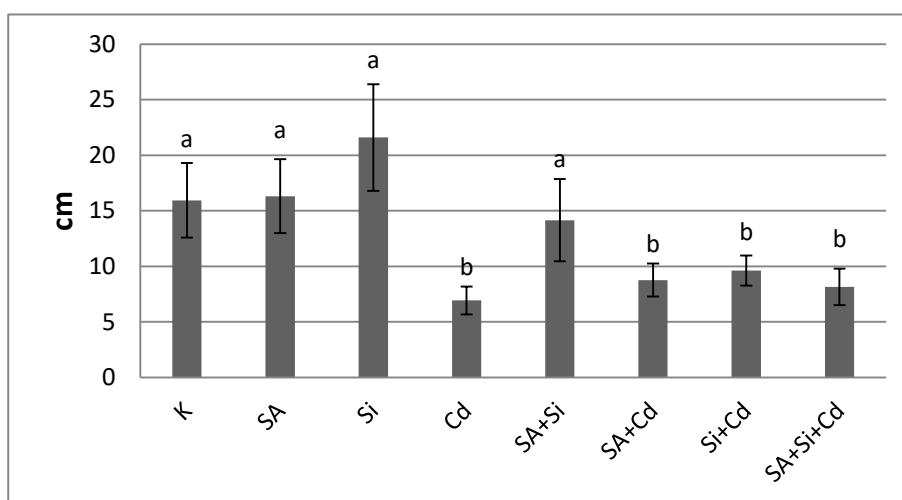
Naměřené údaje jsme vyjádřili v podobě základních statistických parametrů: průměrná hodnota a směrodatná odchylka. Byla použita metoda jedno faktorové analýzy rozptylu (ANOVA) s následným Tukeyho testem, na hladině významnosti $P = 0,05$ (Statistica; Statsoft, ČR). Hodnoty ve sloupcích označené stejnými písmeny nevykazují statisticky významný rozdíl. Celý experiment byl vyhotoven ve dvou opakováních.

2.2 Výsledky

2.2.1 Základní fyziologické parametry

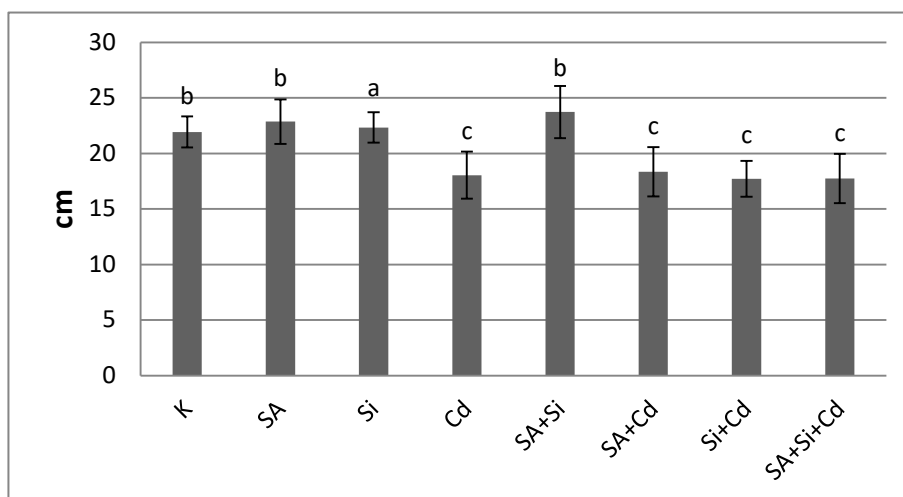
Vývoj kořenového systému pšenice při působení Cd byl výrazně ovlivněn, kde byl zaznamenán až 2-násobný pokles v délce kořenů. Použití Si, SA, nebo obou látek mírně pozitivně, ale ne signifikantně, ovlivnilo délku kořenů.

Nejdelší kořeny byly zaznamenány ve variantě Si. Kořeny u variant SA nebo SA+Si dosahovaly délky podobné kontrolním rostlinám.



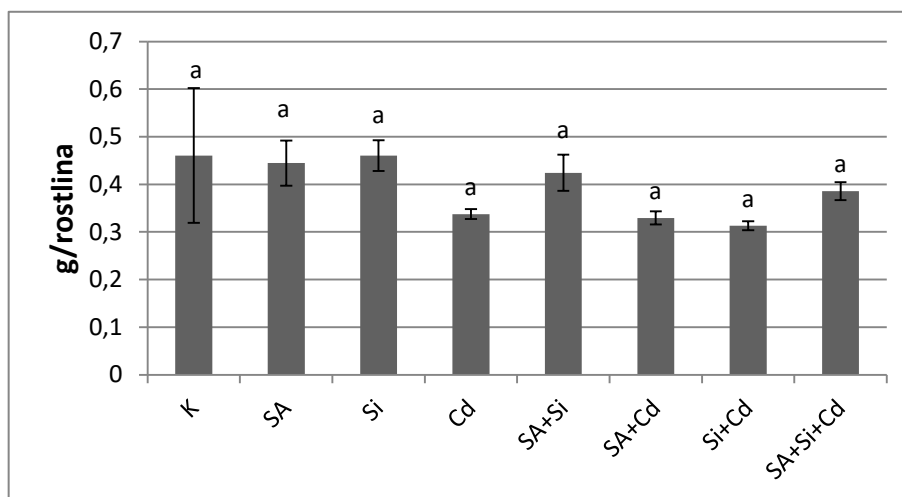
Obrázek 6: Délka kořenů (cm) rostlin pšenice pěstovaných v médiu obsahující Cd a/nebo Si/SA (n = 20).

Spojení prvků SA+Si způsobilo nejdelší růst nadzemních částí pšenice. Na druhou stranu jsme u Cd ve všech kombinacích zaznamenali menší vzrůst. Použití protektivních látek Si a SA s médiem obsahujícím Cd nemělo výrazný pozitivní vliv na délku výhonku.



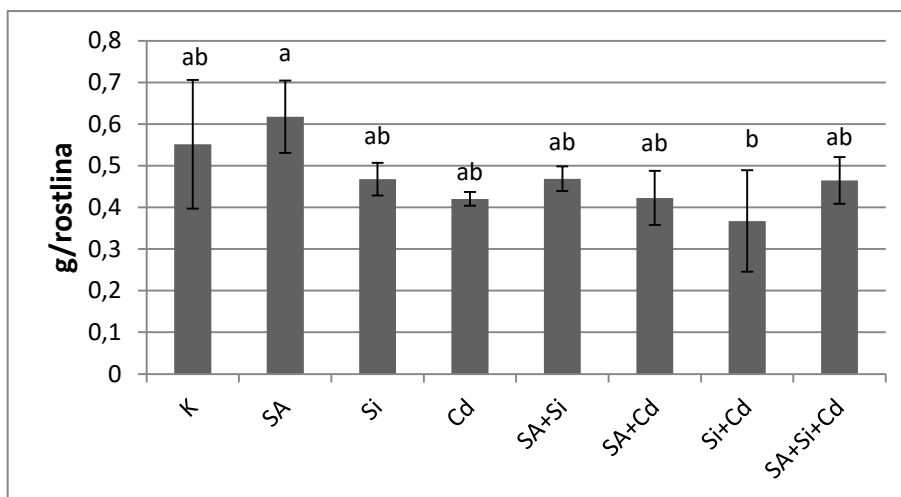
Obrázek 7: Délka nadzemních částí (cm) rostlin pšenice pěstovaných v médiu obsahující Cd a/nebo Si/SA (n = 20).

Přídavek Cd do média způsobil pokles v akumulaci biomasy kořenů. Samotná aplikace SA nebo Si neprojevila pozitivní vliv, naopak při spolupráci protektivních látek byla čerstvá hmotnost kořenů vyšší. Největší čerstvá hmotnost kořenů byla naměřena u variant SA a Si.



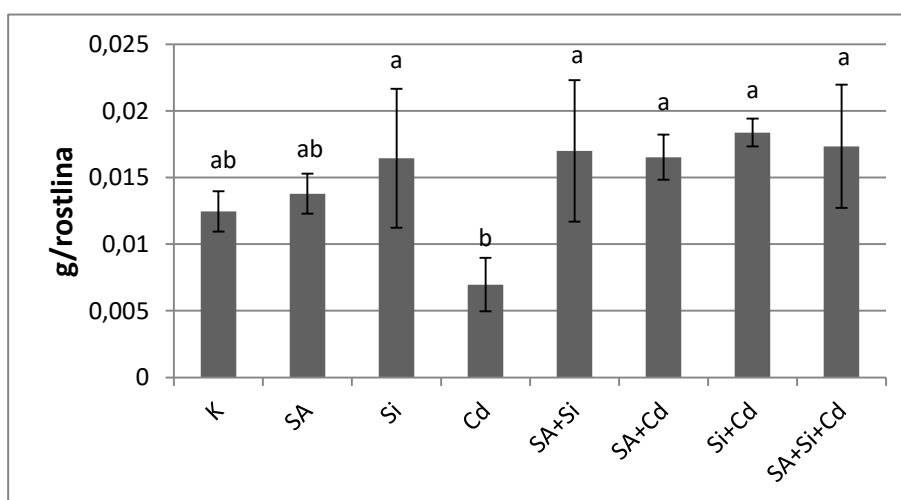
Obrázek 8: Čerstvá hmotnost (FW) kořenů rostlin pšenice (g/rostlina) pěstovaných v médiu obsahující Cd a/nebo Si/SA (n = 20).

Nejvyšší hodnoty čerstvé hmotnosti u nadzemních částí rostlin byly naměřeny u varianty SA. Na druhou stranu nejmenší hodnoty byly u kombinace Si+Cd. O něco vyšší hodnoty od této varianty byly u Cd. V tomto případě se kladně projevila společná protektivita látek Si a SA, protože zde byly nejlepší výsledky při působení Cd.



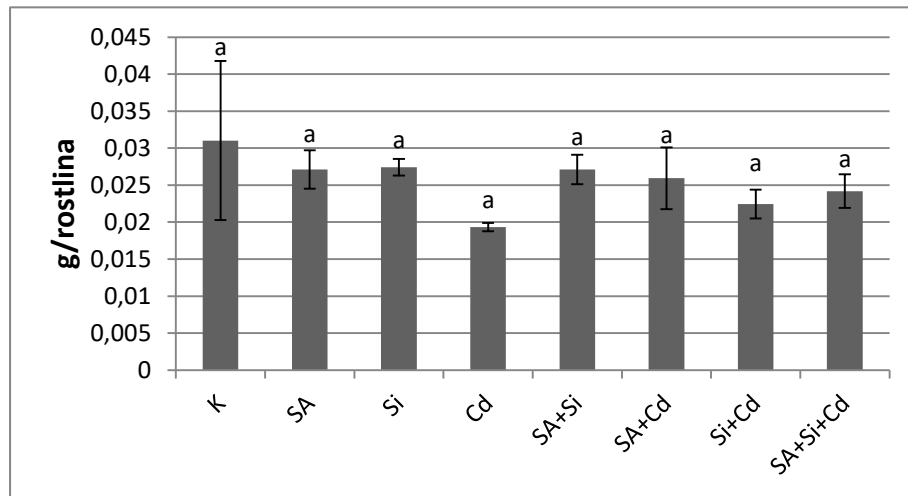
Obrázek 9: Čerstvá hmotnost (FW) nadzemních částí rostlin pšenice (g/rostlina) pěstovaných v médiu obsahující Cd a/nebo Si/SA (n = 20).

Velmi nízké hodnoty u hmotnosti sušiny kořenů rostlin byly naměřeny u Cd. Až trojnásobně vysoké hodnoty od Cd se vyskytly u variant SA+Si, SA+Cd, Si+Cd a SA+Si+Cd. SA měla druhou nejnižší naměřenou hmotnost sušiny.



Obrázek 10: Suchá hmotnost (DW) kořenů rostlin pšenice (g/rostlina) pěstovaných v médiu obsahující Cd a/nebo Si/SA (n = 20).

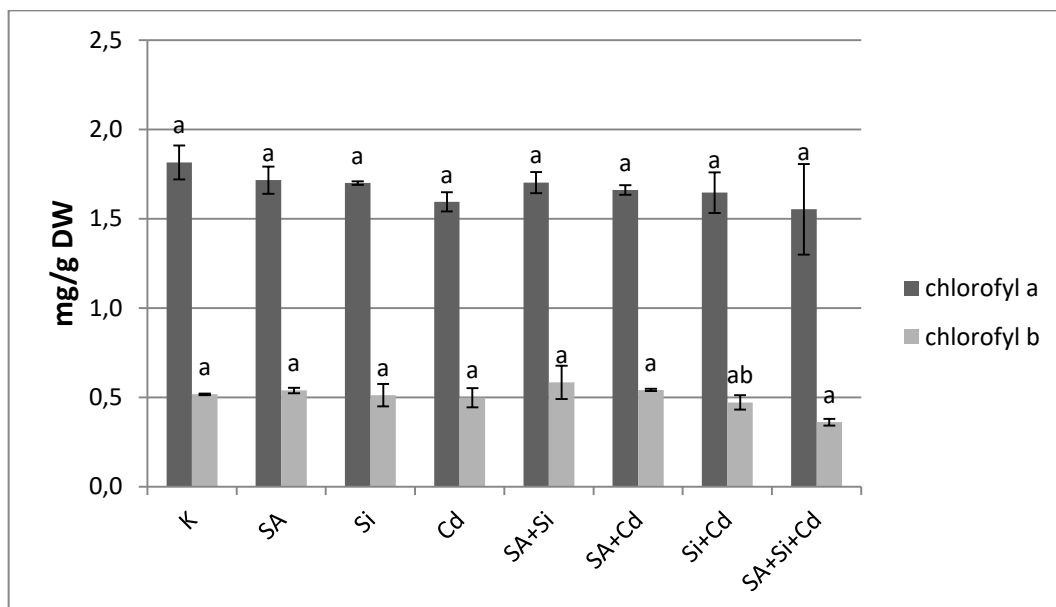
U hmotnosti sušiny nadzemních částí rostlin měla velmi nízkou naměřenou hodnotu varianta s Cd. Ostatní varianty nevykazovaly žádné reakce na protektivní látky.



Obrázek 11: Suchá hmotnost (DW) nadzemních částí rostlin pšenice (g/rostlina) pěstovaných v médiu obsahující Cd a/nebo Si/SA (n = 20).

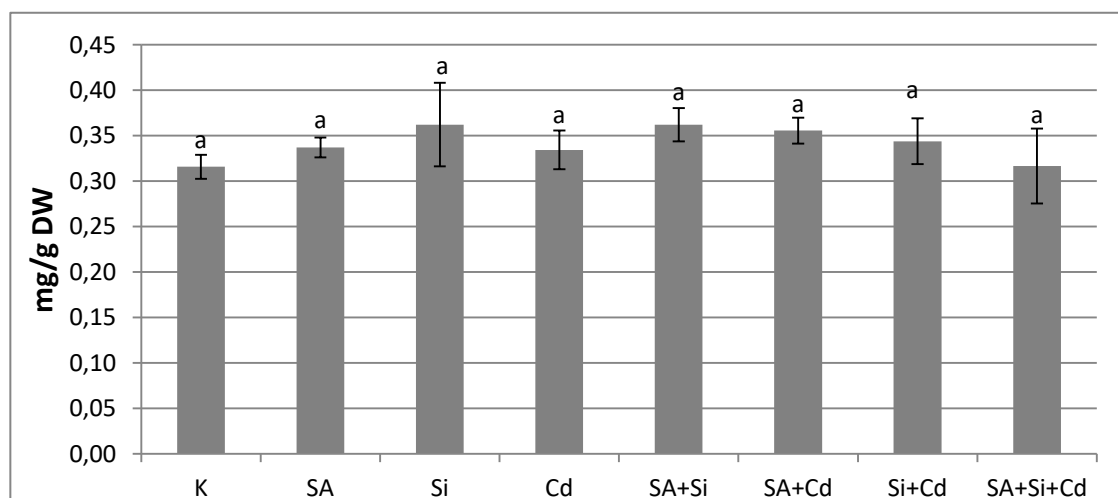
2.2.2 Chlorofyly a fluorescence

Naměřené hodnoty u chlorofylu rostlin nevykazovaly žádné signifikantní rozdíly. Pokles v obsahu chlorofylu *a* i *b* byl zaznamenán u varianty Cd. Po aplikaci SA nebo Si došlo ke zmírnění negativního dopadu Cd. Překvapivě nejnižší obsah chlorofylů byl naměřen u varianty SA+Si+Cd.



Obrázek 12: Obsah chlorofylu *a* a chlorofylu *b* rostlin pšenice (mg/g DW) pěstovaných v médiu obsahující Cd a/nebo Si/SA (n = 6).

Aplikace všech látek zvýšila hodnoty celkových karotenoidů. Nejvyšší hodnoty dosahovaly varianty Si a SA+Si.

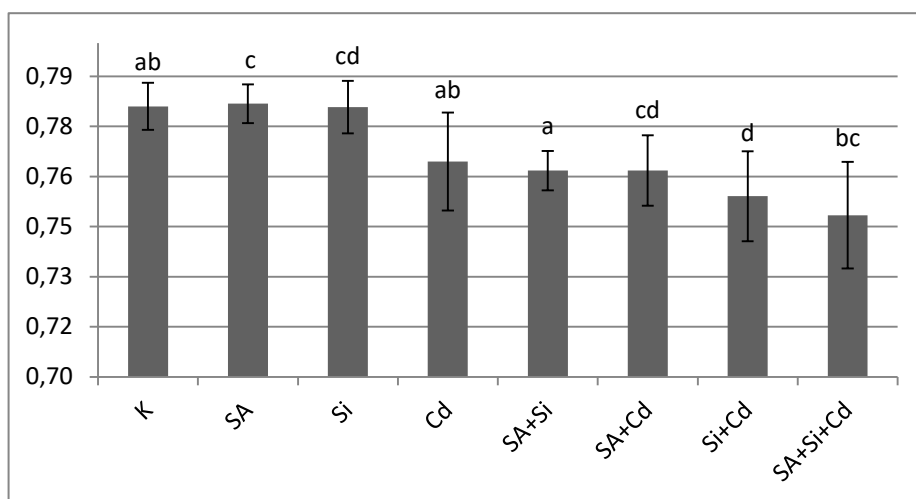


Obrázek 13: Obsah celkových karotenoidů rostlin pšenice (mg/g DW) pěstovaných v médiu obsahující Cd a/nebo Si/SA (n = 6).

Fluorescence chlorofylu je dynamický jev, který se v průběhu času mění na různé hodnoty (Hlízová, 2008). Pomocí fluorescenčních parametrů může být fotosyntéza popisována v závislosti na různých podmínkách (Roháček and Barták, 1999). Nejběžnějším způsobem měření fluorescence chlorofylu je sledování reakce ozáření u listů rostlin, které jsou adaptované na tmu (Hlízová, 2008).

Průběh fotosyntézy při působení SA+Si+Cd byl negativně ovlivněn. Spojení protektivních látek proti toxickému kovu nemělo žádný pozitivní vliv na průběh fotosyntézy.

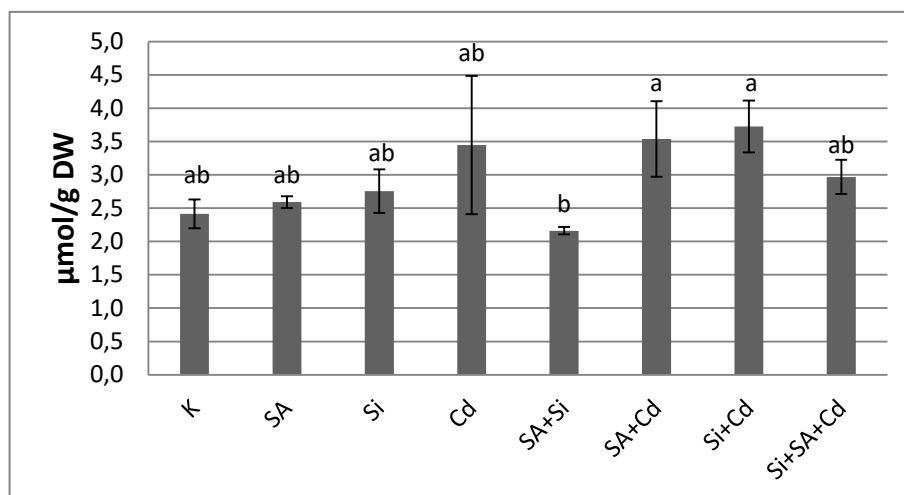
Výsledky ale ukázaly, že samotné působení protektivních látek ve spojení SA+Cd a Si+Cd napomáhají k udržení normálního průběhu fotosyntézy.



Obrázek 14: Fluorescence rostlin pšenice pěstovaných v médiu obsahující Cd a/nebo Si/SA (n = 10).

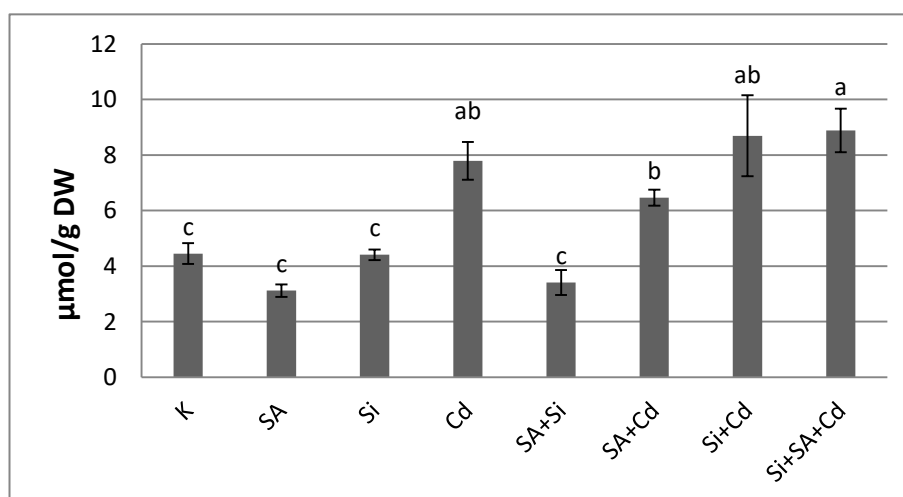
2.2.3 Reaktivní formy kyslíku

Ve všech variantech po přidání Cd do média došlo k výraznému nárůstu obsahu peroxidu vodíku. Pozitivní protektivní účinek byl pozorován při souběžné aplikaci SA a Si, kdy se hladina peroxidu mírně snížila. Při samotné aplikaci těchto látek (varianty SA+Cd, Si+Cd) tato protektivní činnost nebyla tak efektivní. Překvapivě nejvyšší hodnoty byly naměřeny v případě variantu Si+Cd.



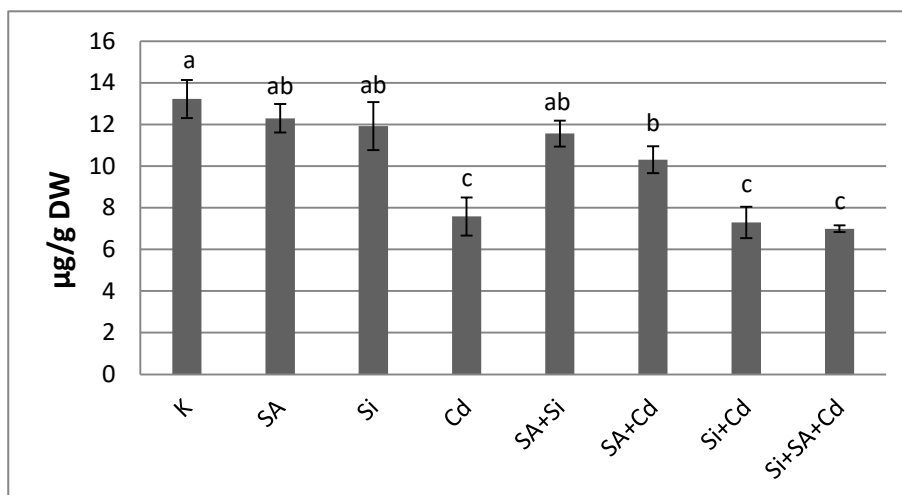
Obrázek 15: Obsah peroxidu vodíku ($\mu\text{mol/g DW}$) v kořenech rostlin pěstovaných v médiu obsahující Cd a/nebo Si/SA ($n = 6$).

Obdobné výsledky byly zaznamenány i v případě nadzemních částí. U kombinace Si, SA a Cd došlo u nadzemní části k největší tvorbě peroxidu vodíku. Pokud rostlině při toxicitě napomáhala SA, docházelo k menší tvorbě peroxidu vodíku, než za přítomnosti Si.



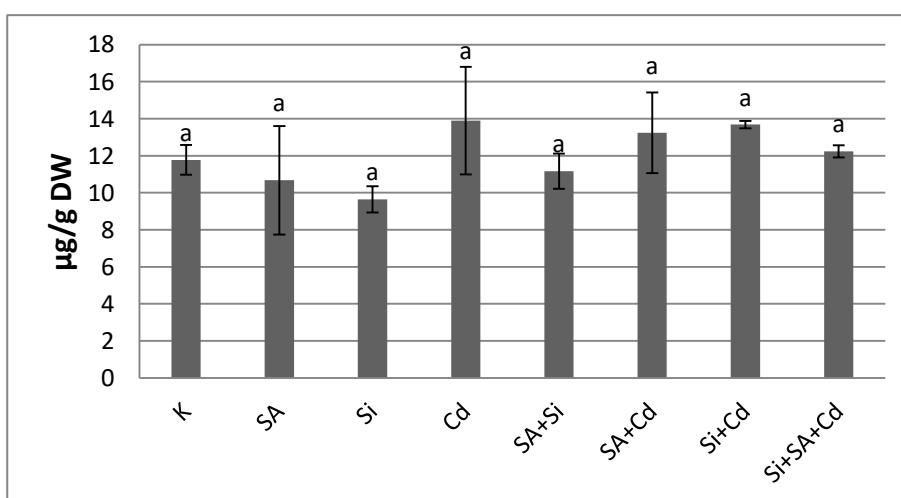
Obrázek 16: Obsah peroxidu vodíku ($\mu\text{mol/g DW}$) v nadzemních částech rostlin pšenice pěstovaných v médiu obsahující Cd a/nebo Si/SA ($n = 6$).

V případě působení samotného Cd nebo jeho kombinace v podobě Si+Cd a Si+SA+Cd byly naměřeny nízké hodnoty superoxidu v kořenech. Na druhou stranu při kombinaci SA+Cd byl vyšší výskyt superoxidu, který lze pozorovat u samotných látek SA a Si.



Obrázek 17: Obsah superoxidového radikálu ($\mu\text{g/g DW}$) v kořenech rostlin pěstovaných v médiu obsahující Cd a/nebo Si/SA ($n = 6$).

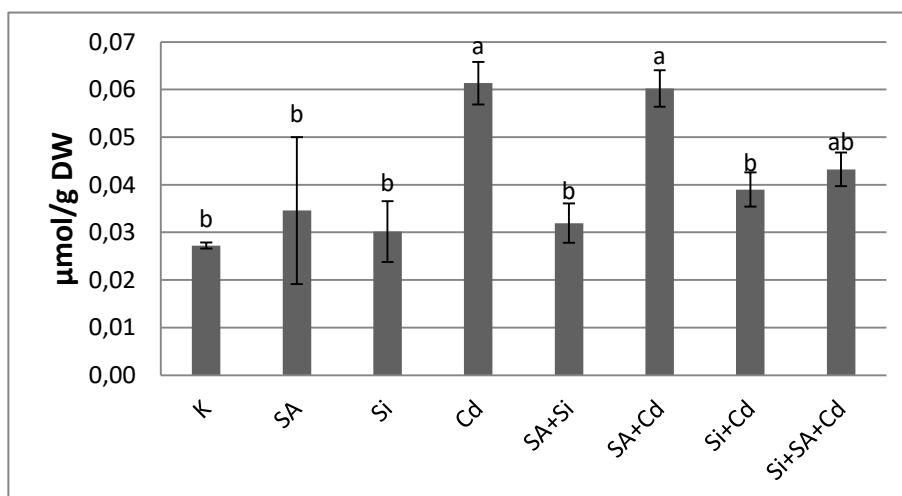
Ve všech variantech po aplikaci Cd do média došlo k nárůstu obsahu superoxidu. Působení protektivních látek samotných nebo v kombinaci došlo k mírnému snížení ve srovnání s variantou Cd. Samotná aplikace těchto látek snížila (SA, Si), nebo vůbec neovlivnila (SA+Si) jeho obsah.



Obrázek 18: Obsah superoxidového radikálu ($\mu\text{g/g DW}$) v nadzemních částech rostlin pšenice pěstovaných v médiu obsahující Cd a/nebo Si/SA ($n = 6$).

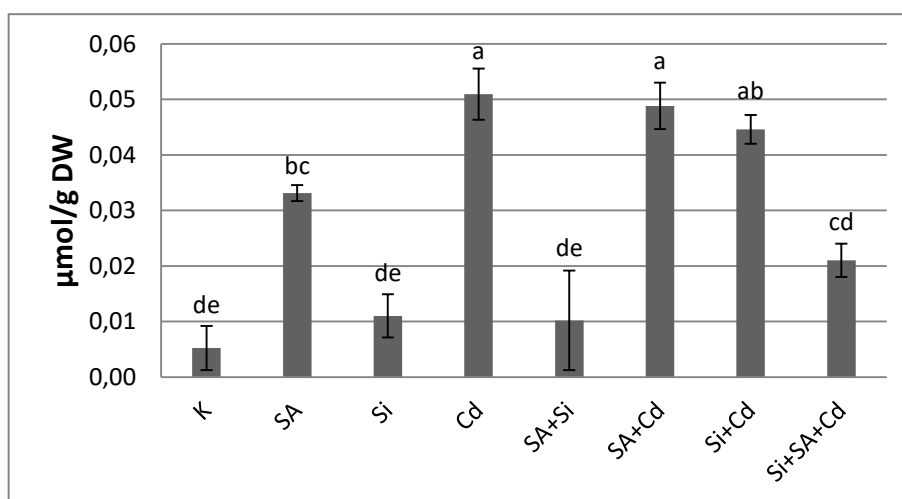
2.2.4 Malondialdehyd

Dvojnásobné zvýšení MDA má za následek samotné Cd a kombinace SA+Cd. Ve variantech Si+Cd a Si+SA+Cd se neprojevil protektivní účinek.



Obrázek 19: Obsah malondialdehydu ($\mu\text{mol/g DW}$) v kořenech rostlin pšenice pěstovaných v médiu obsahující Cd a/nebo Si/SA ($n = 6$).

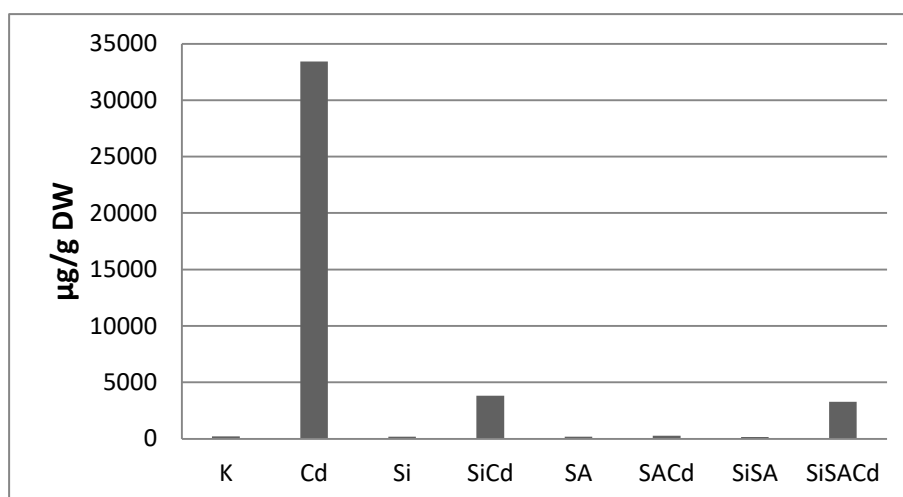
Největší ovlivnění MDA v nadzemních částech rostlin mělo Cd. Aplikace SA nebo Si k Cd nemělo žádný zásadní vliv na hodnoty MDA. Naopak jejich kombinace se projevila dvojnásobným poklesem ve srovnání s Cd variantou



Obrázek 20: Obsah malondialdehydu ($\mu\text{mol/g DW}$) v nadzemních částech rostlin pšenice pěstovaných v médiu obsahující Cd a/nebo Si/SA ($n = 6$).

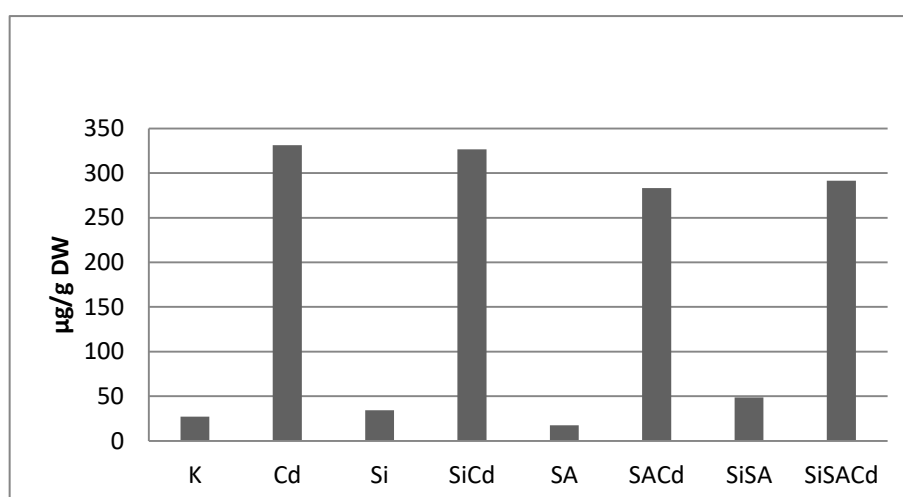
2.2.5 Prvková analýza

Kořeny rostlin pěstovaných v médiu obsahující Cd vykazovaly vysoký obsah kadmia, až 157-násobný růst. Použití SA, Si nebo jejich kombinace značně redukovala obsah přijatého Cd, Jako nejlepší se ukázala samotná aplikace SA.



Obrázek 21: Obsah kadmia ($\mu\text{g/g DW}$) v kořenech rostlin pšenice pěstovaných v médiu Cd a /nebo Si/SA.

Rostliny pěstované v médiu s Cd akumulovaly v nadzemní části přibližně stejné hodnoty Cd ve všech variantů. Avšak tyto hodnoty jsou v porovnání s kořenovým systémem výrazně nižší, dalo by se říci, že zanedbatelné. Jako nejlepší protektivum se opět ukázala SA.



Obrázek 22: Obsah kadmia ($\mu\text{g/g DW}$) v nadzemních částech rostlin pšenice pěstovaných v médiu obsahující Cd a/nebo Si/SA.

3 Diskuse

Studium toxicity kadmia a možným protektivním účinkům Si a SA se věnuje mnoho prací. Jen málo experimentů je zaměřených na jejich vzájemné spolupůsobení. V souladu s našim experimentem, Si nebo SA, zprostředkují zmírnění růstu, což je jeden z negativních aspektů toxicity těžkých kovů. Projevy byly pozorovány u mnoha rostlinných druhů, například lilku černém (*Solanum nigrum*) (Liu et al., 2013), kukuřice (*Zea sp.*) (Mihaličová et al., 2014) nebo lnu setého (*Linum usitatissimum*) (Belkhadit et al., 2010)

Bylo také potvrzeno, že při spolupůsobení SA s těžkými kovy má rostlina vyšší hodnoty čerstvé hmotnosti a sušiny (Liu et al., 2016). Při použití varianty SA+Si+Cd však měly rostliny největší hmotnost. Výjimkou je pouze sušina kořenů, kde byly výsledky s Si+Cd lepší než při působení SA+Cd. Je to díky tomu, že rostliny zvýší příjem kovů na stabilnější frakce (Cunha et al., 2008). Spolupůsobení SA+Si+Cd v tomto případě mělo pozitivní účinky. Opačné výsledky byly pozorovány v práci (Mohsenzadeh et al., 2011), kdy spolupůsobení SA a Si vykazovalo nejlepší hodnoty.

V našem experimentu obsah chlorofylů nebyl výrazně negativně ovlivněn účinkem Cd na rostlinu. Je to pravděpodobně dáno tím, že se Cd spíše nachází v kořenové části, takže thylakoidní membrány v chloroplastech nebyly ovlivněny těžkým kovem.

Z výsledků fluorescence vychází, že Cd v jakékoliv variantě ovlivňuje fyziologii rostlin. Nejedná se však o žádné velké změny. V případě SA jsou hodnoty vyšší než u Si+Cd. U variantu SA+Si+Cd je naměřena nejmenší aktivita fluorescence. Je to pravděpodobně dáno tím, že SA podporuje přežití rostliny při působení stresoru (Fu and Dong, 2013). Si se ale nepodílí na ochraně procesu fluorescence.

U zpracování výsledků reaktivních forem kyslíku byly zjevné odlišnosti. U peroxidu vodíku byl větší výskyt Cd v kořenové části rostliny než u nadzemní části. Je to dáno tím, že se Cd nedostává v takové míře do vyšších částí rostliny (Tlustoš et al., 2006). Přesný opak byl ale pozorován u superoxidu. Dále z výsledků vyplývá, že spolupůsobení SA+Si+Cd má menší pozitivní vliv, než když látky SA a Si

napomáhají samostatně při stresu rostliny těžkým kovem. U peroxidu vodíku se při protektivě více podílel Si, kdežto u superoxidu se více podílela SA.

Výsledky u MDA poukazují na negativní vliv Cd na všechny části rostliny. Je to kvůli tomu, že Cd ovlivňuje nakládání s lipidy, které se nacházejí ve všech částech rostliny (Votrubová, 2011). Samostatná ochrana SA nebo Si je nedostatečná. Aby se rostlina vypořádala se stresem v podobě Cd, potřebuje kombinaci Si+SA+Cd.

Závěr

Cílem bakalářské práce bylo prozkoumat spolupůsobení křemíku a kyseliny salicylové jako protektivních látek při působení kadmia. Z výsledků výše popsaných experimentů lze říci, že k největšímu ovlivnění dochází v kořenovém systému. Při ochraně rostlin proti působení Cd je vhodné využívat oba dva prvky společně. Výjimkou jsou ale pouze výsledky MDA u kořenů. Je to ale dáno tím, že se zde soustřeďuje velké množství lipidů.

U nadzemních částí ale nelze s určitostí říct, zda je jejich vývoj ovlivněn pouze Cd, nebo zda se zde promítají následky ovlivnění Cd kořenového systému.

Seznam použité literatury

AIDID, S. B. and Okamoto, H. Responses of elongation rate, turgor pressure and cell wall extensibility of stem cells of *impatiens balsamina* to lead, cadmium and zinc. In: *BioMetals* 6: 1993, 245 – 249.

ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. In: *American Society of Plant Biologists* 141: 2006, 391 – 396.

BALAKHNINA, T. and Borkowska, A. Effects of silicon on plant resistance to environmental stresses. In: *International Agrophysics*: 2013, 27(2), 225-232.

BARCELÓ, J. and Poschenrieder, C. Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. In: *Journal of Plant Nutrition* 13: 1990, 1 – 37.

BARCELÓ, J. et al. Structural and ultrastructural disorders in cadmium – treated bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). In: *New Phytologist* 108: 1988, 37 – 49.

BAUER, P. et al. Calcium and silicon mineralization in land plants: Transport, structure and function. In: *Plant Science* 180 (6): 2011, 746 – 756.

BELKHADI, A. et al. Effects of exogenous salicylic acid pre-treatment on cadmium toxicity and leaf lipid content in *Linum usitatissimum* L. In: *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73 (5): 2010, 1004 – 1011.

BĚLOHLÁVKOVÁ STAFFOVÁ, P. Koloběh kadmia v životním prostředí. Brno, 2013. Bakalářské práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická.

BLOKHINA, O. et al. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. In: *Annals of Botany*: 2003, 179 – 194.

BOKOV, A. et al. The role of oxidative damage and stress in ageing. In: *Mechanisms of Ageing and Development* 125 (10-11): 2004, 811 – 826.

CERKAL, R. Stresy a produkční výkonnost polních plodin. Brno, 2011. Habilitační přednáška. Mendelova univerzita Brno.

CIBULKA, J. Pohyb olova, kadmia a rtuti v biosféře. Praha: Academia, 1991. ISBN: 80-200-0401-7.

COBBETT, Ch. S. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. In: American Society of Plant Biologists 123: 2000, 825.

COOKE, J. and Leishman, M. R. Silicon concentration and leaf longevity: is silicon a player in the leaf dry mass spectrum?. In: Functional Ecology 25(6): 2011, 1181 – 1188.

CUNHA, K. P. V. and nascimento, C. W. A. Silicon effects on metal tolerance and structural changes in maize (*Zea mays* L.) grown on a cadmium and zinc enriched soil. In: Water, Air, and Soil Pollution 197: 2009, 323 – 330.

CUNHA, K. P. V. et al. Silicon alleviates the toxicity of cadmium and zinc for maize (*Zea mays* L.) grown on a contaminated soil. In: Journal of Plant Nutrition and Soil Science 171 (6): 2008, 849 – 853.

CURRIE, H. and Perry, C. C. Silica in plants. In: Biological, Biochemical and Chemical Studies:2007, 1383-1389.

ČASOPIS ČESKÉHO SVAZU GREENKEEPERŮ. 2010 Klíčový přínos křemíku [online]. [citováno 10. 7. 2018]. Dostupné z WWW: < <http://www.casopis-green.cz/articles/view/1313-klicovy-prinos-kremiku>>.

DUČAIOVÁ, Z. et al. Dynamics of accumulation of coumarin-related compounds in leaves of *Matricaria chamomilla* after methyl jasmonate elicitation. In: Plant Growth Regulation 79(1): 2016, 81 – 94.

EPSTEIN, E. Silicon: its manifold roles in plants. In: Annals of Applied Biology 155 (2):2009, 155 – 160.

EPSTEIN, E. The anomaly of silicon in plant biology. In: Proceedings of the National Academy of Sciences 91: 1994, 11-17.

FIŠER, J. et al. Mechanismy snižující toxicitu rizikových prvků u rostlin. In: Chemické listy 108: 2014, 566 – 571.

FU, Z. Q. and Dong, X. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defence. In: Annual Review of Plant Biology 64: 2013, 839 – 863.

GLAZENBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. In: Annual Review of Phytopathology 43: 2005, 205 – 227.

GORDON, A. S. et al. Characterization of an arabidopsis mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. In: Plant Cell 6 (11): 1994, 1583 – 1592.

GUO, G. et al., Role of exogenous salicylic acid in alleviating cadmium – induced toxicity in Kentucky bluegrass. In: Biochemical Systematics and Ecology 50: 2013, 269 – 276.

HALL, J. L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. In: Journal of Experimental Botany 53: 2002, 1 – 11.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. In: Plant Physiology 141 (2): 2006, 312 – 322.

HASAN, S. A. et al. Cadmium: toxicity and tolerance in plants. In: Journal of Environmental Biology 30: 2009, 165 – 174.

HERBETTE, S. et al. Genome – wide transcriptome profiling of the early cadmium response of *Arabidopsis* roots and shoots. In: Biochimie 88: 2006, 1751 – 1765.

HLÍZOVÁ, E. Využití fluorescence chlorofylu ke sledování fyziologického stavu vegetace. Praha, 2008. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze. Přírodovědecká fakulta.

HODSON, M. J. et al. Phylogenetic variation in the silicon composition of plants. In: Annals of Botany 96: 2005, 1027 – 1046.

HUNG, S. H. et al. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. In: Botanical Bulletin – Academia Sinica 46: 2006, 1 – 10.

JANDA, M. and Valentová, O. Kyselina salicylová. In: Bioprospect (Praha) 24 (1): 2014, 9 – 12.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH. Zemědělská fakulta. 2018
Pšenice obecná (*Triticum aestivum* L.) [online]. [citováno 6. 7. 2018]. Dostupné
z WWW: <<http://www2.zf.jcu.cz/~moudry/databaze/Psenice.htm>>.

KESSLER, A. and Brand, M. D. The mechanism of the stimulation of state 4
respiration by cadmium in potato tuber (*Solanum tuberosum*) mitochondria. In:
Plant Physiology and Biochemistry 33: 1995, 519 – 528.

KHAN, D. H. and Frankland, B. Effects of cadmium and lead on radish plants with
particular reference to movement of metals through soil profile and plant. In: Plant
Soil 70: 1983, 335 – 345.

KOVÁŘOVÁ, M. Jak dokáží přežít rostliny na toxických výsypkových
substrátech? Fyziologické a strukturální vlastnosti rostlin na substrátech
s vysokým obsahem As a Hg. Praha, 2010. Bakalářské práce. Univerzita Karlova
v Praze. Přírodovědecká fakulta.

KUKLA, J. and Kuklová, M. Pôsobenie abiotických stresorov na rastliny a
ekosystémy. In: Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin: 2013,
85-94.

KYSELÁKOVÁ, H. Obranné mechanismy rostlin proti oxidačnímu stresu.
Olomouc, 2012. Disertační práce. Univerzita Palackého v Olomouci.
Přírodovědecká fakulta.

LARBI, A. et al. Effect of Cd and Pb in sugar beet plants grown in nutrient
solution: induced Fe deficiency and growth inhibition. In: Functional Plant Biology
29: 2002, 1453 – 1464.

LARCHER. W. Physiological Plant Ecology. Michiganská univerzita, 1995. ISBN:
0387581162.

LEVITT, J. Responses of plants to environmental stresses. Volume 1: Chilling,
freezing, and high temperature stresses. New York: Academic Press, 1980. ISBN:
0124455018.

LIANG, W. et al. Surface modification of fibrillar silicate and its reinforcing mechanism on FS/rubber composites. In: *Composites Science and Technology* 65 (7 – 8): 2005, 1129 – 1138.

LIANG, Y. et al. Mechanisms of silicon – mediated alleviation of abiotic stresses in higher plants: a review. In: *Environmental Pollution* 147: 2007, 422 – 428.

Liu, J. et al. Silicon attenuates cadmium toxicity in *Solanum nigrum L.* by reducing cadmium uptake and oxidative stress. In: *Plant Physiology and Biochemistry* 68: 2013, 1 – 7.

LIU, Z. et al., Role of salicylic acid in resistance to cadmium stress in plants. In: *Plant Cell Reports* 35: 2016, 719 – 731.

MA, J – F. and Yamoji, N. Silicon uptake and accumulation in higher plants. In: *Trends in Plant Science* 11: 2006, 392 – 397.

MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ. 2014 Stresy a produkční výkonnost polních plodin [online]. [citováno 6. 7. 2018]. Dostupné z WWW: <http://web2.mendelu.cz/af_291_sklad/habilitacni_prednasky/habilitacni_prednaska_cerkal.pdf>.

MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ. 2014 Živinný režim půd. Těžké kovy v půdě [online]. [citováno 6. 7. 2018]. Dostupné z WWW: <http://web2.mendelu.cz/af_221_multitext/vyziva_rostlin/html/agrochemie_pudy/puda_tk.htm>.

METWALLY, A. et al. Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barely seedlings. In: *Plant Physiology* 132 (1): 2003, 272 – 281.

MIHALIČOVÁ, S. et al. Effect of silicon on growth, photosynthesis, oxidative status and phenolic compounds of maize (*Zea mays L.*) grown in cadmium excess. In: *Water, Air and Soil Pollution* 225 (8): 2014, 2056.

MITANI, N. et al. Identification and characterization of maize and barely Lsi2 – like silicon efflux transporters reveals a distinct silicon uptake system from that in rice. In: *Plant Cell* 21: 2009, 2133 – 2142.

MITANI, N. et al. Isolation and functional characterization of an influx silicon transporter in two pumpkin cultivars contrasting in silicon accumulation. In: *The Plant Journal* 66: 2011, 231 – 240.

MOHSENZADEH, S. et al. Interactive effects of salicylic acid and silicon on some physiological responses of cadmium-stressed maize seedlings. In: *Iranian Journal of Science and Technology*: 2011, 57 – 60.

NEIL, V. B. et al. Mechanisms of hydrogen peroxide decomposition in soil. In: *Environmental Science and Technology* 36 (4): 2002, 639 – 645.

NOCTOR, G. And Foyer, Ch. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. In: *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 1998, 249 – 279.

NOVOTNÁ, M. Modely přestupu těžkých kovů do rostlin. Brno, 2012. Diplomová Práce. Masarykova Univerzita. Přírodovědecká fakulta.

PERFUS – Barbeoch, L. et al. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. In: *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology* 32: 2002, 539 – 548.

ROHÁČEK, K. and Barták, M. Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts useful parameters, and some applications. In: *Photosynthetica* 37: 1999, 339 – 363.

PRASAD, M. N. V. and Freitas, H. M. D. Metal hyperaccumulation in plants – Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. In: *Electronic Journal of Biotechnology* 6: 2003, 285 – 321.

PRASAD, M. N. V. and Hagemeyer, J. Heavy metal stress in plants – from molecules to ecosystems. New York: Springer, Berlin, Heidelberg, 1999. ISBN: 978-3-662-07745-0.

PRAUSOVÁ, R. Ekologie rostlin. Rostliny a prostředí. Hradec Králové, 2015. Přednáška. Univerzita Hradec Králové.

PROCHÁZKA, S. et al. Fyziologie rostlin. Praha: Academia, 1998. ISBN: 80-200-0586-2.

RICHMOND, K. E. and Sussman, M. Got silicon? The non – essential beneficial plant nutrient. In: Current Opinion in Plant Biology 6 (3): 2003, 268 – 272.

SCHÜTZENDÜBEL, A. et al. Cadmium – induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in *Scots pine* roots. In: Plant Physiology 127: 2001, 887 – 898.

SHARIKOVA, F. M. et al. Salicylic acid – induced protection against cadmium toxicity in wheat plants. In: Environmental and Experimental Botany 122: 2016, 19 – 28.

SHI, G. R. et al. Photosynthetic and anatomic responses of peanut leaves to zinc stress. In: Biologia Plantarum 53(2): 2009, 391 – 394.

SLOVÁKOVÁ, Ľ. and Mistrík, I. Fyziologické procesy rastlín v podmienkach stresu. Bratislava: Univerzita Komenského, 2007. ISBN: 978-80-223-2322-2.

TLUSTOŠ, P. et al. The effect of liming on cadmium, lead, and zinc uptake reduction by spring wheat grown in contaminated soil. In: Plant, Soil and Environment 52: 2006, 16 – 24.

TOMAŠTÍK, M. Pohyb těžkých kovů v environmentu. Zlín, 2010. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická.

TRAM, T. A. and Popova, L. P. Functions and toxicity of cadmium in plants: recent advances and future prospects. In: Turkish Journal of Botany 37: 2013, 1 13.

VLOT, A. C. et al. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. In: Annual Review of Plant Biology 47: 2009, 177 – 206.

VOTRUBOVÁ, O. Anatomie rostlin. Karolinum, 2011. ISBN: 9788024618678.

WELLBRUN, A.R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. In: Journal of Plant Physiology 144(3): 1994, 307-313.

YAMAJI, N. and Ma, J. F. A transporter at the nod1 responsible for intervascular transfer of silicon in rice. In: Plant Cell 21: 2009, 2878 – 2883.

ZEMĚDĚLSKÉ KOMODITY. 2017. Pšenice [online]. [citováno 6. 7. 2018]. Dostupné z WWW: <<http://www.zemedelskekomodity.cz/index.php/roslinna-vyroba-menu/obilniny/psenice>>.